

# DPP-IV 阻害薬 Vildagliptin による膵β細胞保護作用の分子機構の解明 ～2型糖尿病モデルおよび非糖尿病コントロールマウスを用いた検討

濱本 純子

川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 DPP-IV 阻害薬による耐糖能改善, 膵β細胞機能障害進展阻止作用が明らかになっているが, その分子機構については不明な点が多い. 本研究は, DPP-IV 阻害薬による膵β細胞保護効果の分子機構を明らかにするために, 糖尿病モデル KKA<sup>y</sup>-TaJcl (KKA<sup>y</sup>) マウスと非糖尿病モデル C57BL/6J (B6) マウスを用いて, 生化学的や組織学的検討に加え, 膵β細胞特異的な遺伝子発現の網羅的解析を行った. 8週齢雄性の両モデルマウスを, それぞれ Vildagliptin 投与群と非投与群の2群に分けて4週間介入した. 遺伝子発現は LCM 法により取り出した膵ラ氏島コア領域サンプルを用いて, Real timeRT-PCR 法により解析した. KKA<sup>y</sup>, B6ともに, 介入期間中の摂餌量, 体重および介入終了後の空腹時血糖値, 血中インスリン値, 血中グルカゴン値, 活性型 GLP-1値は, Vildagliptin 投与の有無で差を認めなかった. KKA<sup>y</sup> の血中中性脂肪値, 膵ラ氏島中性脂肪含量およびインスリン感受性は Vildagliptin 投与群で有意な改善を認めた. 経口糖負荷試験でみた耐糖能は vildagliptin を投与した KKA<sup>y</sup> で有意に改善し, インスリン分泌増加を伴っていた. 糖負荷後の活性型 GLP-1血中レベルは, 両マウスとも Vildagliptin 投与で有意に高値を示した. 膵ラ氏島のインスリン含量および高濃度グルコース応答性インスリン分泌反応, 膵β細胞重量は Vildagliptin 投与によって有意に増加した. 遺伝子発現解析の結果, KKA<sup>y</sup>, B6ともに, Vildagliptin 投与群で分化増殖関連遺伝子発現の有意な増加を認めた. 一方, 酸化ストレス関連遺伝子発現の増加, 小胞体ストレスおよびアポトーシス誘導遺伝子発現の低下, 抗アポトーシス関連遺伝子発現の増加を Vildagliptin 投与 KKA<sup>y</sup> マウスでのみ認めた. 膵ラ氏島を用いた免疫染色の結果は, 遺伝子解析結果と良く一致していた. DPP-IV 阻害薬のβ細胞保護効果の分子機構として, 活性型 GLP-1増加による GLP-1シグナル増強が, 直接的な細胞の分化・増殖促進効果と, 糖脂質代謝改善による間接的なβ細胞の酸化ストレス, 小胞体ストレスの軽減, アポトーシス抑制効果をもたらす可能性が示唆された.

(平成23年10月22日受理)

キーワード: DPP-IV 阻害薬, 膵β細胞, 小胞体ストレス, 酸化ストレス, 糖脂肪毒性

## 緒言

2型糖尿病の主な病態は, インスリン抵抗性と膵β細胞機能障害によるインスリン分泌不全である. これら病態は発症前から, すでに進

展がみられ, 膵β細胞機能は, 糖尿病の診断時点で, 約50%まで低下するとの報告もある<sup>1)</sup>. また経年的な病態進展に一致して, β細胞量の減少が確認されている<sup>2)</sup>. 慢性的な細胞量減

別刷請求先  
濱本 純子  
〒701-0192 倉敷市松島577  
川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学

電話: 086 (462) 1111  
ファックス: 086 (464) 1046  
Eメール: sumiko@med.kawasaki-m.ac.jp

少に起因する膵β細胞機能障害の進展は疾患の長期管理に多大な影響を及ぼす。慢性的な高血糖の存在、すなわち糖毒性が、その進展要因として重要視されている<sup>3)</sup>。従って、血糖降下薬作用を持つ薬剤による介入は、糖毒性を軽減し、膵β細胞機能保持に働く可能性が有る。

一方、既存の血糖降下薬の中でもチアゾリジン誘導体であるピオグリタゾン<sup>4, 5)</sup>は、血糖降下作用に加えて、直接的に膵β細胞機能保持に働く可能性が報告されてきた<sup>4, 5)</sup>。さらに、最近、臨床応用が可能になったインクレチン関連薬が、膵β細胞量を増加させる可能性を示唆する報告がなされ<sup>6)</sup>、2型糖尿病の病態改善に寄与するものと注目されている。

インクレチンは、食事摂取に伴い、消化管から分泌され、膵β細胞からインスリン分泌を促進するホルモンの総称であり、上部小腸のK細胞から分泌される glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) と小腸下部や大腸のL細胞から分泌される Glucagon-like peptide1 (GLP-1) が知られている。GIPとGLP-1は、膵作用として、血糖依存性のインスリン分泌促進効果<sup>7, 8)</sup>を発揮するとともに、動物レベルであるが、膵β細胞の複製、新生、分化促進作用やアポトーシス抑制作用が報告されている<sup>9-12)</sup>。さらにGLP-1による抗糖尿病作用として、グルカゴン分泌抑制作用<sup>13, 14)</sup>や胃内容排泄遅延作用<sup>15)</sup>が知られている。

インクレチンは、生体内に存在する dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) により、速やかに分解されるため臨床応用には難があった。近年、DPP-IV 活性を阻害し、インクレチン効果を高める血糖降下薬として数種類の DPP-IV 阻害薬が登場し、経口投与可能なインクレチン関連薬として使用頻度が急速に高まっている。DPP-IV 阻害薬による抗糖尿病作用は、内因性 GIP および GLP-1 濃度の上昇によって発揮される<sup>6, 16)</sup>。従って、DPP-IV 阻害薬の効果はインクレチン作用によるものと考えられるが、近年、Sitagliptin や Alogliptin による糖尿病モデル動物の膵β細胞量増加効果を示唆する報告<sup>17, 18)</sup>が

なされ、DPP-IV 阻害薬による膵β細胞保護作用として注目されている。

本研究は、DPP-IV 阻害薬による膵β細胞保護作用の分子機構を明らかにすることを目的に、肥満2型糖尿病モデルおよび非糖尿病モデルマウスを用いて、DPP-IV 阻害薬 Vildagliptin による膵β細胞保護効果とその機構について検討した。

## 材料と方法

### 実験動物

肥満2型糖尿病モデル動物である KKA<sup>y</sup>-TaJcl (KKA<sup>y</sup>) マウス (雄性 8 週齢) と KKA<sup>y</sup> が C57BL/6Jcl (B6) マウスから派生したマウスであることから、非糖尿病コントロールとして B6 マウス (日本クレア株式会社, 東京) を用いた。実験期間を通して室温 22 ± 2 °C, 湿度 20~60%, 照明時間 7~21 時のクリーンエリア飼育室で飼育し、固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業, 東京) と水道水を自由摂取させた。本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.08-081, 10-059), 川崎医科大学動物実験指針に基づき行った。

### 薬剤投与方法

KKA<sup>y</sup> マウスと B6 マウスを Vildagliptin 投与群 (Vilda 群) と非投与群 (Cont 群) の 2 群に分け、Vilda 群には Vildagliptin 50mg/kg, Cont 群には Vehicle を 4 週間に渡り 1 日 1 回強制経口投与した。

### 体重、摂餌量、生化学データ測定方法

摂餌量、体重測定は 8 週齢から 12 週齢まで毎週測定した。採血は、4 週間介入後に 16 時間絶食後、尾静脈から行った。血糖値は、フリースタイル<sup>®</sup> (キッセイ薬品工業, 松本) を用い、採血直後に測定した。血漿分離した採血試料は -80 °C にて保存した。血漿インスリン濃度、血漿中性脂肪濃度、血漿グルカゴン濃度、血漿活性型 GLP-1 測定には、それぞれ超高感度マウスインスリン測定キット (森永生科学研究所, 横

浜), トリグリセライド E- テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪), グルカゴン ELISA (矢内原研究所, 静岡), GLP-1 (active) ELISA キット (株式会社シバヤギ, 群馬) を用いた。

#### 糖負荷試験

4 週間介入終了後に, 16 時間絶食下において, まず Vildagliptin または Vehicle を経口投与し, 15 分後に 1 g/kg のグルコースを経口投与した。グルコース投与後, 15, 30, 60, 90 分後に尾静脈から採血を行い, 血糖値および血漿インスリン値を前述した方法で測定した。また, グルコース投与 15 分後においてのみ血漿活性型 GLP-1 値を前述した方法で測定した。

#### インスリン負荷試験

4 週間介入終了後に, 4 時間絶食下においてインスリン (KKA<sup>y</sup> マウスにはヒューマリン R<sup>®</sup> 2.0 単位/kg, B6 マウスにはヒューマリン R<sup>®</sup> 0.75 単位/kg 日本イーライリリー株式会社, 神戸) をマウス腹腔内に投与した。採血は 0, 15, 30, 60, 90 分に尾静脈から行い, 血糖値はフリースタイル<sup>®</sup> を用い, 採血直後に行った。

#### 膵ラ氏島採取とインスリン含量測定

膵ラ氏島の単離は Kitamura らの方法<sup>19)</sup> に準じて, 以下のようにコラゲナーゼ消化法により行った。1.5mg/ml コラゲナーゼ (collagenase P, Roche. Swiss) と 10% ウシ胎仔血清を含む HBSS (Hanks' balanced salt solution : 137mM NaCl, 5.36mM KCl, 0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.55mM Glucose, 0.03mM Phenol Red, 0.34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.27mM MgSO<sub>4</sub>, 1.26mM CaCl<sub>2</sub>, 5.83mM NaHCO<sub>3</sub>) を, ペントバルビタール (0.05mg/g) にて腹腔内麻酔を行ったマウスの胆管に 27 ゲージの注射針で 3 ml 注入し, 膵管へ逆流させた。コラゲナーゼ注入によって膨張した膵臓を採取し, 50ml コニカルチューブに移し, 37℃ で 19 分間継続的に振とうした。HBSS 30ml を加えて遠心 (1,100rpm, 2 分) を 3 度繰り返し, 最後のペレットに 10ml の HBSS を添加して金属製フィ

ルターに通した。さらに Histopaque-1077 (sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて遠心 (2,500rpm, 22 分) し, 内分泌組織と外分泌組織を分離した。中間層を採取し, HBSS を 30ml 入れて遠心 (1,100rpm, 2 分) する操作を 3 度繰り返した。最後に残った膵ラ氏島をシャーレに移し実体顕微鏡下で, ピペットを用いて膵ラ氏島を採取した。インスリン含量測定までは, -80℃ にて凍結保存し, インスリン含量測定は, 膵ラ氏島を酸エタノールで溶解し, 前述した超高感度マウスインスリン測定キットにて測定した。

#### 膵ラ氏島中性脂肪含量測定

採取した膵ラ氏島を, 50μl High-salt buffer (2 M NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM sodium phosphate) を添加した PBS にて 2 回洗浄した後, 1 分間超音波処理した。得られた試料を遠心 (12,000rpm, 5 分) した後, 上清 10μl を 10 μl t-ブタノール, 50 μl Triton X-100-methyl alcohol (1:1) と混合した。膵ラ氏島中性脂肪含量測定は前述した ELISA 法にて測定した。

#### グルコース応答性インスリン分泌反応

採取した膵ラ氏島を KRB-HEPES バッファー (5mg/ml BSA 含有 KRBH, pH 7.4) でプレインキュベートし, 遠心 (10,000rpm, 1 分) 後に上清を 3.0mM もしくは 16.7mM グルコースと置換し, 60 分間インキュベートした。遠心 (10,000rpm, 1 分) により得られた上清を用い, 前述した ELISA にてインスリン濃度を測定した。

#### Laser Capture Microdissection (LCM) 法

ペントバルビタール (0.05 mg/g) による腹腔内麻酔下のマウスから膵臓を採取後, OCT コンパウンドに入れ凍結保存し, 凍結切片をクリオスタットで 8 μm にスライスし, スライドグラスに張り付け, 染色まで -80℃ にて凍結保存した。スライドを 70% エタノール, Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水にそれぞれ 30 秒間浸した後, ヘマトキシリンで 30 秒

間染色した。さらに DEPC 処理水, 70%, 95%, 100% エタノールに各30秒間浸した後, キシレンに5分間浸した。組織染色を行った後, PixCell system (Arcturus, Mountain View Ca. USA) を用いて組織切片内の腭ラ氏島にレーザーを照射し, 専用転写フィルムに採取した。まず周辺部を採取し, 腭β細胞が主に存在するコア領域を採取した。

#### RNA 抽出と Reversed transcription

RNA 抽出には PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus PN 12206-01, Applied Biosystems, Life Technologies. Corp., Carlsbad, CA) を使用した。DNase 処理を追加し, ゲノム DNA のコンタミネーションを回避した。Reversed transcription には TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems N808-0234) を使用し, cDNA 合成のためのプライマーには Random Hexamers を用いた。

#### Real time-PCR 法

SYBR Green による Real-time RT-PCR (reverse transcriptase- polymerase chain reaction) 法を用いた。プライマーは GenBank の nucleotides からダウンロードした mRNA sequence に基づき Primer Express (Applied Biosystems) で設計し, blast を用いてプライマーの相同性について確認した。腭β細胞分化, 細胞増殖, アポトーシス, 酸化ストレス, 小胞体ストレス, 脂質合成に関するプライマーを使用し遺伝子発現プロファイルの解析を行った。

サンプル量0.5μl, プライマー溶液を1μl, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 希釈水の混液を9μl 入れて最終10μl の反応液を作成した。ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) で55サイクルの Real time-PCR を行った。PCR 条件は50℃ 2分, 95℃ 10分, 95℃ 15秒, 60℃ 1分とした。全ての実験において Dissociation curve 分析を行い解離温度, アガロースゲル電気泳動で PCR products の確認を行った。遺伝子発現量の定量化のため,

内部コントロールとして18srRNA を用い,  $2^{-\Delta CT}$  を計算した。

#### 腭ラ氏島の組織学的検討

第12週齢に, ペントバルビタール (0.05mg/g) にてマウスの腹腔内麻酔を行い, 膵臓を摘出し, ホルマリン固定・パラフィン包埋した後, 4μm の薄切スライド標本を作製した。免疫染色は酵素抗体法に従って行った。まず, 膵パラフィン切片をレモゾール® (和光純薬工業株式会社, 大阪), エタノールにて脱パラフィンを行った。Tris-Buffered saline (pH 7.6) TBS (pH7.0) で洗浄後, 必要に応じてマイクロウエーブを用いた抗原賦活処置を行い, 3% 過酸化水素メタノールにより内因性ペルオキシダーゼを除去した。1次抗体として, 抗膵ホルモン2種混合抗体 (ウサギ抗グルカゴン抗体: ウサギ抗ソマトスタチン=1:1, 25℃, 1時間) (株式会社ニチレイ, 東京), マウス抗 PCNA (proliferative cell nuclear antigen) モノクローナル抗体 (4℃, 一晚) (株式会社ニチレイ, 東京), マウス抗 4-HNE (4-hydroxy-2-noneal modified protein) モノクローナル抗体 (4℃, 一晚) (日本老化制御研究所, 袋井), ウサギ抗 CHOP/GADD153 抗体 (4℃, 一晚) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) を使用した。TBS にて洗浄後, シンプルステイン MAX-PO® (株式会社ニチレイ, 東京) を添加し, 25℃ にて10分間反応させた。TBS にて洗浄後, シンプルステイン DAB 溶液 (株式会社ニチレイ, 東京) 添加し発色させ, 対比染色は Mayer Hematoxylin にて行った。

TUNEL染色は, colorimetric apoptotic detection system (DeadEnd; Promega, Madison, WI, USA) を用いて行った。

#### 形態学的解析

全膵切片面積, 腭ラ氏島面積の計測には, NIH Image (Ver. 1.61) を用いた。腭β細胞量は, 膵重量 (mg) × (%腭ラ氏島面積) × (%腭β細胞数) により算出した。PCNA, CHOP, TUNEL 染色は核が染色されているものを,

4HNE 染色は細胞質が染色されているものを陽性とした。陽性細胞率は、膵ラ氏島内すべての細胞数を分母とし、50個の膵ラ氏島を用いて判定し、その平均値を算出した。

統計学的解析

全てのデータは平均値±標準誤差 (mean ± SEM) で記した。2群間の比較は Mann-Whitney U test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。多重比較は、Mann-Whitney U test を繰り返し、Bonferroni-Holm 法により補正を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計検定には StatView- ver. 5 (SAS, NC, USA) を使用した。

結果

Vildagliptin の代謝マーカーに及ぼす影響

介入開始時 (8 週齢), KKA<sup>y</sup> マウスの摂餌

量, 空腹時に測定した体重, 血糖値, 血中インスリン値, 血中中性脂肪値は, B6マウスに比べて有意に高値であったが, Vilda 群, Cont 群の2群間に有意な差は認めなかった。空腹時の血中グルカゴン値, 活性型 GLP-1値も両マウスとも2群間に有意な差は認めなかった。摂餌量, 空腹時の体重は, 両マウスともに週齢とともに増加したが, 介入期間中 Vilda 群, Cont 群間に有意な差を認めなかった (図1A, B)。介入終了時 (12週齢) の空腹時に測定した血糖値, インスリン値, 活性型 GLP-1値, グルカゴン値は, 両マウスとも2群間で有意な差を認めなかった (図1C-F)。空腹時血中中性脂肪値は, KKA<sup>y</sup> マウスのみ Vilda 群で Cont 群に比し, 有意に低値を示した (KKA<sup>y</sup>: Cont 群 274.3±9.2 vs. Vilda 群 214.4±7 mg/dl,  $p < 0.01$ , 図1G)。

糖負荷試験において, KKA<sup>y</sup> マウス Vilda 群

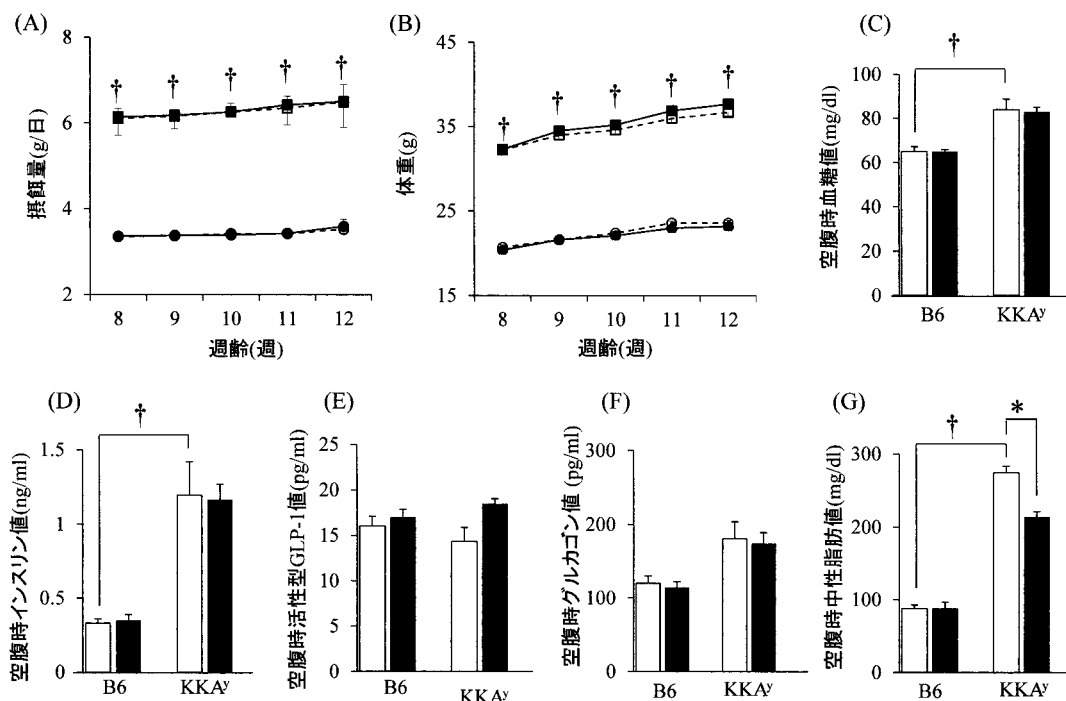


図1 摂餌量, 体重, 代謝パラメータの比較

■: KKA<sup>y</sup> Vilda 群, □: KKA<sup>y</sup> Cont 群, ●: B6 Vilda 群, ○: B6 Cont 群, □: Cont 群, ■: Vilda 群。

(A): 摂餌量の推移, (B): 体重の推移, (C): 空腹時血糖値, (D): 空腹時インスリン値,

(E): 空腹時活性型 GLP-1 値, (F): 空腹時グルカゴン値, (G): 空腹時中性脂肪値

†:  $p < 0.05$  vs B6 Cont 群, \*:  $p < 0.05$  vs KKA<sup>y</sup> Cont 群, 各群 n=5.

は、Cont群に比し糖負荷後の全ての測定ポイントにおいて有意に血糖値の上昇が抑制され、インスリン分泌反応も増加していた。一方、B6マウスでは、糖負荷15分後の血糖値、インスリン値のみ改善を認めたが、それ以外の測定ポイントでは有意な差を認めなかった(図2A-B)。糖負荷15分後の活性型GLP-1は、KKA<sup>y</sup>マウス、B6マウスともにVilda群がCont群と比べて有意に増加していた(B6: Cont群  $36.1 \pm 2.7$  vs Vilda群  $53.0 \pm 1.3$  pg/ml,  $p < 0.001$ , KKA<sup>y</sup>: Cont群  $28.1 \pm 0.6$  vs Vilda群  $40.9 \pm 2.0$  pg/ml,  $p < 0.01$ , 図2C)。インスリン感受性試験では、KKA<sup>y</sup>マウスにおいてCont群に比しVilda群でインスリン感受性の有意な改善をみた(図3A)が、B6マウスでは、両群間に有意な差は認めなかった(図3B)。

#### 膵ラ氏島構築およびβ細胞機能への影響

Vildagliptinの膵ラ氏島への影響をみるため、グルカゴンとソマトスタチンの二重免疫染色を行い、膵ラ氏島の構築、膵β細胞率および膵β細胞重量について検討した(図4)。KKA<sup>y</sup>マウスではB6マウスに比し、膵ラ氏島は腫大したが構築の乱れは認めなかった。B6マウスに比し、KKA<sup>y</sup>マウスの膵ラ氏島内β細胞比率は有意に高く、Vildagliptin投与でさらにβ細胞比率は増加し、β細胞重量も有意な増加をみた(表1)。B6マウスにおいてもVilda群のβ細胞比率およびβ細胞重量は、Cont群に比し増加していた(表1)。

膵ラ氏島中性脂肪含量は、血中中性脂肪値と一致してKKA<sup>y</sup>マウスのみCont群と比べて、Vilda群で有意に低値を示した(KKA<sup>y</sup>: Cont群

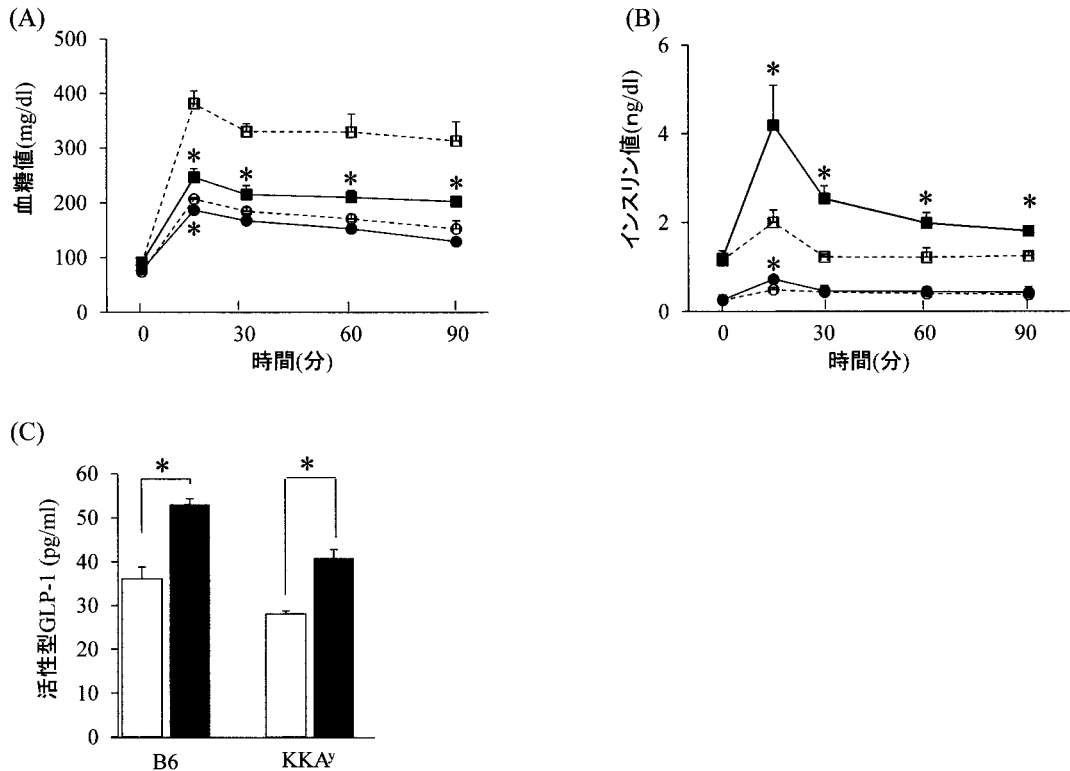


図2 経口糖負荷試験(1g/kg)施行時の血糖値、インスリン値の推移と活性型GLP-1値

■: KKA<sup>y</sup> Vilda群, □: KKA<sup>y</sup> Cont群, ●: B6 Vilda群, ○: B6 Cont群, □: Cont群, ■: Vilda群

(A): 血糖値の推移, (B): インスリン値の推移, (C): 糖負荷15分後の活性型GLP-1値

\*:  $p < 0.05$  vs Cont群, 各群  $n=5$ .

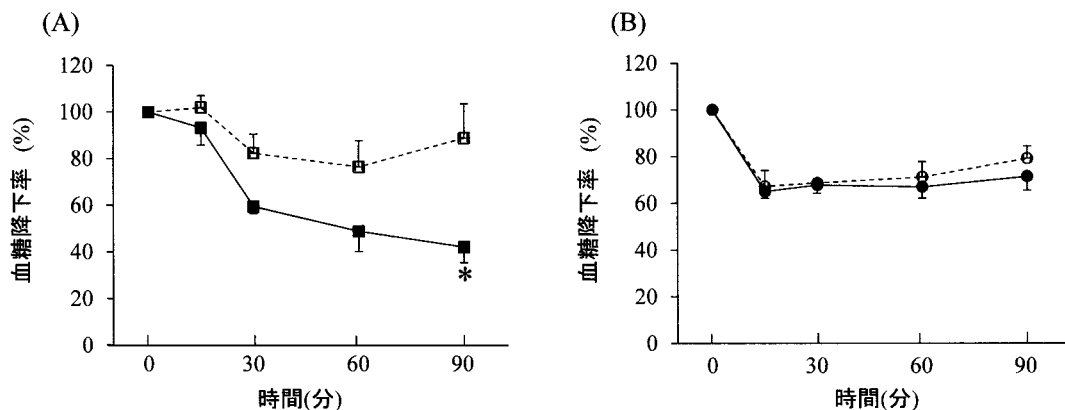


図3 インスリン感受性試験  
 ■：KKA<sup>y</sup> Vilda 群，□：KKA<sup>y</sup> Cont 群，●：B6 Vilda 群，○：B6 Cont 群  
 (A)：KKA<sup>y</sup> マウス (2U/kg)，(B)：B6マウス (0.75U/kg)  
 \*： $p < 0.05$  vs Cont 群，各群  $n=5$ 。

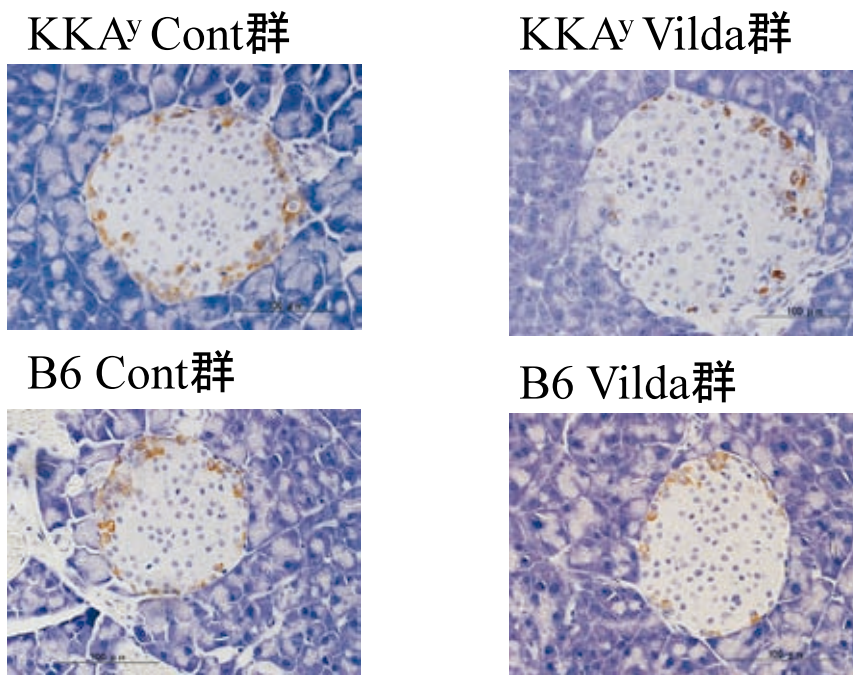


図4 膵ラ氏島のグルカゴン・ソマトスタチン二重染色  
 各群  $n=5$ 。

表1 Vildagliptin の膵β細胞に対する影響

	β細胞率 (%)	β細胞重量 (mg)
B6 Cont	74.83 ± 1.46	0.81 ± 0.15
B6 Vilda	79.25 ± 0.89*	1.19 ± 0.11*
KKA <sup>y</sup> Cont	85.75 ± 2.00*	2.90 ± 0.39*
KKA <sup>y</sup> Vilda	91.19 ± 0.74 †	5.00 ± 0.39 †

平均 ± 標準誤差，各群  $n=5$ ，\*： $P < 0.05$  vs B6 Cont 群，†： $P < 0.05$  vs KKA<sup>y</sup> Cont 群

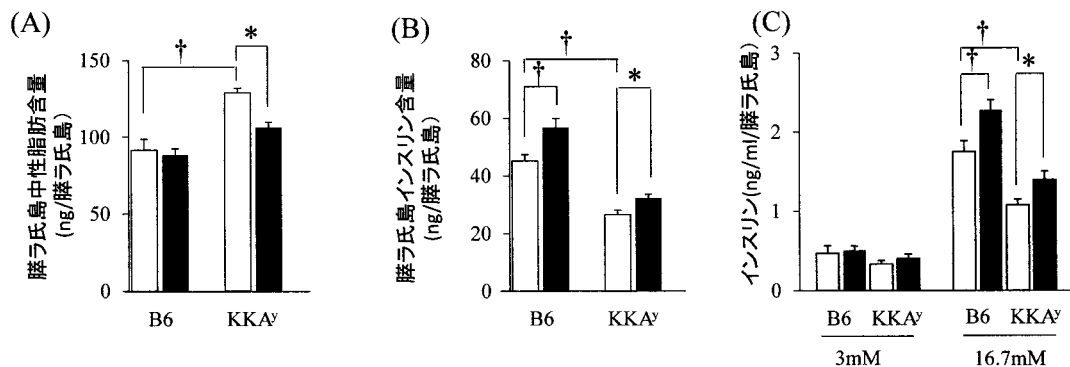


図5 膵ラ氏島における生化学パラメータの比較

□: Cont 群, ■: Vilda 群, 各群 n=5

(A): 膵ラ氏島インスリン含量, (B): 膵ラ氏島中性脂肪含量, (C): 低濃度グルコース (3mM) および高濃度グルコース (16.7mM) によるグルコース応答性インスリン分泌反応.

†:  $p < 0.05$  vs B6 Cont 群, \*:  $p < 0.05$  vs KKAy Cont 群.

123.8 ± 3.2 vs Vilda 群 106.1 ± 3.5 ng/膵ラ氏島,  $p < 0.005$ , 図5A) が, B6マウスでは, 両群間に有意な差を認めなかった (図5A). 膵ラ氏島インスリン含量は, B6マウスに比し KKAy マウスで有意に低値であったが, Vilda 群では有意な改善をみた (KKAy: Cont 群 26.7 ± 1.5 vs Vilda 群: 32.3 ± 1.3 ng/膵ラ氏島,  $p < 0.01$ , 図5B). B6マウスにおいても, Vilda 群で Cont 群に比べて膵ラ氏島インスリン含量は有意に増加していた (B6: Cont 群 45.2 ± 2.2 vs Vilda 群 56.8 ± 3.1 ng/ml/膵ラ氏島,  $p < 0.05$  図5B).

低濃度グルコース刺激による膵ラ氏島インスリン分泌反応は, KKAy, B6マウスともに Vildagliptin 投与の有無で有意な差を認めなかった. 一方, 高濃度グルコース応答性インスリン分泌反応は, B6マウスに比し KKAy マウスで有意に低値であるが, Vilda 群ではインスリン分泌反応が改善した (KKAy: Cont 群 1.1 ± 0.1 vs Vilda 群 1.4 ± 0.1 ng/ml/膵ラ氏島,  $p < 0.05$ , 図5C). B6マウスにおいても, Vilda 群のインスリン分泌反応は, 有意に増加した (B6: Cont 群 1.8 ± 0.1 vs Vilda 群 2.3 ± 0.1 ng/ml/膵ラ氏島,  $p < 0.05$ , 図5C).

#### 膵β細胞遺伝子発現への影響

4週間介入後に, Vildagliptin の膵β細胞に

与える影響を明らかにするために, LCM法を用いて膵β細胞が主に存在する膵ラ氏島コア領域の組織を採取し, 遺伝子発現について検討した. KKAy マウス Vilda 群は, Cont 群に比し, 細胞分化関連遺伝子 (*Hlb-9*, *NeuroD*, *Pdx-1*) 発現が有意に増加し, 分化抑制遺伝子 (*Hes-1*) 発現が有意に低下していた. B6 マウスでも Vilda 群で, Cont 群に比し, *Hlb-9*, *NeuroD* の有意な発現増加をみた (図6). 細胞増殖関連遺伝子 (*CyclinD*, *Erkl*) 発現は, KKAy マウス, B6マウスともに Vilda 群で有意に増加していた (図6). 小胞体ストレス関連遺伝子 (*Xbp-1*), アポトーシス誘導遺伝子 (*Casp3*) および脂質合成関連遺伝子 (*Sreblc*) の発現は KKAy マウスにおいてより顕著な傾向にあるが, その発現は Vildagliptin 投与により有意に抑制された (図7). 一方, アポトーシス抑制遺伝子 (*Bcl-2*) および抗酸化ストレス関連遺伝子 (*GSHPx*, *SOD2*) 発現は, Vilda 群で有意に増加していた (図7). B6マウスにおいて, Vildagliptin 投与は, これら遺伝子発現に何ら影響を与えなかった (図7).

#### 膵ラ氏島の免疫組織学的解析

細胞増殖マーカーである PCNA 免疫染色では, KKAy マウス, B6マウスとも, Vildagliptin



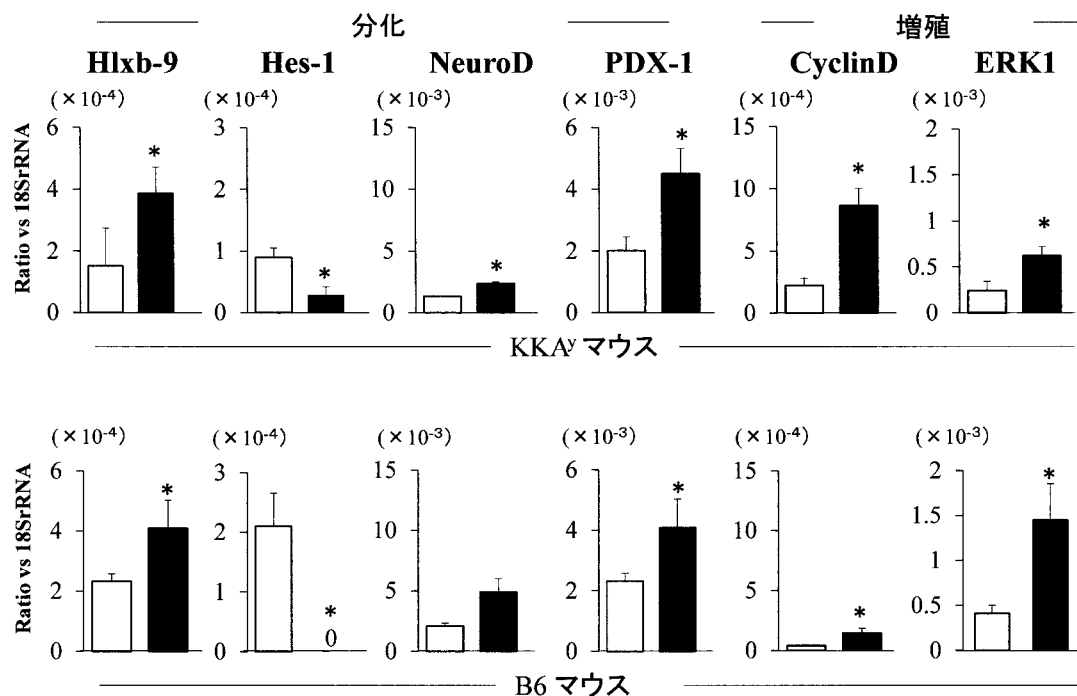


図6 膵β細胞特異的分化増殖関連遺伝子発現プロファイルの比較  
 □: Cont 群, ■: Vilda 群  
 上段: KKA<sup>y</sup> マウス, 下段: B6 マウス, 各群 n=5. \*: p<0.05 vs Cont 群.

投与で陽性細胞率は有意に増加していた (図8A, 表2). 一方, 酸化ストレス, 小胞体ストレス, アポトーシスの各マーカーとしての4HNE 染色, CHOP 染色, TUNEL 染色では, KKA<sup>y</sup> マウスのみ Vildagliptin 投与によって, 陽性細胞率は有意に減少した (図8B-D, 表2).

### 考察

肥満2型糖尿病モデルマウス KKA<sup>y</sup> マウスを用いた本研究において, Vildagliptin による膵β細胞の機能改善作用および膵β細胞重量の増加作用を明らかにした. 更に遺伝子発現プロファイルの検討により, 本薬剤が, 直接的, 間接的に, 細胞分化・増殖の促進, アポトーシスの抑制に働き, 膵β細胞保護作用を発揮する可能性を明らかにした. DPP-IV 阻害薬による膵β細胞保護効果としては, 高脂肪食負荷およびストレプトゾトシン発症2型糖尿病モデ

ルマウスに Sitagliptin あるいは Alogliptin を投与し, 膵β細胞重量の増加を明らかにした報告<sup>17, 18)</sup> が, 既にあるが, Vildagliptin を用いた本研究結果も, ほぼ既報と一致するものであった. しかし, DPP-IV 阻害薬による膵β細胞保護効果の分子機構の解明は, これまでに殆どなされておらず, 本研究結果が唯一の知見といってよい. 本研究は, 更にグルコース応答性インスリン分泌能が Vildagliptin によって改善することも明らかにしており, DPP-IV 阻害薬は膵β細胞の質を高め, 量を増やすことで, 糖尿病における膵β細胞保護効果を発揮するものと思われた.

Vildagliptin による細胞分化・増殖関連遺伝子発現調節は糖尿病モデルマウスのみならず非糖尿病モデルマウスでも認められており, 本薬剤の細胞分化・増殖への効果は, 代謝改善を介することなく, 直接的なものであることが強く示

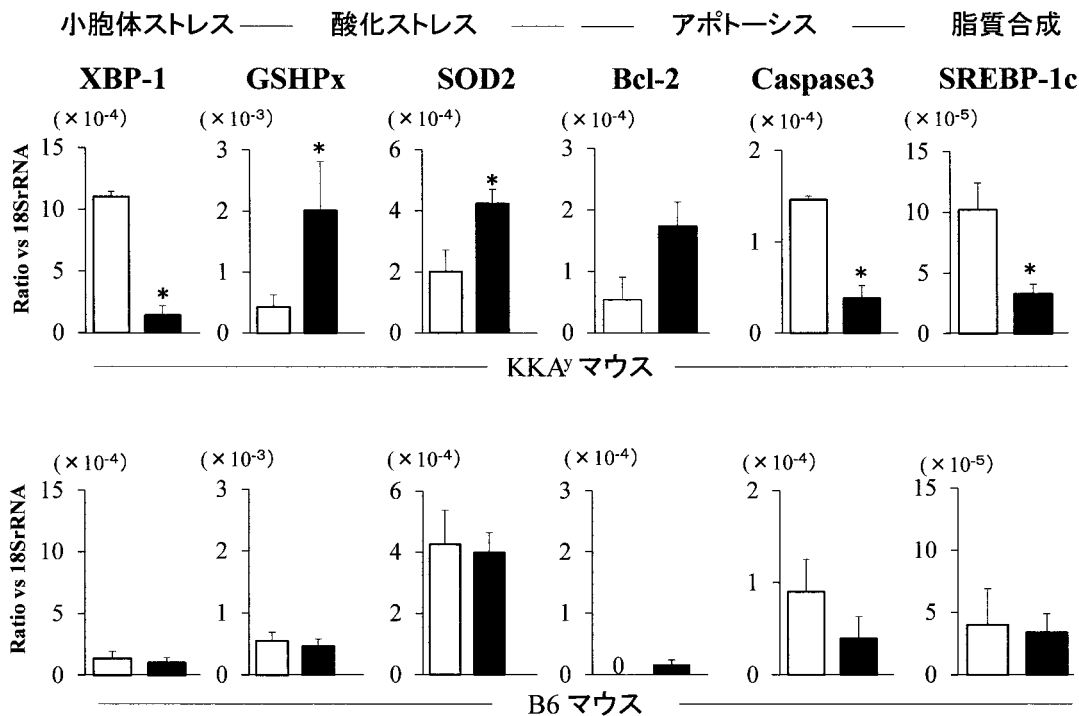


図7 膵β細胞特異的小胞体ストレス，酸化ストレス，アポトーシス，脂質合成関連遺伝子発現プロファイルの比較

□ : Cont 群, ■ : Vilda 群

上段 : KKA<sup>y</sup> マウス, 下段 : B6 マウス, 各群 n=5. \* :  $p < 0.05$  vs Cont 群.

唆された。Duttaroy らは、血糖値が正常の新生児 Wistar rat に Vildagliptin を投与し、膵β細胞重量が増加したと、本研究と同様の報告<sup>20)</sup> をしており、本薬剤の直接的な細胞増殖効果を強く示唆するものである。

一方、アポトーシス、小胞体ストレス、酸化ストレスに関連する遺伝子発現に及ぼす Vildagliptin の効果は、糖尿病モデル KKA<sup>y</sup> マウスにのみ認められ、元来、小胞体ストレス、酸化ストレスの進展がない B6 マウスではみられなかった。この結果から、本薬剤による抗アポトーシス効果、酸化ストレスや小胞体ストレス抑制効果は、直接的なものではなく、糖・脂質代謝改善を介する間接的な作用であることが示唆された。高血糖のみならず膵ラ氏島への脂肪蓄積は、酸化ストレスや小胞体ストレスを助長し、膵β細胞障害を引き起こす（脂肪毒性）ことが知られている<sup>3, 21)</sup>。本研究において、

Vildagliptin は KKA<sup>y</sup> マウス糖代謝を改善するとともに、膵ラ氏島内中性脂肪蓄積を減少させており、遺伝子発現プロファイルは、その結果を反映したものと考えられる。一方で、GLP-1 および GIP が直接的に酸化ストレス、小胞体ストレス、アポトーシスを軽減させるとの報告<sup>22-27)</sup> がある。しかし、これらの実験で使用されている GLP-1, GIP 用量は、DPP-IV 阻害薬によって得られる内因性 GLP-1 や GIP レベルと比べて、はるかに高用量であり、また *in vitro* であるため、その結果をそのまま本研究結果と比較するのは困難である。GLP-1 アナログであるリラグルチドを糖尿病モデルおよび正常モデルマウスに用いて、酸化/小胞体ストレス、アポトーシス関連遺伝子発現をみた報告<sup>28)</sup> では、DPP-IV 阻害薬を用いた本研究結果とほぼ同様の成績であった。本研究において、広範な遺伝子発現解析から得られた成績は、細

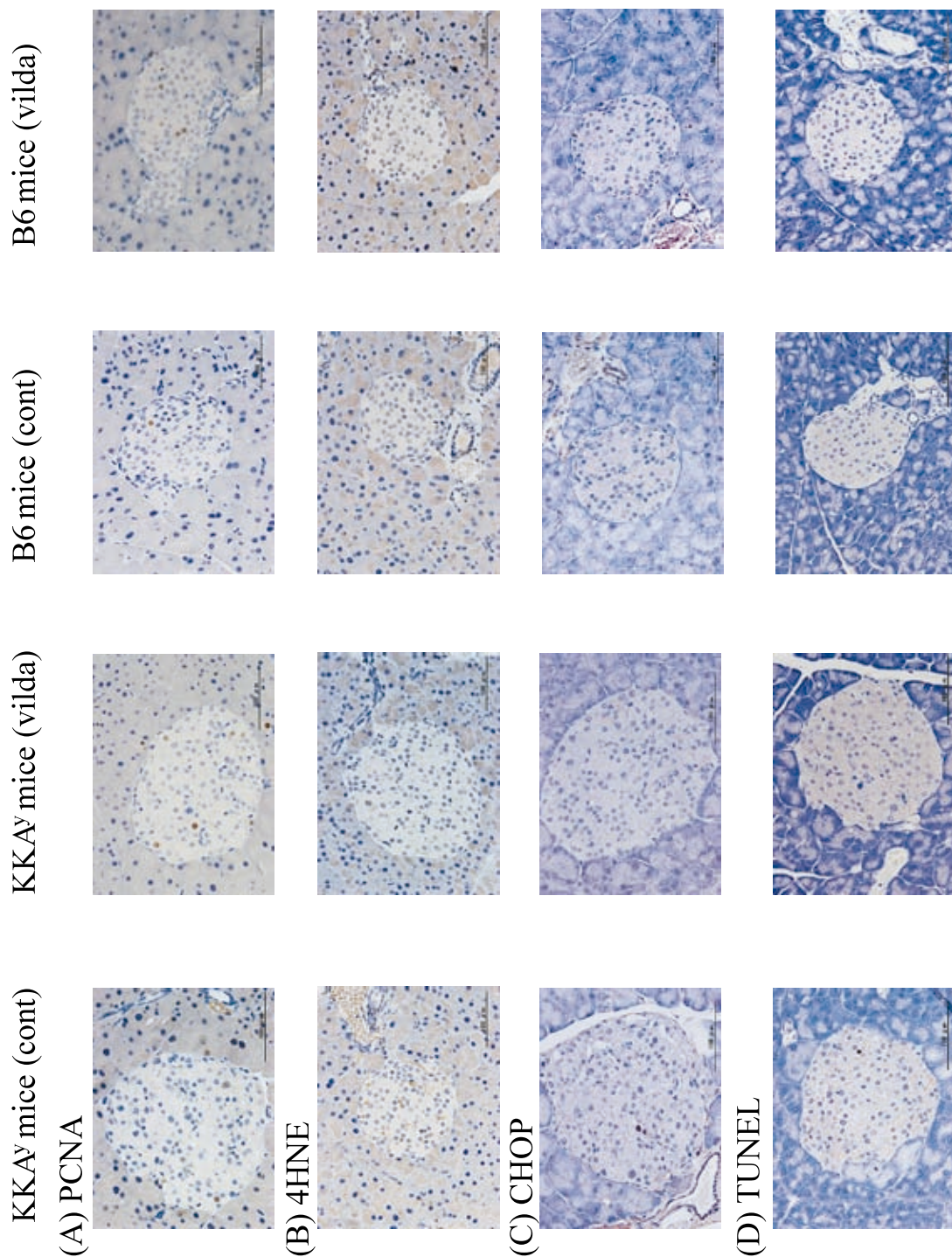


図8 免疫染色の比較

(A) : PCNA (proliferative cell nuclear antigen) 免疫染色, (B) : 4HNE (4-hydroxy-2-noneal modified protein) 免疫染色,  
 (C) : CHOP 免疫染色, (D) : TUNEL 免疫染色

表2 免疫組織学的検討

	B6 Cont	B6 Vilda	KKA <sup>y</sup> Cont	KKA <sup>y</sup> Vilda
PCNA 陽性細胞率 (%)	0.71 ± 0.09	1.15 ± 0.16*	2.07 ± 0.17	4.25 ± 0.62*
4HNE 陽性細胞率 (%)	4.16 ± 0.61	4.00 ± 0.30	12.08 ± 0.80	6.00 ± 0.60*
CHOP 陽性細胞率 (%)	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.12 ± 0.02*
TUNEL 陽性細胞率 (%)	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.13 ± 0.01*

平均 ± 標準誤差, 各群 n=5, \*: P < 0.05 vs Cont 群

PCNA: proliferative cell nuclear antigen

4HNE: 4-hydroxy-2-noneal modified protein

胞増殖, アポトーシス, 酸化ストレス, 小胞体ストレスマーカーを用いた, 免疫組織学的解析結果ともよく一致するものであった。

本研究で示された Vildagliptin による膵β細胞保護作用は, DPP-IV 活性阻害によって, 活性型インクレチン (GIP, GLP-1) 濃度上昇とそのシグナル増強が惹起された結果と考えられる。しかし糖尿病状態では, GIP 濃度は減少しないものの, 膵β細胞における GIP シグナルは減弱するとの報告<sup>29)</sup>がある。従って, 本研究において確認された DPP-IV 阻害薬 Vildagliptin による膵β細胞保護効果は, 主に GLP-1シグナル増強を介するものと考えられる。当教室の Shimoda らは, 肥満糖尿病モデル *db/db* マウスを用いて, GLP-1受容体作動薬であるリラグルチドが, 本研究と同様の効果を発揮することを報告<sup>28)</sup>しており, 膵β細胞保護作用における GLP-1シグナルの重要性を強く示唆するものである。

本研究では, LCM 法を用いて遺伝子発現の網羅的解析から, 膵β細胞の分化・増殖に及ぼす GLP-1の効果を検討したが, GLP-1受容体結合に始まる GLP-1シグナルは, アデニル酸シクラーゼの活性化, cyclic AMP/protein kinase A (PKA) シグナル経路の活性化として理解されている<sup>30)</sup>。PKA 依存的に cAMP 応答配列結合タンパク (cyclin AMP element binding protein; CREB) を介して, または epidermal growth factor-1 (EGF-1) 受容体を介して phosphoinositide 3-kinase (PI3K) が活性化される。本研究において, Vildagliptin 投与により, *Erk*, *CyclinD*, *Pdx-1* 遺伝子発現増加がみられたが, PKA-MAPK (p42 mitogen-activated protein

kinase) 経路および PI3K 経路を介して, 本薬剤の作用を発揮していることを示唆するものである。今後, 遺伝子解析のみならず, 蛋白レベルでの活性調節機構の検討が求められる。

本研究では, 非糖尿病マウスに対しても, DPP-IV 阻害薬による膵β細胞増殖促進作用がみられた。GLP-1受容体作動薬を正常ラットに用いた検討では, 投与1週間後には非投与群に比し有意に膵β細胞重量が増加したが, 6週間投与後には, 膵β細胞重量に有意な差は認めなくなっていた<sup>31)</sup>。GLP-1の正常血糖モデルに対する効果は, 一過性のものであることが示唆され, DPP-IV 阻害薬の効果についても同様であろうと思われるが, 今後の検討が必要である。

DPP-IV 阻害薬によるインスリン感受性改善効果の機序については幾つかの可能性が示唆されている。Pospisilik らは, VDF Zucker Rat に12週間, DPP-IV 阻害薬を投与し, 肝臓からの糖放出の抑制, 末梢組織における糖取り込み増加によるインスリン感受性改善作用を報告<sup>32)</sup>した。Dardevet ら<sup>33)</sup>も生理的レベルの GLP-1が肝臓での糖の取り込みを増加させることを示している。さらに, 最近の報告では, DPP-IV 自体が脂肪, 骨格筋, 平滑筋におけるインスリンによる Akt のリン酸化を減少させることによりインスリン抵抗性を惹起させることを示唆している<sup>34)</sup>。一方, Duez らは, マウスに DPP-IV 阻害薬を投与し, 血中 GLP-1および GIP 濃度が測定感度以下にもかかわらず, 肝臓での糖新生を減少させたと報告<sup>35)</sup>したが, DPP-IV はインクレチン以外の, 多くのペプチドの分解および不活性化に関わっているおり, その阻害薬によ

る未知の機構の存在も示唆される。

本研究において、インクレチン関連薬である DPP-IV 阻害薬 Vildagliptin が、KKA<sup>y</sup> マウスと B6 マウスの膵ラ氏島インスリン含量、高濃度グルコース応答性インスリン分泌増加という膵β細胞の機能改善/亢進とともに、β細胞量の増加に働くことを明らかにした。さらにβ細胞量増加の分子機構として、GLP-1 シグナル増強が、細胞の分化・増殖促進効果(直接的効果)と、糖脂質代謝改善によるβ細胞の酸化ストレス、小胞体ストレスの軽減およびアポトーシス抑制効果(間接的効果)をもたらす可能性を、網羅的な遺伝子発現解析および膵ラ氏島免疫染色によって明らかにした。今後、GLP-1 シグナル伝達経路に関連する蛋白の機能解析も含めた包括的な検討、更には GIP シグナルの関与についての検討を進めることで、インクレチンによる膵β細胞保護作用の分子機構を更に詳細に検討する必要がある。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の立案から論文作成までご指導いただいた川崎医科大学糖尿病・代謝・内分泌内科学教授の加来浩平先生に深甚なる謝意を表します。また実験遂行にあたり、ご助力いただいた同教室員並びに研究補助員の皆様に深謝申し上げます。

なお、本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金(18591008, 21591153) および川崎医大プロジェクト研究費(19-502, 20-505, 22-A53, 23- 挑5)の援助により行われた。

## 引用文献

- 1) U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* 44 : 1249-1258, 1995
- 2) Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110, 2003
- 3) Poynter V, Robertson RP: Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29: 351-66, 2008
- 4) Kawasaki F, Matsuda M, Kanda Y, Inoue H, Kaku K: Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in db/db mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E510-518, 2005
- 5) Kanda Y, Shimoda M, Hamamoto S, Tawaramoto K, Kawasaki F, Hashiramoto M, Nakashima K, Matsuki M, Kaku K: Molecular mechanism by which pioglitazone preserves pancreatic beta-cells in obese diabetic mice: evidence for acute and chronic actions as a PPARγ agonist. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E278-286, 2010
- 6) Drucker DJ, Nauck MA: The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368: 1696-1705, 2006
- 7) Kreymann B, Williams G, Ghatgei MA, Bloom SR: Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 2: 1300-1304, 1987
- 8) Jia X, Brown JC, Ma P, Pederson RA, McIntosh CH: Effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-I- (7-36) on insulin secretion. *Am J Physiol* 268: E645-651, 1995
- 9) Friedrichsen BN, Neubauer N, Lee YC, Gram VK, Blume N, Petersen JS, Nielsen JH, Moldrup A: Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol* 188: 481-492, 2006
- 10) Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S: Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48: 2270-2276, 1999
- 11) Hui H, Wright C, Perfetti R: Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50: 785-796, 2001
- 12) Widenmaier SB, Kim SJ, Yang GK, De Los Reyes T, Nian C, Asadi A, Seino Y, Kieffer TJ, Kwok YN, McIntosh CH: A GIP receptor agonist exhibits beta-cell anti-apoptotic actions in rat models of diabetes resulting in improved beta-cell function and glycemic control. *PLoS One* 5: e9590, 2010
- 13) Nauck MA, Wollschläger D, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Willms B: Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* 39: 1546-1553,

- 1996
- 14) De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, *et al.*: GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca<sup>2+</sup> channel-dependent exocytosis. *Cell Metab* 11: 543-553, 2010
  - 15) Näslund E, Gutniak M, Skogar S, Rossner S, Hellstrom PM: Glucagon-like peptide 1 increases the period of postprandial satiety and slows gastric emptying in obese men. *Am J Clin Nutr* 68: 525-530, 1998
  - 16) Ahren B, Hughes TE: Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 augments insulin secretion in response to exogenously administered glucagon-like peptide-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, and gastrin-releasing peptide in mice. *Endocrinology* 146: 2055-2059, 2005
  - 17) Mu J, Woods J, Zhou YP, *et al.*: Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55: 1695-1704, 2006
  - 18) Zhang X, Wang Z, Huang Y, Wang J: Effects of chronic administration of alogliptin on the development of diabetes and beta-cell function in high fat diet/streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* 13: 337-347, 2011
  - 19) Kitamura T, Kido Y, Nef S, Merenmies J, Parada LF, Accili D: Preserved pancreatic beta-cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor. *Mol Cell Biol* 21: 5624-5630, 2001
  - 20) Duttaroy A, Voelker F, Merriam K, Zhang X, Ren X, Subramanian K, Hughes TE, Burkey BF: The DPP-4 inhibitor vildagliptin increases pancreatic beta cell mass in neonatal rats. *Eur J Pharmacol* 650: 703-707, 2011
  - 21) Giacca A, Xiao C, Oprescu AI, Carpentier AC, Lewis GF: Lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction: focus on in vivo studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E255-262, 2011
  - 22) Yusta B, Baggio LL, Estall JL, Koehler JA, Holland DP, Li H, Pipeleers D, Ling Z, Drucker DJ: GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 4: 391-406, 2006
  - 23) Cunha DA, Ladriere L, Ortis F, Igoillo-Esteve M, Gurzov EN, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL, Cnop M: Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB. *Diabetes* 58: 2851-2862, 2009
  - 24) Oluwadiya KS, Kolawole IK, Adegbehingbe OO, Olasinde AA, Agodirin O, Uwaezuoke SC: Motorcycle crash characteristics in Nigeria: implication for control. *Accid Anal Prev* 41: 294-298, 2009
  - 25) Yin F, Liu JH, Zheng XX, Guo LX: GLP-1 receptor plays a critical role in geniposide-induced expression of heme oxygenase-1 in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 31: 540-545, 2010
  - 26) Widenmaier SB, Ao Z, Kim SJ, Warnock G, McIntosh CH: Suppression of p38 MAPK and JNK via Akt-mediated inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 constitutes a core component of the beta-cell pro-survival effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *J Biol Chem* 284: 30372-30382, 2009
  - 27) Hui H, Nourparvar A, Zhao X, Perfetti R: Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144: 1444-1455, 2003
  - 28) Shimoda M, Kanda Y, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Matsuki M, Kaku K: The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 54: 1098-1108, 2011.
  - 29) Lynn FC, Pamir N, Ng EH, McIntosh CH, Kieffer TJ, Pederson RA: Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetes* 50: 1004-1011, 2001
  - 30) Buteau J: GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab* 34: 73-77, 2008
  - 31) Bock T, Pakkenberg B, Buschard K: The endocrine pancreas in non-diabetic rats after short-term and long-term treatment with the long-acting GLP-1 derivative NN2211. *APMIS* 111: 1117-1124, 2003
  - 32) Pospisilik JA, Stafford SG, Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA: Long-term treatment with dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in the VDF Zucker rat: a euglycemic-hyperinsulinemic clamp study. *Diabetes* 51: 2677-2683, 2002
  - 33) Dardevet D, Moore MC, DiCostanzo CA, Farmer B,

- Neal DW, Snead W, Lautz M, Cherrington AD: Insulin secretion-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism do not involve portal vein GLP-1 receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: G806-814, 2005
- 34) Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, *et al.*: Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 60: 1917-1925, 2011
- 35) Duez H, Smith AC, Xiao C, Giacca A, Szeto L, Drucker DJ, Lewis GF: Acute dipeptidyl peptidase-4 inhibition rapidly enhances insulin-mediated suppression of endogenous glucose production in mice. *Endocrinology* 150: 56-62, 2009

## Molecular mechanism by which vildagliptin, a DPP-IV inhibitor, preserves pancreatic $\beta$ cells : A comparative analysis between diabetic and non-diabetic mice

Sumiko HAMAMOTO

*Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolism, Kawasaki Medical School,  
577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

**ABSTRACT** We investigated the molecular mechanism by which vildagliptin, a DPP-IV inhibitor, preserves the pancreatic  $\beta$  cells in diabetic mice. Male diabetic KK- $A^y$ /TaJcl (KK- $A^y$ ) mice and non-diabetic C57BL/6J (B6) mice, 8 weeks of age, received vildagliptin or were vehicle-treated for 4 weeks. In addition to the morphological and biochemical analysis of the islets, gene expression profiles in the core area of pancreatic islet were also analyzed at 12 weeks by using laser capture microdissection method. We did not find any differences in body weight, food intake, fasted blood glucose, insulin, glucagon, and basal active-GLP-1 levels between the control and vildagliptin-treated groups in both of KK- $A^y$  and B6 mice. Vildagliptin decreased the plasma TG level and islet TG content only in KK- $A^y$ . Insulin sensitivity assessed by an intraperitoneal insulin tolerance test significantly improved in KK- $A^y$  when treated with vildagliptin, but did not in B6. Vildagliptin ameliorated glucose tolerance and induced significantly higher plasma insulin at nearly all of the observed points on OGTT in KK- $A^y$ , but at only 15min on OGTT in B6 mice. Vildagliptin increased the pancreatic  $\beta$  cell mass, islet insulin content, and glucose-stimulated insulin secretion from isolated islets in both strains of mice. Genes involved in cellular differentiation and proliferation were up-regulated by vildagliptin in both mouse strains. Gene expressions related with apoptosis, endoplasmic reticulum stress and lipid synthesis were downregulated and antioxidative stress related gene expression was up-regulated only in KK- $A^y$  mice treated with vildagliptin. Morphometric results for PCNA, 4HNE, CHOP and TUNEL corresponded with the data obtained in gene expression analysis.

Vildagliptin increased the  $\beta$  cell mass not only by directly regulating cell kinetics but also by suppressing oxidative and/or ER stress, secondary to amelioration of glucolipotoxicity.

*(Accepted on October 22, 2011)*

**Key words : DPP-IV inhibitor, Pancreatic  $\beta$  cell, Oxidative stress, Endoplasmic reticulum stress, Glucolipotoxicity**

---

Corresponding author

Sumiko Hamamoto

Division of Diabetes, Endocrinology and Metabolism,  
Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki,  
701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 464 1046

E-mail : [sumiko@med.kawasaki-m.ac.jp](mailto:sumiko@med.kawasaki-m.ac.jp)