

Timp-3 in cognitive function

Y Baba *et al*

we do not find it too surprising that Timp-3 KO mice were able to recognize visual cues.

The results of the open-field test indicated that habituation was functional in WT mice, but seemed to be lacking in KO mice. This may be because KO mice were unable to remember the environment over time, and thus could not habituate during the test period. It is also possible that the KO mice had a neurological disorder that will impair both memory and habituation.

Timp-3 has been shown to have various functions in previous reports that described other phenotypes of Timp-3 KO mice. For example, at the age of 21 months, Timp-3 KO mice exhibited left ventricular enlargement similar to that observed in dilated cardiomyopathy, cardiac muscle cell hypertrophy, and contractile dysfunction.³⁷ Others reported that Timp-3 KO mice exhibited a spontaneous air space enlargement in the lung, and enhanced collagen degradation in the peribronchiolar space.³⁸ In addition, Timp-3 was reportedly involved in apoptosis, cell proliferation, inhibition of cell proliferation, and angiogenesis. However, this study showed for the first time that Timp-3 deficiency impaired cognitive dysfunction, potentially through the deregulation of ECM homeostasis within the brain.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms Taeko Kaimoto for excellent secretarial and technical assistance. This study was supported by a grant in aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Japan, and by a grant from the Japan Foundation for Applied Enzymology.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

1. Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:456–468.
2. Dityatev A, Schachner M. The extracellular matrix and synapses. *Cell Tissue Res* 2006;326:647–654.
3. Wright JW, Harding JW. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol* 2004;72:263–293.
4. Nagase H, Woessner Jr JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–21494.
5. Milward EA, Fitzsimmons C, Szklarczyk A, *et al*. The matrix metalloproteinases and CNS plasticity: an overview. *J Neuroimmunol* 2007;187:9–19.
6. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356–361.
7. Tsunemi K, Takai S, Nishimoto M, *et al*. Possible roles of angiotensin II-forming enzymes, angiotensin converting enzyme and chymase-like enzyme, in the human aneurysmal aorta. *Hypertens Res* 2002;25:817–822.
8. Iwashima Y, Horio T, Kuroda S, *et al*. Influence of plasma aldosterone on left ventricular geometry and diastolic function in treated essential hypertension. *Hypertens Res* 2002;25:49–56.
9. Higuchi M, Yasuda O, Kawamoto H, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 deficiency inhibits blood pressure elevation and myocardial microvascular remodeling induced by chronic administration of Nomega-nitro-L-arginine methyl ester in mice. *Hypertens Res* 2007;30:563–571.
10. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267–283.
11. Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 1994;269:9352–9360.
12. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, *et al*. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol* 2005;14:49–60.
13. Lambert E, Dasse E, Haye B, *et al*. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:187–198.
14. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69:562–573.
15. Dzwonek J, Rylski M, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett* 2004;567:129–135.
16. Agrawal SM, Lau L, Yong VW. MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:42–51.
17. Yong VW, Power C, Forsyth P, *et al*. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:502–511.
18. Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, *et al*. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 1998;21:75–80.
19. Park JB, Kwak HJ, Lee SH. Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adh Migr* 2008;2:202–207.
20. Ulrich R, Baumgartner W, Gerhauser I, *et al*. MMP-12, MMP-3, and TIMP-1 are markedly upregulated in chronic demyelinating theiler murine encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:783–793.
21. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:931–944.
22. Ethell IM, Ethell DW. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* 2007;85:2813–2823.
23. Jourquin J, Tremblay E, Bernard A, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) modulates neuronal death, axonal plasticity, and learning and memory. *Eur J Neurosci* 2005;22:2569–2578.
24. Chaillan FA, Rivera S, Marchetti E, *et al*. Involvement of tissue inhibition of metalloproteinases-1 in learning and memory in mice. *Behav Brain Res* 2006;173:191–198.
25. Jaworski DM, Boone J, Caterina J, *et al*. Prepulse inhibition and fear-potentiated startle are altered in tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) knockout mice. *Brain Res* 2005;1051:81–89.
26. Kawamoto H, Yasuda O, Suzuki T, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 plays important roles in the kidney following unilateral ureteral obstruction. *Hypertens Res* 2006;29:285–294.
27. Amantea D, Corasaniti MT, Mercuri NB, *et al*. Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 2008;152:8–17.
28. Mook OR, Van Overbeek C, Ackema EG, *et al*. In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin. *J Histochem Cytochem* 2003;51:821–829.
29. Upchurch M, Wehner JM. Differences between inbred strains of mice in Morris water maze performance. *Behav Genet* 1988;18:55–68.
30. Schuster T, Krug M, Stalder M, *et al*. Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J Neurobiol* 2001;49:142–158.
31. Staubli U, Chun D, Lynch G. Time-dependent reversal of long-term potentiation by an integrin antagonist. *J Neurosci* 1998;18:3460–3469.
32. Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, *et al*. Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol* 1998;152:729–741.
33. Jaworski DM, Fager N. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp-3) mRNA expression during rat CNS development. *J Neurosci Res* 2000;61:396–408.
34. Li Z, Clarke MP, Barker MD, *et al*. TIMP3 mutation in Sorsby's fundus dystrophy: molecular insights. *Expert Rev Mol Med* 2005;7:1–15.

35. Langton KP, McKie N, Curtis A, *et al*. A novel tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mutation reveals a common molecular phenotype in Sorsby's fundus dystrophy. *J Biol Chem* 2000;275:27027–27031.
36. Fariss RN, Apte SS, Luthert PJ, *et al*. Accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human eyes with Sorsby's fundus dystrophy or retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1329–1334.
37. Fedak PW, Smookler DS, Kassiri Z, *et al*. TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110:2401–2409.
38. Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, *et al*. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 2001;108: 817–829.

若年女性において飽和脂肪酸と野菜の1日摂取量は インスリン抵抗性と相関する

本田 まり^{*1} 伊達ちぐさ^{*1,*2} 呉 斌^{*1} 鈴木 一永^{*1,*2}
福尾 恵介^{*1,*2} 鹿住 敏^{*1,*2}

要約：18～22歳の女性85人においてインスリン抵抗性(イ抵抗性)と食事因子の関連を検討した。イ抵抗性はHOMA-IRで、体組成はDXAで、食事調査は7日間の秤量食事記録で評価した。HOMA-IR 2.5以上(対象の14%)はHOMA-IR 1.6未満と比べて、エネルギー、炭水化物、脂質、飽和脂肪酸(SFA)、穀類の1日摂取量が多かった。体脂肪量、レプチン、PAI-1、アディポネクチンとすべての栄養素を説明変数とした多変量解析では、体脂肪量($\beta=0.0001$)、SFA摂取量($\beta=0.065$)、 β カロテン当量($\beta=-0.0002$)が独立してHOMA-IRと相関した。食品群で同様に解析すると体脂肪量($\beta=0.0001$)、乳類($\beta=0.003$)、野菜類($\beta=-0.003$)がHOMA-IRの規定因子であった。若年女性におけるイ抵抗性低減のためにはSFA(乳類)の過剰に注意し、野菜類の摂取を推奨する必要性が示唆された。

Key words：①若年女性 ②インスリン抵抗性 ③飽和脂肪酸 ④野菜 ⑤ β カロテン
[糖尿病 52(4)：271～278, 2009]

緒 言

肥満、2型糖尿病は今や中高年のみならず若年者にもみられる。インスリン抵抗性は肥満、2型糖尿病、脂質異常症、高血圧などの動脈硬化性疾患、さらにはメタボリックシンドロームの成因的基盤として重要である^{1,2)}。インスリン抵抗性の成因として内臓脂肪の蓄積に焦点をあてた研究が注目を集めているが、インスリン抵抗性に対する食事因子の詳細に関する報告は本邦では少なく³⁾、若年者においてはほとんどみられない。本研究は若年女性におけるインスリン抵抗性と、摂取栄養素や摂取食品群の食事因子との関連について検討した。

方 法

武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科の学生101人を対象に、食事調査と血液生化学検査および体組成検査を行った。本研究の実施にあたって武庫川女子大学の倫理委員会の承認を得、また、すべての研究

参加者から書面による参加の同意を得た。

血液生化学検査は食事調査から2週間以内に実施し、一夜絶食後、午前9時から10時半の間に肘静脈から採血を行い、空腹時血糖(FPG)、空腹時インスリン(FIRI:ELISA法、アボットジャパン)、HbA_{1c}、レプチン(RIA法、LINCO社)、アディポネクチン(ELISA法、大塚製薬)、Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)を測定した。体組成検査は二重エネルギー放射線吸収法(DXA:Hologic QDR-2000)を用いて測定した。インスリン抵抗性は空腹時血糖値と空腹時インスリン濃度から算出したHOMA-IR(Homeostasis model assessment insulin resistance index)を指標として用い、HOMA-IR 1.6以下を正常、2.5以上をインスリン抵抗性とした⁴⁾。

食事調査は、すべての曜日を含んだ7日間の秤量食事記録をもとに行った⁵⁾。実施前に説明会を行い、資料として、①食事調査協力に関する説明書、②食事内容記録方法の説明書、③自動秤1台(タニタ)、④食品

^{*1} 武庫川女子大学生生活習慣病オープン・リサーチ・センター(〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46)

^{*2} 武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科(〒663-8558 兵庫県西宮市池開町6-46)

連絡先：本田まり(〒513-8505 三重県鈴鹿市国府町112-1 鈴鹿回生病院)

受付日：2008年3月17日

採択日：2009年1月26日

Table 1 Anthropometric and bioclinical subject profiles

Age (years)	20.2±1.2
Body mass index (kg/m ²)	20.5±2.2
Body fat percent (%)	29.4±5.4
Body fat mass (kg)	15.4±4.5
Body lean mass (kg)	33.7±3.1
Fasting plasma glucose (mg/dl)	85.6±7.2
Fasting plasma insulin (μU/ml)	6.9±4.3
Hemoglobin A1c (%)	4.7±0.3
HOMA-IR	1.5±1.0
Leptin (ng/ml)	9.5±4.1
Adiponectin (μg/ml)	10.9±3.9
Plasminogen activator inhibitor-1 (ng/ml)	17.5±8.5

Mean±SD. n=85. HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance

重量の目安本(写真集), ⑤食品立体モデル(76品目), ⑥食事記録手帳, ⑦身体状況に関する質問票, ⑧歩数計, を配布した。食事の分析は, 7日間の食事記録から1日当たり平均の摂取食品群と摂取栄養素を分析した。摂取栄養素の算出は, 五訂日本食品成分表⁶⁾に記載されている食品中の栄養素含有量を用い, 摂取食品重量当たりの各栄養素の含有量を算出し, それらを総和して1日当たりの摂取量を算出した。栄養素の分析項目は, エネルギー, 炭水化物, 蛋白質(動物性, 植物性), 脂質(動物性, 植物性), 飽和脂肪酸(以下SFA), 一価不飽和脂肪酸(以下MUFA), 多価不飽和脂肪酸(以下PUFA), ビタミンおよびミネラルを分析した。このほか, エネルギー密度(1日当たり摂取エネルギーを1日当たり摂取食品の総重量で除した値), 摂取エネルギーに対する3大栄養素の各エネルギー比率, 動物性蛋白比, 動物性脂質比, SFAエネルギー比(摂取エネルギーに対するSFAエネルギーの割合, 以下MUFA, PUFAについても同様), MUFAエネルギー比, PUFAエネルギー比, P/S(SFAに対するPUFAの割合)についても検討した。なお, 評価可能な食事調査の回答は85人から得られた。

解析には統計ソフトSPSS15.0 for Windowsを使用した。HOMA-IRと食事因子の相関はSpearmanの順位相関係数, 次いで多変量解析としてStepwise回帰分析を行った。HOMA-IRで3分類した群間の比較には分散分析を行い, 体脂肪率で補正した。危険率5%未満を統計学的有意とし, 結果は平均値±標準偏差または標準誤差で示した。

結果

対象の平均年齢は20.2±1.2歳, 平均BMIは20.5±2.2 kg/m²であったが, DXAによる体脂肪率の

平均は29.4±5.4%であった(Table 1)。空腹時血糖をはじめとした糖・インスリン代謝に異常はみられなかった。なお, 食事調査の回答が得られなかった16人と得られた85人の中で体組成と血液生化学検査の成績に差はみられなかった。

1日当たり平均の食物摂取状況を, 平成16年の国民栄養調査⁷⁾における20歳台女性のデータと比較すると(Table 2), 摂取エネルギーは約90 kcal 少なかった。脂質エネルギー比は日本人の摂取基準における目標量⁸⁾の範囲内となる29.2%であった。また, 豆類, 野菜類, 魚介類, 肉類の摂取は少なく, 乳類, 菓子類, 嗜好飲料類は多い傾向にあった。

HOMA-IRは栄養素では脂質, SFA, MUFAの摂取量との間に正の相関がみられた(Table 3, Fig. 1)。エネルギー比でみると, SFAエネルギー比はHOMA-IRと正に相関したが, 脂質エネルギー比およびMUFAエネルギー比はHOMA-IRと相関しなかった。食品群では豆類と野菜類がHOMA-IRと負に相関した(Table 3, Fig. 1)。

85人中12人(14%)にHOMA-IR 2.5以上のインスリン抵抗性が認められた。一方, HOMA-IR 1.6以下の正常群は66%であった。インスリン抵抗性群の平均の体脂肪率は33.6%と高値であったため, 体脂肪率で補正した後に比較すると(Table 4), 正常群と比べてインスリン抵抗性群は, BMI, PAI-1が有意に高かった。また, 1日摂取エネルギー, 炭水化物, 脂質, SFA, MUFA, 穀類, 乳類の摂取量とSFAエネルギー比が有意に高値であった。

HOMA-IRを目的変数とした多変量解析の結果は(Table 5), 体脂肪量, レプチン, PAI-1, アディポネクチンと栄養素および食品群の全項目を説明変数としたモデル1では, 体脂肪量(正)とSFA(正), 野菜類(負)がHOMA-IRを規定する独立因子であり, その寄与率は26%であった。体脂肪量, レプチン, PAI-1, アディポネクチンと栄養素の全項目を説明変数としたモデル2では, 体脂肪量(正)とSFA(正), βカロテン当量(負)がHOMA-IRの規定因子であり, その寄与率は25%であった。体脂肪量, レプチン, PAI-1, アディポネクチンと食品群の全項目を説明変数としたモデル3では, 体脂肪量(正), 乳類(正), 野菜類(負)が規定因子であり, その寄与率は27%であった。

Table には示していないが, SFAは乳類($r=0.53$, $p<0.01$), 肉類($r=0.44$, $p<0.01$), 油脂類($r=0.41$, $p<0.01$)と相関した。SFAを目的変数とした多変量解析では, 乳類(正)がSFAの最大の規定因子であった(寄与率24%)。このほか, 肉類, 菓子類, 穀類, 油脂類が規定因子としてみられた(すべて正, 寄与率

若年女性では飽和脂肪酸と野菜の摂取量はインスリン抵抗性と相関する

Table 2 Daily dietary intake in 85 young women

	Mean \pm SD	References*
Nutrients		
Energy (kcal)	1,568 \pm 336	1,659
Energy density (kcal/g)	0.95 \pm 0.22	0.92
Carbohydrates (g)	215.2 \pm 49.0	223.5
Protein (g)	55.3 \pm 12.0	62.2
Fat (g)	51.2 \pm 14.0	53.5
Saturated fatty acid (g)	14.0 \pm 4.2	—
Monounsaturated fatty acid (g)	17.6 \pm 5.2	—
Polyunsaturated fatty acid (g)	11.0 \pm 3.4	—
Carbohydrate (% energy)	54.9 \pm 4.6	56.1
Protein (% energy)	14.2 \pm 1.8	15.2
Fat (% energy)	29.2 \pm 4.3	28.7
Saturated fatty acid (% energy)	8.0 \pm 1.5	—
Monounsaturated fatty acid (% energy)	10.0 \pm 1.8	—
Polyunsaturated fatty acid/Saturated fatty acid	0.8 \pm 1.0	—
Foods		
Grain (g)	336.0 \pm 104.4	376.0
Sugar and/or sweeteners (g)	5.4 \pm 3.4	5.9
Pulses (g)	32.7 \pm 31.1	49.7
Vegetables (g)	173.0 \pm 80.4	223.0
Fruit (g)	90.8 \pm 85.1	83.1
Fish and shellfish (g)	38.3 \pm 25.2	63.5
Meat (g)	66.9 \pm 34.2	84.9
Milk and/or dairy products (g)	149.9 \pm 99.4	96.8
Oil and fat (g)	11.3 \pm 4.9	12.0
Confections (g)	56.5 \pm 37.8	28.9
Preferred beverages (g)	602.6 \pm 318.0	473.7

* References were data on women aged 20 to 29 years in the 2004 National Nutrition Survey in Japan

Table 3 Spearman's correlations of HOMA-IR with dietary factors

Nutrient	r	Food	r
Energy (kcal)	0.16	Grain	0.14
Energy density (kcal/g)	0.12	Sugar and/or sweetener	0.18
Carbohydrates (g)	0.11	Pulses	-0.25*
Protein (g)	0.06	Vegetables	-0.22*
Fatty acid (g)	0.24*	Fruit	-0.04
Saturated (g)	0.25*	Fish and shellfish	0.01
Monounsaturated (g)	0.26*	Meat	0.08
Polyunsaturated (g)	0.19	Eggs	-0.05
Carbohydrate (% energy)	-0.10	Milk and/or dairy products	0.16
Protein (% energy)	-0.16	Oil and fat	0.02
Fat (% energy)	0.17	Confections	0.03
Saturated fatty acid (% energy)	0.23*	Preferred beverages	0.10
Beta carotene potency (μ g)	-0.17	Seasonings	-0.20

*: $p < 0.05$. n = 85

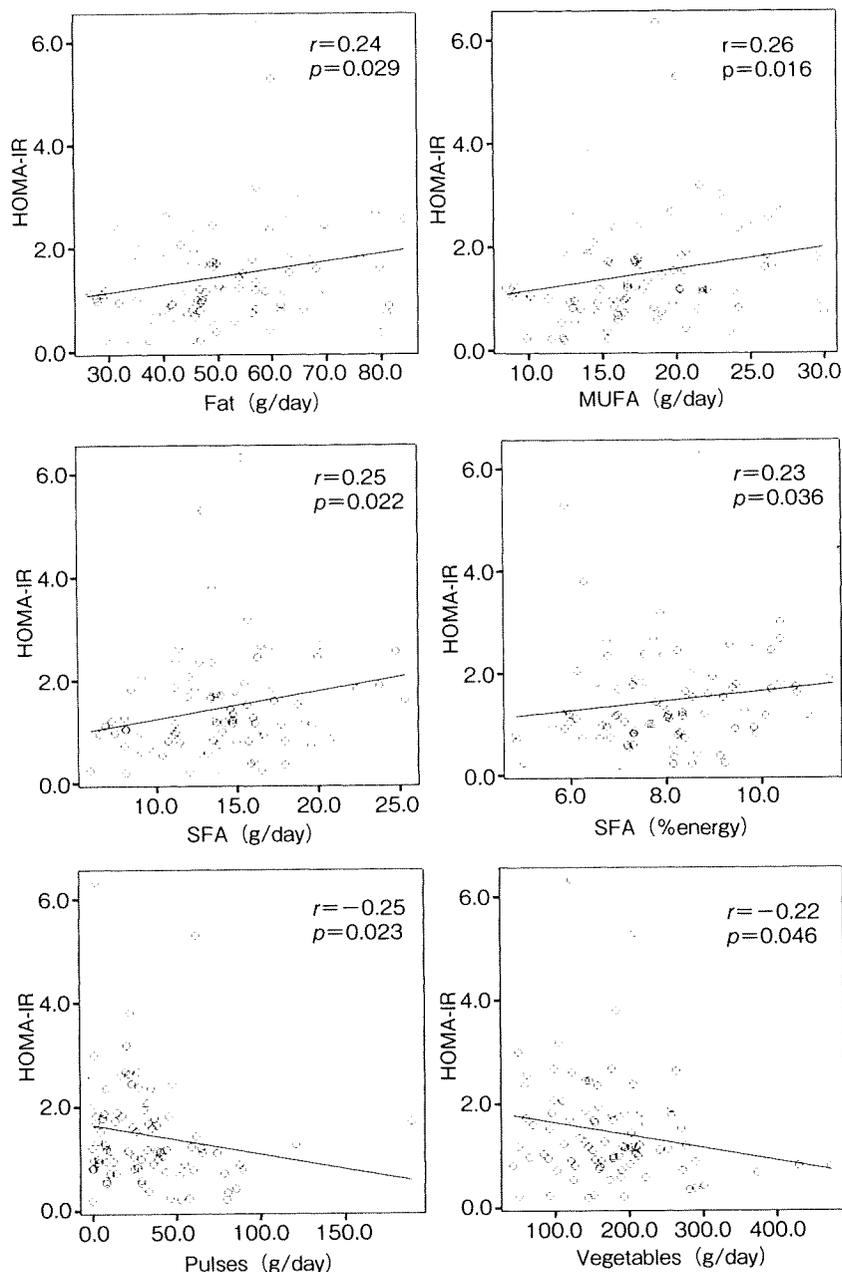


Fig. 1 Correlation between HOMA-IR and dietary factors in young Japanese women

60%). β カロテン当量は野菜類 ($r=0.70, p<0.01$), 調味料類 ($r=0.50, p<0.01$), 藻類 ($r=0.36, p<0.01$) と相関した. β カロテン当量を目的変数とした多変量解析では, 野菜類(正)が β カロテン当量の最大の規定因子であった(寄与率 56%). このほか, 豆類(正), 種実類(負)が規定因子にみられた(寄与率 60%).

考 察

本研究は若年女性におけるインスリン抵抗性について食事因子を中心に, 食事調査から得られた摂取栄養素, 摂取食品群のデータを用いて詳細な検討を行った. 栄養素との関連では, HOMA-IR は脂質, SFA,

MUFA の 1 日摂取量, SFA エネルギー比と正相関した. インスリン抵抗性はアディポサイトカインとの関連性も示されており, なかでもレプチン, PAI-1, アディポネクチンはインスリン抵抗性と関連深い⁹⁾. 多変量解析では, 体脂肪量とこれらのアディポサイトカインとは独立して HOMA-IR を規定する因子として SFA(正)と野菜類(負)が認められた. 栄養素における多変量解析では SFA 以外に β カロテン当量(負)が, 食品群における多変量解析では野菜類以外に乳類(正)も規定因子に認められた.

本研究では, SFA は乳類, 次いで肉類と正相関を認めた. 乳類は酪酸, ミリスチン酸, パルミチン酸,

Table 4 Anthropometric, biochemical, and dietary parameters stratified by insulin resistance after adjustment for body fat percentage

	Normal (n = 56)	Median (n = 17)	High (n = 12)
HOMA-IR	0.9±0.4	1.9±0.2	3.3±1.2
Body fat percent (%)	28.5±4.8	29.4±5.0	33.6±6.9
BMI (kg/m ²)	20.4±0.2	20.1±0.4	21.6±0.5 ^a
Fasting plasma glucose (mg/dl)	83.0±0.8	89.7±1.5 ^b	92.4±1.9 ^c
Fasting plasma insulin (μU/ml)	4.7±0.3	8.8±0.5 ^c	14.2±0.7 ^c
Plasminogen activator inhibitor-1 (ng/ml)	16.5±1.0	16.1±1.8	23.8±2.2 ^a
Energy (kcal)	1,533±43	1,478±78	1,859±97 ^a
Carbohydrate (g)	210.6±6.4	202.3±11.5	254.5±14.3 ^a
Fatty acid (g)	49.2±1.8	49.7±3.3	62.6±4.1 ^a
Saturated (g)	13.2±0.5	13.9±1.0	17.8±1.2 ^b
Monounsaturated (g)	16.8±0.7	17.5±1.2	21.5±1.5 ^a
Saturated (% energy)	7.7±0.2	8.4±0.3	8.8±0.4 ^a
Grain (g)	326.1±13.4	303.9±24.1	427.4±30.1 ^a
Milk · dairy products (g)	140.1±13.1	132.6±23.6	220.3±29.4 ^a

Mean±SE. Normal insulin resistance was defined as HOMA-IR<1.6 and high as ≥2.5, based on criteria in the 2007 Treatment Guide for Diabetes edited by the Japan Diabetes Society. a : p<0.05, b : p<0.01, c : p<0.001 versus Normal group

Table 5 Stepwise multiple logistic regression analysis for HOMA-IR

Model	r ²	β	SE (β)	p value
1	0.26			0.000
Body fat mass (kg)		0.0001	0.000	0.000
Saturated fatty acid (g)		0.065	0.023	0.006
Vegetables (g)		-0.003	0.001	0.020
2	0.25			0.000
Body fat mass (kg)		0.0001	0.000	0.000
Saturated fatty acid (g)		0.066	0.023	0.005
Beta carotene potency (μg)		-0.0002	0.000	0.023
3	0.27			0.000
Body fat mass (kg)		0.0001	0.000	0.000
Milk and/or dairy products (g)		0.003	0.001	0.003
Vegetables (g)		-0.003	0.001	0.007

Body fat mass measured using DXA, plasma levels of leptin, plasminogen activator inhibitor-1, and adiponectin were included in all models. In addition to the 3 variables, model 1 included all nutrients and all food, model 2 included all nutrients, and model 3 included all food

ステアリン酸等のSFAを多く含み、脂肪酸の中でもSFAの割合が比較的高い食品群である¹⁰⁾。一般にSFAと言えば肉類が想像されることが多いが、SFAの供給源として鶏卵、牛乳、精白米が上位を占めるとの報告もある¹¹⁾。乳類は若年女性の嗜好に合った、手軽に摂取し易い食品の1つと考えられるが、本研究の対象では国民栄養調査における同年代の女性に比べ、乳類の平均摂取量は1.5倍であった。インスリン抵抗性とSFAとの関係に関する報告として、中高年男性

におけるSFA摂取の増加は空腹時インスリン濃度の上昇と関連したとの報告がある¹²⁾。SFA食とMUFA食の割付け研究では、健康な中年男女においてMUFA食でインスリン感受性は変化しなかったが、SFA食でインスリン感受性が低下し、また、総脂質摂取量を抑えたうえでMUFA摂取を増すことの有益性が示されている¹³⁾。このほか、高SFA食はインスリン抵抗性を惹起し、脂質摂取がそう過大でない範囲において(脂質エネルギー比37%未満)、高MUFA

食のインスリン感受性への有益性も報告されている¹⁴⁾。これらの報告からも、インスリン抵抗性の抑制においては、脂質の摂取量を減らし脂質エネルギー比を下げ、かつ脂肪酸組成(脂肪酸の種類とその割合)も重要であり、SFAの摂取割合を下げるのが重要である。本研究でもHOMA-IRとSFAとの関係において、エネルギー比とともに正の関係が認められ、HOMA-IR 2.5以上のインスリン抵抗性群においてSFAの量、SFAエネルギー比ともに高値が認められた。したがって、若年女性においてもインスリン抵抗性の増大を防ぐためには、SFAの摂取の過剰に注意を払う必要があり、その摂取として乳類の過剰摂取に注意する必要があると思われる。なお、MUFAについて、本研究ではHOMA-IR 2.5以上の対象において体脂肪率調整後のMUFA摂取量が多いなど、HOMA-IRと正の関係を示唆する結果もみられたが、MUFAの効果は前述のように脂質の摂取を抑えた上での有益性が報告されている。本研究では平均脂質エネルギー比が29.2%と、18~29歳女性の目標量(20%以上30%未満)⁸⁾の上限値であった。また、脂質エネルギー比30%以上が、対象の44.7%に認められた。インスリン抵抗性の観点からみた日本人、若年女性における脂質エネルギー比の問題やMUFAの影響については、今後の検討が必要であると考えらる。

本研究では、若年女性において、HOMA-IRと野菜類との間に負の相関を認めた。先行研究では、アメリカ人女性(BMI 29未満)において、果物の摂取は糖尿病の発症リスクと関係しなかったが、野菜類の摂取と負の関係を認めた報告¹⁵⁾や、カロテノイドを多く含む野菜類や果物の摂取は糖尿病のハイリスク集団に対して予防的な役割をもつ報告がある¹⁶⁾。また、本研究では、HOMA-IRは β カロテン当量と負の相関を認めた。今回の β カロテン当量は、 β カロテンと α カロテンおよびクリプトキサンチンの β カロテン当量を合計したものである⁶⁾。2型糖尿病とカロテノイドとの関係について、先行研究では、フィンランドの中老年男女において、カロテノイド、その中でも β クリプトキサンチンの摂取が2型糖尿病の発症リスクの減少と相関したとの報告がある¹⁷⁾。フィンランドでのケースコントロールスタディでは、血清 α トコフェロールおよび β カロテンが高い者において、2型糖尿病の発症リスクが減少していた報告がある¹⁸⁾。日本においては、健康診断受診の中年男女において、HOMA-IRで評価したインスリン抵抗性と血清カロテノイドとの間に負の相関が認められている¹⁹⁾。

以上の所見は、非肥満の若年女性でみられたHOMA-IRと野菜類および β -カロテン当量との間における関係と一致するものと思われる。さらに本研究

では、野菜類が β カロテン当量の最大の供給源であり、野菜類の摂取の意義が高いことが示唆された。

カロテノイドのほか、食物成分で抗酸化作用を有し、2型糖尿病のリスク軽減に関係する成分としてビタミンE(トコフェロール)やビタミンCの報告があるが^{17,20)}、本研究ではビタミンE(α トコフェロール当量)およびビタミンCの摂取量と、インスリン抵抗性との間に有意な相関はみられなかった(順に $r=0.08$, $r=-0.05$)。また、今回は各種トコフェロール別(α , β , γ , δ トコフェロール)や抗酸化作用を持つポリフェノール等については未検討であり、インスリン抵抗性を軽減する食物成分として β カロテン以外の関与成分の可能性も考慮に入れるべきである。

本研究では、食事調査の手法として秤量食事記録(食物記録法)を用いた。この手法は食物摂取頻度調査の妥当性を検証するためのゴールドスタンダードとして推奨され²¹⁾、国民栄養調査にも用いられている。しかし、国民栄養調査の記録は1日のみである。本研究ではすべての曜日を含んだ7日間を詳細に調査した。一方、秤量食事記録の限界として、被験者の記録に対する負担感から食事内容の簡素化、過少報告等の可能性は否定できない²²⁾。また、今回インスリン抵抗性の指標に用いたHOMA-IRはグルコースクランプ法やミニマムモデルによって求められたインスリン感受性指数と有意に相関し、日常臨床および大規模研究においてもインスリン抵抗性を簡易に評価しうる非侵襲性の指標として広く用いられている²³⁾。しかし、インスリン抵抗性が過大または過小評価されることもあり^{24~26)}、HOMA-IRがインスリン抵抗性の絶対的指標ではないことも考慮に入れておく必要がある。

本研究では、平均BMIが 20.5 kg/m^2 の若年女性においても、体脂肪量はHOMA-IRを規定する独立因子であった。したがって、若年女性においてもインスリン抵抗性の増大を予防するには体脂肪のこれ以上の蓄積を予防することが重要であると思われる。食事では、乳類も考慮に入れたSFAの過剰摂取に注意を払い、 β カロテンの補給をふまえ、野菜類の積極的な摂取を含んだ食事療法が推奨される。

謝 辞

本研究にご協力頂きました武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科、戸矢崎美さん、深田瑠美さん、古川曜子さんに深謝致します。

本研究は、文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業(平成15年度~平成19年度)による私学助成を得て行われた。

文 献

- 1) 荒井秀典, 北 徹(2004) Metabolic syndrome 病態の理解と今後の展望について. 日内会誌 93:1-9
- 2) 島本和明(2004) Metabolic syndrome: 診断と治療の進歩 I. 疾患概念 2. 疫学. 日内会誌 93:642-647
- 3) Murakami K, Okubo H, Sasaki S(2005) Effect of dietary factors on incidence of type 2 diabetes: A systematic review of cohort studies. J Nutr Sci Vitaminol 51:292-310
- 4) 日本糖尿病学会編(2006) 糖尿病治療ガイド 2006-2007, 文光堂, 東京, p 10
- 5) Marilyn B(2003) 24 時間食事思い出し法と食物記録法. 食事調査のすべて栄養疫学第 2 版, 第一出版, 東京, p 54-81
- 6) 食品成分研究調査会編(2001) 五訂日本食品成分表. 医歯薬出版, 東京
- 7) 健康・栄養情報研究会編(2006) 厚生労働省平成 16 年国民健康・栄養調査報告, 第一出版, 東京, p 56, p 67
- 8) 厚生労働省策定(2005) 日本人の食事摂取基準 2005 年版, 第一出版, 東京
- 9) 下村伊一郎, 船橋 徹, 松澤佑治(2004) Metabolic syndrome: 診断と治療の進歩 II. 機序と病態 1. 肥満の役割—アディポサイトカインの産生異常—. 日内会誌 93:655-661
- 10) 香川芳子監修(2006) 五訂増補食品成分表 2007, 女子栄養大学出版部, 東京
- 11) 佐々木敏(2001) Evidence-based Nutrition EBN 栄養調査・栄養指導の実際. 医歯薬出版, 東京, p 33-45
- 12) Maron DJ, Fair JM, Haskell WL(1991) Saturated fat intake and insulin resistance in men with coronary artery disease. Circulation 84:2020-2027
- 13) Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Näslén C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH(2001) Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. Diabetologia 44:312-319
- 14) Lara-Castro C, Garvey WT(2004) Diet, insulin resistance, and obesity: zoning in on data for Atkins dieters living in South Beach. J Clin Endocrinol Metab 89:4197-4205
- 15) Colditz GA, Manson JE, Stampfer MJ, Rosner B, Willett WC, Speizer FE(1992) Diet and risk of clinical diabetes in women. Am J Clin Nutr 55:1018-1023
- 16) Ylönen K, Alftan G, Groop L, Saloranta C, Aro A, Virtanen SM, the Botnia Research Group(2003) Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. Am J Clin Nutr 77:1434-1441
- 17) Montonen J, Knekt P, Järvinen R, Reunanen A(2004) Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. Diabetes Care 27:362-366
- 18) Reunanen A, Knekt P, Aaran R-K, Aromaa A(1998) Serum antioxidants and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus. Eur J Clin Nutr 52:89-93
- 19) Sugiura M, Nakamura M, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Matsumoto H, Kato M, Ohshima M, Nagao A(2006) The homeostasis model assessment-insulin resistance index is inversely associated with serum carotenoids in non-diabetic subjects. J Epidemiol 16:71-78
- 20) Feskens EJ, Virtanen SM, Rasanen L, Tuomilehto J, Stengard J, Pekkanen J, Nissinen A, Kromhout D(1995) Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. Diabetes Care 18:1104-1112
- 21) Willett W, Lenart E(2003) 食物摂取頻度調査法の再現性と妥当性. 食事調査のすべて栄養疫学, 第 2 版, 第一出版, 東京, p 112-162
- 22) Marilyn B(2003) 24 時間食事思い出し法と食物記録法. 食事調査のすべて栄養疫学, 第 2 版, 第一出版, 東京, p 54-81
- 23) Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M(2000) Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetes Care 23:57-63
- 24) 小野利夫, 志賀伯弘, 種田嘉信, 梅村周香(1999) HOMA 指数の適用範囲について—インスリン抵抗性と空腹時血糖値の関係からの考察—. 糖尿病 42:1005-1011
- 25) Ferrara CM, Goldberg AP(2001) Limited value of the homeostasis model assessment to predict insulin resistance in older men with impaired glucose tolerance. Diabetes Care 24:245-249
- 26) 堺 弘治, 中丸和彦, 宮川克俊, 山口康平(2007) インスリン抵抗性の簡便な指標とその限界. 糖尿病 50:725-730

Abstract

Saturated Fat and Vegetable Intake Associated with Insulin Resistance in Young Japanese Women

Mari Honda^{*1}, Chigusa Date^{*1,2}, Bin Wu^{*1}, Kazuhisa Suzuki^{*1,2}, Keisuke Fukuo^{*1,2},
and Tsutomu Kazumi^{*1,2}

^{*1} Open Research Center for Studying Lifestyle-Related Diseases, School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan

^{*2} Department of Food Sciences and Nutrition, School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Japan

To determine whether diet is associated with obesity-independent insulin resistance, we studied how dietary content and caloric intake relate to insulin resistance in 85 women college students aged 18-22 years. Subjects were weighed daily during the seven-consecutive-day dietary assessment. Insulin resistance was measured using homeostasis model assessment (HOMA-IR) and body composition was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). Twelve (14%) of the 85 had HOMA-IR of ≤ 2.5 and consumed more energy, carbohydrates, protein, and fat—specifically, saturated fat—than did those with HOMA-IR of < 1.6 . In stepwise multiple regression analysis including all nutrients as independent variables, body fat mass, saturated fat, and beta carotene potency (inverse) were significant determinants of HOMA-IR independent of leptin, adiponectin, and plasminogen activator inhibitor-1. Dairy products and vegetables (inverse) were significant independent predictors of HOMA-IR in multiple regression analysis including all foods as independent variables. Our results suggest that vegetable intake should be increased and saturated fat (dairy product) intake decreased to lower insulin resistance in young women.

アポリポ蛋白 A-I, A-II, A-IV

Apolipoprotein A-I, A-II, A-IV

鹿住 敏¹ 芳野 原²**Key words** : HDL, コレステロール逆転送, 冠動脈疾患, アポリポ蛋白 A-I, A-II, A-IV

1. 概 説

HDL-コレステロール(HDL-C)は冠動脈疾患の独立した負の危険因子である¹⁾。HDL粒子のアポリポ蛋白の約70%はアポリポ蛋白(アポ)A-I, 20%はアポA-IIであり, 少量のアポA-IVも存在する(表1)。アポA-Iは肝および小腸で, アポA-IIは肝臓で, アポA-IVは主に小腸で合成される。

アポA-IはHDLの構造蛋白であり, lecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT)の活性化, 末梢組織からのコレステロールの引き抜き, HDL受容体のリガンドなど, コレステロールの逆転送系に重要な役割を果たしている。

アポA-IIの生理機能は, 不明な点が多い²⁾が, *in vitro*では肝性トリグリセリドリパーゼ

(HTGL)を活性化し, LCATを抑制する。HDL粒子にはアポA-IとアポA-IIの両者を有する粒子(LpA-I/A-II)と, アポA-Iのみを有する粒子(LpA-I)の2種類が存在する。コレステロール逆転送機能の主体はLpA-Iに存在するので, アポA-IIはこの2つの粒子間のアポA-I分布を決定することにより, 間接的にHDLの機能を調節していると考えられる。

脂肪摂取に伴うカイロミクロン産生により小腸細胞で合成, 分泌されるアポA-IVの生理的な役割も明らかではない³⁾。*in vivo*の研究で, アポA-IVは, アポA-IがもつLCAT活性化能の約20-40%の能力をもつことが示されている。また, マウスアポA-IVを過剰発現させたマウスでは, アポA-IVが動脈硬化を抑制することが示されている。

表1 アポリポ蛋白 A-I, A-II, A-IVの概要

アポリポ蛋白	主な機能	存在する主なリポ蛋白	主な生成部位
A-I	LCATの活性化, HDLの構造維持 HDL受容体に対するリガンド	HDL, カイロミクロン	肝臓, 小腸
A-II	不明	HDL	肝臓 >> 小腸
A-IV	LCATの活性化, コレステロール逆転送促進 小腸から視床下部への満腹シグナル(?)	HDL, カイロミクロン	小腸

¹Tsutomu Kazumi: Department of Food Sciences and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University 武庫川女子大学生活環境学部 食物栄養学科 ²Gen Yoshino: Department of Diabetes, Metabolism and Endocrinology, School of Medicine, Toho University(Oomori) 東邦大学医学部 内科学(大森) 糖尿病・代謝・内分泌科

2. 検査の目的

アポ A-I は HDL-C とともに冠動脈疾患の負の危険因子であり、冠動脈疾患をはじめとする動脈硬化性疾患の予防・進展抑制の指標となる。アポ A-I は HDL-C と強い相関があり(正常健常者で相関係数 0.8-0.9)、アポ A-I の測定は HDL を含めたりポ蛋白代謝、特にコレステロールの逆転送系の理解に役立つ。

血清アポ A-II の 90% 以上は HDL と結合しているが、HDL-C との相関は、アポ A-I より弱い(正常健常者で相関係数 0.4-0.5)。アポ A-II は単独で測定するのではなく、HDL-C、アポ A-I などと合わせて測定することによって、HDL 粒子の質的変化、機能的変化をより明らかにできる。

アポ A-IV は一般臨床では測定できない。また、その臨床的な意義も確立されていない。

3. 試料の採取方法、保存条件

アポ A-I とアポ A-II は食事摂取には大きく影響を受けないが、12 時間以上の絶食後の空腹時に採血し、血清または血漿の形で保存する。測定値は血清および血漿でほとんど差がない。4℃ 保存では 14 日以内に測定しなければならないが、-20℃ 保存では 28 日以上経過した後でも著しい測定値の変動は認められない。

4. 測定法

血中濃度の測定には多くの免疫化学的測定法があるが、国際的にはアポ A-I とアポ B を除いてまだ標準化されていない。アポ A-I とアポ A-II の測定は免疫比濁法(TIA)⁴⁾が主に用いられている。アポ A-IV の測定法³⁾としては、定量的免疫電気泳動法(ロケット法)、酵素免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)、ラジオイムノアッセイ(radioimmunoassay: RIA)がある。

5. 基準値(表 2)

アポ A-I の基準値は男性で 100-150 mg/dL、女性で 120-180 mg/dL である。アポ A-II は男

表 2 アポリポ蛋白 A-I, A-II, A-IV の健常成人における基準値

アポリポ蛋白	基準値	男性	女性
A-I(mg/dL)	男性: 100-150 女性: 120-180	128±24	141±23
A-II(mg/dL)	20-40	30.5±5.5	30.1±5.1
A-IV(mg/dL)		14.6±4.2(全体)	

平均 ± 標準偏差。

女とも 20-40 mg/dL である。健常成人におけるアポ A-I の平均値⁴⁾は男性より女性が高いが、アポ A-II の平均値⁴⁾は男女差が認められない。空腹時ヒト血漿アポ A-IV 濃度は平均約 15 mg/dL である^{5,6)}。

6. 生理的変動(測定に影響を及ぼす因子)

HDL の主要な構成蛋白であるアポ A-I は、HDL-C の変動と同様に变化する。すなわち、アポ A-I の血中濃度は思春期以後、女性が男性に比べ高値である(表 2)⁴⁾。また、高脂肪食でアポ A-I は上昇し、高糖質食で低下する。喫煙、身体活動の低下と体重の増加によりアポ A-I は低下し、禁煙、有酸素運動と体重減少により上昇する。季節変動、加齢による変動も明らかではない。

アポ A-II は、アポ A-I と異なり、性差は認めない。加齢による変動も認められない。慢性アルコール飲酒者(肝機能正常者)では、アポ A-I と比較してアポ A-II の上昇率が高い。また、フィブラート投与により血清アポ A-I とアポ A-II 濃度は上昇する。

7. 異常値を示す疾患

アポ A-I は HDL-C と同様に冠動脈疾患の独立した危険因子である。また、血清アポ A-I、A-II と HDL-C を測定することにより、多様な HDL 粒子の変化を明らかにし、更にリポ蛋白異常の特徴を明らかにすることができる。アポ A-I と A-II は、HDL と正の相関および血清トリグリセリドと負の相関を示し、コレステロール逆転送系を反映して、冠動脈疾患で低下する。

家族性複合型高脂血症(FCH)⁷⁾において、HDL-Cが低値にもかかわらず、血清アポA-IIの高値が報告された。FCHは、脂質代謝異常(高TG, 低HDL, 高アポB)のみならず、メタボリックシンドロームの特徴を数多く備えており、冠動脈疾患患者に多く認められる。FCHにおけるアポA-IIの有意の予知因子は血清TGであった⁷⁾。一方、アポA-IIが冠動脈疾患の独立した負の危険因子であることが最近報告された⁸⁾。アポA-IIのアテローム硬化に与える影響はいまだ確立されていない。

アポA-IとA-IIが高値を示す疾患には、原発性高HDL血症、CETP欠損症、HTGL欠損症、原発性胆汁性肝硬変の一部がある。アポA-IとA-IIの中等度低値は、高トリグリセリド血症、種々の肝疾患(急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、閉塞性黄疸)、コントロール不良の糖尿病、腎不全、薬物(プロブコール)でみられる。高度低値を示す疾患には、それぞれのアポリポ蛋白欠損症、LCAT欠損症、フィッシュ・アイ病、Tangier病がある。

アポA-IVがごく初期の腎機能障害で増加し⁵⁾、慢性腎臓病の進行の独立した予知因子であることが報告された⁶⁾。一方、大血管障害を合併する2型糖尿病患者⁹⁾においてアポA-IVの高値が、冠動脈疾患において低値¹⁰⁾が報告された。前者は2型糖尿病における腎機能障害を反映しているものと推察される。

血清アポA-IVは長鎖脂肪酸摂取、特に不飽

和脂肪酸により、著明に増加する¹¹⁾。しかし、中鎖脂肪酸ではほとんど増加しない。また、血清アポA-IVは、脂肪吸収障害(無 β リポ蛋白血症、低 β リポ蛋白血症、慢性膵炎など)において著明に減少する。動物実験での成績ではあるが、アポA-IVは消化管由来の満腹因子の一つである¹²⁾。重症肥満でみられる食欲の亢進が胃バイパス術後に消失し、このとき血清アポA-IVの著明な増加が体重の減少に伴って報告された¹³⁾。

種々の疾患に伴う2次性の低下に対しては、原因疾患の治療をするが、高度のものはほとんどが遺伝性疾患に伴うもので、現在のところは診断にとどまる。

8. 関連検査項目

アポA-IとA-IIはHDLの構成蛋白であるので、HDL-C、LCAT活性、CETP活性とともにトリグリセリドを同時に測定する。また、中等度までの低値を示す場合には肝機能検査を、高度な高・低値を示す場合には関連する蛋白・酵素についての家系調査も併せて検査するべきである。

アポB/A-I比がリポ蛋白の脂質やLDL/HDL比より簡潔で、精度の高い新しい危険因子であることが判明した¹⁴⁾。すなわち、この比が高ければ高いほど冠動脈疾患のリスクが高いといえる。

■ 文献

- 1) Rader DJ: Am J Cardiol 92(4A): 42J-49J, 2003.
- 2) Tailleux A, et al: Atherosclerosis 164: 1-13, 2002.
- 3) Stan S, et al: Biochim Biophys Acta 1631: 177-187, 2003.
- 4) 野間昭夫ほか: Therapeutic Res 9: 1134-1138, 1988.
- 5) Kronenberg F, et al: J Am Soc Nephrol 13: 461-469, 2002.
- 6) Boes E, et al: J Am Soc Nephrol 17: 528-536, 2006.
- 7) Allayee H, et al: Circ J 92: 1262-1267, 2003.
- 8) Birjmohun RS, et al: Circulation 116: 2029-2035, 2007.
- 9) Verges BL, et al: Diabetes 46: 125-132, 1997.
- 10) Kronenberg F, et al: J Am Coll Cardiol 36: 751-757, 2000.
- 11) Kratz M, et al: J Nutr 133: 1821-1825, 2003.
- 12) Tso P, et al: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 286: G885-G890, 2004.
- 13) Culnan DM: Obesity (Silver Spring) 17: 46-52, 2009.
- 14) Walldius G, Jungner I: J Intern Med 259: 493-519, 2006.

Pleiotropic Effects of Mitiglinide in Type 2 Diabetes Mellitus

H KONYA, M MIUCHI, K KONISHI, E NAGAI, T UHEYAMA, Y KUSUNOKI, Y KIMURA, Y NAKAMURA, T ISHIKAWA, C INOKUCHI, T KATSUNO, T HAMAGUCHI, J MIYAGAWA AND M NAMBA

Division of Diabetes and Metabolism, Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Hyogo, Japan

This study investigated the effects of mitiglinide in 16 patients with type 2 diabetes mellitus treated with 30 mg/day mitiglinide, divided into three doses given just before each meal, for approximately 12 months. A 450 kcal meal tolerance test was performed at baseline and after 3, 6 and 12 months, and levels of plasma glucose and immunoreactive insulin were measured. Various parameters of glucose metabolism and lipid metabolism, urinary albumin and markers of atherosclerosis, coagulation and fibrinolysis were also determined. Mitiglinide showed a rapid stimulatory

effect on insulin secretion and reduced the levels of plasma glucose. The free fatty acid level significantly decreased at 60 min after the meal tolerance test. Mitiglinide also significantly lowered glycosylated haemoglobin and raised 1,5-anhydroglucitol after 6 months, and significantly decreased urinary albumin after 12 months. These data indicate that mitiglinide may have beneficial effects not only on glycaemic control but also on lipid metabolism and urinary albumin excretion, and may have a role in the prevention of the vascular complications of diabetes.

KEY WORDS: TYPE 2 DIABETES MELLITUS; MITIGLINIDE; MEAL TOLERANCE TEST; GLYCAEMIC CONTROL; LIPID METABOLISM; URINARY ALBUMIN

Introduction

Patients with diabetes mellitus are at increased risk from cardiovascular-related morbidity and mortality compared with healthy individuals.¹ An association between the post-prandial state of metabolism and atherogenesis has been demonstrated^{2,3} and has also been observed in patients with diabetes mellitus.^{4,5} It has been suggested that post-prandial

hyperglycaemia may be an independent risk factor for cardiovascular disease.⁶ Moreover, large-scale clinical trials such as the Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe (DECODE) study have shown that post-prandial hyperglycaemia is a risk factor for arteriosclerosis, independent of other risk factors such as hypertension and hyperlipidaemia.^{7,8} In the Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (STOP-NIDDM), treatment with an α -glucosidase inhibitor in patients with

This work was presented in part at the 67th Conference of the American Diabetes Association held in Chicago, Illinois, USA, on 22 – 26 June 2007.

impaired glucose tolerance not only reduced conversion to type 2 diabetes, but was also associated with a reduction in the risk of a cardiovascular event.⁹ These results indicate the importance of treatment of post-prandial hyperglycaemia in the early stages of diabetes mellitus. Although sulphonylureas have been commonly used for the treatment of diabetes mellitus, they do not act rapidly enough to increase glucose-stimulated insulin secretion after a meal and are, therefore, insufficient to control post-prandial hyperglycaemia. Since it has been shown that sulphonylureas can easily cause prolonged hypoglycaemia and weight gain, they must be used carefully in the early stages of type 2 diabetes mellitus.^{10,11}

Mitiglinide calcium hydrate, a derivative of benzylsuccinic acid, closes ATP-dependent K⁺ channels by selectively binding to the sulphonylurea receptor on pancreatic β -cells, which leads to opening of the voltage-dependent calcium channels and induces insulin secretion.¹² The pharmacokinetic properties of mitiglinide include rapid absorption and elimination. Thus mitiglinide provokes a rapid and short-acting insulin secretion that improves post-prandial hyperglycaemia, mimicking normal physiological insulin secretion and glucose metabolism in healthy individuals. Due to its shorter duration of action, mitiglinide has a low risk of hypoglycaemia compared with other insulin secretagogues.¹³ Moreover, it has been reported that the suppression of post-prandial hyperglycaemia with mitiglinide prevents post-prandial increases in oxidative stress and markers of inflammation in patients with diabetes mellitus.¹⁴ In the present study in patients with type 2 diabetes mellitus, the effects of mitiglinide on fasting and post-prandial plasma glucose were investigated together with its pleiotropic actions on

various parameters of lipid metabolism and urinary albumin excretion, and on markers of atherosclerosis, coagulation and fibrinolysis.

Patients and methods

PATIENTS

Patients with type 2 diabetes mellitus who were routinely and regularly attending the Diabetes Clinic of Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan, were recruited to the study between November 2004 and March 2006. The study protocol was approved by the Institutional Review Board of Hyogo College of Medicine and written informed consent was obtained from all the study participants.

MITIGLINIDE TREATMENT

Each patient received 30 mg/day mitiglinide, divided into three doses given just prior to each meal, for approximately 12 months. Patients continued on their usual treatment/diet and exercise during the course of the study. No additions or changes to other hypoglycaemic agents, antihypertensive agents, antiplatelet agents or antilipidaemic agents were made during the study period.

ASSESSMENTS

Meal tolerance tests using meals providing 450 kcal of energy, of which 50% was carbohydrate, 35% fat and 15% protein, were performed at baseline and after 3, 6 and 12 months. Patients were required to fast from 21:00 h on the day before each meal tolerance test. For each test, plasma levels of fasting glucose, and 30 and 60 min post-prandial plasma glucose levels, immunoreactive insulin (IRI) and free fatty acids (FFAs) were determined. In addition, the following variables were measured before and after mitiglinide treatment using

standard laboratory techniques: body weight; body mass index (BMI); waist girth; waist-hip ratio; body fat composition; blood pressure; glycosylated haemoglobin (Hb_{A1c}); 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG); homeostasis model assessment insulin resistance index (HOMA-R) and homeostasis model assessment β -cell function (HOMA- β);¹⁵ plasma levels of total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), adiponectin, tumour necrosis factor- α (TNF- α), plasminogen-activator inhibitor type 1 (PAI-1), advanced glycation end-product (AGE; carboxymethyl lysine), receptor for AGE (RAGE), fibrinogen; and urinary albumin excretion. The levels of TNF- α , PAI-1, AGE and RAGE were measured using either a latex photometric immunoassay kit or enzyme-linked immunosorbent assay kit (SRL Inc., Tokyo, Japan), according to the manufacturer's instructions.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as the mean \pm SE. The Wilcoxon signed-ranks test was used to compare differences from baseline in all study measurements at 3, 6 and 12 months post-treatment. Multiple regression analysis was performed to assess the combined influence of variables on changes in urinary albumin and 60-min post-prandial FFA levels in patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months. A *P*-value $<$ 0.05 was considered to be statistically significant. All the statistical analyses were performed using StatView J-5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

A total of 16 patients with type 2 diabetes mellitus were included in the study. Their

characteristics and laboratory parameters at baseline are given in Table 1.

Treatment with mitiglinide for 12 months significantly reduced 30 and 60 min post-prandial plasma glucose levels from 203.0 ± 8.2 to 186.0 ± 8.4 mg/dl ($P < 0.05$) and from 241.9 ± 7.3 to 205.8 ± 10.6 mg/dl ($P < 0.005$), respectively (Fig. 1A). In addition, mitiglinide therapy significantly increased 30 and 60 min post-prandial IRI levels from 14.6 ± 2.0 to 31.1 ± 5.0 μ U/ml ($P < 0.001$) and from 21.4 ± 3.2 to 28.2 ± 3.6 μ U/ml ($P < 0.05$), respectively (Fig. 1B). Statistically significant improvements in Hb_{A1c} and 1,5-AG were observed after 3 and 6 months of treatment; however, these levels showed only a tendency for improvement after 12 months (Hb_{A1c} $7.5 \pm 0.2\%$ compared with $7.0 \pm 0.2\%$; 1,5-AG 6.1 ± 1.1 μ g/ml compared with 8.9 ± 1.6 μ g/ml) (Fig. 2).

No significant changes were observed in body weight, BMI, waist girth, waist-hip ratio, body fat composition or systolic and

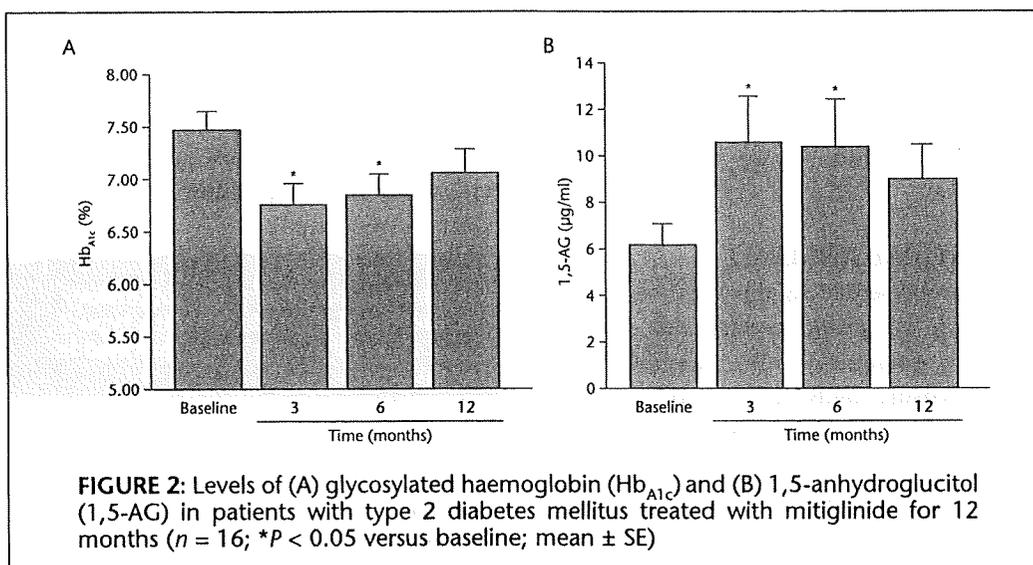
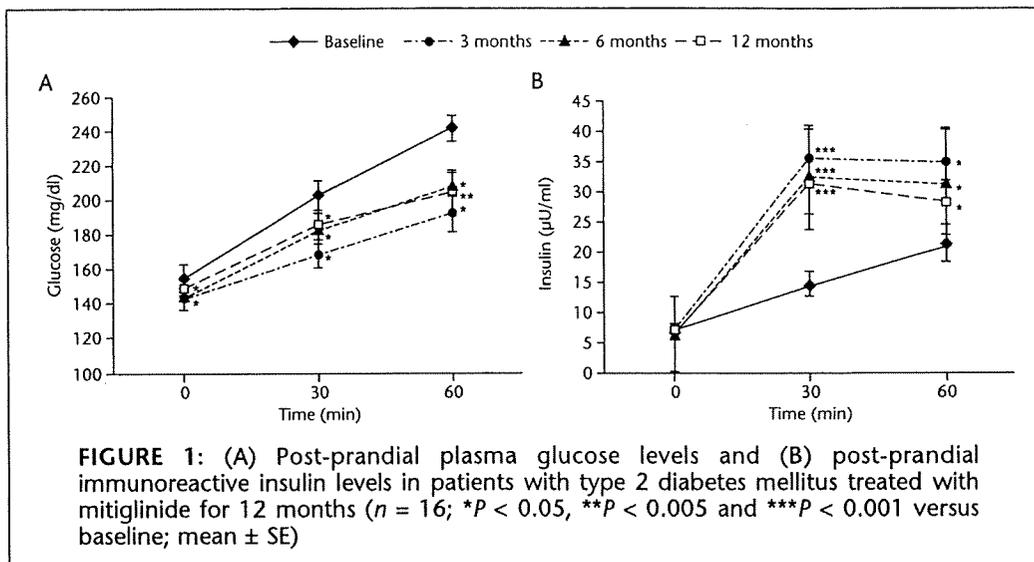
TABLE 1:
Baseline characteristics and laboratory parameters of the patients with type 2 diabetes mellitus who were included in the study (*n* = 16)

Age (years)	64.8 \pm 2.0
Sex	
Male	12
Female	4
BMI (kg/m ²)	23.3 \pm 1.0
Duration of diabetes (years)	9.7 \pm 2.4
Hb _{A1c} (%)	7.5 \pm 0.2
FPG (mg/dl)	155.3 \pm 8.3
PPG (1 h)	241.9 \pm 7.3
IRI (μ U/ml)	6.8 \pm 1.2
FFA (mEq/l)	0.78 \pm 0.06
Urinary albumin (mg/g creatinine)	27.7 \pm 7.2

Values are expressed as the mean \pm SE or number of patients.

BMI, body mass index; Hb_{A1c}, glycosylated haemoglobin; FPG, fasting plasma glucose; PPG, post-prandial glucose; IRI, immunoreactive insulin; FFA, free fatty acid.

H Konya, M Miuchi, K Konishi *et al.*
Pleiotropic effects of mitiglinide



diastolic blood pressure after 12 months of treatment with mitiglinide (Table 2).

No significant changes were observed in fasting serum lipid levels (total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol and FFAs) (Table 3; Fig. 3A), whereas the 60 min post-prandial FFA level was significantly reduced from 0.52 ± 0.06 to 0.30 ± 0.03 mEq/l ($P < 0.01$) after 12 months of treatment with

mitiglinide (Fig. 3B). Urinary albumin excretion was also significantly reduced from 27.7 ± 7.2 at baseline to 20.7 ± 5.4 mg/g creatinine at 12 months ($P < 0.05$) (Fig. 4). After 12 months of treatment, HOMA-R was reduced from 2.6 ± 0.5 to 2.3 ± 0.4 , and HOMA- β was increased from 29.7 ± 6.2 to 33.4 ± 11.5 ; however, these changes were not statistically significant (Table 4). Treatment

TABLE 2:
Body weight and blood pressure parameters of the patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months ($n = 16$)

Parameter	Baseline	After mitiglinide treatment
Body weight (kg)	60.7 ± 2.4	61.6 ± 2.1
Body mass index (kg/m ²)	23.3 ± 1.0	23.7 ± 1.0
Waist girth (cm)	82.9 ± 2.4	82.8 ± 2.0
Waist-hip ratio	0.92 ± 0.01	0.93 ± 0.01
Body fat composition (%)	24.1 ± 2.4	24.6 ± 1.8
Systolic blood pressure (mmHg)	125.6 ± 4.9	122.4 ± 4.3
Diastolic blood pressure (mmHg)	72.4 ± 3.2	70.2 ± 3.2

Values are expressed as the mean ± SE.

No statistically significant between-group differences were found for any of the parameters ($P > 0.05$; Wilcoxon signed-ranks test).

TABLE 3:
Fasting serum lipid levels in the patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months ($n = 16$)

Parameter	Baseline	After mitiglinide treatment
Total cholesterol (mg/dl)	219.1 ± 8.3	222.9 ± 10.6
Triglycerides (mg/dl)	117.4 ± 13.7	119.1 ± 12.5
HDL-cholesterol (mg/dl)	58.3 ± 3.6	58.6 ± 3.8
Free fatty acids (mEq/l)	0.78 ± 0.06	0.72 ± 0.07

Values are expressed as the mean ± SE.

No statistically significant between-group differences were found for any of the parameters ($P > 0.05$; Wilcoxon signed-ranks test).

HDL, high density lipoprotein.

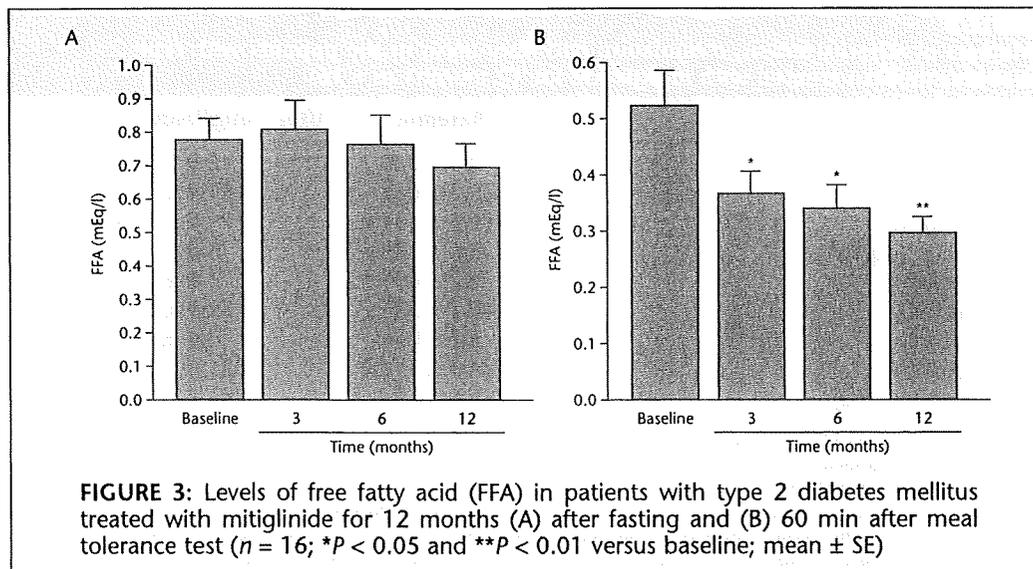
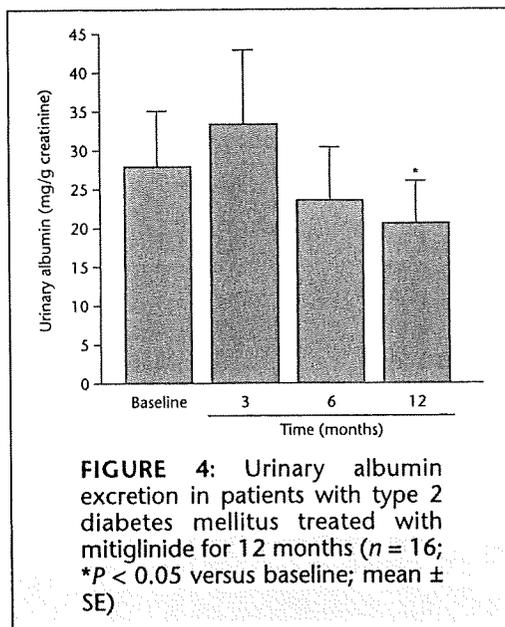


FIGURE 3: Levels of free fatty acid (FFA) in patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months (A) after fasting and (B) 60 min after meal tolerance test ($n = 16$; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus baseline; mean ± SE)



with mitiglinide for 12 months decreased levels of hs-CRP, TNF- α , PAI-1, RAGE and fibrinogen, and increased levels of adiponectin and AGE; however, none of these changes was statistically significant (Table 4).

Multiple regression analysis was used to

determine the effect of variables such as HOMA-R, PAI-1 and AGE at baseline on changes in the 60 min post-prandial FFA level and urinary albumin excretion after 12 months of treatment with mitiglinide. The results showed that the 60-min post-prandial FFA level was reduced most commonly in patients with a lower PAI-1 or AGE level at baseline (Table 5) and that urinary albumin excretion was improved most commonly in patients with a higher HOMA-R and lower PAI-1 levels at baseline (Table 6). No serious hypoglycaemia was observed during the study period.

Discussion

In the present study, mitiglinide therapy resulted in a statistically significant reduction in post-prandial hyperglycaemia by significantly increasing glucose-stimulated insulin secretion after a meal without causing serious hypoglycaemia. It has been previously reported that mitiglinide reduces post-prandial hyperglycaemia by improving early insulin secretion in type 2 diabetes patients, mimicking normal

TABLE 4: Markers of atherosclerosis, coagulation and fibrinolysis in the patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months ($n = 16$)

Marker	Baseline	After mitiglinide treatment
HOMA-R	2.6 \pm 0.5	2.3 \pm 0.4
HOMA- β	29.7 \pm 6.2	33.4 \pm 11.5
hs-CRP (ng/ml)	1316.5 \pm 581.9	719.6 \pm 108.8
Adiponectin (μ g/ml)	8.6 \pm 1.0	8.8 \pm 1.1
TNF- α (pg/ml)	2.2 \pm 0.7	1.8 \pm 0.2
PAI-1 (ng/ml)	40.7 \pm 5.7	39.9 \pm 3.5
AGE (mU/ml)	3.2 \pm 0.2	3.4 \pm 0.3
RAGE (pg/ml)	1124.9 \pm 113.0	1025.6 \pm 101.2
Fibrinogen (mg/ml)	285.5 \pm 19.5	281.7 \pm 13.8

Values are expressed as the mean \pm SE.

No statistically significant between-group differences were found for any of the parameters ($P > 0.05$; Wilcoxon signed-ranks test).

HOMA-R, homeostasis model assessment insulin resistance index; HOMA- β , homeostasis model assessment β -cell function; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; PAI-1, plasminogen activator inhibitor; AGE, advanced glycation end-products; RAGE, receptor for AGE.

Pleiotropic effects of mitiglinide

TABLE 5:
Multiple regression analysis of changes in levels of 60-min post-prandial free fatty acids in the patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months (*n* = 16)

Independent variable	β	SE	Standardized β	Statistical significance ^a
PAI-1	0.006	0.002	0.541	<i>P</i> = 0.0224
AGE	0.123	0.053	0.486	<i>P</i> = 0.0369

^aMultiple regression analysis was performed in order to assess the combined influence of variables on changes in levels of 60-min post-prandial free fatty acids in patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months. For independent variables, the baseline values were used; for dependent variables, the change in 60-min post-prandial free fatty acids after 12 months' mitiglinide therapy was used. PAI-1, plasminogen-activator inhibitor type 1; AGE, advanced glycation end-products.

TABLE 6:
Multiple regression analysis of changes in levels of urinary albumin in the patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months (*n* = 16)

Independent variable	β	SE	Standardized β	Statistical significance ^a
HOMA-R	-5.681	1.195	-0.737	<i>P</i> = 0.0005
PAI-1	0.250	0.094	0.407	<i>P</i> = 0.0212

^aMultiple regression analysis was performed to assess the combined influence of variables on changes in levels of urinary albumin in patients with type 2 diabetes mellitus treated with mitiglinide for 12 months. For independent variables, the baseline values were used; for dependent variables, the change in urinary albumin after 12 months' mitiglinide therapy was used.

HOMA-R, homeostasis model assessment insulin resistance index; PAI-1, plasminogen-activator inhibitor type 1.

physiological insulin secretion.¹⁶ In addition, due to its shorter duration of action, mitiglinide is less likely to cause hypoglycaemia.¹³ In the present study, Hb_{A1c} and 1,5-AG levels were significantly improved up to 6 months after initiation of treatment; however, these statistically significant improvements were not maintained at 12 months of treatment.

Sulphonylurea agents, which stimulate basal insulin secretion for long periods, often cause weight gain.^{10,11} In contrast, because it stimulates rapid and short-lasting insulin secretion, 12 months of treatment with mitiglinide induced little change in body weight, BMI, waist girth, waist-hip ratio and body fat composition.

Previously, the effect of a glinide on post-prandial hyperlipidaemia, as well as hyperglycaemia, was investigated in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, a

model of spontaneous type 2 diabetes in which early insulin secretion is impaired. The results indicated that an increase in early post-prandial insulin secretion induced by glinides improved not only post-prandial hyperglycaemia but also post-prandial hyperlipidaemia.^{17,18} The clinical effects of nateglinide, which also produces rapid insulin secretion, on post-prandial hyperlipidaemia have been reported.¹⁹ No statistically significant changes in fasting total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol or FFAs were observed after 12 months of treatment with mitiglinide in the present study, whereas there was a statistically significant decrease in 60-min post-prandial FFAs, suggesting that this drug may reduce lipotoxicity. FFAs may cause or aggravate type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome via inhibition of insulin action in insulin-sensitive organs such as