

表 題 2型糖尿病患者における血管石灰化と動脈硬化：  
骨代謝マーカーと RBP 4 からの検討

---

論文の区分 博士課程

著 者 名 青木 厚

担当指導教員氏名 石川三衛 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系  
総合医学  
内科系総合医学

2014年1月10日申請の学位論文

## 目 次

### I 第 I 部 頸動脈石灰化と骨代謝マーカーとの関連

|       |    |
|-------|----|
| 1. 緒言 | 2  |
| 2. 方法 | 4  |
| 3. 結果 | 11 |
| 4. 考察 | 19 |
| 5. 結論 | 22 |

### II 第 II 部 2 型糖尿病患者における血管内皮前駆細胞および

#### レチノール結合蛋白 4 の動態：急性運動負荷

|       |    |
|-------|----|
| 1. 緒言 | 24 |
| 2. 方法 | 25 |
| 3. 結果 | 29 |
| 4. 考察 | 35 |
| 5. 結論 | 38 |

### III 引用文献 39

## 第 I 部

### 頸動脈石灰化と骨代謝マーカーとの関連

#### 1. 緒言

喫煙・肥満・糖尿病・高血圧・脂質代謝異常は、動脈硬化危険因子としてよく知られているが、この他にも動脈硬化関連因子が存在することが示唆される。動脈硬化は、血管の内皮機能障害から始まり、その後血管内膜・中膜の肥厚や石灰化などの器質的変化が生じ、血管内腔の狭窄や血小板血栓などが引き起こされて動脈硬化性疾患を生じる<sup>1)</sup>。すなわち、血管石灰化は、動脈硬化の重要な役割を担っている。血管石灰化は、糖尿病患者に広く見られる現象であるが<sup>2-4)</sup>、糖尿病罹病歴との関連性はない<sup>5)</sup>。血管石灰化には既知の動脈硬化危険因子の他に、骨代謝関連因子の関与も示唆されている。

血管石灰化の発症機構は主に培養血管平滑筋細胞を用いた *in vitro* での研究により明らかにされている。血管石灰化に関わる重要な細胞生物学的変化は、血管平滑筋細胞のアポトーシスと骨・軟骨形成細胞への分化と考えられている。

血管平滑筋細胞がin vitro で骨芽細胞様の性格を示すことが数多く報告されている。骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP), osteopontin(OPN)やosteocalcin(OC)などが血管平滑筋細胞にも発現することが確認されている。また, 血管平滑筋細胞に骨芽細胞の分化に関わる転写因子であるRunt-related transcription factor 2 (Runx2) (軟骨細胞の分化にも関与する) の発現も証明されている<sup>6)</sup>。血管壁に出現する骨芽細胞様細胞あるいは軟骨細胞様細胞は骨・軟骨における石灰化過程と類似の機構で血管石灰化を引き起こす<sup>6)</sup>。血管平滑筋細胞が骨芽細胞への分化を促進する因子として, 酸化LDL, 炎症性サイトカイン, 酸化ストレス, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) , 細胞外リン濃度の上昇 (高リン血症) などが示されている。これらの因子のうち炎症性サイトカインや酸化ストレス (酸化LDL を含む) は本来の骨芽細胞の分化を抑制するとされている。このような反応性の違いが骨形成の低下 (骨粗鬆症) と血管石灰化に関与すると考えられている。

Matrix gla protein(MGP), osteopontin(OPN), osteoprotegerin(OPG) および $\alpha$ 2-HS-glycoprotein(Fetuin-A) などの骨基質蛋白質の遺伝子欠損マウスでは血管石灰化が促進されることから、これらの蛋白が血管壁での石灰化を抑制する作用を有するものと考えられる<sup>7-9)</sup>。破骨細胞の成熟を抑制するサイトカ

インとして、OPGがクローニングされている<sup>10)</sup>。OPGはTNF受容体ファミリーであるが、膜貫通領域が存在しない分泌性の蛋白である<sup>11)</sup>。破骨作用をもつReceptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)はReceptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK)と結合するが、OPGは高親和性のおとり受容体 (decoy receptor)としてRANKLに結合することにより、RANKの活性を抑制する<sup>12)</sup>。OPG欠損マウスでは、骨組織中に多数の破骨細胞が出現し、活発に骨吸収が行われることにより骨粗鬆症を呈する。骨吸収活性を制御しているのは骨芽細胞由来のOPGであることがわかる。このように破骨細胞の分化には、細胞間接触を介したRANK-RANKLのシグナル伝達が必須である。骨芽細胞を供給源とする可溶性のOPGは、破骨細胞前駆細胞に作用することにより、破骨細胞の分化を阻害する。つまり、骨芽細胞におけるRANKLの発現とOPGの産生の相互バランスにより、骨組織における破骨細胞の分化誘導が制御されていると考えられる。

本研究では、2型糖尿病患者の動脈硬化進展の中で、血管石灰化に対する血中OPGの役割について検討した。

## 2. 方法

### 対象

2006年3月から2011年10月までに自治医科大学附属さいたま医療センター外来に通院加療している2型糖尿病患者124例を対象とした。患者は男性88例、女性36例で、年齢は44-82歳 ( $65.6 \pm 8.2$  歳, mean  $\pm$  SD) であった。

2型糖尿病の診断は、日本糖尿病学会の判定基準<sup>13)</sup>に準じて、空腹時血糖 $\geq 126$  mg/dl、75g OGTT 2時間値  $\geq 200$  mg/dl、随時血糖  $\geq 200$  mg/dl のいずれかを認めたもの、または病歴で2型糖尿病と診断され食事療法、運動療法、経口糖尿病薬、インスリンのいずれかで加療中の患者を対象とした。

ヘモグロビン A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>)  $7.7 \pm 1.4$  %、糖尿病罹患歴  $14.7 \pm 8.2$  年であった。

患者は糖尿病の他に、高血圧症65例、脂質異常症74例、肥満35例を合併し、喫煙者は40例認められた。細小血管症は、網膜症46例、神経障害56例、腎症64例であった。透析患者、亜硝酸薬の常用患者、感染症合併例、悪性腫瘍合併例、骨盤内手術既往例は対象から除外した。収縮期血圧140、拡張期血圧90 mmHg以上のもの、もしくは降圧薬を常時服用しているものを高血圧症とした。血清LDLコレステロール値140 mg/dl以上、血清HDLコレステロール値40 mg/dl未満、血清中性脂肪値150 mg/dl以上、もしくはスタチンやフィブラート系薬剤を常時服用しているものを脂質異常症とした。血清LDLコレステロールは、Friedewaldの計算式 ( $LDL-C = Total-C - (HDL-C + TG/5)$ ) を用いて計算した。Body mass index (BMI)が25以上を肥満とした。過去3か月以内に1日1本以

上喫煙習慣があるものを喫煙者とした。糖尿病網膜症は眼科医が診断した。

血液検体は空腹時、座位で定期外来受診時に採取した。項目は、HbA<sub>1c</sub>、血清総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、クレアチニン、血清 OPG、osteocalcin、FGF23、25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>、そして adiponectin である。心電図の R-R 間隔変動率 (coefficient of variation of R-R interval, CVRR) が 2%未満を糖尿病自律神経障害ありとした。糖尿病腎症は、微量アルブミン尿や顕性タンパク尿、推定糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) から、厚生労働省糖尿病調査研究班の糖尿病腎症の病期分類に準じて診断した<sup>14)</sup>。第 1 期 (腎症前期) : 微量アルブミン尿陰性、第 2 期 (早期腎症) : 微量アルブミン尿  $\geq 30$  mg/g・クレアチニン、 $< 300$  mg/g・クレアチニン、第 3 期 A (顕性腎症前期) : 尿中微量アルブミン  $\geq 300$  mg/g・クレアチニンもしくはタンパク尿  $< 1$  g/g・クレアチニン、GFR  $\geq 60$  ml/min、第 3 期 B (顕性腎症後期) : タンパク尿  $> 1$  g/g・クレアチニン、GFR  $< 60$  ml/min、血清クレアチニン正常範囲、第 4 期 (腎不全期) : 高窒素血症、血清クレアチニン上昇、第 5 期 : 透析療法期。

血管内皮機能の評価は、血管内皮依存性血管拡張反応 (flow-mediated dilatation, FMD) にて評価した。

本研究は自治医科大学の倫理委員会で臨床研究 (許可番号 : 臨 06-26 号およ

び、臨 10-05 号) として許可され、書面にてすべての患者からインフォームド  
コンセントを得た上で行った。

## 測定

### (1) 血液生化学検査

血液検体は採血管に採取し 4℃で 3,000 回転/分で 15 分間遠心し、上清は保  
存チューブに分注し測定するまで -80 °Cで凍結保存した。HbA<sub>1c</sub>、血清総コレス  
テロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、血清クレアチニンは酵素法で測定  
した。血清 adiponectin は ELISA 法で Human adiponectin ELISA kits (Otsuka  
Pharmaceutical Co., Tokyo) を用いて測定した。血清 OPG は ELISA 法で Human  
osteoprotegerin ELISA kits (Bio Vender, Modrice, Czech) を用いて測定した。  
血清 osteocalcin は ELISA 法で human osteocalcin ELISA kits (Biomedical  
Technologies Inc., Stoughton, MA, USA) を用いて測定した。血清 FGF23 は ELISA  
法で Human FGF23 ELISA kits (Kainos, Tokyo, Japan) を用いて測定した。血  
清 25-hydroxyvitamin D3 は ELISA 法で human 25-hydroxyvitamin D3 ELISA kits  
(Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) を用いて測定した。



尿検体は早朝外来時に採取した。尿中微量アルブミン排泄量はラテックス凝集免疫測定法 (Eiken, Tokyo) で測定した。腎機能は日本腎臓学会による日本人での推定糸球体濾過量 (eGFR) 推算式を用いた<sup>15)</sup>。

$$\text{eGFR (ml/min/1.73m}^2\text{)} = 194 \times \text{Cr}^{(-1.094)} \times \text{年齢}^{(-0.287)} \text{ (女性は} \times 0.739\text{)}$$

末梢血の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell ; EPC) は表面抗原 CD34<sup>+</sup>/133<sup>+</sup>細胞数とし、抗 CD34<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>抗体を用いた fluorescence-activated cell sorting (FACS) (FACS Calibur™; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) により測定した。

## (2) 血管内皮機能検査

血管内皮機能検査 flow-mediated dilatation (FMD) は超音波装置を用いた非侵襲的な検査法である<sup>16-17)</sup>。検査時刻は 16 時~18 時、当センター生理機能検査室で行った。超音波装置 (UNEXEF 18G®, UNEX Corp., Nagoya, Japan) を使用し右上腕動脈の FMD を測定した。15 分間安静臥床したあと、被験者の右前肘窩付近に水銀血圧計のマンシェット、四肢に超音波装置と同期させた心電図肢誘導を装着し、前肘窩より 2~3 cm 近位側に 12-MHz の探触子をあて B-モード画

像で上腕動脈長軸像の血管内膜 near wall (体表近位側)と far wall (遠位側)が明瞭に描出されるよう走査した。心電図上拡張末期の静止画像で血管内膜の near wall から far wall の血管内径を計測し、この値をベースラインの血管径 (A)とした。その後、右前腕の水銀血圧計のカフを収縮期血圧+50 mmHg 以上に急速に膨らませて5分間駆血した。これにより末梢抵抗血管の虚血と血管拡張を引き起こす。5分間駆血後、カフを急速に解除し2分後まで血管径変化を追跡記録した。駆血解除後から2分後までの最大血管径を最大拡張時の血管径 (B)とした。FMDはベースラインの血管径に対して最大拡張時の血管径の変化量 (%)である。

$$\text{FMD (\%)} = \frac{\text{B}-\text{A}}{\text{A}} \times 100$$

### (3) R-R 間隔変動率

心電図の R-R 間隔変動率 (coefficient of variation of R-R interval, CVRR) は主に副交感神経を評価する自律神経機能検査で、糖尿病神経障害では心電図の R-R 間隔変動幅が減少する。15分間安静臥床後、12誘導心電図で連続して100心拍記録し自動的に CVRR を測定した (Cardiofax V, 日本光電, 東京)。CVRR は記録した R-R 間隔の標準偏差 (SD) と平均値 (M) から求めた。

$$\text{CVRR (\%)} = (\text{SD}/\text{M}) \times 100$$

本研究では CVRR <2 %を自律神経障害進展群とした。

#### (4) 頸動脈超音波検査

動脈壁の石灰化や総頸動脈での平均内膜中膜複合体厚（以下 mean intima-media thickness: mean IMT）を測定するために、総頸動脈を超音波にて観察した。mean IMT は、頸動脈球部を含まない左右の総頸動脈で計測した。総頸動脈における max IMT 計測部位の両サイド（末梢側および中枢側）1cm の位置でそれぞれの IMT を計測し、max IMT を含めた 3 点の平均値を mean IMT とした<sup>18)</sup>。動脈壁の石灰化は、総頸動脈にて、中膜の石灰化（メンケベルグ型動脈硬化）や内膜の石灰化（アテローム性粥状動脈硬化）を検出した。超音波機器は、アロカ社製(Prosound SSD-4000SV, Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)を使用し、中心周波数 7.5 MHz にて総頸動脈を観察した。

#### 統計

すべての測定値は平均値±標準誤差で示した。群間比較は、 $\chi^2$ 乗独立性の検定（カテゴリー変数）や一元配置分散分析（連続変数）をおこなった。一元配置分散分析を行うにあたり、等分散性を Leven 検定にて確認した。等分散の場合は Tukey の方法、等分散ではない場合は Games-Howell の方法で多重比較を行った。連続変数の間の相関性評価には Pearson の相関係数を用いた。血管石灰

化に影響を与える因子を解析するために多重ロジスティック回帰分析を行った。

正規分布にするために、OPG、FGF23、25-hydroxyvitamin D3、adiponectin を対

数変換した。0.05 未満の P 値を統計学的有意とした。解析はすべて SPSS<sup>®</sup>

Statistics 18.0 (Japan IBM., Tokyo, Japan) 統計ソフトを用いた。

### 3. 結果

2 型糖尿病患者124例を、血清OPG、osteocalcin、FGF23、25-hydroxyvitamin D3 の値により四分位に分け、総頸動脈石灰化の有無を評価した (Table 1)。

2 型糖尿病患者124例を、血清OPG値によって四分位に分けた場合、第1分位 は他

3 群に比べて、総頸動脈石灰化なしの割合が有意に多く、石灰化ありの割合が

有意に少ない。一方、第4分位は他 3 群に比べて、総頸動脈石灰化なしの割合が

有意に少なく、石灰化ありの割合が有意に多いことが示された

( $P=0.015$ ) (Figure 1)。

2 型糖尿病患者124例を、血清osteocalcin、FGF23、

25-hydroxyvitamin D3 の値によりそれぞれ四分位に分け、総頸動脈石灰化の有無を評価したが、有意な関連性は生じなかった。

Table 1. Presence or absence of cervical arterial calcification in quartiles based on serum osteoprotegerin, osteocalcin, FGF23, and 25-hydroxyvitamin D3 levels in 124 patients with type 2 diabetes.

|                                                  | 1st quartile   | 2nd quartile | 3rd quartile | 4th quartile    |
|--------------------------------------------------|----------------|--------------|--------------|-----------------|
| Serum osteoprotegerin(pg/ml) <sup>a</sup>        | <5.6           | 5.6-8.4      | 8.5-52.7     | 52.8- 9027      |
| No calcification, n                              | 26*            | 25           | 19           | 16 <sup>#</sup> |
| Calcification, n                                 | 5 <sup>#</sup> | 6            | 12           | 15*             |
| Serum osteocalcin (ng/ml) <sup>b</sup>           | 0.77-0.82      | 0.83-0.92    | 0.93-1.53    | 1.60-10.56      |
| No calcification, n                              | 24             | 18           | 21           | 23              |
| Calcification, n                                 | 7              | 13           | 10           | 8               |
| Serum FGF23 (pg/ml) <sup>c</sup>                 | 10.0-22.7      | 22.9-29.0    | 29.7-40.7    | 42.0- 148.0     |
| No calcification, n                              | 24             | 20           | 19           | 23              |
| Calcification, n                                 | 7              | 11           | 12           | 8               |
| Serum 25-hydroxyvitamin D3 (nmol/l) <sup>d</sup> | 29.2-48.1      | 48.6-77.3    | 78.6-119.1   | 121.1-239.3     |
| No calcification, n                              | 20             | 19           | 25           | 22              |
| Calcification, n                                 | 11             | 12           | 6            | 9               |

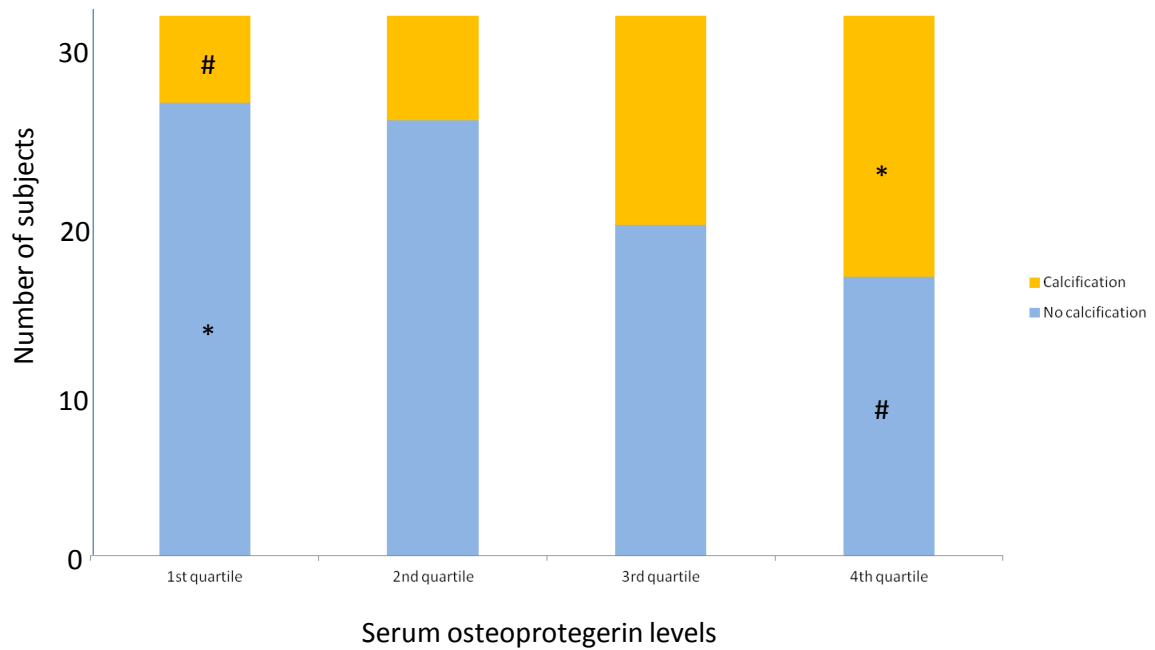
<sup>a</sup> P=0.015 by chi-square test. \*: Number of subjects significantly greater than other quartiles. #: Number of subjects significantly less than other quartiles.

<sup>b</sup> P=0.278 by chi-square test.

<sup>c</sup> P=0.499 by chi-square test.

<sup>d</sup> P=0.364 by chi-square test.

Figure 1. Presence or absence of cervical arterial calcification in quartiles based on serum osteoprotegerin levels in 124 patients with type 2 diabetes. P=0.015 by chi-square test. Serum osteoprotegerin levels in the 1st, 2nd, 3rd and 4th quartiles were <5.6, 5.6-8.4, 8.5-52.7, and 52.8-9027 pg/ml, respectively. \* Number of subjects was significantly greater than in other quartiles. # Number of subjects was significantly less than in other quartiles.



2型糖尿病患者124例を、血清OPG値によって四分位に分けた場合の臨床成績および検査成績をTable 2に示した。年齢と血清adiponectinは、血清OPGが増加するにつれて高値になった(年齢:P=0.001、血清adiponectin: P=0.002)。これに対して血清25-hydroxyvitamin D3は、血清OPG第4分位において低値を示した(P=0.002)。

Table 2. Clinical and laboratory data for 124 patients with type 2 diabetes divided into quartiles of serum osteoprotegerin levels (<5.6; 5.6-8.4; 8.5-52.7; and 52.8-9027 pg/ml)

|                                       | 1st quartile | 2nd quartile | 3rd quartile            | 4th quartile    | P value |
|---------------------------------------|--------------|--------------|-------------------------|-----------------|---------|
| Subjects (male/female)                | 31(25/6)     | 31(20/11)    | 31(23/8)                | 31(20/11)       |         |
| Age (years)                           | 61.0±1.2     | 66.3±1.4*    | 65.9±1.5                | 69.6±1.4**      | 0.001   |
| Height (cm)                           | 165.3±1.4    | 158.3±1.4**  | 164.6±1.1 <sup>##</sup> | 158.8±1.5**,\$  | 0.001   |
| Weight (kg)                           | 68.6±2.4     | 59.6±1.7*    | 66.7±2.5                | 60.0±1.7*       | 0.003   |
| BMI                                   | 24.9±0.7     | 23.7±0.5     | 24.5±0.7                | 23.6±0.5        | 0.366   |
| Duration of diabetes mellitus (years) | 12.0±1.4     | 16.9±1.6     | 14.7±1.4                | 15.2±1.4        | 0.142   |
| Systolic blood pressure (mmHg)        | 127.0±2.6    | 133.6±2.5    | 136.1±4.6               | 140.7±2.6*      | 0.029   |
| Diastolic blood pressure (mmHg)       | 74.7±1.5     | 75.0±1.6     | 74.9±1.7                | 75.7±1.7        | 0.975   |
| FMD (%)                               | 4.0±0.5      | 4.4±0.4      | 4.2±0.4                 | 3.0±0.7         | 0.178   |
| Mean IMT (mm)                         | 0.95±0.05    | 1.07±0.06    | 1.13±0.07               | 1.04±0.09       | 0.337   |
| HbA1c (NGSP) (%)                      | 8.0±0.4      | 7.6±0.2      | 7.9±0.2                 | 7.4±0.2         | 0.371   |
| Total cholesterol (mg/dl)             | 192.1±7.7    | 191.6±4.6    | 188.1±6.4               | 192.4±4.7       | 0.953   |
| Triglyceride (mg/dl)                  | 136.6±12.9   | 129.7±12.6   | 120.5±9.0               | 137.1±10.8      | 0.709   |
| HDL-Cholesterol (mg/dl)               | 47.8±2.3     | 51.4±2.7     | 55.2±2.3                | 51.7±2.3        | 0.210   |
| LDL-Cholesterol (mg/dl)               | 111.7±7.4    | 113.8±4.3    | 109.0±5.2               | 113.0±5.2       | 0.937   |
| Creatinine (mg/dl)                    | 0.78±0.03    | 0.79±0.03    | 0.81±0.04               | 0.83±0.05       | 0.721   |
| eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )     | 79.5±3.7     | 70.0±3.0     | 74.4±4.1                | 69.2±3.4        | 0.159   |
| Albuminuria (mg/g creatinine)         | 75.4±27.9    | 146.8±37.6   | 173.7±43.6              | 117.4±53.6      | 0.357   |
| Adiponectin (µg/ml)                   | 5.8±0.7      | 8.5±1.1      | 9.0±1.6                 | 12.2±1.0**      | 0.002   |
| Osteocalcin (ng/ml)                   | 1.6±0.2      | 1.7±0.4      | 1.4±0.2                 | 1.9±0.3         | 0.596   |
| 25-hydroxyvitamin D3 (nmol/l)         | 93.1±7.7     | 103.4±7.3    | 93.9±10.1               | 61.9±5.6*,\$,\$ | 0.002   |
| FGF23 (pg/ml)                         | 32.7±2.8     | 31.3±3.1     | 39.0±4.5                | 34.8±2.2        | 0.370   |
| Ca (mg/dl)                            | 9.3±0.05     | 9.4±0.06     | 9.4±0.07                | 9.3±0.07        | 0.499   |
| iP (mg/dl)                            | 3.6±0.09     | 3.6±0.09     | 3.6±0.08                | 3.5±0.08        | 0.937   |

Values are shown as mean ±SE and were analyzed by one-way ANOVA.

eGFR: estimated glomerular filtration rate.

\* P< 0.05 vs. 1st quartile. \*\* P<0.01 vs. 1st quartile.

# P<0.05 vs. 2nd quartile. ## P<0.01 vs. 2nd quartile.

\$ P<0.05 vs. 3rd quartile. \$\$ P<0.01 vs. 3rd quartile.

2型糖尿病患者124例を、糖尿病腎症の病期分類に従い分けた場合の臨床データならびに血管石灰化の有無を評価した (Table 3)。血清クレアチニン、尿中アルブミン排泄は腎症の病期が進展するに従い増加し、eGFRは腎症の進展に従い低下した。血清FGF23は腎症4期において高値を示した (P=0.007)。血清osteoprotegerin、osteocalcin、25-hydroxyvitamin D3は腎症病期において差異はなかった。また頸動脈石灰化の有無に関しても、腎症病期の間に関連性はなかった。

Table 3. Laboratory data for 124 patients with type 2 diabetes according to progression of diabetic nephropathy

|                                     | Stage 1     | Stage 2     | Stage 3           | Stage 4              | P value |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------------|----------------------|---------|
| Subjects (male/female)              | 59(42/17)   | 40(24/16)   | 19(17/2)          | 6(5/1)               |         |
| Serum creatinine (mg/dl)            | 0.73±0.02   | 0.81±0.03   | 0.87±0.03*        | 1.2±0.10**.,###,\$\$ | < 0.001 |
| eGFR (ml/min)                       | 80.1±2.6    | 69.3±2.9*   | 68.7±4.0          | 46.5±3.2**.,#        | <0.001  |
| Albuminuria (mg/g creatinine)       | 12.4±1.1    | 95.0±10.7** | 483.8±63.6**.,### | 538.0±98.4**.,###    | <0.001  |
| Serum osteoprotegerin (pg/ml)       | 183.8±117.5 | 329.6±227.4 | 168.1±87.2        | 59.8±27.6            | 0.876   |
| Serum osteocalcin (ng/ml)           | 1.58±0.2    | 1.79±0.3    | 1.35 ±0.3         | 2.06 ±0.8            | 0.696   |
| Serum 25-hydroxyvitamin D3 (nmol/l) | 85.3±5.7    | 86.2±6.5    | 103.3±14.9        | 81.1±18.8            | 0.516   |
| Serum FGF23 (pg/ml)                 | 32.6±1.8    | 33.2±3.5    | 36.1±3.6          | 58.7±7.1**           | 0.007   |
| No calcification, n                 | 41          | 26          | 13                | 5                    |         |
| Calcification, n                    | 18          | 14          | 4                 | 1                    | 0.725   |

Values are mean ±SE or n.

Values were analyzed by one-way ANOVA or chi-square test.

\* P< 0.05 vs. 1st quartile. \*\* P<0.01 vs. 1st quartile.

# P<0.05 vs. 2nd quartile. ## P<0.01 vs. 2nd quartile.

\$ P<0.05 vs. 3rd quartile. \$\$ P<0.01 vs. 3rd quartile.



血清 OPG の対数と様々な因子との間の単回帰分析を行った (Table 4)。血清 OPG は年齢 ( $P < 0.0001$ )、収縮期血圧 ( $P = 0.030$ )、血清 adiponectin ( $P = 0.001$ ) と正の相関を示し、BMI ( $P = 0.045$ )、血清 25-hydroxyvitamin D3 ( $P = 0.001$ ) と負の相関を示した (Figure 2)。

Table 4. Simple linear regression analysis of variables with possible associations with serum osteoprotegerin levels in patients with type 2 diabetes.

|                                       | P value | r      |
|---------------------------------------|---------|--------|
| Age                                   | <0.0001 | 0.37   |
| BMI                                   | 0.045   | -0.18  |
| Systolic blood pressure               | 0.030   | 0.20   |
| Diastolic blood pressure              | 0.722   | -0.03  |
| Duration of diabetes mellitus (years) | 0.255   | 0.10   |
| HbA1c (NGSP)                          | 0.072   | -0.16  |
| Total-Cholesterol                     | 0.972   | -0.003 |
| Triglyceride                          | 0.927   | 0.01   |
| HDL-Cholesterol                       | 0.310   | 0.09   |
| LDL-Cholesterol                       | 0.809   | -0.02  |
| Creatinine                            | 0.878   | 0.01   |
| Ln (FGF23)                            | 0.373   | 0.08   |
| Ln (25-hydroxyvitamin D3)             | 0.001   | -0.31  |
| Osteocalcin                           | 0.422   | 0.07   |
| Ln (FMD)                              | 0.294   | -0.01  |
| Mean IMT                              | 0.976   | 0.002  |
| Ln (Adiponectin)                      | 0.001   | 0.34   |
| EPC                                   | 0.330   | -0.13  |
| Ln Ca                                 | 0.217   | -0.11  |
| iP                                    | 0.983   | -0.002 |
| Ualb                                  | 0.634   | 0.05   |
| CVRR                                  | 0.362   | 0.09   |

Figure 2. Relationships of serum osteoprotegerin (OPG) levels with age (A), serum 25-hydroxyvitamin D3 (B), and serum adiponectin (C) in the patients with type 2 diabetes.

Figure 2. (A)

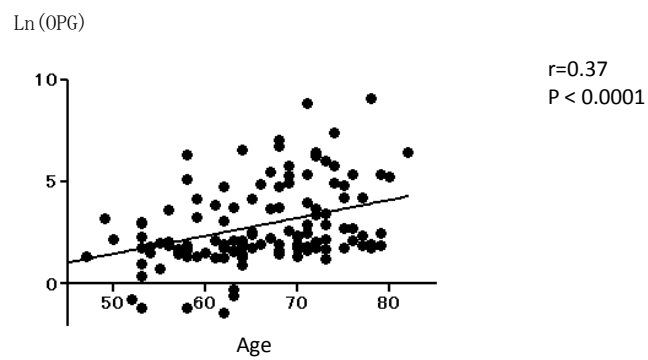


Figure 2. (B)

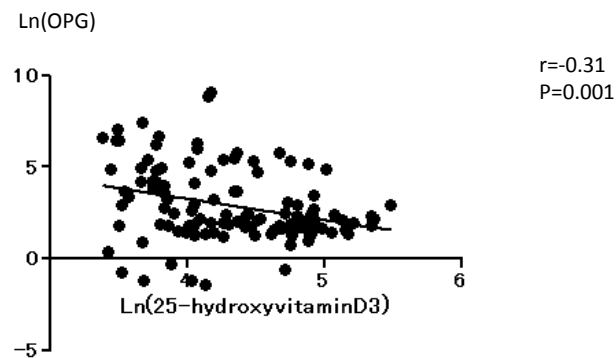
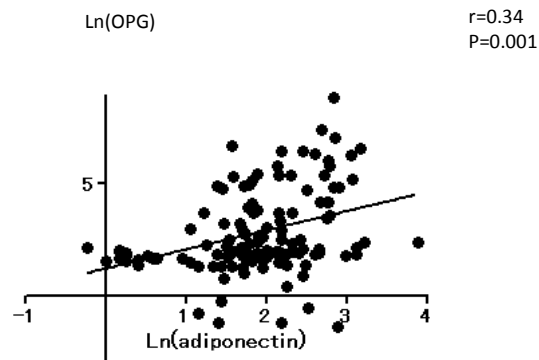


Figure 2. (C)



血管石灰化に影響を及ぼす因子を調べるために、血管石灰化の有無を従属変数として、血清 OPG との単回帰分析で P 値 0.05 未満であった、年齢、BMI、収縮期血圧、25-hydroxyvitamin D3 の対数、adiponectin の対数そして OPG の対数を独立変数として、尤度比による変数増加法による多重ロジスティック回帰分析を行った (Table 5)。年齢、収縮期血圧、25-hydroxyvitamin D3 の対数、OPG の対数は検定から外れ、モデル  $\chi^2$  検定は有意 ( $P=0.001$ ) となった。Ln(adiponectin) (オッズ比 1.89、オッズ比の 95%信頼区間 1.04-3.46) と BMI (オッズ比 0.85、オッズ比の 95%信頼区間 0.73-0.99) が有意 ( $P<0.05$ ) であった。血管石灰化は BMI と血清 adiponectin 値で説明され、血清 OPG 値は関連しないことを意味した。

Table 5. Multiple logistic model analysis showing independent variables to assess patients with calcification vs., no calcification.

|                             | B     | P value | EXP  | 95% CI |      |
|-----------------------------|-------|---------|------|--------|------|
| BMI                         | -0.16 | 0.041   | 0.85 | 0.73   | 0.99 |
| Ln(adiponectin)             | 0.64  | 0.038   | 1.89 | 1.04   | 3.46 |
| model $\chi^2$ test P=0.001 |       |         |      |        |      |
|                             |       | P value |      |        |      |
| Age                         |       | 0.180   |      |        |      |
| Systolic blood pressure     |       | 0.610   |      |        |      |
| Ln(OPG)                     |       | 0.281   |      |        |      |
| Ln(25-hydroxyvitamin D3)    |       | 0.771   |      |        |      |

Comparison between calcification vs. no calcification was performed. Age, systolic blood pressure, Ln(OPG), Ln(25-hydroxyvitamin D3) were included in the initial model as independent variables, but all of these were excluded at the final step.

#### 4. 考察

2型糖尿病患者の血管石灰化は、血清OPG値との関連が示唆されたが、血清osteocalcin、FGF23、25-hydroxyvitamin D3などの骨関連液性因子との関連性はみられなかった。血清OPGは、他の骨関連因子や鉄などを介することなく、直接に血管平滑筋の骨芽細胞化に影響を与える<sup>10, 19)</sup>。このことは、FGF23が腎臓におけるリン代謝を介して、血清リン濃度が血管石灰化に影響を与えるといった機序とは異なる<sup>20)</sup>。重度の糖尿病腎症の症例では、血清リン濃度の上昇や他の因子などが血管石灰化に影響を及ぼすため、本研究では、血清リン濃度が上昇してこない軽度から中等度までの糖尿病腎症の患者集団において、頸動脈石灰化と骨代謝関連因子との関連を調べた。

FMDは動脈硬化初期の変化として現れる血管内皮機能低下を評価するのに良い指標である。FMDの変化は、血清OPG値や頸動脈石灰化とは関連がなかった。このことから、血清OPGの増加は動脈硬化や糖尿病腎症の進展とは独立して、血管石灰化に影響を与える因子といえる。本研究は横断観察であるため、血清OPGと血管石灰化の因果関係を解明するには至らないが、血清OPG値は血管障害、さらに動脈硬化を推定するのに有用な指標となる可能性がある。実際にこれまで、2型糖尿病患者における、血清OPG値と頸動脈や末梢動脈疾患との関係<sup>21)</sup>、2型男性糖尿病患者における、血清OPG値と心血管機能との関係<sup>22)</sup>、微量アルブミン尿を伴った2型糖尿病患者において、血清OPG値は冠動脈疾患の予測因子となること<sup>23)</sup>、血清OPG値は、経皮的冠動脈形成術を行った心筋梗塞患者の長期予後を推測する因子となること<sup>24)</sup>などが報告されている。

RANKLは骨芽細胞に、RANKは破骨細胞に発現している。OPGは骨芽細胞が分泌している可溶性蛋白質で<sup>25)</sup>、TNF-related family の一員であり、主な作用は未熟破骨細胞に発現しているRANKにRANKLの可溶性decoy receptorとして作用し、RANK-RANKL 信号伝達を阻害することにより、未熟破骨細胞の成熟化を抑制している<sup>10, 25)</sup>。正常血管壁において、内膜と血管平滑筋はOPGを産生しているが、RANK

やRANKLは発現していない<sup>10, 26-28)</sup>。ところが、動脈硬化病変ではRANKLやRANKが発現するようになる<sup>29-31)</sup>。このことは、動脈硬化病変において、RANK-RANKL信号伝達により破骨細胞が成熟していくが、OPGがこの信号伝達を阻害することにより、血管石灰化に抑制的に作用していることが示唆される<sup>26, 32-33)</sup>。RANK-RANKLによる血管石灰化は、糖尿病罹病期間、糖尿病細小血管障害、FGF23や25-hydroxyvitamin D3などが関係したカルシウム・リン代謝異常による血管障害とは独立した作用機序である。本研究において我々は、合併症の進展していない糖尿病患者において、RANK-RANKL系がどのように破骨細胞を分化させるのかは解明できなかったが、糖尿病細小血管障害や大血管障害の有無にかかわらず、血管石灰化は血清OPG高値の症例に発症しやすいことを明らかにした。

血管石灰化は糖尿病患者、特に糖尿病腎症を有する患者によく見られる<sup>2, 4, 34)</sup>。私が所属する研究室の過去の研究では、糖尿病腎症が進展した症例において、冠動脈石灰化症例が増加することを明らかにした<sup>3)</sup>。この場合、FGF23や25-hydroxyvitamin D3に関連して、カルシウム・リン代謝異常が血管石灰化を引き起こしている。本研究では、対象患者124人中糖尿病腎症4期の症例は6人のみで主に糖尿病腎症が軽度から中等度の患者を対象にしているが、Table 3に示すように、血管石灰化の割合や血清OPG値は、糖尿病腎症の進展とは関連がな

い。このことから血管石灰化は、単に糖尿病腎症が進展したから生じるといったものではないことが示された。

BMI、収縮期血圧、adiponectin、そして25-hydroxyvitamin D3は、単回帰分析にて、血清OPG値と有意の相関関係を示した。血清adiponectin値と血清OPG値とは特に強い正相関を認めた。骨組織においてadiponectinは骨芽細胞に作用し、RANKLの発現を高めOPGの分泌を抑制している<sup>35)</sup>。血清adiponectinと血清OPGは正相関を示すことから<sup>36)</sup>、RANK-RANKL系の賦活に抗して増加したOPGに対して、adiponectinはOPG産生に拮抗してRANK-RANKL系を介する破骨細胞の分化を進めることが推察される<sup>35)</sup>。血清25-hydroxyvitamin D3は、血清OPG値と負の相関を示した。これまでの研究によると、顎骨において活性型1 $\alpha$ ,25-hydroxyvitamin D3はRANKLの発現を誘導し、OPGの分泌を抑制する。すなわち、活性型vitamin D3は、破骨細胞の分化を誘導する<sup>37-38)</sup>。したがって、骨組織でのOPGとadiponectin、25-hydroxyvitamin D3との関係は、血管壁の石灰化においても相応する関連性が推察される。

血管石灰化に影響を及ぼす因子を調べるために、血管石灰化の有無を従属変数として、血清OPGとの単回帰分析でP値0.05未満であった、年齢、BMI、収縮期

血圧、25-hydroxyvitamin D3の対数、adiponectinの対数そしてOPGの対数を独立変数として、多重ロジスティック回帰分析を行った。その結果、BMI (P=0.041)、Ln(adiponectin) (P=0.038)は血管石灰化に影響を及ぼす因子として有意となったが、Ln(OPG)などは外れてしまった。このことから、血管石灰化は、骨代謝関連因子より肥満とくに内臓脂肪による影響のほうが多大であることが示された。実際にこれまで、肥満や肥満の罹病期間が冠動脈の石灰化に影響を及ぼすといった報告がされている<sup>39-41)</sup>。内臓脂肪より炎症性サイトカインTNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha)が分泌され、血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への分化を促進すると報告されている<sup>42)</sup>。

## 5. 結論

糖尿病腎症軽度から中等度の患者において、血管石灰化と血清OPG値との関連を見出した。また、血管石灰化や血清OPG値は、糖尿病腎症の進展とは関連がなかった。2型糖尿病患者において、血清OPG値の上昇は血管石灰化存在と関連し、石灰化の進展抑止に関わる可能性がある。



## 第Ⅱ部

2型糖尿病患者における血管内皮前駆細胞およびレチノール結合蛋白4の動態：急性運動負荷

### 1. 緒言

Retinol-binding protein 4 (RBP4)は、21KDaの蛋白質で主に肝細胞で合成されているが、骨格筋や脂肪細胞でも合成され、インスリン抵抗性を表す指標の一つである<sup>43)</sup>。血清RBP4は、肥満、耐糖能障害、糖尿病、特に糖尿病腎症の患者において増加する<sup>44-47)</sup>。RBP4は、骨格筋におけるインスリンシグナルの阻害、肝細胞においてブドウ糖の放出を増加させることにより、インスリン抵抗性を増大させる<sup>48)</sup>。RBP4はトランスサイレチンホモ四量体 transthyretin homotetramer (TTR)に結合し、高分子量の蛋白複合体(RBP4-TTR)を形成する。糸球体濾過量が低下すると、RBP4-TTRの腎排泄が低下し、血清RBP4濃度が増加し、インスリン抵抗性が増大する<sup>48)</sup>。しかし、RBP4はインスリン抵抗性と関係がないという報告もありさらなる検討を要する<sup>49)</sup>。

最近、Kahnら<sup>50)</sup>は、ラットでの急性運動負荷による筋由来のRBP4を調べた。彼

らは、対照群と比較して糖尿病ラットでは、筋由来RBP4 mRNAの発現が亢進するが、運動はこれを修飾することを報告している。

私たちの研究室では、骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) の動態を研究してきた。過去の研究では、虚血性心疾患患者において、日常の運動習慣がEPCを増加させることを見い出した<sup>51)</sup>。増加したEPCは、動脈硬化性変化を起こした血管内皮を修復しているのかもしれない<sup>51-52)</sup>。

本研究では、2型糖尿病患者を対象に急性運動負荷が、血清RBP4値に与える影響を検討した。また、動脈硬化の進展にける内皮機能に関連してEPC数の動態も併せて検討した。さらに急性運動負荷によるこれらの反応性が糖尿病腎症の進展により変化するかについても検討した。

## 2. 方法

### 対象

2006年3月から2010年12月までに自治医科大学附属さいたま医療センター外来に通院加療している2型糖尿病患者62例を対象とした。患者は男性50例、女性12人例で、年齢は47-79歳 ( $65.1 \pm 8.1$  歳, mean  $\pm$  SD) であった。

2 型糖尿病の診断は、日本糖尿病学会の判定基準<sup>13)</sup>に準じて、空腹時血糖 $\geq 126$  mg/dl、75g OGTT 2 時間値  $\geq 200$  mg/dl、随時血糖  $\geq 200$  mg/dl のいずれかを認めたもの、または病歴で 2 型糖尿病と診断され食事療法、運動療法、経口糖尿病薬・インスリンのいずれかで加療中の患者を対象とした。HbA<sub>1c</sub> (NGSP) は  $7.6 \pm 1.4$  %、糖尿病罹患歴  $14.9 \pm 8.5$  年であった。患者は糖尿病の他に、高血圧症 32 例、脂質異常症 38 例、肥満 18 例を合併し、喫煙は 24 例で認められた。細小血管症は、網膜症 23 例、神経障害 28 例、腎症 32 例であった。透析患者、亜硝酸薬の常用患者、感染症合併例、悪性腫瘍合併例、骨盤内手術既往例は対象から除外した。動脈硬化の危険因子は以下のように定義した。収縮期血圧 140、拡張期血圧 90 mmHg 以上のもの、あるいは降圧薬を常時服用しているものを高血圧症とした。血清 LDL コレステロール値 140 mg/dl 以上、血清 HDL コレステロール値 40 mg/dl 未満、血清中性脂肪値 150 mg/dl 以上、あるいはスタチンやフィブラート系薬剤を常時服用しているものを脂質異常症とした。血清 LDL コレステロールは、Friedewald の計算式 ( $LDL-C = Total-C - (HDL-C + TG/5)$ ) を用いて計算した。Body mass index (BMI) が 25 以上を肥満とした。過去 3 か月以内に 1 日 1 本以上喫煙習慣があるものを喫煙者とした。また糖尿病網膜症は眼科医が診断した。心電図の R-R 間隔変動率 (coefficient of variation of R-R interval, CVRR) が 2 %未満を糖尿病自律神経障害ありとした。糖尿病腎症

は、微量アルブミン尿や顕性タンパク尿、推定糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) から、厚生労働省糖尿病調査研究班報告糖尿病腎症の病期分類に従い診断した<sup>14)</sup>。

血液検体は空腹時、座位で定期外来受診時に採取した。項目は、HbA<sub>1c</sub>、血清総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、血中尿素窒素そしてクレアチニンである。尿検体は早朝外来時に採取し、尿中のアルブミンやクレアチニンを測定した。運動耐容能はエルゴメータによる心肺運動負荷試験 (CPX) を行い、嫌気性代謝閾値 (anaerobic thresholds, AT) における酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2$  at AT) と最大酸素摂取量 (Peak  $\dot{V}O_2$ ) を測定した。また、運動負荷前後の EPC 数 (CD34<sup>+</sup>/133<sup>+</sup>細胞数) および血清 RBP4 値を測定した。

本研究は自治医科大学の倫理委員会で臨床研究 (許可番号: 臨 06-26 号および、臨 10-05 号) として許可され、書面にてすべての患者からインフォームドコンセントを得た上で行った。

## 測定

### (1) 血液生化学検査

血液検体は採血管に採取し 4℃で 3,000 回転/分で 15 分間遠心し、上清は分注し測定するまで -80 °Cで凍結保存した。HbA<sub>1c</sub>、血清総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、血清クレアチニンは酵素法で測定した。血清 adiponectin は ELISA 法で Human adiponectin ELISA kits (Otsuka Pharmaceutical Co., Tokyo)を用いて測定した。血清 RBP4 は ELISA 法で Human RBP4 ELISA kits (AdipoGen, Seoul, Korea)を用いて測定した。尿中微量アルブミン排泄量はラテックス凝集免疫測定法 (Eiken, Tokyo) で測定した。腎機能は日本腎臓学会による日本人での推定糸球体濾過量 (eGFR) 推算式を用いた<sup>15)</sup>。

$$\text{eGFR (ml/min/1.73m}^2\text{)} = 194 \times \text{Cr}^{(-1.094)} \times \text{年齢}^{(-0.287)} \text{ (女性は} \times 0.739\text{)}$$

末梢血の EPC は表面抗原 CD34<sup>+</sup>/133<sup>+</sup>細胞数とし、抗 CD34<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>抗体を用いた fluorescence-activated cell sorting (FACS) (FACS Calibur<sup>TM</sup>; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)により測定した。

## (2) 運動耐容能検査

心肺運動負荷試験 (Cardio-pulmonary exercise stress test, CPX) はエルゴメータと呼気ガス分析を併用した、代謝動態も評価できる運動耐容能検査である。検査時刻は 14 時~15 時で、当センター生理機能検査室で行った。評価項目は嫌気性代謝閾値 (AT) と最大酸素摂取量 (peak  $\dot{V}O_2$ ) である。12 誘導心電

図と血圧計を装着し、エルゴメータ (Ergometer 232C<sup>®</sup>, Minato Medical Science, Osaka, Japan) と呼気ガス分析機 (AE-300SR, Minato Medical Science) を用いて ramp 負荷テスト (直線的漸増負荷法) を行った。プロトコールは、安静座位 1 分、ウォーミングアップ 1 分 (0W、60 rpm) の後、運動強度 15W/min、回転速度 60 rpm で運動負荷し、下肢疲労、息切れ、心電図上有意な ST 低下、最大心拍数 (220-年齢) 達成のいずれかで検査終了とした。AT は  $\dot{V}CO_2$  の  $\dot{V}O_2$  に対する上昇点 (V-slope method) で決定した。検査の平均的な時間は約 8 分である。運動耐容能検査の前後に採血し、末梢血の EPC 数および血清 RBP4 値を測定した。

### 統計

すべての測定値は平均値±標準誤差で示した。群間比較は、Student の t 検定をおこなった。関連のある 2 群の差は対応のある t 検定を行った。解析はすべて SPSS<sup>®</sup> Statistics 18.0 (Japan IBM., Tokyo, Japan) 統計ソフトを用いた。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意と判断した。

### 3. 結果

2 型糖尿病患者 62 例を、糖尿病腎症 1 期、糖尿病腎症 2 期から 4 期 の 2 群に分けて臨床的データを比較した (Table 6)。糖尿病腎症は、微量アルブミン尿や顕性タンパク尿、推定糸球体濾過量 (eGFR) から、厚生労働省糖尿病調査

研究班報告糖尿病腎症の病期分類に準じて診断した<sup>14)</sup>。BUN, 血清 creatinine は、腎症 2 - 4 期の群において高値であり、eGFR は、腎症 2 - 4 期の群において低値であった(BUN; P= 0.031, serum creatinine; P= 0.033, eGFR; P= 0.052)。他の因子においては、2 群間で有意差はなかった。

Table 6. Clinical characteristics of the diabetic subjects with and without nephropathy

| Clinical stages                       | Stage 1   | Stages 2-4 | P value |
|---------------------------------------|-----------|------------|---------|
| Subjects (male/female)                | 30(24/6)  | 32(26/6)   |         |
| Age (years)                           | 64.4±1.5  | 65.8±1.4   | 0.515   |
| Height (cm)                           | 163.3±1.5 | 162.2±1.2  | 0.564   |
| Weight (kg)                           | 65.4±1.9  | 62.3±2.1   | 0.281   |
| BMI                                   | 24.4±0.6  | 23.5±0.6   | 0.277   |
| Duration of diabetes mellitus (years) | 13.5±1.6  | 16.1±1.5   | 0.236   |
| Systolic blood pressure (mmHg)        | 130.8±2.4 | 129.4±2.3  | 0.684   |
| Diastolic blood pressure (mmHg)       | 75.9±1.2  | 72.8±1.5   | 0.124   |
| HbA1c (NGSP) (%)                      | 7.5±0.2   | 7.69±0.2   | 0.610   |
| Total cholesterol (mg/dL)             | 189±5.3   | 196±6.8    | 0.457   |
| Triglyceride (mg/dL)                  | 113±10.6  | 124±10.2   | 0.432   |
| HDL-Cholesterol (mg/dL)               | 53.5±2.5  | 52.0±2.7   | 0.689   |
| LDL-Cholesterol (mg/dL)               | 112±4.2   | 117±5.9    | 0.511   |
| BUN (mg/dL)                           | 14.2±0.7  | 16.5±0.8   | 0.031   |
| Creatinine (mg/dL)                    | 0.76±0.03 | 0.85±0.03  | 0.033   |
| Uric acid                             | 5.22±0.2  | 4.98±0.2   | 0.417   |
| eGFR(ml/min/1.73m <sup>2</sup> )      | 77.8±2.7  | 69.3±3.3   | 0.052   |
| Albuminuria (mg/g creatinine)         | 13.1±1.7  | 440±145    | 0.0001  |
| Adiponectin (µg/mL)                   | 7.77±0.9  | 9.62±1.0   | 0.173   |
| RBP4 (µg/mL)                          | 48.2±4.3  | 53.5±3.6   | 0.349   |
| EPCs (cells/100µL)                    | 88.9±18.6 | 63.2±13.4  | 0.259   |
| Smoking, n (%)                        | 12 (40)   | 12 (38)    | 0.847   |
| Dyslipidemia, n (%)                   | 18 (60)   | 20 (63)    | 0.840   |
| Hypertension, n (%)                   | 14 (47)   | 18 (56)    | 0.316   |

|                           |         |         |       |
|---------------------------|---------|---------|-------|
| Obesity, <i>n</i> (%)     | 10 (33) | 8 (25)  | 0.657 |
| Retinopathy, <i>n</i> (%) | 10 (33) | 13 (40) | 0.497 |
| Neuropathy, <i>n</i> (%)  | 12 (40) | 16 (50) | 0.429 |
| Medication, <i>n</i> (%)  |         |         |       |
| ACEI                      | 5 (17)  | 6 (19)  | 0.830 |
| ARB                       | 6 (20)  | 13 (41) | 0.078 |
| Calcium channel blockers  | 5 (17)  | 8 (25)  | 0.421 |
| Diuretics                 | 1 (3)   | 0 (0)   | 0.298 |
| Statins                   | 13(43)  | 11(34)  | 0.469 |

Values are mean  $\pm$  SE or *n* (%). Values are analyzed by Student's t-test or chi-square for independence test. GFR: glomerular filtration rate, ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitor, ARB: angiotensin receptor blocker

2型糖尿病患者において、心肺運動負荷試験が血清 RBP 4 に与える影響を検討した (Fig 3)。心肺運動負荷試験は、運動強度を次第に高める事により酸素消費量を増加させ、嫌気性代謝閾値 ( $12.7 \pm 3.0$  ml/kg/min)そして最大酸素摂取量 ( $20.7 \pm 4.6$  ml/kg/min)まで到達させる試験である。嫌気性代謝閾値および最大酸素摂取量ともに、糖尿病腎症 1 期、糖尿病腎症 2 期から 4 期の 2 群において差異はなかった (嫌気性代謝閾値 ;  $13.1 \pm 0.5$  VS.  $12.4 \pm 0.6$  ml/kg/min,  $P=0.369$  最大酸素摂取量;  $21.9 \pm 0.9$  VS.  $20.6 \pm 0.9$  ml/kg/min,  $P=0.297$ )。糖尿病腎症 1 期の群において、最大酸素摂取量に達する急性運動負荷をかけたところ、血清 RBP4 値は有意に増加した (負荷前  $48.2 \pm 4.3$ , 負荷後  $54.3 \pm 4.2$   $\mu$ g/ml,  $p=0.0006$ ) ( Fig 3a)。これに対して、糖尿病腎症 2 – 4 期の群では、血清 RBP 4 値は運動負荷前後において変化を認めなかった (負荷前  $53.5 \pm 3.6$



負荷後  $52.2 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$  (Fig 3b)。

Fig 3. Serum RBP4 levels in response to an acute exercise load in diabetic subjects with nephropathy. (a) the subjects with stage 1 ( $n=30$ ), (b) the subjects with stages 2-4 ( $n=32$ ). Open circles show means  $\pm$  SE.

Fig 3 (a)

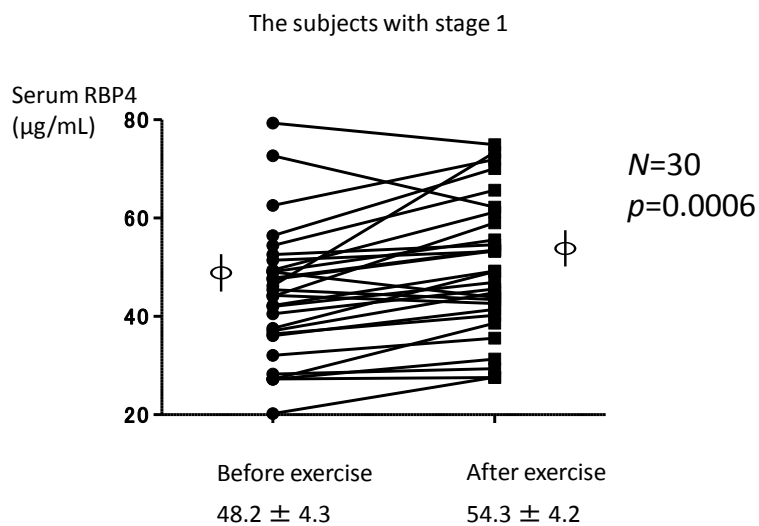


Fig 3 (b)

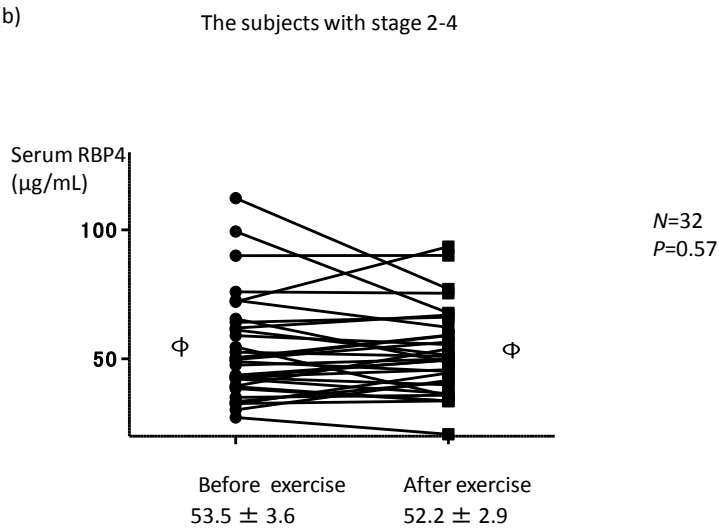
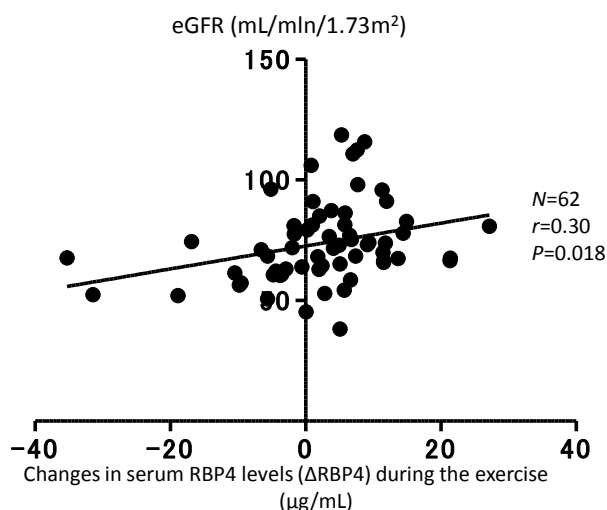


Fig 4. は、急性運動負荷による血清 RBP 4 の変化と eGFR との関係を示した。

両者の間には 正の相関を認めた ( $r=0.30$ ,  $P=0.018$ )。

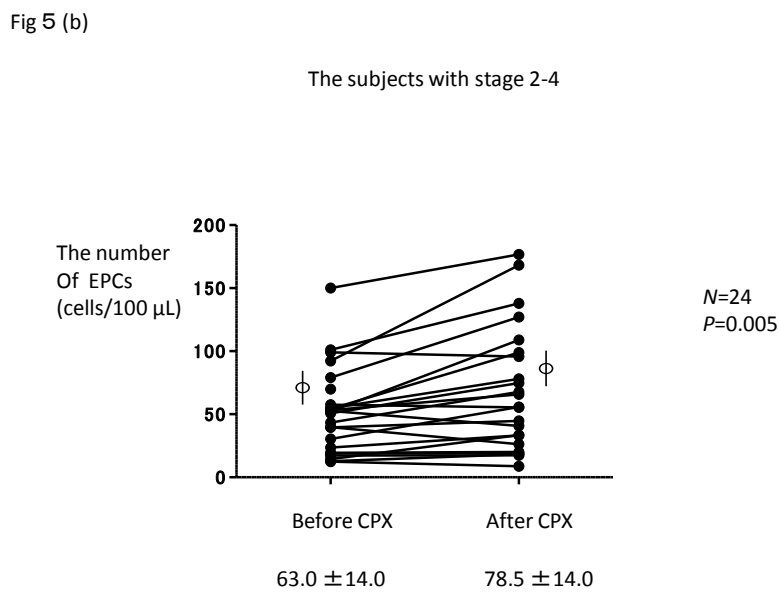
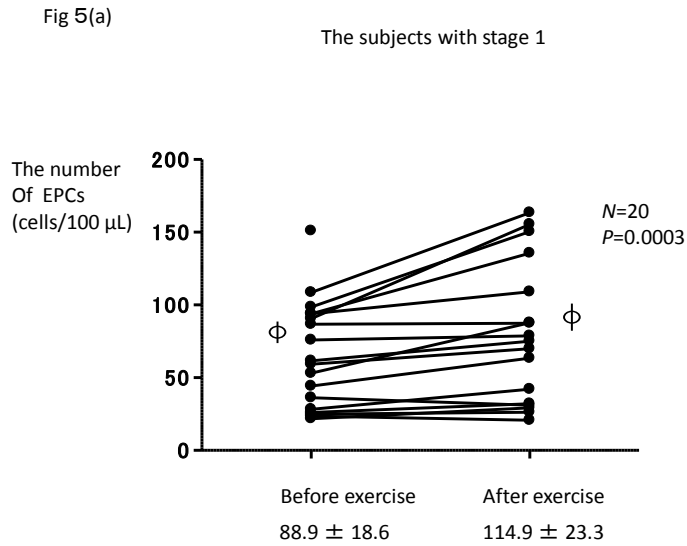
Fig 4. The relationship of changes in serum RBP4 levels ( $\Delta$ RBP4) during the acute exercise load with estimated GFR in the diabetic subjects.  $n=62$ .

Fig. 4



恒常状態における2型糖尿病患者62例のEPC数を、糖尿病腎症1期、糖尿病腎症2期から4期の2群に分けて検討したが、2群間に差異はなかった（糖尿病腎症1期の群  $88.9 \pm 18.6$ ，糖尿病腎症2-4期の群  $63.2 \pm 13.4$  cells/100  $\mu$ l、 $P=0.259$ ）。さらに急性運動負荷によるEPC動員は腎症の有無にかかわらず負荷後に有意に増加した（Fig. 5）。

Fig 5. The number of endothelial progenitor cells (EPCs) in response to the acute exercise load in diabetic subjects with nephropathy. (a) the subjects with stage 1 ( $n= 20$ ), (b) the subjects with stages 2-4 ( $n= 24$ ). Open circles show means  $\pm$  SE.



#### 4. 考察

血清RBP4値は様々な病態で変化がみられる。私たちの研究室でのこれまでの研究では、血清RBP4値は糖尿病や脳梗塞のような動脈硬化性疾患で上昇していた<sup>53-54)</sup>。特に糖尿病患者において、血清RBP4値は糖尿病腎症の進展により次第に増加した<sup>45, 47, 53)</sup>。よって、eGFRと血清RBP4値との間には負の相関がみられた。また、脳梗塞患者では新規発症または既往にかかわらず血清RBP4値が上昇しており、血清adiponectin値は減少していた<sup>54)</sup>。血中のRBP4は、筋組織におけるインスリンシグナルの抑制や肝細胞でのブドウ糖放出を亢進させることにより、インスリン抵抗性を増大させる<sup>48, 55)</sup>。持続的なインスリン抵抗性は、虚血性心疾患、脳血管疾患や末梢動脈疾患など動脈硬化性疾患を引き起こすことが示唆されてきた<sup>56-58)</sup>。糖尿病、高血圧、脂質異常症が脳梗塞患者の基礎疾患となることはよく認められており、血清RBP4値の上昇は、ビタミンA(レチノール)輸送担体とは関係なく、このような動脈硬化性疾患と深く関わるものが推察される。

RBP4は、血液中におけるレチノール輸送担体であり、主に肝細胞で合成される。RBP4は、肝細胞以外でも合成され、脂肪組織や骨格筋でも発現している<sup>43)</sup>。また腎臓は生体のレチノールの恒常性を維持するために重要な働きを担っている。私たちの研究室でのこれまでの研究では、2型糖尿病患者で血清RBP4値は

糖尿病腎症の進展に伴い次第に増加し、血清RBP4値はeGFRと負の相関を示した<sup>53)</sup>。RBP4の腎排泄については検討していないが、GFRの低下がRBP4-transthyretin複合体の腎クリアランスに影響を与えることが推測される。

今回の研究では、急性運動負荷による血清RBP4値の上昇が糖尿病腎症1期のグループでみられたが、糖尿病腎症2-4期のグループでは認められなかった。急性運動負荷はおよそ8分程度であり、心肺運動負荷試験のガイドラインに従って最大酸素摂取量に達するまで運動負荷をかけた<sup>59)</sup>。また今回対象とした2型糖尿病患者において、急性運動負荷前後の血清RBP4の変動はeGFRと正の相関を示した。腎障害のない2型糖尿病患者では、急性運動負荷は、RBP4の産生および放出を刺激することが考えられる。RBP4は肝細胞と同様に骨格筋や脂肪細胞でも産生される<sup>43, 55)</sup>。Kahnらは、糖尿病ラットではコントロールラットと比較して、骨格筋でのRBP4mRNAの発現が4倍亢進していることを、また筋由来RBP4mRNAの発現が急性運動負荷により増加することを報告した<sup>50)</sup>。Kahnらの報告より、我々の研究で見出した、急性運動負荷による血清RBP4値の上昇は筋由来ではないかと推測される。糖尿病腎症が進展した症例では、急性運動負荷により血清RBP4値は増加しなかった。血清RBP4の基礎値は、糖尿病腎症の進展に伴い微増し、急性運動負荷による血清RBP4値の増加は、糖尿病腎症の進展に伴

い消失した。今回の研究での急性運動負荷は僅か10分未満であり、RBP 4 の腎排泄の関わりは除外できるのではないかと考えられる。また急性運動負荷によるRBP 4 の変動は、直接的に糖尿病腎症の進展とは関連がないかもしれない。糖尿病腎症の進展に伴い、まだ未同定の動脈硬化関連因子が出現し、これが血清RBP4値の変動に関わった可能性も推察される。本研究は、急性運動負荷により血清RBP 4 値が上昇することを示した初めての報告であるが、その生理学的、病理学的な役割は未解明のままである。急性運動負荷による筋組織から放出されるRBP 4 やRBP 4 の病態生理学的役割に関して今後の研究で解明する必要がある。

血管内皮前駆細胞は、フローサイトメトリーによりCD34<sup>+</sup>/133<sup>+</sup>細胞として同定した。EPC数は糖尿病腎症1期から4期の群間にて、差異がみられなかった。私たちの研究室でのこれまでの研究では、糖尿病腎症や神経障害が進展するにつれてEPC数は減少したが、統計学的な有意差は生じなかった<sup>60)</sup>。細小血管障害がない、またはわずかに糖尿病腎症がみられる糖尿病患者において、EPC数は急性運動負荷により増加した。これに対して、糖尿病腎症が進展した症例では、急性運動負荷によるEPC数の増加は生じなかった<sup>60)</sup>。急性運動負荷により誘発されるEPCの機序は明らかではないが、急性運動負荷は、骨髄由来のEPCを誘導することにより、血管内皮を修復するものと推測される。

## 5. 結論

今回の研究では、2型糖尿病患者において急性運動負荷により血清RBP4値は腎症のない症例で速やかに増加するが、腎症のある症例では変化がみられなかった。EPC数は、腎症の有無に関わらず、急性運動負荷により増加した。これらの成績より、急性運動負荷により増加したRBP4は、糖尿病腎症進展に伴って低減するが、急性運動負荷により増加したEPC数は、腎症の進展に関わらず保持されることが示唆される。

## 引用文献

1. Inoue T. & Node K.: Vascular failure: A new clinical entity for vascular disease. *J Hypertens.* 24: 2121-2130, 2006.
2. Demer L. & Tintut Y.: The bone-vascular axis in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 19: 349-353, 2010.
3. Ogita M., Funayama H., Nakamura T., Sakakura K., Sugawara Y., Kubo N., Ako J., Ishikawa S. & Momomura S.: Plaque characterization of non-culprit lesions by virtual histology intravascular ultrasound in diabetic patients: impact of renal function. *J Cardiol.* 54: 59-65, 2009.
4. Ketteler M., Westenfeld R., Schlieper G. & Brandenburg V.: Pathogenesis of vascular calcification in dialysis patients. *Clin Exp Nephrol.* 9: 265-270, 2005.
5. Moreno P. R. & Fuster V.: New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 44: 2293-2300, 2004.
6. Shao J. S., Cai J. & Towler D. A.: Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26: 1423-1430, 2006.
7. Luo G., Ducy P., McKee M. D., Pinero G. J., Loyer E., Behringer R. R. & Karsenty G.: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature.* 386: 78-81, 1997.
8. Speer M. Y., McKee M. D., Gulberg R. E., Liaw L., Yang H. Y., Tung E., Karsenty G. & Giachelli C. M.: Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med.* 196: 1047-1055, 2002.
9. Schafer C., Heiss A., Schwarz A., Westenfeld R., Ketteler M., Floege J., Muller-Esterl W., Schinke T. & Jahn-Dechent W.: The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest.* 112: 357-366, 2003.
10. Simonet W. S., Lacey D. L., Dunstan C. R., Kelley M., Chang M. S., Luthy R., Nguyen H. Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H. L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T. M., Hill D., Pattison W.,



- Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R. & Boyle W. J.: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89: 309-319, 1997.
11. Schoppet M., Preissner K. T. & Hofbauer L. C.: RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22: 549-553, 2002.
  12. Khosla S.: Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 142: 5050-5055, 2001.
  13. 葛谷健中., 佐藤譲, 金澤康德, 岩本安彦, 小林正, 南条輝志男, 佐々木陽, 清野裕, 伊藤千賀子, 島健二, 野中共平, 門脇孝, 糖尿病診断基準委員会: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病*. 42: 385-404, 1999.
  14. The research committee of diabetic nephropathy: The renewal of classification by Research Committee of the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare for disorders of diabetes mellitus. *J Jpn Diab Soc*. 44: 623, 2001.
  15. Matsuo S., Imai E., Horio M., Yasuda Y., Tomita K., Nitta K., Yamagata K., Tomino Y., Yokoyama H. & Hishida A.: Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis*. 53: 982-992, 2009.
  16. Celermajer D. S., Sorensen K. E., Gooch V. M., Spiegelhalter D. J., Miller O. I., Sullivan I. D., Lloyd J. K. & Deanfield J. E.: Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 340: 1111-1115, 1992.
  17. Corretti M. C., Anderson T. J., Benjamin E. J., Celermajer D., Charbonneau F., Creager M. A., Deanfield J., Drexler H., Gerhard-Herman M., Herrington D., Vallance P., Vita J. & Vogel R.: Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 39: 257-265, 2002.
  18. Terminology and Diagnostic Criteria Committee, Japan Society of Ultrasonics in Medicine: Standard method for ultrasound evaluation of carotid artery lesions. *Japanese Journal of Medical Ultrasonics*. 36: 510-518, 2009.
  19. Kong Y. Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H. L., Timms E., Capparelli C.,

- Morony S., Oliveira-dos-Santos A.J., Van G., Itie A., Khoo W., Wakeham A., Dunstan C.R., Lacey D.L., Mak T.W., Boyle W.J. & Penninger J.M.: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 397: 315-323, 1999.
20. Mirza M.A., Hansen T., Johansson L., Ahlstrom H., Larsson A., Lind L. & Larsson T.E.: Relationship between circulating FGF23 and total body atherosclerosis in the community. *Nephrol Dial Transplant*. 24: 3125-3131, 2009.
21. Poulsen M.K., Nybo M., Dahl J., Hosbond S., Poulsen T.S., Johansen A., Hoiland-Carlson P.F., Beck-Nielsen H., Rasmussen L.M. & Henriksen J.E.: Plasma osteoprotegerin is related to carotid and peripheral arterial disease, but not to myocardial ischemia in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 10: 76, 2011.
22. Chen W.J., Rijzewijk L.J., van der Meer R.W., Heymans M.W., van Duinkerken E., Lubberink M., Lammertsma A.A., Lamb H.J., de Roos A., Romijn J.A., Smit J.W., Bax J.J., Bjerre M., Frystyk J., Flyvbjerg A. & Diamant M.: Association of plasma osteoprotegerin and adiponectin with arterial function, cardiac function and metabolism in asymptomatic type 2 diabetic men. *Cardiovasc Diabetol*. 10: 67, 2011.
23. Reinhard H., Nybo M., Hansen P.R., Wiinberg N., Kjaer A., Petersen C.L., Winther K., Parving H.H., Rasmussen L.M., Rossing P. & Jacobsen P.K.: Osteoprotegerin and coronary artery disease in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Cardiovasc Diabetol*. 10: 70, 2011.
24. Pedersen S., Mogelvang R., Bjerre M., Frystyk J., Flyvbjerg A., Galatius S., Sorensen T.B., Iversen A., Hvelplund A. & Jensen J.S.: Osteoprotegerin predicts long-term outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Cardiology*. 123: 31-38, 2012.
25. Osako M.K., Nakagami H., Koibuchi N., Shimizu H., Nakagami F., Koriyama H., Shimamura M., Miyake T., Rakugi H. & Morishita R.: Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circ Res*. 107: 466-475, 2010.

26. Min H., Morony S., Sarosi I., Dunstan C.R., Capparelli C., Scully S., Van G., Kaufman S., Kostenuik P.J., Lacey D.L., Boyle W.J. & Simonet W.S.: Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 192: 463-474, 2000.
27. Nadra I., Mason J.C., Philippidis P., Florey O., Smythe C.D., McCarthy G.M., Landis R.C. & Haskard D.O.: Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res.* 96: 1248-1256, 2005.
28. Hofbauer L.C., Shui C., Riggs B.L., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., O'Brien T. & Khosla S.: Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 280: 334-339, 2001.
29. Golledge J., McCann M., Mangan S., Lam A. & Karan M.: Osteoprotegerin and osteopontin are expressed at high concentrations within symptomatic carotid atherosclerosis. *Stroke.* 35: 1636-1641, 2004.
30. Schoppet M., Al-Fakhri N., Franke F.E., Katz N., Barth P.J., Maisch B., Preissner K.T. & Hofbauer L.C.: Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in Monckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 4104-4112, 2004.
31. Dhore C.R., Cleutjens J.P., Lutgens E., Cleutjens K.B., Geusens P.P., Kitslaar P.J., Tordoir J.H., Spronk H.M., Vermeer C. & Daemen M.J.: Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1998-2003, 2001.
32. Morony S., Tintut Y., Zhang Z., Cattley R.C., Van G., Dwyer D., Stolina M., Kostenuik P.J. & Demer L.L.: Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr(-/-)* mice. *Circulation.* 117: 411-420, 2008.
33. Kaden J.J., Bickelhaupt S., Grobholz R., Haase K.K., Sarikoc A.,

- Kilic R., Brueckmann M., Lang S., Zahn I., Vahl C., Hagl S., Dempfle C.E. & Borggrefe M.: Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol.* 36: 57–66, 2004.
34. Singh D.K., Winocour P., Summerhayes B., Kaniyur S., Viljoen A., Sivakumar G. & Farrington K.: Prevalence and progression of peripheral vascular calcification in type 2 diabetes subjects with preserved kidney function. *Diabetes Res Clin Pract.* 97: 158–165, 2012.
35. Luo X.H., Guo L.J., Xie H., Yuan L.Q., Wu X.P., Zhou H.D. & Liao E.Y.: Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res.* 21: 1648–1656, 2006.
36. Gannage-Yared M.H., Fares F., Semaan M., Khalife S. & Jambart S.: Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population. *Clin Endocrinol (Oxf).* 64: 652–658, 2006.
37. Kondo T., Kitazawa R., Maeda S. & Kitazawa S.: 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res.* 19: 1411–1419, 2004.
38. Tang X. & Meng H.: Osteogenic induction and 1,25-dihydroxyvitamin D3 oppositely regulate the proliferation and expression of RANKL and the vitamin D receptor of human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 54: 625–633, 2009.
39. Cassidy A.E., Bielak L.F., Zhou Y., Sheedy P.F., 2nd, Turner S.T., Breen J.F., Araoz P.A., Kullo I.J., Lin X. & Peyser P.A.: Progression of subclinical coronary atherosclerosis: does obesity make a difference? *Circulation.* 111: 1877–1882, 2005.
40. Lee C.D., Jacobs D.R., Jr., Schreiner P.J., Iribarren C. & Hankinson A.: Abdominal obesity and coronary artery calcification in young adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr.* 86: 48–54, 2007.
41. Reis J.P., Loria C.M., Lewis C.E., Powell-Wiley T.M., Wei G.S., Carr J.J., Terry J.G. & Liu K.: Association between duration of overall and abdominal obesity beginning in young adulthood and coronary artery calcification in middle age. *JAMA.* 310: 280–288, 2013.

42. Tintut Y., Patel J., Parhami F. & Demer L.L. : Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*. 102: 2636-2642, 2000.
43. Soprano D.R., Soprano K.J. & Goodman D.S. : Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res*. 27: 166-171, 1986.
44. Graham T.E., Yang Q., Bluher M., Hammarstedt A., Ciaraldi T.P., Henry R.R., Wason C.J., Oberbach A., Jansson P.A., Smith U. & Kahn B.B. : Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 354: 2552-2563, 2006.
45. Raila J., Henze A., Spranger J., Mohlig M., Pfeiffer A.F. & Schweigert F.J. : Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. *Kidney Int*. 72: 505-511, 2007.
46. Takebayashi K., Suetsugu M., Wakabayashi S., Aso Y. & Inukai T. : Retinol binding protein-4 levels and clinical features of type 2 diabetes patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 2712-2719, 2007.
47. Cabre A., Lazaro I., Girona J., Manzanares J., Marimon F., Plana N., Heras M. & Masana L. : Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J Intern Med*. 262: 496-503, 2007.
48. Graham T.E. & Kahn B.B. : Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. *Horm Metab Res*. 39: 717-721, 2007.
49. Lewis J.G., Shand B.I., Elder P.A. & Scott R.S. : Plasma retinol-binding protein is unlikely to be a useful marker of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract*. 80: e13-15, 2008.
50. Kahn B.B. : Novel mechanisms by which adipose cells regulate fuel homeostasis and systemic insulin sensitivity (abstract). *The 92nd Annual Meeting of The Endocrine Society*. June 19-22 San Diego CA, 2010.
51. Ikeda N., Yasu T., Kubo N., Nakamura T., Sugawara Y., Ueda S., Ishikawa S.E., Saito M., Kawakami M. & Momomura S. : Daily exercise and bone marrow-derived CD34<sup>+</sup>/133<sup>+</sup> cells after myocardial infarction treated by bare metal stent implantation. *Circ J*. 72: 897-901, 2008.
52. Van Craenenbroeck E.M., Vrints C.J., Haine S.E., Vermeulen K.,

- Goovaerts I., Van Tendeloo V.F., Hoymans V.Y. & Conraads V.M.: A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J Appl Physiol (1985)*. 104: 1006-1013, 2008.
53. Murata M., Saito T., Otani T., Sasaki M., Ikoma A., Toyoshima H., Kawakami M. & Ishikawa S.E.: An increase in serum retinol-binding protein 4 in the type 2 diabetic subjects with nephropathy. *Endocr J*. 56: 287-294, 2009.
54. Sasaki M., Otani T., Kawakami M. & Ishikawa S.E.: Elevation of plasma retinol-binding protein 4 and reduction of plasma adiponectin in subjects with cerebral infarction. *Metabolism*. 59: 527-532, 2010.
55. Sasaki M., Kawano T., Saito T., Yuzawa M., Ikoma A., Tamemoto H., Kawakami M. & Ishikawa S.E.: Hypoadiponectinemia in patients with cerebral infarction: comparison with other atherosclerotic disorders. *Am J Med Sci*. 333: 140-144, 2007.
56. Chen M.P., Tsai J.C., Chung F.M., Yang S.S., Hsing L.L., Shin S.J. & Lee Y.J.: Hypoadiponectinemia is associated with ischemic cerebrovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25: 821-826, 2005.
57. Efsthathiou S.P., Tsioulos D.I., Tsiakou A.G., Gratsias Y.E., Pefanis A.V. & Mountokalakis T.D.: Plasma adiponectin levels and five-year survival after first-ever ischemic stroke. *Stroke*. 36: 1915-1919, 2005.
58. Yang Q., Graham T.E., Mody N., Preitner F., Peroni O.D., Zabolotny J.M., Kotani K., Quadro L. & Kahn B.B.: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 436: 356-362, 2005.
59. 伊東春樹 谷. ed (2007) *心肺運動負荷テストと運動療法* (南江堂).
60. Murata M T.H., Saito T, Otani T, Jinbo S, Ishikawa S: Endothelial Impairment and Bone Marrow-derived CD34+/133+ Cells in Diabetic Subjects with Erectile Dysfunction *J Diabetes Invest* 3: 526-533, 2012.

