



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1693号
学位記番号	第339号
氏名	堀 英生
授与年月日	平成30年3月31日
学位論文の題名	2型糖尿病における血管障害およびアディポネクチンに対する statin の影響
論文審査担当者	主査： 青山 峰芳 副査： 松永 民秀， 木村 和哲， 頭金 正博

名古屋市立大学学位論文

2 型糖尿病における血管障害および  
アディポネクチンに対する statin の影響

平成 29 年度 (2018 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科 臨床薬学分野

堀 英生

一. 本論文は2018年 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである.

主査 青山 峰芳 教授

副査 木村 和哲 教授

頭金 正博 教授

松永 民秀 教授

二. 本論文は, 学術情報誌に掲載された次の報文を基礎とするものである.

【基礎となる報文】

1. **Eisei Hori**, Chigusa Kikuchi, Chie Nagami, Junko Kajikuri, Takeo Itoh, Masayoshi Takeuchi, Tamihide Matsunaga  
Role of glyceraldehyde-derived AGEs and mitochondria in superoxide production in femoral artery of OLETF rat and effects of pravastatin.  
*Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1903-1908 (2017).
2. **Eisei Hori**, Chigusa Kikuchi, Kenro Imaeda, Naotsuka Okayama, Tadashi Suzuki, Tamihide Matsunaga  
Effect of statins on glycemic status and plasma adiponectin concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus and hypercholesterolemia.  
*Yakugaku Zasshi* (accepted).

三. 本論文の基礎となる研究は, 松永民秀 教授の指導のもとに名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた.

## 略語一覧

Ad	アディポネクチン
AGE	終末糖化産物
$\alpha$ -GI	$\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬
AMP	アデノシン一リン酸
AMPK	AMP 活性化キナーゼ
BSA	ウシ血清アルブミン
DHE	ジヒドロエチジウム
DMSO	ジメチルスルホキシド
DPP4	ジペプチジルペプチダーゼ 4
ELISA	酵素結合免疫吸着検定法
eNOS	内皮型一酸化窒素合成酵素
FADH <sub>2</sub>	1,5-ジヒドロフラビンアデニンジヌクレオチド
Glycer-AGE	グリセルアルデヒド由来 AGE
HbA1c	ヘモグロビン A1c
HDL	高比重リポタンパク質
HEPES	2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]-エタンスルホン酸
HMG-CoA	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A
HOMA-IR	インスリン抵抗性指数
IGT	耐糖能障害
GLUT4	グルコーストランスポーター4
L-012	8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3,4-d] ピリダジン-1,4-(2H,3H) ジオンナトリウム塩
LDL	低比重リポタンパク質
LETO	Long-Evans-Tokushima-Otsuka
NAD(P)H	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸
OLETF	Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty
PAD	末梢動脈疾患
PBS	リン酸緩衝食塩水
PBS(-)	カルシウム-マグネシウム不含リン酸緩衝食塩水
PKC	プロテインキナーゼ C
PPAR $\gamma$	ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$
RAGE	AGE 受容体
ROS	活性酸素種
TFA	テノイルトリフルオロアセトン

## 目次

第一章 序論 .....	1
第二章 2型糖尿病モデルラット大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生増加 機序の解明とプラバスタチン慢性投与効果.....	3
2.1 緒言 .....	3
2.2 実験材料および実験方法 .....	5
2.2.1 試薬.....	5
2.2.2 実験動物.....	5
2.2.3 血液パラメーターの測定 .....	6
2.2.4 Glycer-AGEs の測定 .....	6
2.2.5 化学発光法を用いたスーパーオキシドの測定 .....	7
2.2.6 蛍光色素を用いたスーパーオキシドの測定 .....	7
2.2.7 TTFA 処理によるスーパーオキシド産生の変動の測定 .....	7
2.2.8 Glycer-AGEs および TTFA 処理によるスーパーオキシド産生の変動の測定.....	8
2.2.9 溶液組成.....	8
2.2.10 試薬の調製.....	8
2.2.11 統計学的解析 .....	9
2.3 実験結果 .....	10
2.3.1 LETO, OLETF およびプラバスタチン投与 OLETF ラットの代謝的特徴 .....	10
2.3.2 大腿動脈におけるスーパーオキシド産生 .....	11
2.3.2.1 化学発光法を用いた評価 .....	11
2.3.2.2 蛍光色素 DHE を用いた評価.....	11
2.3.3 血清 Glycer-AGEs .....	11
2.3.4 プラバスタチン投与 OLETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生に対 する Glycer-AGEs および TTFA の効果.....	11
2.4 考察.....	15
2.5 小括 .....	18
第三章 高LDL コレステロール血症を伴う2型糖尿病患者の血糖コントロールならびに血中 アディポネクチン濃度に対するスタチンの影響.....	19
3.1 緒言 .....	19
3.2 方法 .....	21

3.2.1 対象患者 .....	21
3.2.2 評価項目および調査方法 .....	21
3.2.3 Ad の測定 .....	21
3.2.4 マッチング .....	22
3.2.5 統計学的解析 .....	22
3.2.6 倫理的配慮 .....	22
3.3 試験結果 .....	23
3.3.1 観察期間終了時までの登録患者の推移 .....	23
3.3.2 試験開始時における対照群およびスタチン投与群の患者背景 .....	24
3.3.3 試験開始時における対照群およびスタチン投与群の臨床的特徴 .....	26
3.3.4 対照群およびスタチン投与群の各マーカーの経時的変化 .....	27
3.3.5 試験開始時におけるマッチング後の対照群とプラバスタチン投与群の患者背景 .....	28
3.3.6 試験開始時におけるマッチング後の対照群とプラバスタチン投与群の臨床的特徴 .....	30
3.3.7 マッチング後の対照群およびプラバスタチン投与群の各マーカーの経時的変化 .....	32
3.4 考察 .....	33
3.5 小括 .....	35
第四章 総括 .....	36
謝辞 .....	37
引用文献 .....	39

## 第一章 序論

糖尿病はインスリン作用不足に基づく慢性高血糖状態を主徴とする代謝疾患群である。糖尿病は、その成因により1型、2型、その他の特定の機序、疾患によるものおよび妊娠糖尿病に分類されるが、2型糖尿病がその大半を占める。International Diabetes Federationの統計によると、世界では2015年において糖尿病人口が約4億1,500万人、成人(20-79歳)人口の9%を占めており、2040年には約6億4,200万人、10%にまで増加すると予測されている。<sup>1)</sup> 我が国では、平成28年の国民健康・栄養調査によって20歳以上の成人において「糖尿病が強く疑われる人」と「糖尿病を否定できない人」を合わせ約2,000万人いることが明らかとなった。また、「糖尿病が強く疑われる人」は調査が開始された平成9年以降増加し続けていることも判明し、我が国においても糖尿病の増加が懸念されている。<sup>2)</sup> 糖尿病による慢性高血糖やそれに伴う代謝異常は三大合併症(網膜症、腎症、神経障害)の原因となる細小血管障害と動脈硬化の原因となる大血管障害を進展させる。糖尿病患者では動脈硬化性疾患である下肢の末梢動脈疾患(PAD)を起しやすく、重症化すると切断に至る。さらに間欠性跛行の症状を有するPAD患者の5年生存率は70%と低く、その死因は虚血性心疾患、脳血管障害が多い。<sup>3)</sup> そのためPADは、生命予後にも配慮しなければならない疾患である。このような糖尿病において促進される動脈硬化の原因として、血管における酸化ストレスの亢進が挙げられる。実際、糖尿病モデル動物の大動脈や冠動脈において酸化ストレスの亢進とその機序が推定されている。<sup>4-6)</sup> しかし、PADの好発部位である大腿動脈における報告<sup>7)</sup> は少なく不明な点が多い。

スタチンは、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A(HMG-CoA)還元酵素を特異的に阻害し、低比重リポタンパク質(LDL)コレステロールを低下させると共に、大規模臨床試験によって冠動脈疾患のリスクを減少することが知られている。<sup>8)</sup> 一方、スタチンには、コレステロール低下作用では説明のつかない他の作用機序によって動脈硬化性疾患の発症や進展を抑制することを示す報告がある。<sup>9-11)</sup> このコレステロール低下作用に依存しない作用は、多面的効果(pleiotropic effects)として内皮機能改善作用、抗炎症作用、抗酸化作用およびプラーク安定化作用などが*in vivo*, *in vitro* 実験の結果から報告されている。<sup>12-15)</sup> 実際、動脈硬化の発症や進展を促進する2型糖尿病患者にスタチンを投与した臨床試験では、下肢動脈において動脈硬化の進展を抑制するとの報告<sup>16)</sup> があり、その作用はpleiotropic effectsによるものと考えられているが、<sup>17)</sup> その抑制機序については明らかとなっていない。

一方、近年スタチンは、糖尿病の新規発症のリスクを増加させるとの報告があり、<sup>18-20)</sup> スタチン投与による糖代謝の悪化が懸念されている。また、その機序の一つとしてスタチン

がインスリン感受性を増加させるアディポネクチン (Ad) の分泌を低下させる可能性が示唆されている。<sup>21)</sup> しかし、2 型糖尿病をすでに発症した患者の血糖コントロール及び血中 Ad 濃度に及ぼす影響については、未だ結論が出ていないのが現状である。

本研究では、2 型糖尿病モデルラットの大腿動脈を用いてスーパーオキシドの産生増加とその機序について検討した。また、2 型糖尿病モデルラットにスタチンの一種であるプラバスタチンを慢性投与し、その効果を検討した。続いて、2 型糖尿病患者の血糖コントロールおよび血中 Ad 濃度に対するスタチンの影響について検討を行った。

## 第二章 2型糖尿病モデルラット大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生増加機序の解明とプラバスタチン慢性投与効果

### 2.1 緒言

糖尿病は動脈硬化性疾患である PAD の重要なリスクファクターの一つである。<sup>3)</sup> 糖尿病における PAD などを引き起こす動脈硬化の発症および進展は、血管内皮が障害されることによって引き起こされると考えられている。<sup>22)</sup> この血管内皮機能を障害する原因として血管における生体内活性酸素種 (ROS) の産生増加が挙げられ、その機序として糖尿病および高血糖条件下においてミトコンドリアの活性化亢進、<sup>23)</sup> ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 [NAD(P)H] オキシダーゼの活性化ならびに発現の増加および内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) アンカップリングなどが推定されている。<sup>24-25)</sup> 一方、高血糖状態において促進される終末糖化産物 (AGEs) の生成やその蓄積は、糖尿病合併症である腎症、網膜症および動脈硬化の発症や進展に関連していることが知られており、中でもグリセルアルデヒド由来の AGEs (Glycer-AGEs) は、その影響が強いとされる。<sup>26-28)</sup> Glycer-AGEs がそれらの合併症を引き起こす原因として、その受容体である AGE 受容体 (RAGE) と結合することによって NAD(P)H オキシダーゼの活性化を誘導し、血管内皮細胞におけるスーパーオキシドを過剰産生させることによって引き起こされると推察されている。<sup>27,29)</sup> また、興味深いことに高血糖条件下のウシ大動脈内皮細胞において認められた AGEs およびソルビトールの産生増加、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化ならびにスーパーオキシド産生の増加は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II 阻害薬であるテノイルトリフルオロアセトン (TTFA) によって抑制された。<sup>23)</sup> このことからミトコンドリアの活性化亢進は、高血糖および AGEs が引き起こす細胞内のスーパーオキシド産生に重要な役割を担っていることが示唆されるが、ミトコンドリアの活性化亢進と AGEs の関係については未だ詳細に解明されていない。

今回、本研究で使用した Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットは、ヒト 2 型糖尿病モデル動物として確立されており、<sup>30)</sup> 多くの研究に用いられている。OLETF ラットを用いた以前の研究では、大動脈や冠動脈においてスーパーオキシド産生が増加しているとの報告があり、その機序として NAD(P)H オキシダーゼの活性化や eNOS アンカップリングが推定されている。<sup>4-6)</sup> 同様にストレプトゾトシンの投与により誘発した 1 型糖尿病モデルラットの大動脈では、NAD(P)H オキシダーゼの活性化と eNOS アンカップリングを介したスーパーオキシド産生の増加が確認されている。<sup>7)</sup> しかし、2 型糖尿病モデルラット

大腿動脈におけるスーパーオキシド産生の増加およびその機序については未だ解明されていない。

肥満や2型糖尿病の代謝異常に関連して起こる高コレステロール血症は、PADを引き起こす独立したリスク因子であることが知られている。また、コレステロール低下作用を有するスタチンは、前述のとおり心血管疾患のリスクを減少させる。そのためスタチンは、高コレステロール血症患者に対し積極的に用いられているのが現状である。<sup>8)</sup> これまでにPAD患者に対して行われたスタチンを用いた臨床試験では、心筋梗塞既往歴および狭心症を有する患者に対して新規間欠性跛行の発症を抑制することや、高コレステロール血症を合併する2型糖尿病患者に対し下肢動脈の硬化を改善したとの報告があり、<sup>17,31)</sup> スタチンがPADの進行の抑制や症状を改善させることが示唆されている。これらのPADに対するスタチンの効果は、pleiotropic effectsによるものと考えられているが、<sup>18)</sup> その機序については十分に解明されていない。また、上述のOLETFラットを用いた報告では、スタチンの一種であるプラバスタチンが大動脈や冠動脈においてNAD(P)Hオキシダーゼの活性化やeNOSアンカップリングを抑制することで血管におけるスーパーオキシドの産生を減少させることが示唆されている。<sup>4,6)</sup> しかし、PADの好発部位である2型糖尿病の大腿動脈におけるスタチンの効果についての報告は無く未だ不明である。

そこで本研究では、まず初めにOLETFラット大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生について評価した。続いて、OLETFラット大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生に対するミトコンドリアの活性化亢進およびGlycer-AGEsの影響について検討した。また、高血糖初期段階からのプラバスタチンの慢性投与が、OLETFラット大腿動脈のスーパーオキシド産生および血清Glycer-AGEs濃度に与える影響について検討した。

## 2.2 実験材料および実験方法

### 2.2.1 試薬

プラバスタチンナトリウム塩は第一三共株式会社（東京）より供与された。ウシ血清アルブミン (BSA), Glycer-AGEs-BSA のリン酸緩衝食塩水 (PBS) 溶液は金沢医科大学教授 竹内正義先生より供与された。ジヒドロエチジウム (DHE) は Molecular Probes 社 (オレゴン州ユージーン, 米国) より, BCA protein assay kit は, Thermo Scientific 社 (マサチューセッツ州ウォルサム, 米国) より, O.C.T. compound は Sakura Finetek 社 (東京) より, TTFA は Sigma-Aldrich 社 (ミズリー州セントルイス, 米国) より, セボフルランは丸石製薬株式会社 (大阪) より, カルシウム-マグネシウム不含リン酸緩衝食塩水 [PBS(-)] 用錠剤は大日本製薬株式会社 (大阪) より, D (+)-グルコース, 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]-エタンスルホン酸 (HEPES), エタノール, 塩酸, 塩化カリウム, 塩化カルシウム二水和物, 塩化ナトリウム, 塩化マグネシウム六水和物, 水酸化ナトリウム, 炭酸水素ナトリウム, 硫酸マグネシウム七水和物, リン酸水素二カリウム, リン酸二水素カリウム, リン酸水素ナトリウム, リン酸二水素ナトリウム二水和物, 8-アミノ-5-クロロ-7-フェニルピリド[3,4-d] ピリダジン-1,4-(2H,3H) ジオンナトリウム塩 (L-012), ジメチルスルホキシド (DMSO) は和光純薬工業社 (大阪) より購入した。その他, 実験に使用した試薬類は市販品の特級または生化学用のものを使用した。

### 2.2.2 実験動物

本研究における全ての実験は, 名古屋市立大学動物実験ガイドラインにしたがって実施した。また, 本研究は名古屋市立大学の動物バイオ倫理審査委員会の承認を得て実施した。2型糖尿病モデル動物として雄性 OLETF ラット ( $n=40$ ) を用いた。対照群として同起源の糖尿病を発症しない同週齢の雄性 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラット ( $n=20$ ) を用いた。LETO および OLETF ラットは, 大塚製薬株式会社徳島研究所 (徳島) から入手した。ラットは, 自由に餌と水を摂取することができるようにし, 12 時間ごとの明暗サイクルで温度および湿度をコントロールした部屋で飼育した。プラバスタチン (100 mg/kg/day) は, OLETF ラットの約半数 ( $n=19$ ) に 20 週齢から 28 週齢の 8 週間自由飲水にて投与した。<sup>46)</sup> ラットは, 投与開始 8 週間後に一晩絶食させた後, セボフルランで吸入麻酔し, 放血により殺処分した。また, 大腿動脈は摘出した後, 直ちにクレブス溶液に入れた。その後, 筋肉, 結合組織および脂肪を除去し, 実験に用いるまで新たなクレブス溶液に入れ 4°C で静置した。

血液サンプルは、空腹時血糖値、ヘモグロビン A1c (HbA1c) 値、血清インスリン値、総コレステロール値、中性脂肪値、高比重リポタンパク質 (HDL) コレステロール値および LDL コレステロール値を測定するため採取した。

### 2.2.3 血液パラメーターの測定

血糖値および HbA1c 値の測定には、全血を用いて測定した。血糖値は、グルテストエース R (三和化学研究所, 名古屋, 日本) を使用しグルコースオキシダーゼ法にて測定した。HbA1c 値は、DCA バンテージ (Siemens Healthcare Diagnostics 社, ミュンヘン, 独国) を用い免疫凝集比濁法にて測定した。血清インスリン値は、インスリン測定キット (AKRIN-010T シバヤギ社, 群馬, 日本) を使用し酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) にて測定した。また、測定した血糖値および血清インスリン値を用いて、インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR) を算出した [HOMA-IR: 血清インスリン値 ( $\mu\text{U}/\text{mL}$ )  $\times$  血糖値 ( $\text{mM}$ ) / 22.5]。

6) 総コレステロール値と LDL コレステロール値の測定は、酵素法にて測定した。また、中性脂肪値は、比色法を用い、HDL コレステロール値は、直接法を用いて測定した。なお、総コレステロール値と LDL コレステロール値、中性脂肪値および HDL コレステロール値の測定は、株式会社福山臨床検査センター高松支店に依頼した。

### 2.2.4 Glycer-AGEs の測定

Glycer-AGEs は 28 週齢に採取した血清サンプルを用いて行った。また、Glycer-AGEs の測定には、免疫精製した抗 Glycer-AGEs 抗体を用いた ELISA 法にて行った。<sup>32)</sup> ELISA 法は、まず始めに  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  Glycer-AGEs-BSA で 96 ウェルマイクロタイタープレートにコーティングし、低温室にて一晩インキュベートした。その後、PBS-Tween-20 溶液  $0.3 \text{ mL}$  で 3 回各ウェルを洗浄し、PBS に溶解した 1% BSA 溶液  $0.2 \text{ mL}$  で 1 時間ブロッキングを行った。各ウェルを PBS-Tween-20 溶液で洗浄した後、検体  $50 \mu\text{L}$  と抗 Glycer-AGEs 抗体 (1 : 1,000)  $50 \mu\text{L}$  を添加し競合させ、水平振盪式のシェーカーを用いて 2 時間室温にて振盪した。続いて、各ウェルを PBS-Tween-20 溶液で洗浄し、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を添加し反応させた。最後に発色基質 *p*-ニトロフェニルリン酸を用いて発色させ測定した。測定結果は、血清  $1 \text{ mL}$  中の Glycer-AGEs units (U) で表した。1 U は、標品 Glycer-AGEs-BSA  $1 \mu\text{g}$  に相当する。<sup>32)</sup> また、今回用いた ELISA 法の感度は、 $0.01 \text{ U}/\text{mL}$  であり、アッセイ内、アッセイ間の変動係数は、それぞれ 6.2%と 8.8%であった。<sup>33)</sup> なお、Glycer-AGEs の測定は、金沢医科大学教授 竹内正義先生に行って頂いた。

### 2.2.5 化学発光法を用いたスーパーオキシドの測定

大腿動脈におけるスーパーオキシド産生の測定は、化学発光試薬である L-012 を用いて行った。<sup>4,6)</sup> 大腿動脈は (6 mm)、測定前にクレブス溶液に入れ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 条件下で 30 分間インキュベートした。大腿動脈におけるスーパーオキシドの測定にあたりまず始めに L-012 (100 μM) を含む改変クレブス-HEPES 緩衝液をルミノメーター用バイアルチューブに入れルミノメーター (Lumat LB 9507 Luminometer; Berthold 社, バート・ヴィルトバート, 独国) で化学発光を測定した。得られた値は、バックグラウンドシグナルとした。続いて大腿動脈をルミノメーター用バイアルチューブに入れ化学発光を測定した。化学発光は、37°C, 1 秒間隔で 30 分間測定した。大腿動脈の化学発光は、血管存在下の化学発光からバックグラウンドシグナルを引き計算した。一連の実験の後、大腿動脈のタンパク質を定量し大腿動脈の化学発光を補正した。評価には、安定した 5 分間の値から平均値を算出し、大腿動脈のタンパク量で除した値を用い、RLU/sec/μg protein で表した。タンパク質の含有量は、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific 社, マサチューセッツ州ウォルサム, 米国) を用いて定量した。

### 2.2.6 蛍光色素を用いたスーパーオキシドの測定

大腿動脈におけるスーパーオキシド産生は、化学発光法とは別に酸化的蛍光色素であるジヒドロエチジウム (DHE) を用いて検出した。<sup>4,5)</sup> O.C.T. compound を用いて包埋した大腿動脈 (4 mm) を凍結マイクロトーム (LEICA, CM1850, ウェツラー, 独国) を用いて厚さ 10 μm の凍結切片を作製し、MAS コート付スライドガラス (Matunami Glass 社, 大阪, 日本) に貼付した。作製した標本は、改変クレブス-HEPES 緩衝液に溶解した DHE 溶液 (2 μM) 中で遮光, 37°C にて 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター (SANYO, MCO-5M, 大阪, 日本) 中で 30 分間インキュベートした。その後、標本を PBS(-) で 3 回洗浄し、最後に PBS(-) で満たし封入した。標本は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510; Carl Zeiss, イチューナ, 独国, 励起波長 488 nm, 蛍光波長 585 nm) を用いて撮影した。それぞれの標本の蛍光強度は、Image J (アメリカ国立衛生研究所, メリーランド州ベセスダ, 米国) を用い 8×8 pixels をランダムに 10 点選択した値を平均化し評価した。

### 2.2.7 TTFA 処理によるスーパーオキシド産生の変動の測定

本実験には、OLETF ラットおよびプラバスタチンを投与した OLETF ラットの大腿動脈を用いた。ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II の特異的阻害薬である TTFA の影響を評価するた

め 2.2.6 と同様の手段で作製した標本にクレブス-ヘンゼライト緩衝液に溶解した TTFA 溶液<sup>34, 35)</sup> (10  $\mu$ M) または Vehicle として 0.1%エタノール中で遮光, 37°Cにて 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 40 分間静置した. その後, 2.2.6 と同様に蛍光色素である DHE を用いてスーパーオキシドを検出し, その蛍光強度を評価した.

### 2.2.8 Glycer-AGEs および TTFA 処理によるスーパーオキシド産生の変動の測定

本実験には, プラバスタチンを投与した OLETF ラットの大腿動脈を用いた. Glycer-AGEs および TTFA の影響を評価するため 2.2.6 と同様の手段で作製した標本にクレブス-ヘンゼライト緩衝液に溶解した 1 mg/mL Glycer-AGEs-BSA 溶液, 1 mg/mL Glycer-AGEs-BSA+TTFA (10  $\mu$ M) 溶液および Vehicle として 1 mg/mL BSA 溶液中で遮光, 37°Cにて 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 60 分間静置した. その後, 2.2.6 と同様に蛍光色素である DHE を用いてスーパーオキシドを検出し, その蛍光強度を評価した.

### 2.2.9 溶液組成

クレブス溶液は 137.4 mM 塩化ナトリウム, 5.9 mM 塩化カリウム, 15.5 mM 炭酸水素ナトリウム, 1.2 mM 塩化マグネシウム, 1.2 mM リン酸二水素カリウム, 11.5 mM グルコース, 2.5 mM 塩化カルシウムを含み, CO<sub>2</sub> 曝気して pH 7.3-7.4 とした. クレブス-ヘンゼライト緩衝液には 118.3 mM 塩化ナトリウム, 4.7 mM 塩化カリウム, 25 mM 炭酸水素ナトリウム, 1.2 mM 硫酸マグネシウム, 1.2 mM リン酸二水素カリウム, 11 mM グルコース, 2.5 mM 塩化カルシウムを含み, 2 M 塩化水素にて pH 7.4 に調製した. 改変クレブス-HEPES 緩衝液は 20 mM HEPES, 99 mM 塩化ナトリウム, 4.7 mM 塩化カリウム, 1.2 mM 硫酸マグネシウム, 1.03 mM リン酸水素カリウム, 25 mM 炭酸水素ナトリウム, 11.1 mM グルコース, 1.9 mM 塩化カルシウムを含み, 0.1 M 水酸化ナトリウムにて pH 7.4 に調製した.

### 2.2.10 試薬の調製

DHE は, DMSO に溶解し原液とした. また, TTFA は, エタノールに溶解し原液とした. その他の試薬は, ultrapure Milli-Q water (Japan Millipore Corp, 東京, 日本) に溶解した. これらの原液は, -80°Cで保存し, 実験時に改変クレブス-HEPES 緩衝液あるいはクレブス-ヘンゼライト緩衝液に溶解し使用した.

### 2.2.11 統計学的解析

測定値は全て測定値の平均値  $\pm$  標準誤差で表記した。多重の比較には、一元配置分散分析の後にボンフェローニ補正多重比較検定を用いた。また、2群での比較には、対応のある  $t$  検定を用いた。危険率 5%未満を有意とした。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 LETO, OLETF およびプラバスタチン投与 OLETF ラットの代謝的特徴

28 週齢の LETO ラット, OLETF ラットおよびプラバスタチンを投与した OLETF ラットの各パラメーターを Table 1 に示した. OLETF ラットは LETO ラットに比べ体重, 血糖値, HbA1c 値, 血清インスリン値, HOMA-IR, 総コレステロール値, 中性脂肪値, HDL コレステロール値が有意に増加していた. しかし, LDL コレステロール値および LDL コレステロール/HDL コレステロール比は, LETO ラットおよび OLETF ラットの両群で有意な差は認められなかった. 一方, 8 週間 OLETF ラットにプラバスタチンを投与した結果, 血糖値は LETO ラットと比べ有意に高い値を示したものの OLETF ラットと比べ有意に減少していた. また, プラバスタチンの投与によって LDL コレステロール値がわずかに増加していたが, その他のパラメーターに変化は認められなかった.

**Table 1. Metabolic Characteristics of LETO, OLETF, and Pravastatin-treated OLETF (OLETF + PVS) Rats**

	LETO ( <i>n</i> = 20)	OLETF ( <i>n</i> = 21)	OLETF+PVS ( <i>n</i> = 19)
Body weight (g)	507.3 ± 7.0	667.0 ± 9.5**	667.0 ± 6.1**
Blood glucose (mg/dL)	86.1 ± 2.9	136.0 ± 7.4**	112.2 ± 6.6 <sup>§</sup>
HbA1c (%)	3.4 ± 0.0	4.8 ± 0.2**	4.5 ± 0.2**
Insulin (ng/mL)	1.2 ± 0.3	2.2 ± 0.2*	2.2 ± 0.3*
HOMA-IR score	6.6 ± 1.5	20.2 ± 3.0**	17.1 ± 3.2*
Triglyceride (mg/dL)	35.3 ± 1.8	296.9 ± 22.8**	268.3 ± 16.5**
Total cholesterol (mg/dL)	96.7 ± 1.9	148.2 ± 6.8**	158.9 ± 6.7**
HDL-cholesterol (mg/dL)	64.0 ± 1.3	91.6 ± 3.7**	99.2 ± 3.5**
LDL-cholesterol (mg/dL)	22.9 ± 0.9	29.4 ± 2.2	35.8 ± 2.6**
LDL/HDL cholesterol ratio	0.36 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.35 ± 0.02

(*n*) Indicates the number of animals used. Values are mean ± standard error of the mean (SEM). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 vs. LETO. <sup>§</sup>*p* < 0.05 vs. OLETF. LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka rats; OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats; OLETF + PVS, pravastatin-treated OLETF rats; HbA1c, glycosylated hemoglobin A1c; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol.

## 2.3.2 大腿動脈におけるスーパーオキシド産生

### 2.3.2.1 化学発光法を用いた評価

OETF ラットの大腿動脈におけるスーパーオキシド産生は、LETO ラットに比べ有意に増加していた。また、プラバスタチンの投与は、OETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生を有意に抑制した (Fig. 1A)。

### 2.3.2.2 蛍光色素 DHE を用いた評価

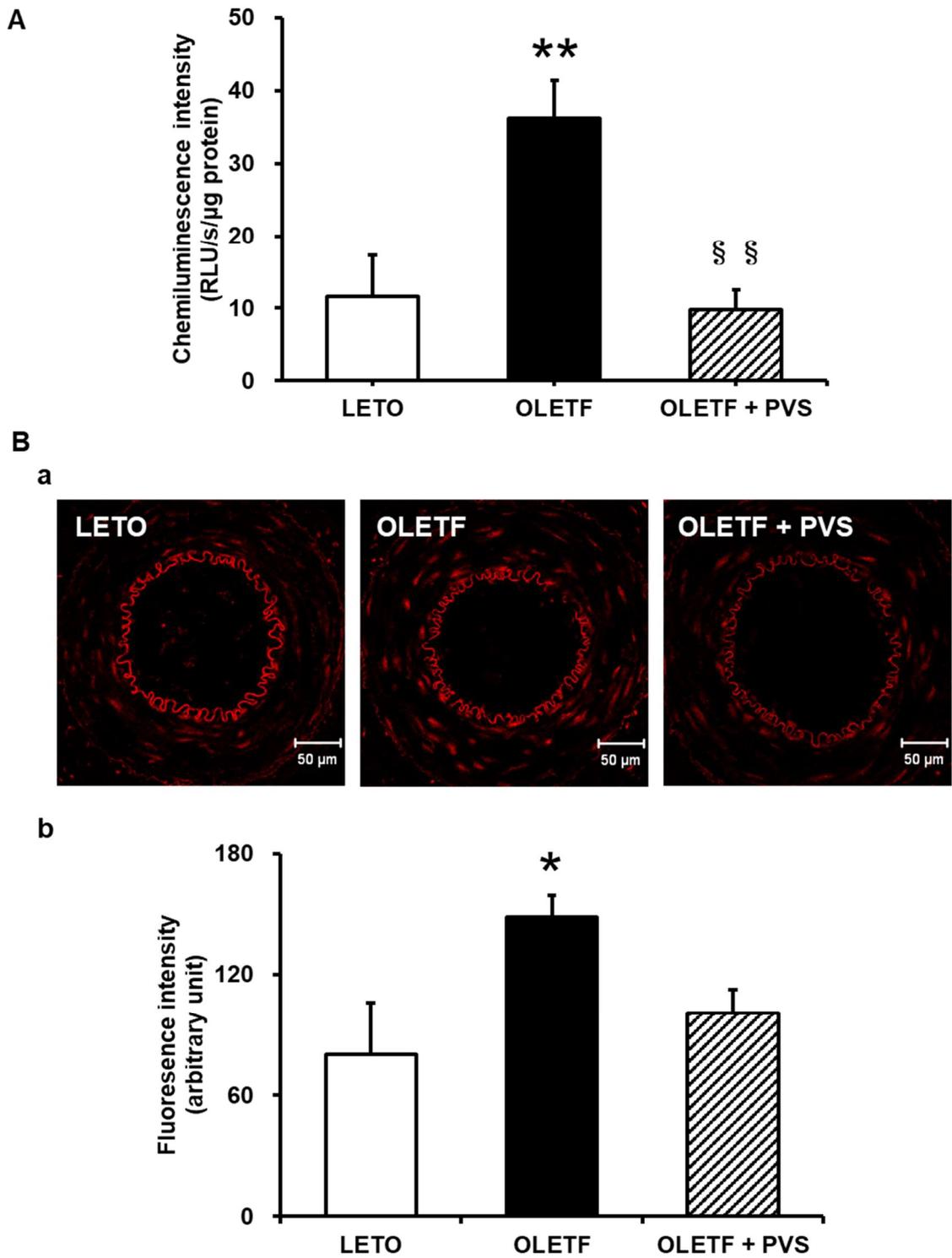
OETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生は、LETO ラットと比べ有意に増加していた。一方、プラバスタチンを投与した OETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生は、OETF ラットと比べ有意な差は認められなかったものの LETO ラットと同等の値を示した (Fig. 1B)。また、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II 阻害薬 TTFA で処理したところ、OETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生が有意に減少した。しかし、TTFA 処理によってプラバスタチンを投与した OETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生に変化は認められなかった (Fig. 2)。

## 2.3.3 血清 Glycer-AGEs

OETF ラットの血清 Glycer-AGEs 濃度は、LETO ラットに比べ有意に増加していた。一方、OETF ラットにプラバスタチンを投与した結果、血清 Glycer-AGEs 濃度は有意に減少し LETO ラットとほぼ同程度となった (Fig. 3)。

## 2.3.4 プラバスタチン投与 OETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生に対する Glycer-AGEs および TTFA の効果

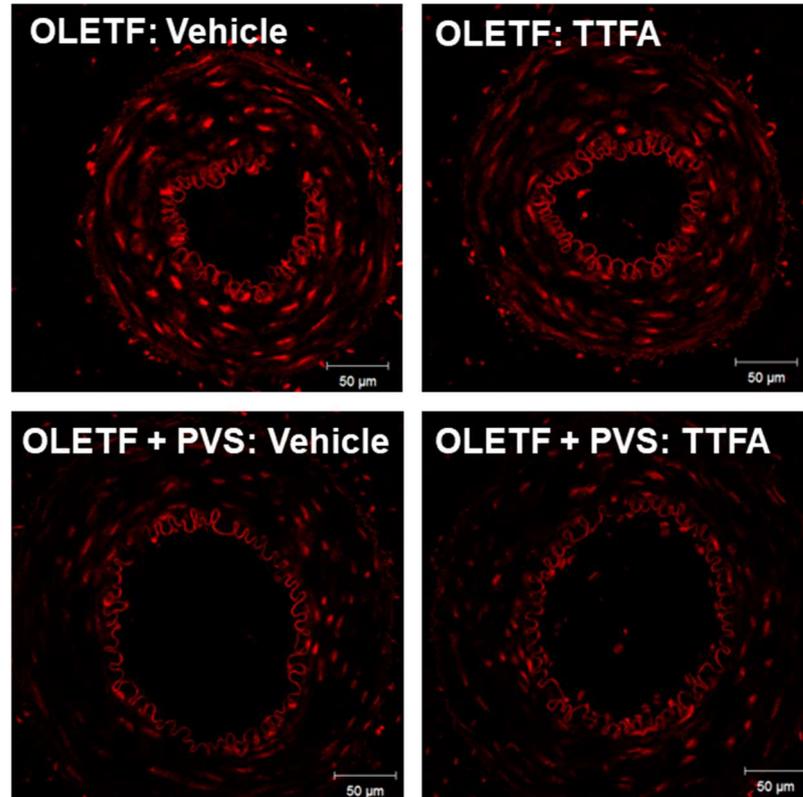
2.3.3 の結果より、プラバスタチンを投与した OETF ラットの血清では Glycer-AGEs 濃度が低下していた。そのため、プラバスタチンを投与した OETF ラットの大腿動脈に Glycer-AGEs を添加し、スーパーオキシド産生に対する Glycer-AGEs の影響を検討した。さらに、ミトコンドリアの活性化亢進に対する Glycer-AGEs の影響を検討するため、Glycer-AGEs とミトコンドリア呼吸鎖複合体 II 阻害薬である TTFA を同時に添加し OETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生を評価した。Glycer-AGEs による処理は、プラバスタチンを投与した OETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生を有意に増加させた。一方、Glycer-AGEs および TTFA の同時処理は、Glycer-AGEs によって増加したスーパーオキシド産生を約 35%抑制した (Fig. 4)。



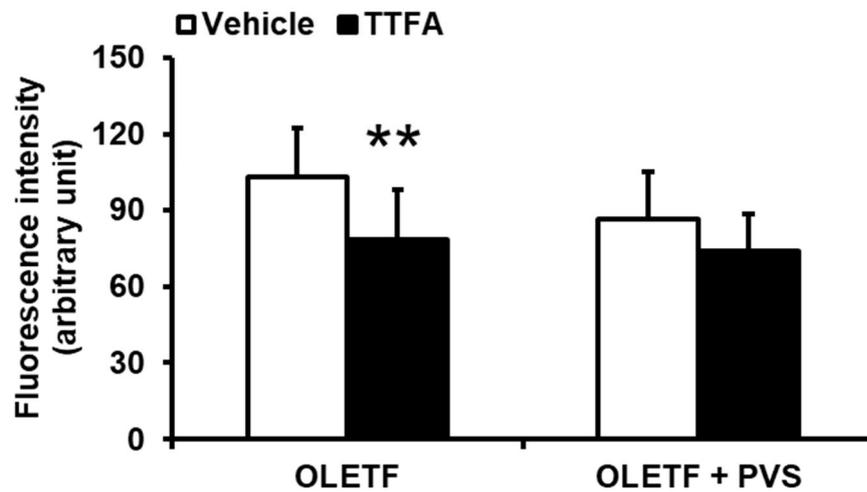
**Fig. 1. Superoxide Production in Femoral Arteries of LETO, OLETF, and Pravastatin-treated OLETF (OLETF + PVS) Rats.**

(A) Chemiluminescence intensity of the superoxide-sensitive dye L-012. Data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM),  $n = 4$ . \*\* $p < 0.01$  vs. LETO, §§ $p < 0.01$  vs. OLETF. (B) a) Fluorescence intensity of superoxide-sensitive dye dihydroethidium and b) summary of the results. Data are mean  $\pm$  SEM,  $n = 5$ . \* $p < 0.05$  vs. LETO.

A

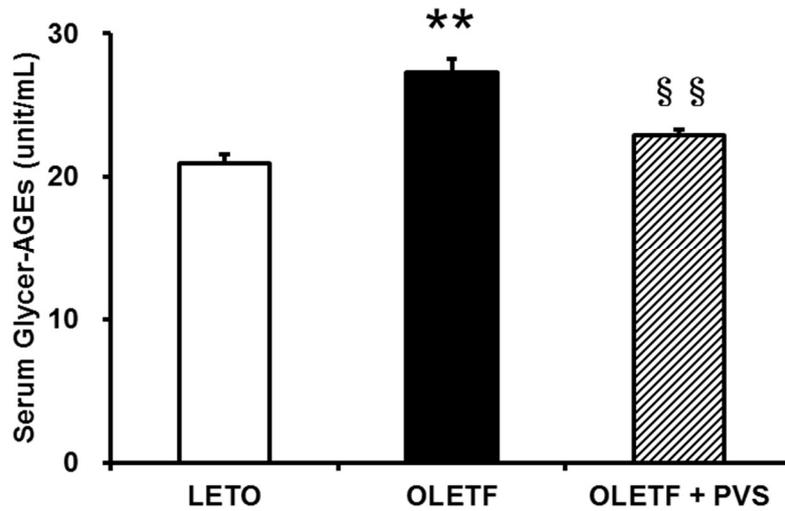


B



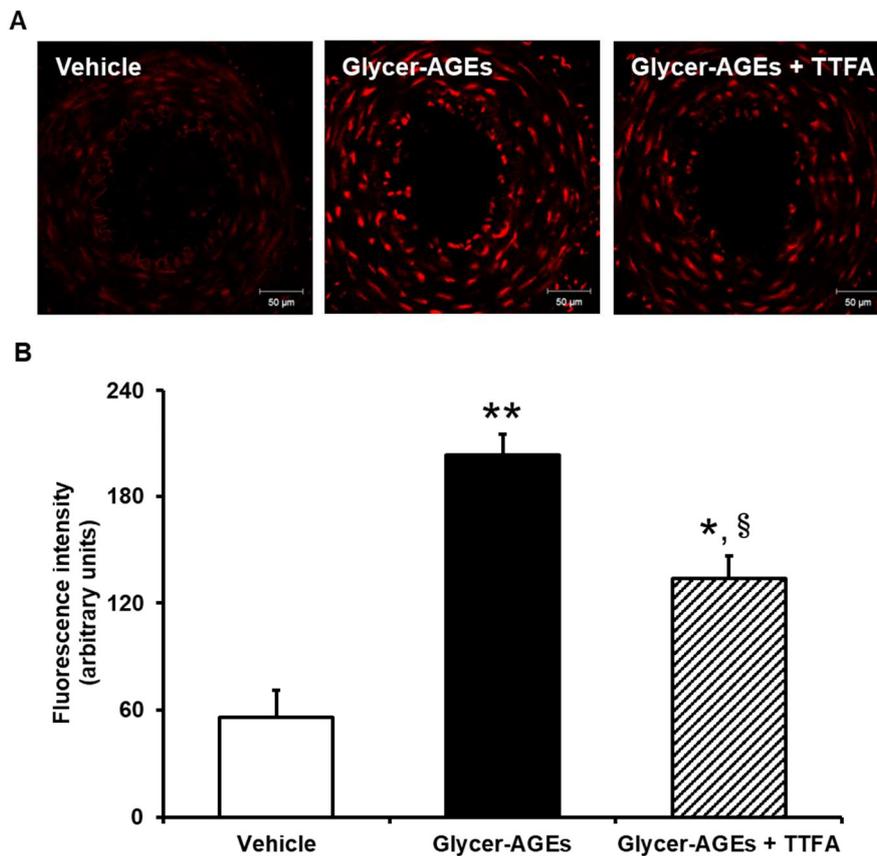
**Fig. 2. Effects of Thenoyltrifluoroacetone (TTFA) on Superoxide Production in Femoral Arteries of Pravastatin-treated OLETF (OLETF + PVS) Rats.**

(A) Fluorescent signal of dihydroethidium in femoral artery histological sections observed under a confocal microscope. (B) Quantification of fluorescence intensity of the superoxide-sensitive dye dihydroethidium. OLETF rats administered the vehicle were used as control. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM),  $n = 6$ . \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle.



**Fig. 3. Serum Glycer-AGE levels in LETO, OLETF, and Pravastatin-treated OLETF (OLETF+PVS) Rats.**

Serum was collected after euthanizing the rats at 28 weeks of age. Glycer-AGE content was determined via ELISA. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM),  $n = 10$ .  $**p < 0.01$  vs. LETO,  $§§p < 0.01$  vs. OLETF.



**Fig. 4. Effects of Glycer-AGEs with and without Thenoyltrifluoroacetone (TTFA) on Superoxide Production in Femoral Arteries of Pravastatin-treated OLETF (OLETF + PVS) Rats.**

(A) Fluorescent signal of dihydroethidium in femoral artery histological sections observed under a confocal microscope. (B) Quantification of fluorescence intensity of the superoxide-sensitive dye dihydroethidium. OLETF rats administered the vehicle were used as control. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM),  $n = 3$ .  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  vs. vehicle,  $§p < 0.05$  vs. Glycer-AGEs.

## 2.4 考察

2型糖尿病モデル動物として多用される OLETF ラットは、12 週齢からインスリン抵抗性を、18 週齢以降には遅発性の高血糖症状をきたし、24 週齢から糖尿病と診断される。さらに、60 週齢では血漿インスリンが低値を示すことが知られている。<sup>30)</sup> 本研究においても 28 週齢の OLETF ラットは、同週齢の LETO ラットに比べ体重、血糖値、HbA1c 値、血清インスリン値、HOMR-IR の増加を認め、肥満、高血糖およびインスリン抵抗性を示した。さらに、OLETF ラットでは、LETO ラットに比べ総コレステロール値および中性脂肪値の増加がみられ、インスリン抵抗性および糖代謝の悪化の要因となる脂質代謝異常が認められた。

本研究では、化学発光法およびDHE染色法を用いて大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生量を評価した。化学発光法による評価では、LETOラットと比べOLETFラットにおいて化学発光の有意な増加が認められた。また、DHE染色法においてもLETOラットに比べOLETFラットにおいて蛍光強度が増加しており同様の結果となった。このことからOLETFラットの大腿動脈では、スーパーオキシドの産生が増加していることが明らかとなった。また、この結果は同時期のOLETFラット大動脈および冠動脈における報告<sup>5,6)</sup>と同様の結果であった。

これまでの報告により高血糖状態によって増加した AGEs は、その受容体である RAGE と結合することで NAD(P)H オキシダーゼを活性化させ細胞内のスーパーオキシド産生を増加させることが示唆されている。<sup>27,29)</sup> さらに、34 週齢の OLETF ラット大動脈では、LETO ラットと比べ Glycer-AGEs の蓄積、RAGE の遺伝子発現ならびにタンパク質発現、酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシデオキシグアノシンおよび NAD(P)H オキシダーゼの発現の増加が認められている。<sup>36)</sup> 本研究においても 28 週齢の OLETF ラットの血清における Glycer-AGEs 濃度が LETO ラットに比べ有意に増加していた。さらに、プラバスタチンを投与した OLETF ラット大腿動脈に Glycer-AGEs を処理したところ、スーパーオキシドの産生を増加させることが明らかとなった。そのため、高血糖状態で増加した Glycer-AGEs は、OLETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生増加に関与している可能性が示唆された。

一方、ミトコンドリア呼吸鎖複合体におけるスーパーオキシドの過剰産生は、糖尿病における酸化ストレス亢進の機序の一つとして推定されており、特に、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I、III およびその中間に存在するユビキノンを電子が伝達される際にスーパーオキシドが発生すると考えられている。<sup>37-39)</sup> 高血糖状態では、細胞内に流入するグルコースが増加し、解糖系を活性化させピルビン酸の産生を増加させる。続いて、増加したピルビ

ン酸は、クエン酸回路を促進し、NADHおよび1,5-ジヒドロフラビンアデニンジヌクレオチド (FADH<sub>2</sub>) の産生を増加させる。このNADHおよびFADH<sub>2</sub>は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I および II に電子を供給し電子伝達系を増強することによってプロトン濃度勾配を形成し、結果的にスーパーオキシドの産生を増加させる。<sup>23)</sup> 実際、ウシ大動脈内皮細胞では、高血糖条件下において増加したスーパーオキシド産生が、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II 特異的阻害薬であるTTFAや脱共役剤であるカルボニルシアニド*m*-クロロフェニルヒドラゾンの作用によって減少した。<sup>23)</sup> また、同報告ではミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害薬であるロテノンを作用させても、スーパーオキシドの産生に影響が認められないとの結果が得られている。<sup>23)</sup> 同様にOLETFラット大動脈においてミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害薬であるロテノンの効果を検証したところ、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害してもスーパーオキシド産生に影響を与えないとの結果が報告された。<sup>4)</sup> 一方、42週齢のOLETFラット大動脈および心臓組織においてミトコンドリア由来のROSが増加しているとの報告がある。<sup>40)</sup> 今回の研究結果ではOLETFラット大腿動脈で増加したスーパーオキシド産生がミトコンドリア呼吸鎖複合体II阻害薬であるTTFAによって抑制された。また、プラバスタチンを投与したOLETFラット大腿動脈においてGlycer-AGEs処理によって増加したスーパーオキシド産生をTTFAが抑制することが明らかとなった。以上のことから、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II は、OLETFラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生の増加を促進する役割を担っている可能性が示唆された。しかし、OLETFラット大動脈におけるスーパーオキシド産生は、PKC活性化剤であるホルボール12,13-ジブチレートによって増強されること、また、その効果がNAD(P)Hオキシダーゼ阻害薬アポシニンによって抑制されるとの報告もあることから、<sup>4)</sup> 大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生増加には、NAD(P)Hオキシダーゼが関与している可能性も考えられた。

本研究では、高血糖状態をきたして間もない20週齢のOLETFラットにプラバスタチンを8週間自由飲水投与し、その効果について検証した。プラバスタチンを投与した結果、総コレステロール値、LDLコレステロール値の減少は認められず、プラバスタチンによる脂質代謝改善作用は認められなかった。スタチンは、肝臓においてHMG-CoA還元酵素を阻害しコレステロール低下作用を示すが、ラットやマウスにスタチンを投与すると投与直後では血清コレステロール値の低下が確認されるものの、長期にわたって投与するとHMG-CoA還元酵素が著しく増加し、血清コレステロール値に変化が認められなくなることが知られている。そのため、本研究においてもプラバスタチンが同様式によってコレステロール低下作用を示さなかったと考えられた。<sup>41)</sup> 一方、糖代謝に与える影響を検討したと

ころ、血糖値の減少がみられたものの HbA1c 値、血清インスリン値および HOMA-IR に変化が認められず、脂質代謝と同様にプラバスタチンによって著しい糖代謝改善作用は認められなかった。このような条件下、プラバスタチンは、血清 Glycer-AGEs 濃度を減少させると同時に OLETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生増加を抑制した。さらに、OLETF ラット大腿動脈において増加したスーパーオキシドは、TTFA の処理によって減少した。しかし、プラバスタチンを投与した OLETF ラット大腿動脈に TTFA 処理を行ってもスーパーオキシド産生に変化は認められなかった。加えて、プラバスタチンを投与した OLETF ラット大腿動脈に Glycer-AGEs を加えるとスーパーオキシド産生の増加がみられ、Glycer-AGEs と TTFA の同時処理によって Glycer-AGEs によるスーパーオキシドの産生増加が抑制された。以上これらの結果から、プラバスタチン慢性投与による OLETF ラット大腿動脈におけるスーパーオキシド産生の抑制作用は、プラバスタチンが高血糖状態で増加する Glycer-AGEs の生成を抑制することにより Glycer-AGEs 増加に伴うミトコンドリアの活性化亢進を抑制することによって引き起こされることが示唆された。また、これらの作用は、プラバスタチンによるコレステロール低下作用とは独立したものであることが示唆された。一方、以前の報告では、プラバスタチンの投与により OLETF ラットの冠動脈において eNOS アンカップリングおよび NAD(P)H オキシダーゼの発現ならびに活性化を抑制することでスーパーオキシドの産生増加を抑制することが示唆されており、<sup>5)</sup> 大腿動脈においてプラバスタチンが同機序に作用しスーパーオキシド産生の増加を抑制している可能性も否定できない。そのため、これらの機序に関しても今後検討していく必要があると考えられた。

## 2.5 小括

2型糖尿病では、高血糖状態によって血清中に増加した Glycer-AGEs が、大腿動脈におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体Ⅱを介して、スーパーオキシド産生を増加させることが示唆された。また、プラバスタチンは血清 Glycer-AGEs 濃度を低下させることによって、PADの好発部位である大腿動脈におけるスーパーオキシド産生の増加を抑制することが示唆された。

### 第三章 高 LDL コレステロール血症を伴う 2 型糖尿病患者の血糖コントロールおよび血中アディポネクチン濃度に対するスタチンの影響

#### 3.1 緒言

スタチンは、前述のとおり LDL コレステロール低下作用によって心血管イベントを減少させることから、<sup>8-10, 42-44)</sup> 心血管疾患の 1 次予防および 2 次予防に使用されている。また、2013 年に米国心臓協会/米国心臓病学会 (AHA/ACC) が成人に対する動脈硬化性心血管疾患のリスクを減少させるための脂質異常症治療に関するガイドライン<sup>45)</sup> の中でスタチンの使用を推奨したため使用頻度が増加し、日常的に使用されるに至っている。

糖尿病は、心血管疾患発症の独立したリスク因子であり、<sup>46-48)</sup> 糖尿病患者において脂質異常症の治療は積極的に行うことが推奨されている。<sup>45)</sup> 実際、脂質異常症を伴う糖尿病患者にスタチンを投与することによって致死的および非致死的に関わらず心血管イベントのリスクを減少させることが示されている。<sup>49, 50)</sup> そのため我が国においてスタチンは、糖尿病患者の高 LDL コレステロール血症に対して第一選択薬として使用されている。<sup>51)</sup>

一方、スタチンの使用は糖尿病の新規発症のリスクを減少<sup>9)</sup> あるいは増加<sup>18, 20)</sup> させるとの相反する報告があり、スタチンの糖代謝に与える影響については議論の分かれるところであった。しかし、1994 から 2009 年に実施され登録患者数が 1000 名以上で観察期間が 1 年以上のスタチンが使用された 13 のランダム化比較試験を用いたメタ解析が行われた結果、平均観察期間 4 年間でスタチン投与群は対照群に比べ 9% のリスクの増加が認められた。<sup>19)</sup> そのためスタチンの使用は糖代謝を悪化させる可能性があることが指摘された。また、すでに 2 型糖尿病に罹患している患者に対するスタチンの影響は、血糖コントロールが悪化するとの報告<sup>52-54)</sup> がある一方、血糖コントロールには影響しないとの報告<sup>55-57)</sup> があり、脂質代謝異常症を合併する 2 型糖尿病患者の血糖コントロールに対するスタチンの影響についての明確な結論は出ていない。

Ad は、脂肪細胞から分泌されるホルモンであるアディポカインの一種であり、血中濃度の低下はインスリン抵抗性およびメタボリックシンドロームの存在と密接に関連していることが知られている。<sup>58)</sup> また、Ad は、肝および脂肪細胞においてアデノシン一リン酸 (AMP) 活性化キナーゼ (AMPK) を活性化し、グルコースの細胞内への取り込みを増大させインスリン感受性を増加させる。<sup>59, 60)</sup> この Ad の分泌の低下は、スタチンが引き起す糖尿病の新規発症の原因の一つと考えられている。実際、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$

(PPAR $\gamma$ ) は、脂肪細胞の分化ならびに Ad の発現・分泌を増加させるが、マウスの脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞にスタチンの一種であるロバスタチンを添加すると PPAR $\gamma$  のリガンドであるファルネシルピロリン酸の産生量を低下させ Ad の遺伝子発現を抑制することが報告されている。<sup>61)</sup> しかし、2 型糖尿病患者の血中 Ad 濃度に対するスタチンの影響は、血中 Ad 濃度を増加させるとの報告がある<sup>62,63)</sup> 一方、影響がないとの報告があり、<sup>64,65)</sup> スタチンが 2 型糖尿病患者の血中 Ad 濃度に与える影響は、血糖コントロールと同様に議論の分かれるところである。

そこで本研究では、高 LDL コレステロール血症を伴う 2 型糖尿病患者の血糖コントロールおよび血中 Ad 濃度に対するスタチンの影響を解析した。

## 3.2 方法

### 3.2.1 対象患者

本研究では、2011年9月から2017年2月に名古屋市立大学病院内分泌・糖尿病内科外来を受診していた血糖値コントロールが安定している2型糖尿病患者で同意の得られた患者を対象とした。また、対象患者のうち、スタチンが初めて投与された患者でスタチンを12週間以上服用できた者をスタチン投与群とし、日本動脈硬化学会編纂の動脈硬化性疾患予防ガイドライン2012<sup>66)</sup>におけるLDLコレステロール管理目標値(LDLコレステロール<120mg/dL)を満たしており、スタチンが投与されていない患者で同意取得後12週間以上観察できた者を対照群とした。さらに、観察期間中に糖尿病薬の変更がみられた患者、食事および運動療法または生活習慣に変更がみられた患者、入院した患者および下記に示す評価項目が調査できなかった患者を除外した。また、スタチン投与群において観察期間中にスタチンが中止もしくは他剤へ変更となった患者、対照群では観察期間中にスタチンが投与された患者を除外した。

### 3.2.2 評価項目および調査方法

本研究における主要結果因子は、血中高分子量Ad濃度、随時血糖値およびHbA1c値の変化率とした。また、副次的結果因子を血中総Ad濃度、総コレステロール値、中性脂肪値、LDLコレステロール値およびHDLコレステロール値の変化率とした。その他、交絡因子として年齢、ボディ・マス・インデックス(BMI)、および服用している糖尿病治療薬とした。血中Ad濃度の測定は、血液検査の際に採血された患者の血液より得られた残りの血漿を用いて行った。その他の因子は、試験開始時および終了時のデータを診療録より取得した。またBMIは、診療録から得られた体重と身長をもとに以下に示す計算式を用いて算出した。

計算式: BMI = 体重 (kg) / [身長 (m) × 身長 (m)]

### 3.2.3 Adの測定

血漿中の総Ad濃度の測定には、ヒトアディポネクチンELISAキット(大塚製薬, 東京, 日本)を高分子量Ad濃度の測定にはヒト高分子アディポネクチンELISAキット(大塚製薬, 東京, 日本)を使用し、添付マニュアルに従い測定した。

### 3.2.4 マッチング

スタチン投与群の中で15例と最も多く投与されていたプラバスタチンによる血糖コントロールおよび血中 Ad 濃度に与える影響を検討した。また、プラバスタチンの影響を明確にするため、血中 Ad 濃度と関連があると報告されている性別、<sup>67)</sup> 年齢 (±5 歳以内)、<sup>67)</sup> HbA1c 値 (±0.5%以内) <sup>68)</sup> を対照群とマッチさせペアを作成した上で解析を行った。

### 3.2.5 統計学的解析

対照群およびスタチン投与群の試験開始時の患者背景ならびに臨床データの比較、試験開始時から観察期間終了時における臨床データの変化率の比較について正規分布を示すデータには独立の *t* 検定を、正規分布を示さないデータにはマン・ホイットニーの U 検定を行い解析した。また、マッチング後の対照群およびプラバスタチン投与群の試験開始時の患者背景ならびに臨床データの比較、試験開始時から観察期間終了時における臨床データの変化率の比較について正規性を示すデータには対応のある *t* 検定を、正規性を示さないデータにはウィルコクソンの符号順位検定を行い解析した。性別の比較には  $\chi^2$  検定を用いた。統計解析には PASW statistics 18.0 (SPSS 社, イリノイ州シカゴ, 米国) を使用し、有意水準を 5%未満とした。本研究の症例数は実数、値は平均値および中央値と四分位範囲 (25%, 中央値, 75%) にて表記した。

### 3.2.6 倫理的配慮

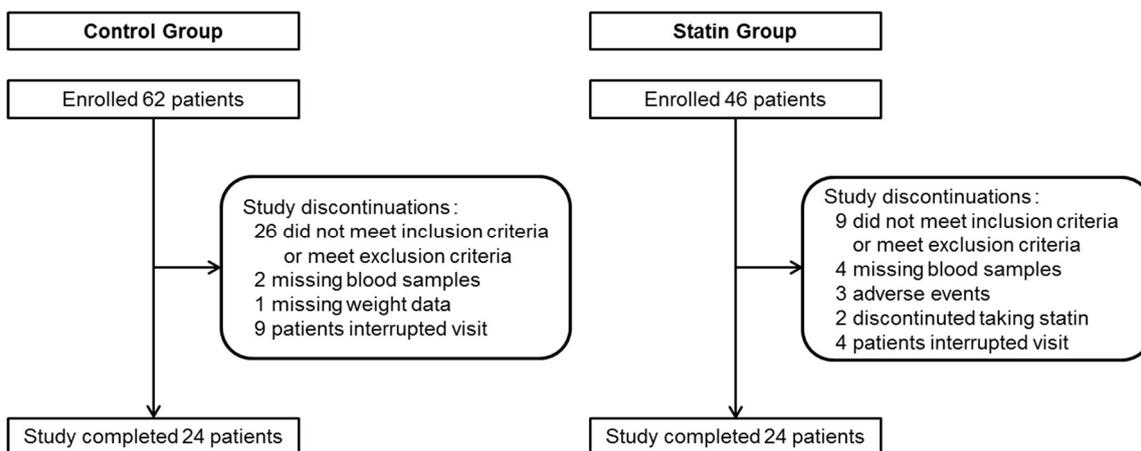
本研究は、名古屋市立大学医学研究科倫理審査委員会の承認内容に準拠して実施した。  
(承認番号: 559-6)

### 3.3 試験結果

#### 3.3.1 観察期間終了時までの登録患者の推移

登録患者は対照群が 62 例，スタチン投与群が 46 例であったが，対照群では，26 例が除外基準に適合し本試験から脱落した．残る対象者のうち血液サンプルが回収できなかった患者 2 例，体重測定が行われなかった 1 例および外来受診が継続できなかった 9 例の計 38 例が本試験から脱落した．一方，スタチン投与群では，除外基準に適合した 9 例，血液サンプルが回収できなかった 4 例，外来受診が継続できなかった 4 例，副作用によってスタチンの投与が中止となった 3 例および服薬コンプライアンスが不良であった 2 例の計 22 例が本試験から脱落した．最終的に対照群 24 例およびスタチン投与群 24 例のデータならびに血液サンプルを用い解析を行った (Fig. 5)．

Fig. 5. Diagram of Participants Included in This Study



### 3.3.2 試験開始時における対照群およびスタチン投与群の患者背景

最終的に抽出された対照群（24例；男性14例，女性10例）およびスタチン投与群（24例；男性10例，女性14例）の背景ならびに糖尿病治療薬を Table 2 に示した．対照群は，平均年齢 67（64，66，74）歳，平均糖尿病罹患歴 8.4（5.3，8.0，12.0）年，平均観察期間 16（14，15，16）週であった．一方，スタチン投与群は，平均年齢 62（57，62，71）歳，平均糖尿病罹患歴 6.0（1.8，3.5，9.0）年，平均観察期間 16（13，16，19）週であり，平均年齢，平均糖尿病罹患歴および平均観察期間において対照群と比べ有意な差は認められなかった．また，投与されたスタチンは，プラバスタチンが最も多く 15 例，次いでフルバスタチンとロスバスタチンが各 4 例，アトルバスタチンが 1 例であった．

糖尿病治療薬は，対照群においてジペプチジルペプチダーゼ 4（DPP4）阻害薬が 15 例，スルホニ尿素系薬剤が 12 例， $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬（ $\alpha$ -GI）が 9 例，メトホルミンが 8 例，インスリン製剤が 7 例，ピオグリタゾンが 1 例，グリニド系薬剤が 1 例投与されていた．スタチン投与群では DPP4 阻害薬が 13 例，スルホニ尿素系薬剤が 5 例， $\alpha$ -GI が 7 例，メトホルミンが 11 例，インスリン製剤が 3 例，ピオグリタゾンが 4 例投与されていたが，グリニド系薬剤の投与は無かった．また，インスリン製剤およびスルホニル尿素系薬剤が投与されている患者は，スタチン投与群に比べ対照群において多く存在した（Table 2）．

**Table 2. Baseline Characteristics of Subjects with Control and Statin Groups.**

	Control ( <i>n</i> = 24)	Statin ( <i>n</i> = 24)	P value
Age (years)	67 (64, 66, 74)	62 (57, 62, 71)	0.081
Gender (male/female)	14 / 10	10 / 14	0.248
Estimated diabetic duration (years)	8.4 (5.3, 8.0, 12.0)	6.0 (1.8, 3.5, 9.0)	0.066
Observation period (weeks)	16 (14, 15, 16)	16 (13, 16, 19)	0.546
Use of statins			
Pravastatin	-	15	-
Fluvastatin	-	4	-
Rosuvastatin	-	4	-
Atorvastatin	-	1	-
Treatment of diabetes			
DPP4 inhibitor	15	13	-
Sulfonylurea	12	5	-
Alpha-glucosidase inhibitor	9	7	-
Metformin	8	11	-
Insulin	7	3	-
Pioglitazone	1	4	-
Glinide	1	0	-

(n) Indicates the number of patients. Values are mean [25th, 50th (median), and 75th percentiles]. DPP4, dipeptidyl-peptidase 4.

### 3.3.3 試験開始時における対照群およびスタチン投与群の臨床的特徴

対照群では、糖尿病患者における LDL コレステロールの管理目標値を超える患者を除外したことから総および LDL コレステロール値がスタチン投与群に比べ有意に低下していた。しかし、その他の脂質代謝マーカーである中性脂肪値および HDL コレステロール値では両群間において有意な差は認められなかった。また、BMI、糖代謝マーカーである血糖値と HbA1c 値ならびに血中総および高分子量 Ad 濃度において両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3)。

**Table 3. Clinical Parameters of Control and Statin Groups at Baseline.**

	Control ( <i>n</i> = 24)	Statin ( <i>n</i> = 24)	P value
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.5 (20.3, 22.9, 23.9)	24.6 (21.7, 24.6, 27.4)	0.065
Triglyceride (mg/dL)	135 (88, 126, 166)	137 (96, 129, 171)	0.917
Total cholesterol (mg/dL)	179 (161, 181, 198)	252 (233, 252, 268)	< 0.001
HDL-cholesterol (mg/dL)	62 (45, 58, 77)	61 (51, 59, 67)	0.934
LDL-cholesterol (mg/dL)	89 (78, 90, 100)	163 (150, 161, 178)	< 0.001
Blood glucose (mg/dL)	150 (124, 134, 175)	146 (113, 131, 162)	0.543
HbA1c (%)	6.9 (6.5, 6.9, 7.2)	7.1 (6.5, 7.1, 7.7)	0.319
Total-adiponectin (μg/mL)	12.7 (7.3, 10.9, 15.3)	12.7 (6.8, 9.8, 16.3)	0.726
HMW-adiponectin (μg/mL)	7.7 (3.5, 5.0, 9.9)	9.3 (3.4, 6.7, 11.3)	0.711

(*n*) Indicates the number of patients. Values are mean [25th, 50th (median), and 75th percentiles]. BMI, body mass index; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol; HbA1c, glycosylated hemoglobin A1c; HMW-adiponectin, high molecular weight-adiponectin.

### 3.3.4 対照群およびスタチン投与群の各マーカーの経時的変化

試験開始時から観察期間終了時における対照群およびスタチン投与群の各マーカーの変化率を比較した結果、対照群と比べスタチン投与群において総および LDL コレステロール値の変化率が有意に低下していた。また、中性脂肪値、HDL コレステロール値、血糖値、HbA1c 値、血中総 Ad 濃度ならびに高分子量 Ad 濃度の変化率は、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 4)。

**Table 4. Percent Changes of Clinical Parameters in Control and Statin Groups.**

	Control ( <i>n</i> = 24)	Statin ( <i>n</i> = 24)	P value
Triglyceride	9.7 (-20.2, 7.5, 30.8)	8.9 (-17.1, 5.0, 23.4)	0.893
Total cholesterol	5.6 (-0.3, 3.8, 10.9)	-21.7 (-29.7, -16.9, -14.9)	< 0.001
HDL-cholesterol	-0.2 (-8.0, 0.8, 6.8)	-3.0 (-13.2, -3.6, 5.1)	0.434
LDL-cholesterol	10.9 (-0.8, 7.5, 25.6)	-33.1 (-43.4, -32.3, -22.7)	< 0.001
Blood glucose	-0.8 (-24.7, -3.7, 13.9)	2.6 (-21.1, 4.4, 16.3)	0.650
HbA1c	1.4 (-3.0, 0.0, 5.1)	0.5 (-1.7, 1.5, 4.7)	0.695
Total-adiponectin	1.2 (-12.2, 3.2, 11.8)	-4.9 (-17.9, -8.4, 10.1)	0.331
HMW-adiponectin	0.8 (-12.0, -2.8, 20.8)	-5.8 (-22.1, -13.4, 5.9)	0.155

(*n*) Indicates the number of patients. Values are mean [25th, 50th (median), and 75th percentiles]. HDL-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol; HbA1c, glycated hemoglobin A1c; HMW-adiponectin, high molecular weight-adiponectin.

### 3.3.5 試験開始時におけるマッチング後の対照群とプラバスタチン投与群の患者背景

スタチン投与群の中で最も多く投与されたプラバスタチンを服用した患者と同姓で年齢が  $\pm 5$  歳以内および HbA1c 値が  $\pm 0.5\%$  以内の条件で対照群とマッチさせたところ 11 例のペアが抽出された。抽出された 11 例（男性 4 例，女性 7 例）の背景ならびに糖尿病治療薬を Table 5 に示した。マッチング後の対照群は，平均年齢 68（63，68，75）歳，平均糖尿病罹患歴 8.1（4.0，7.0，12.0）年，平均観察期間 16（14，16，18）週であった。一方，プラバスタチン投与群は，平均年齢 66（61，64，74）歳，平均糖尿病罹患歴 5.3（1.5，3.0，5.5）年，平均観察期間 18（16，19，20）週であり，平均年齢，平均糖尿病罹患歴および平均観察期間において対照群と比べ有意な差は認められなかった。

糖尿病治療薬は，マッチング後の対照群において DPP4 阻害薬が 7 例，スルホニ尿素系薬剤が 3 例， $\alpha$ -GI が 3 例，メトホルミンが 3 例，インスリン製剤が 4 例，グリニド系薬剤が 1 例投与されていた。プラバスタチン投与群では DPP4 阻害薬が 5 例，スルホニ尿素系薬剤が 1 例， $\alpha$ -GI が 4 例，メトホルミンが 4 例，インスリン製剤が 2 例，ピオグリタゾンが 1 例投与されており，両群の間に大きな違いは認められなかった（Table 5）。

**Table 5. Baseline Characteristics of Subjects with Matched Control and Pravastatin Groups.**

	Matched Control ( <i>n</i> = 11)	Pravastatin ( <i>n</i> = 11)	P value
Age (years)	68 (63, 68, 75)	66 (61, 64, 74)	0.094
Gender (male/female)	4 / 7	4 / 7	-
Estimated diabetic duration (years)	8.1 (4.0, 7.0, 12.0)	5.3 (1.5, 3.0, 5.5)	0.181
Observation period (weeks)	16 (14, 16, 18)	18 (16, 19, 20)	0.145
Treatment of diabetes			
DPP4 inhibitor	7	5	-
Sulfonylurea	3	1	-
Alpha-glucosidase inhibitor	3	4	-
Metformin	3	4	-
Insulin	4	2	-
Pioglitazone	0	1	-
Glinide	1	0	-

(*n*) Indicates the number of patients. Values are mean [25th, 50th (median), and 75th percentiles]. DPP4, dipeptidyl-peptidase 4.

### 3.3.6 試験開始時におけるマッチング後の対照群とプラバスタチン投与群の臨床的特徴

マッチングを行う以前の対照群と同様にマッチング後の対照群における総および LDL コレステロール値はプラバスタチン投与群に比べ有意に低下していた。また、プラバスタチンが投与された患者と HbA1c 値  $\pm 0.5\%$  以内の条件で対照群とマッチさせたが、マッチング後の対照群とプラバスタチン投与群の間に有意な差が認められた。しかし、11 ペア中 4 例が同値を示し、四分位範囲においても両群とも 6.4% から 7.0% と同値であること、ならびに血糖値において両群の間に有意な差が認められなかったことから、両群における HbA1c 値の違が以降の結果に与える影響は少ないと考えられた。一方、BMI、中性脂肪値、HDL コレステロール値ならびに血中総および高分子量 Ad 濃度において両群の間に有意な差は認められなかった (Table 6)。また、交絡因子である BMI は、試験開始時時において血中総および高分子量 Ad 濃度との間に有意な相関は認められなかった。

**Table 6. Clinical Parameters of Matched Control and Pravastatin Groups at Baseline.**

	Matched Control ( <i>n</i> = 11)	Pravastatin ( <i>n</i> = 11)	P value
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.4 (19.3, 21.4, 23.2)	24.1 (22.5, 23.2, 26.2)	0.081
Triglyceride (mg/dL)	123 (95, 121, 145)	159 (127, 150, 207)	0.241
Total cholesterol (mg/dL)	182 (171, 183, 201)	253 (236, 252, 270)	< 0.001
HDL-cholesterol (mg/dL)	65 (49, 61, 80)	62 (55, 59, 62)	0.534
LDL-cholesterol (mg/dL)	93 (83, 95, 105)	159 (151, 162, 167)	< 0.001
Blood glucose (mg/dL)	126 (111, 127, 130)	132 (108, 123, 143)	0.476
HbA1c (%)	6.6 (6.4, 6.5, 7.0)	6.7 (6.4, 6.7, 7.0)	0.038
Total-adiponectin (µg/mL)	13.9 (8.1, 11.8, 18.4)	12.4 (6.6, 9.2, 16.6)	0.534
HMW-adiponectin (µg/mL)	9.2 (3.7, 8.1, 13.6)	9.0 (3.4, 5.3, 10.5)	0.790

(*n*) Indicates the number of patients. Values are mean [25th, 50th (median), and 75th percentiles]. BMI, body mass index; HDL-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol; HbA1c, glycated hemoglobin A1c; HMW-adiponectin, high molecular weight-adiponectin.

### 3.3.7 マッチング後の対照群およびプラバスタチン投与群の各マーカーの経時的変化

試験開始時から観察期間終了時におけるマッチング後の対照群およびプラバスタチン投与群の各マーカーの変化率を比較した結果、マッチング後の対照群と比べプラバスタチン投与群において総および LDL コレステロール値ならびに血中高分子量 Ad 濃度の変化率が有意に低下していた。また、中性脂肪値、HDL コレステロール値、血糖値、HbA1c 値および血中総 Ad 濃度の変化率は、両群の間に有意な差は認められなかった (Table 7)。

**Table 7. Percent Changes of Clinical Parameters in Matched Control and Pravastatin Groups.**

	Matched Control ( <i>n</i> = 11)	Pravastatin ( <i>n</i> = 11)	P value
Triglyceride	15.9 (0.4, 8.0, 22.7)	12.3 (-19.8, 0.6, 25.4)	0.286
Total cholesterol	7.9 (-1.4, 4.2, 14.1)	-18.7 (-22.3, -15.9, -13.3)	< 0.001
HDL-cholesterol	0.5 (-5.9, 0.0, 6.5)	-4.7 (-15.7, -8.5, 7.2)	0.413
LDL-cholesterol	12.0 (0.5, 5.1, 27.6)	-30.7 (-38.4, -33.3, -18.4)	< 0.001
Blood glucose	1.8 (-16.7, -6.6, -9.7)	12.6 (-3.9, 10.9, 16.9)	0.450
HbA1c	1.3 (-3.2, 0.0, 2.9)	2.8 (0.6, 3.0, 4.8)	0.202
Total-adiponectin	4.4 (-7.0, 3.1, 17.1)	-10.2 (-18.9, -13.5, -5.5)	0.137
HMW-adiponectin	5.6 (-12.2, 0.1, 23.9)	-19.0 (-31.1, -21.3, -12.3)	0.023

(*n*) Indicates the number of patients. Values are mean [25th, 50th (median), and 75th percentiles]. HDL-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol; HbA1c, glycated hemoglobin A1c; HMW-adiponectin, high molecular weight-adiponectin.

### 3.4 考察

スタチンは大規模臨床試験を用いたメタ解析の結果、糖尿病の新規発症のリスクを増加させることが報告<sup>19)</sup>されていることから糖代謝を悪化させる可能性が指摘されている。そのため糖尿病のリスク因子を有する正常血糖患者ならびに耐糖能障害 (IGT) 患者の糖尿病の新規発症に対するスタチンの影響だけでなく、すでに 2 型糖尿病を発症した患者の血糖コントロールに対する影響を検討する必要がある。また、スタチンが糖代謝に影響を与える機序の一つとしてアディポカインの一種であり肝および脂肪細胞においてインスリン感受性を高める Ad が関与していると考えられている。<sup>69)</sup> そこで本研究では、高 LDL コレステロール血症を伴う 2 型糖尿病患者の血糖コントロールおよび血中 Ad 濃度に対するスタチンの影響を検証した。

本研究では、スタチンの 12 週間以上にわたる投与を行ったが、対照群と比べ糖代謝マーカーである血糖値ならびに HbA1c 値の変化率に有意な差は認められなかった。また、スタチンの中で最も多く投与されたプラバスタチンを服用していた患者を、対照群と性別、年齢、HbA1c 値をマッチングさせたプラバスタチン投与群においても同様の結果となった。2 型糖尿病患者にスタチンを投与した 9 つのランダム化比較試験をもとにメタ解析が行われたが、プラセボ群に比べスタチン投与群では糖コントロールの悪化および HbA1c 値の増加が認められており<sup>70)</sup> 本研究とは異なる結果となった。しかし、脂溶性のスタチンに分類されるアトルバスタチンやロスバスタチンを、2 型糖尿病患者に投与した場合に血糖コントロールが悪化するとの報告がある<sup>54)</sup> 一方、水溶性のスタチンに分類されるプラバスタチンを 2 型糖尿病患者に投与した場合においては、血糖コントロールに影響を与えないとの報告が多い。<sup>53, 71, 72)</sup> そのため、本研究においてスタチンが投与された患者の中でプラバスタチンを服用した患者が 24 例中 15 例と最も多く投与されていたこと、およびプラバスタチン投与群のみで検証を行ったためと考えられた。

Ad はスタチンによる糖代謝悪化の機序に関与する因子の一つとして考えられているが、本研究におけるスタチンの投与は、血中総および高分子量 Ad 濃度に影響を与えなかった。しかし、年齢、性別、HbA1c 値をマッチさせるとプラバスタチン投与群は、対照群に比べ血中高分子量 Ad 濃度の変化率を有意に低下させることが明らかとなった。プラバスタチンは高 LDL コレステロール血症患者や冠動脈疾患および IGT を有する高コレステロール患者に対し投与した場合に血中 Ad 濃度を増加するとの報告がある。<sup>73, 74)</sup> 一方、2 型糖尿病患者を対象にした調査では、血中 Ad 濃度に影響を与えないと報告されている。<sup>65)</sup> しかし、今までに 2 型糖尿病患者にプラバスタチンを投与することによって血中 Ad 濃度を減少させたと

いう報告はない。今回の結果のように血中高分子量 Ad 濃度を低下させた理由としてスタチンの一種であるロスバスタチンがマウスの脂肪前駆細胞である 3T3L-1 細胞において HMG-CoA 還元酵素を阻害することによって PPAR $\gamma$  のリガンドであるファルネシルピロリン酸の産生量を低下させ Ad 遺伝子の発現を抑制するとの報告があり,<sup>61)</sup> プラバスタチンにおいても同様の機序によって脂肪細胞における Ad の生成・分泌を低下させる可能性が考えられた。

本研究では、マッチング後のプラバスタチン投与群において、高分子量 Ad 濃度の変化率がマッチング後の対照群に比べ有意に低下したのにもかかわらず、血糖値および HbA1c 値の変化率に違いが認められなかった。スタチンによる血糖コントロールの悪化の機序の一つとして、Ad とは別にスタチンが直接的および間接的に電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルに影響を与え、膵 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌機能を障害することが考えられている。<sup>75)</sup> シンバスタチンがラット膵 $\beta$ 細胞において、インスリン分泌機構で重要な役割を担う L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルを阻害しインスリンの分泌を低下させる。一方、プラバスタチンは阻害せずインスリン分泌能に影響を与えないとの報告がある。<sup>76)</sup> さらに、高コレステロール血症を伴う早期の 2 型糖尿病患者においてプラバスタチンは、インスリン分泌機能の指標であるディスポジションインデックスを投与前に比べ増加させたとの報告があり、<sup>77)</sup> プラバスタチンは、むしろインスリン分泌機能を改善する可能性が示唆されている。そのため血中高分子量 Ad 濃度が減少し、肝および脂肪細胞におけるインスリン感受性が低下した状態であっても、プラバスタチンが膵 $\beta$ 細胞においてインスリン分泌を増加させ、結果的に血糖コントロールが悪化しなかった可能性が考えられた。しかし、プラバスタチン投与による血中高分子量 Ad 濃度の低下は、インスリン抵抗性を促進する可能性があるため、高 LDL コレステロール血症を伴う 2 型糖尿病患者にプラバスタチンを投与する際は、血糖コントロールの変動に注視する必要があると考えられた。

本研究では、各群において使用されていた糖尿病治療薬に違いがみられた。しかし、観察期間中に糖尿病治療薬の変更がみられた患者は除外されており、本研究で得られた結果に対する影響は少ないものと考えられた。

### 3.5 小括

高 LDL コレステロール血症を伴う 2 型糖尿病患者にプラバスタチンの投与を行ったが、血糖コントロールには影響を与えなかった。しかし、プラバスタチンの投与によって血中高分子量 Ad 濃度が低下する可能性が示唆された。そのため、高 LDL コレステロール血症を伴う 2 型糖尿病患者にプラバスタチンの投与を継続する場合には、血糖コントロールの変動に注視しなければならないことが示唆された。

## 第四章 総括

本研究では、2型糖尿病モデルラットを用いて大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生増加とその機序について検討を行った。また、2型糖尿病モデルラットにプラバスタチンの慢性投与を行いその効果を検討した。さらに、高LDLコレステロール血症を伴う2型糖尿病患者の血糖コントロールおよび血中Ad濃度に与える影響を検討し以下の知見を得ることができた。

2型糖尿病モデルラット大腿動脈において、スーパーオキシド産生が増加していることが明らかとなった。このスーパーオキシドの産生増加には、血清中に増加したGlycer-AGEsが深く関与しており、Glycer-AGEsが大腿動脈においてミトコンドリア呼吸鎖複合体IIを活性化することによってスーパーオキシドの産生を増加させることが示唆された。また、高血糖状態初期段階からのプラバスタチンの慢性投与は、2型糖尿病モデルラットの大腿動脈におけるスーパーオキシドの産生増加を抑制することが明らかとなった。このプラバスタチンによるスーパーオキシドの産生増加抑制効果は、コレステロール低下作用によるものは異なり、血清Glycer-AGEs濃度の減少によるものであることが推察された。

一方、プラバスタチンは、高LDLコレステロール血症を伴う2型糖尿病患者の血糖コントロールには影響を与えないことが示唆された。しかし、観察期間中にインスリン感受性を増加させる血中高分子量Ad濃度を低下させる可能性が示唆された。

以上の結果より、糖尿病初期段階におけるプラバスタチンの投与は、コレステロール低下作用に加え、その作用とは独立した抗酸化作用を有することから2型糖尿病の大血管合併症であるPADの発症を抑制する可能性が示唆された。一方、プラバスタチンが高LDLコレステロール血症を伴う2型糖尿病患者の血中高分子量Ad濃度を低下させたことから、プラバスタチンを2型糖尿病患者に投与する際には、血糖コントロールの悪化に注視し使用しなければならないことが示唆された。

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を戴きました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野 松永 民秀 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲を戴きました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野 鈴木 匡 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本論文作成にあたり、種々の有益な御助言と御校閲を賜りました、名古屋市立大学大学院 薬学研究科 病態解析学分野 青山 峰芳 教授、名古屋市立大学大学院 薬学研究科 病院薬剤学分野 木村 和哲 教授ならびに名古屋市立大学 大学院薬学研究科 レギュラトリーサイエンス分野 頭金 正博 教授に深謝いたします。

本研究に際し、親身なる御助言、御指導を賜り、また本論文の御校閲を戴きました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野 菊池 千草 講師に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、有益な御助言と御協力を賜りました琉球大学大学院 医学研究科 薬物治療学講座 中村 克徳教授に謹んでお礼申し上げます。

本研究に際し、有益な御助言と御協力を賜りました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野 岩尾 岳洋 准教授ならびに坡下 真大 講師に謹んでお礼申し上げます。

本研究に際し、グリセルアルデヒド由来 AGEs の測定をして戴き、さらに終始丁寧な御指導、御助言を賜りました金沢医科大学 総合医学研究所 先端医療研究領域 糖化制御研究分野 竹内 正義 教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、終始丁寧な御指導、御助言を賜りました日本福祉大学 健康科学部 リハビリテーション学科 伊藤 猛雄 教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、終始丁寧な御指導、御助言を賜ました名古屋市立大学大学院 医学研究科 薬理学分野 梶栗潤子 博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、患者様に対し同意を取得して戴き、さらに終始丁寧な御指導、御助言を賜ましたおかやま糖尿病・甲状腺クリニック 岡山 直司 院長に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、患者様に対し同意を取得して戴き、さらに終始丁寧な御指導、御助言を賜ました名古屋市立西部医療センター 内分泌・糖尿病内科 部長 今枝 憲郎 先生に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、患者様の臨床検査値を測定して戴きました、名古屋市立大学病院 中央臨床検査部 五藤 孝秋 様に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、患者様のデータの調査、整理をして戴きました、名古屋市立大学 薬学部 臨床薬学教育研究センター 永味 千枝 様、加藤 真梨 様、野田 雅人 様、川合 結乃 様、末松 菜月 様に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、動物の飼育管理をして戴きました、名古屋市立大学薬学部 実験動物飼育施設の皆様に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際し、多大なるご協力を戴きました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 臨床薬学分野ならびに薬学部 臨床薬学教育研究センターの皆様に深く感謝いたします。

最後に本研究に供せられた多くの動物の冥福を心から祈ります。

## 引用文献

- 1) Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.*, **128**, 40–50 (2017).
- 2) 厚生労働省健康局：平成28年「国民健康・栄養調査」の結果。  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000177189.html>, cited 15, November, 2017.
- 3) Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, Bell K, Caporusso J, Durand-Zaleski I, Komori K, Lammer J, Liapis C, Novo S, Razavi M, Robbs J, Schaper N, Shigematsu H, Sapoval M, White C, White J, Clement D, Creager M, Jaff M, Mohler E 3rd, Rutherford RB, Sheehan P, Sillesen H, Rosenfield K. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J. Vasc. Surg.*, **33**, S5–67 (2007).
- 4) Kikuchi C, Kajikuri J, Watanabe Y, Itoh T. Effect of chronic administration of pravastatin on enhanced vascular superoxide production in a type 2 diabetes rat model. *Nagoya Med. J.*, **49**, 95–110 (2008).
- 5) Kajikuri J, Watanabe Y, Ito Y, Ito R, Yamamoto T, Itoh T. Characteristic changes in coronary artery at the early hyperglycaemic stage in a rat type 2 diabetes model and the effects of pravastatin. *Br. J. Pharmacol.*, **158**, 621–632 (2009).
- 6) Kikuchi C, Kajikuri J, Hori E, Nagami C, Matsunaga T, Kimura K, Itoh T. Aortic superoxide production at the early hyperglycemic stage in a rat type 2 diabetes model and the effects of pravastatin. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 996–1002 (2014).
- 7) Serizawa K, Yogo K, Aizawa K, Tashiro Y, Ishizuka N. Nicorandil prevents endothelial dysfunction due to antioxidative effects via normalisation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase in streptozotocin diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.*, **10**, 105 (2011).
- 8) Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, Kitabatake A, Goto Y, Toyota T, Nakaya N, Nishimoto S, Muranaka M, Yamamoto A, Mizuno K, Ohashi Y; MEGA Study Group. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial. *Lancet.*, **368**, 1155–1163 (2006).
- 9) Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med.*, **333**, 1301–1307 (1995).
- 10) West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Influence of pravastatin and plasma lipids

- on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation.*, **97**, 1440–1445 (1998).
- 11) Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med.*, **8**, 1257–1262 (2002).
  - 12) Delanty N, Vaughan CJ. Vascular effects of statins in stroke. *Stroke.*, **28**, 2315–2320 (1997).
  - 13) Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA.*, **279**, 1643–1650 (1998).
  - 14) Davignon J, Laaksonen R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins. *Curr Opin Lipidol.*, **10**, 543–559 (1999).
  - 15) Vaughan CJ, Gotto AM Jr, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.*, **35**, 1–10 (2000).
  - 16) Shinohara K, Shoji T, Kimoto E, Yokoyama H, Fujiwara S, Hatsuda S, Maeno T, Shoji T, Fukumoto S, Emoto M, Koyama H, Nishizawa Y. Effect of atorvastatin on regional arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Atheroscler. Thromb.*, **12**, 205–210 (2005).
  - 17) Hankey GJ, Norman PE, Eikelboom JW. Medical treatment of peripheral arterial disease. *JAMA.*, **295**, 547–553 (2006).
  - 18) Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.*, **359**, 2195–2207 (2008).
  - 19) Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, Seshasai SR, McMurray JJ, Freeman DJ, Jukema JW, Macfarlane PW, Packard CJ, Stott DJ, Westendorp RG, Shepherd J, Davis BR, Pressel SL, Marchioli R, Marfisi RM, Maggioni AP, Tavazzi L, Tognoni G, Kjekshus J, Pedersen TR, Cook TJ, Gotto AM, Clearfield MB, Downs JR, Nakamura H, Ohashi Y, Mizuno K, Ray KK, Ford I. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet.*, **375**, 735–742 (2010).
  - 20) Yoon D, Sheen SS, Lee S, Choi YJ, Park RW, Lim HS. Statins and risk for new-onset diabetes mellitus: A real-world cohort study using a clinical research database. *Medicine (Baltimore).*, **95**, e5429 (2016).

- 21) Koh KK, Quon MJ, Han SH, Lee Y, Ahn JY, Kim SJ, Koh Y, Shin EK. Simvastatin improves flow-mediated dilation but reduces adiponectin levels and insulin sensitivity in hypercholesterolemic patients. *Diabetes Care.*, **31**, 776–782 (2008).
- 22) Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur J Pharmacol.*, **636**, 8–17 (2010).
- 23) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.*, **404**, 787–790 (2000).
- 24) Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.*, **49**, 1939–1945 (2000).
- 25) Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.*, **105**, 1656–1662 (2002).
- 26) Sato T, Iwaki M, Shimogaito N, Wu X, Yamagishi S, Takeuchi M. TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. *Curr. Mol. Med.*, **6**, 351–358 (2006).
- 27) Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S. Involvement of TAGE-RAGE system in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J. Ophthalmol.*, **2010**, 170393 (2010).
- 28) Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S. Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: a novel therapeutic strategy. *Curr. Drug Targets.*, **11**, 1468–1482 (2010).
- 29) Ojima A, Matsui T, Maeda S, Takeuchi M, Yamagishi S. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) inhibits signaling pathways of advanced glycation end products (AGEs) in endothelial cells via its antioxidative properties. *Horm. Metab. Res.*, **44**, 501–505 (2012).
- 30) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes.*, **41**, 1422–1428 (1992).
- 31) Aronow WS, Nayak D, Woodworth S, Ahn C. Effect of simvastatin versus placebo on treadmill exercise time until the onset of intermittent claudication in older patients with peripheral arterial disease at six months and at one year after treatment. *Am. J. Cardiol.*, **92**, 711–712 (2003).

- 32) Takeuchi M, Makita Z, Bucala R, Suzuki T, Koike T, Kameda Y. Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Mol. Med.*, **6**, 114–125 (2000).
- 33) Jinno M, Takeuchi M, Watanabe A, Teruya K, Hirohama J, Eguchi N, Miyazaki A. Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. *Hum. Reprod.*, **26**, 604–610 (2011).
- 34) Viel EC, Benkirane K, Javeshghani D, Touyz RM, Schiffrin EL. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **295**, H281–288 (2008).
- 35) Baudry N, Laemmel E, Vicaut E. In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294**, H821–H828 (2008).
- 36) Matsui T, Nishino Y, Takeuchi M, Yamagishi S. Vildagliptin blocks vascular injury in thoracic aorta of diabetic rats by suppressing advanced glycation end product-receptor axis. *Pharmacol. Res.*, **63**, 383–388 (2011).
- 37) Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ. Res.*, **85**, 357–363 (1999).
- 38) Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol. Aspects Med.*, **25**, 17–26 (2004).
- 39) Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.*, **416**, 15–18 (1997).
- 40) Minamiyama Y, Bito Y, Takemura S, Takahashi Y, Kodai S, Mizuguchi S, Nishikawa Y, Suehiro S, Okada S. Calorie restriction improves cardiovascular risk factors via reduction of mitochondrial reactive oxygen species in type II diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **320**, 535–543 (2007).
- 41) Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. *Biochim Biophys Acta.*, **575**, 266-276 (1979).
- 42) Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).

- Lancet.*, **344**, 1383–1389 (1994).
- 43) Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA.*, **279**, 1615–1622 (1998).
- 44) Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med.*, **335**, 1001–1009 (1996).
- 45) Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PW, Eddleman KM, Jarrett NM, LaBresh K, Nevo L, Wnek J, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Smith SC Jr, Tomaselli GF; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.*, **129**, S1–45 (2014).
- 46) Abbott RD, Donahue RP, Kannel WB, Wilson PW. The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs women. The Framingham Study. *JAMA.*, **260**, 3456–3460 (1988).
- 47) Scheidt-Nave C, Barrett-Connor E, Wingard DL. Resting electrocardiographic abnormalities suggestive of asymptomatic ischemic heart disease associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus in a defined population. *Circulation.*, **81**, 899–906 (1990).
- 48) Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care.*, **16**, 434–444 (1993).
- 49) Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Kearney PM, Blackwell L, Collins R, Keech A, Simes J, Peto R, Armitage J, Baigent C. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet.*, **371**, 117–125 (2008).

- 50) Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH; CARDS investigators. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet.*, **364**, 685–696 (2004).
- 51) 日本糖尿病学会 (編): 糖尿病診療ガイドライン 2016, 日本糖尿病学会, 南江堂 (作製), 東京, 2016.
- 52) Ohmura C, Watada H, Hirose T, Tanaka Y, Kawamori R. Acute onset and worsening of diabetes concurrent with administration of statins. *Endocr J.*, **52**, 369–372 (2005).
- 53) Takano T, Yamakawa T, Takahashi M, Kimura M, Okamura A. Influences of statins on glucose tolerance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb.*, **13**, 95–100 (2006).
- 54) Simsek S, Schalkwijk CG, Wolffenbuttel BH. Effects of rosuvastatin and atorvastatin on glycaemic control in Type 2 diabetes---the CORALL study. *Diabet Med.*, **29**, 628–631 (2012).
- 55) Kawai T, Tokui M, Funae O, Meguro S, Yamada S, Tabata M, Shimada A. Efficacy of pitavastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, on lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.*, **28**, 2980–2981 (2005).
- 56) Liu PY, Lin LY, Lin HJ, Hsia CH, Hung YR, Yeh HI, Wu TC, Chen JY, Chien KL, Chen JW. Pitavastatin and Atorvastatin double-blind randomized comparative study among high-risk patients, including those with Type 2 diabetes mellitus, in Taiwan (PAPAGO-T Study). *PLoS One.*, **8**, e76298 (2013).
- 57) Anyanwagu U, Mamza J, Donnelly R, Idris I. Effects of background statin therapy on glycemic response and cardiovascular events following initiation of insulin therapy in type 2 diabetes: a large UK cohort study. *Cardiovasc Diabetol.*, **16**, 107 (2017).
- 58) Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.*, **116**, 1784–1792 (2006).
- 59) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.*, **8**, 1288–1295 (2002).
- 60) Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara

- K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.*, **423**, 762-769 (2003).
- 61) Goto T, Nagai H, Egawa K, Kim YI, Kato S, Taimatsu A, Sakamoto T, Ebisu S, Hohsaka T, Miyagawa H, Murakami S, Takahashi N, Kawada T. Farnesyl pyrophosphate regulates adipocyte functions as an endogenous PPAR $\gamma$  agonist. *Biochem J.*, **438**, 111–119 (2011).
- 62) Hu Y, Tong G, Xu W, Pan J, Ryan K, Yang R, Shuldiner AR, Gong DW, Zhu D. Anti-inflammatory effects of simvastatin on adipokines in type 2 diabetic patients with carotid atherosclerosis. *Diab Vasc Dis Res.*, **6**, 262–268 (2009).
- 63) Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Inami N, Tanaka A, Nanba M, Shouda Y, Takahashi N, Kimura Y, Iwasaka T. Correlation between adiponectin and reduction of cell adhesion molecules after pitavastatin treatment in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res.*, **122**, 39–45 (2008).
- 64) Koh KK, Quon MJ, Han SH, Ahn JY, Jin DK, Kim HS, Kim DS, Shin EK. Vascular and metabolic effects of combined therapy with ramipril and simvastatin in patients with type 2 diabetes. *Hypertension.*, **45**, 1088–1093 (2005).
- 65) Kim JH, Lee MR, Shin JA, Lee SS, Lee JM, You SJ, Yoon KH, Chang SA. Effects of pravastatin on serum adiponectin levels in female patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis.*, **227**, 355–359 (2013).
- 66) 日本動脈硬化学会 (編): 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2012 年版, 日本動脈硬化学会, 杏林舎 (作製), 東京, 2012.
- 67) Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, Okazaki Y, Ishii T, Nishikai K, Saruta T. Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond).*, **103**, 137–142 (2002).
- 68) Fernández-Real JM, Botas-Cervero P, López-Bermano A, Casamitjana R, Funahashi T, Delgado E, Kihara S, Ricart W. Adiponectin is independently associated with glycosylated haemoglobin. *Eur J Endocrinol.*, **150**, 201–205 (2004).
- 69) Kei A, Rizos EC, Elisaf M. Statin use in prediabetic patients: rationale and results to date. *Ther Adv Chronic Dis.*, **6**, 246–251 (2015).

- 70) Erqou S, Lee CC, Adler AI. Statins and glycaemic control in individuals with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia.*, **57**, 2444–2452 (2014).
- 71) Takahashi T, Ishii N, Itai K, Goto R, Higashi K, Kobori S. HMG-CoA reductase inhibitors suppress the development and progression of carotid artery intimal-medial thickening in hypercholesterolemic type 2 diabetic patients. *J Atheroscler Thromb.*, **12**, 149–153(2005).
- 72) Endo K, Miyashita Y, Saiki A, Oyama T, Koide N, Ozaki H, Otsuka M, Ito Y, Shirai K. Atorvastatin and pravastatin elevated pre-heparin lipoprotein lipase mass of type 2 diabetes with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.*, **11**, 341–347(2004).
- 73) Koh KK, Quon MJ, Han SH, Lee Y, Kim SJ, Park JB, Shin EK. Differential metabolic effects of pravastatin and simvastatin in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis.*, **204**, 483–490 (2009).
- 74) Sugiyama S, Fukushima H, Kugiyama K, Maruyoshi H, Kojima S, Funahashi T, Sakamoto T, Horibata Y, Watanabe K, Koga H, Sugamura K, Otsuka F, Shimomura I, Ogawa H. Pravastatin improved glucose metabolism associated with increasing plasma adiponectin in patients with impaired glucose tolerance and coronary artery disease. *Atherosclerosis.*, **194**, e43–51 (2007).
- 75) Barylski M, Nikolic D, Banach M, Toth PP, Montalto G, Rizzo M. Statins and new-onset diabetes. *Curr Pharm Des.*, **20**, 3657-3664 (2014).
- 76) Yada T, Nakata M, Shiraishi T, Takei M. Inhibition by simvastatin, but not pravastatin, of glucose-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> signalling and insulin secretion due to blockade of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat islet beta-cells. *Br J Pharmacol.*, **126**, 1205–1213. (1999).
- 77) Mita T, Watada H, Nakayama S, Abe M, Ogihara T, Shimizu T, Uchino H, Hirose T, Kawamori R. Preferable effect of pravastatin compared to atorvastatin on beta cell function in Japanese early-state type 2 diabetes with hypercholesterolemia. *Endocr J.*, **54**, 441–447(2007).