

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 24 年度博士課程入学

氏名 長木 孔明

指導教員 桑原 正貴

### 論文題目 糖尿病抵抗性ラットの発見とその機序の解明に関する研究

糖尿病はインスリンの作用不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う症候群であり、発症因子には遺伝因子と環境因子が関与している。インスリンは血糖値を降下させる唯一のホルモンであり、インスリンを分泌する膵β細胞の機能は非常に重要である。さらに糖尿病合併症に関して、神経障害および循環器系障害は直接命に関わるため重要視されている。また、現在糖尿病研究において、糖尿病モデル動物が使用される研究は多く、その由来は様々であるものの発症に重要な役割を果たす遺伝的素因や環境要因の理解に非常に有用である。その中には薬剤誘発型糖尿病モデル動物として、ストレプトゾトシンを用いた糖尿病モデル動物が存在する。多くの哺乳類はストレプトゾトシンに対して感受性があり、多種多様な動物を用いて糖尿病研究に使用されている。しかしながら、動物種による感受性の違いがあり、げっ歯類でさえ、マウスはラットと比較してストレプトゾトシンに対して感受性が低く、ヒトにおいても比較的抵抗性があると考えられている。当研究室において偶発的に発見された「WTC ラットにおいて、ストレプトゾトシンによる糖尿病誘発効果が現れない」という事象から、このラットにおけるストレプトゾトシン抵抗性の機序および生体の特徴を明らかにすることを目的とした。

はじめに、WTC ラットのストレプトゾトシンに対する感受性を用量反応性も含めて検討した。その結果、いずれの用量においても WTC ラットではストレプトゾトシンによる糖尿病の誘発が妨げられた。また、インスリンの分泌能も維持されていた。この理由として、膵β細胞における ATP 感受性 K チャネルの欠損や GLUT2 の発現低下がストレプトゾトシンの膵β細胞への取り込みを抑制することでストレプトゾトシン抵抗性もたらされることが考えられた。このことから、GLUT2 および Kir6.2 の遺伝子発現の検討を行った。その結果、WTC ラットにおいてストレプトゾトシンの取り込みは Wistar ラットと同様に行われていることが考えられた。そのため、膵臓以外での糖代謝や膵β細胞の保護およびインスリン受容体の感受性増大に関与する GLP-1 着目し、それらの発現について検討した。その結果、ストレプトゾトシンの投与により Wistar ラットの骨格筋において GLP-1R の発現が減少しており、WTC ラットにおいて、Wistar ラットと比較して、より一層糖代謝能に差が現れることが考えられた。これらのことから、WTC ラットにおけるストレプトゾトシン抵抗性に関して、膵β細胞の内部におけるストレプトゾトシンの細胞毒性発現に対する

機能が非常に重要であると考えられた。

続いて、ストレプトゾトシンによって発現される細胞毒性である活性酸素の処理に関する検討を行った。ストレプトゾトシンにより生成される活性酸素の詳細は不明であるが、アロキサンによって生成される活性酸素および膵 $\beta$ 細胞の破壊を導く活性酸素の詳細はスーパーオキシドアニオンから過酸化水素を経て、ヒドロキシラジカルが生成され、それが膵 $\beta$ 細胞を破壊することがすでに報告されている。アロキサンの投与によっても WTC ラットにおいて糖尿病が誘発されなかったことから、この経路がストレプトゾトシンによる糖尿病誘発機序に関わると考え、スーパーオキシドアニオンを過酸化水素に変換する SOD の発現量を検討したところ Wistar ラットにおいて非常に発現量が高い結果が得られた。さらに過酸化水素について、そこに重金属が存在すると過酸化水素と重金属が反応してヒドロキシラジカルが生成される。この時にメタロチオネインが重金属を無毒化することでヒドロキシラジカルの生成を抑制する機構がある。亜鉛は膵 $\beta$ 細胞に多く存在しており、メタロチオネインの作用は非常に重要と考えられる。さらに、糖代謝に重要な役割を果たす骨格筋や肝臓にも多く含まれていることからこれらの臓器においてもメタロチオネインの発現の検討を行ったところ、ストレプトゾトシンの投与前には WTC ラットと Wistar ラットの間で発現の差は認められなかったがストレプトゾトシンの投与により Wistar ラットにおいて肝臓および膵臓においてメタロチオネインの発現が減少していた。これらの結果から、WTC ラットにおいてはヒドロキシラジカルの産生が特に行われにくいことが考えられた。しかしながら、WTC ラットにおいてはスーパーオキシドアニオンが残存する傾向が強くなることになるが、スーパーオキシドアニオンの酸化力はヒドロキシラジカルの酸化力と比較し、極めて弱いため、特にヒドロキシラジカルの生成が膵 $\beta$ 細胞の破壊には重要であることは明らかであり、WTC ラットは以上の理由により、ストレプトゾトシン抵抗性を示すことが考えられた。

WTC ラットにおいて、ヒドロキシラジカルの産生が抑制されることにより、ストレプトゾトシン抵抗性を示すことが考えられたが、*in vivo* 実験によってさらに明確にするために、Wistar ラットに対してマンニトールおよびアスコルビン酸を投与した後、ストレプトゾトシンを投与することにより、糖尿病の誘発にどのような影響を与えるかについて検討した。マンニトールを投与した群においても、アスコルビン酸を投与した群においても、ストレプトゾトシンを単体で投与した群と比較して、血糖値の上昇が有意に妨げられた。しかしながら、マンニトールを投与した群におけるストレプトゾトシンの糖尿病誘発作用の抑制が著しく、この理由については、特にマンニトールがヒドロキシラジカルのスカベンジャーであり、アスコルビン酸は全般的に活性酸素を取り除くため、ヒドロキシラジカルの除去能としてはマンニトールの方が高かったためにストレプトゾトシンの作用の抑制に差が認められたものと考えられ、さらに、特にヒドロキシラジカルの除去能がストレプトゾトシンの作用抑制について非常に重要であることが示された。

さらに、WTC ラットのさらなる糖尿病研究への貢献を考慮し、直接生命に関わる糖尿病

合併症として着目されている神経障害および循環器系障害の観点から、ストレプトゾトシンに対する心拍数、体温、活動量および自律神経系機能に及ぼす影響を検討した。この実験では Wistar ラットを用いた過去のいくつかの同様な研究( Howarth et al. 2005, 2006 ) で使用した 60mg/kg というストレプトゾトシンの用量を用いたところ、血糖値の上昇の程度は Wistar ラットと比較して軽度なものの、ストレプトゾトシン投与による有意な血糖値の上昇を認めた。組織所見においても WTC ラットにおける膵β細胞の破壊は Wistar ラットと比較して軽度であり、機能も維持されているものと考えられた。しかしながら、上記までの結果との異なりは明らかであり、その理由として、活性酸素の役割が一つに考えられた。過酸化水素は安定性が比較的高く、生体においてはセカンドメッセンジャーとして使われており、生体には複雑に関与している。そのため、活性酸素と抗酸化機構のバランスは重要であり、これまでに認められたストレプトゾトシンに対する用量非依存的な反応をもたらしていることが考えられる。また、WTC ラットにおいて心拍数、体温、活動量の低下が非常に小さく、高血糖時における代謝機能の低下に対する抵抗性があることが認められた。高血糖によるミトコンドリア由来活性酸素の産生過剰が糖尿病性血管合併症の発症機序としてもっとも重要な因子であり、WTC ラットにおける活性酸素の処理能力が、このような因子を除去していることが考えられる。自律神経系機能は、ストレプトゾトシン投与前から WTC ラットにおいては HF 値が高く副交感神経系活動が優位であった。ストレプトゾトシン投与後は、Wistar ラット、WTC ラット共に副交感神経系活動が優位に傾くが、WTC ラットではその変化の程度は小さかった。マウスのストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルにおいて心拍数の低下が、コリン作動性神経の節前線維もしくは神経節における神経伝達物質の機能低下に起因すると報告されていることから、自律神経障害の見地から今後の WTC ラットの糖尿病性合併症における検討を行うことで、新たな知見を得ることが期待される。

以上より、ストレプトゾトシンの糖尿病誘発機序として活性酸素の産生が関与しているという報告に基づき、WTC ラットの抗酸化機構の特徴が示された。ストレプトゾトシンもアロキサンと同様にスーパーオキシドアニオンから過酸化水素を経てヒドロキシラジカルを産生することで膵β細胞を破壊すること、SOD の発現が少なく、メタロチオネインの発現が安定していることによって、酸化力が極めて高いヒドロキシラジカルが産生されにくい特徴を示すことが明らかとなった。

これまでラットにおけるストレプトゾトシンを用いた糖尿病研究は多いものの、ラットにおけるストレプトゾトシン感受性は高いのに対し、ウサギやヒトの膵島においては比較的、ストレプトゾトシンに抵抗性を示すことから、ストレプトゾトシンを用いたラットにおける糖尿病研究が有用であるかの判断が難しいところがあった。本論文の成果は、ストレプトゾトシンに感受性が高い動物であるラットにおいて、ストレプトゾトシンの作用機序に直接的に関わる経路における機構を解明し、先天的な糖尿病抵抗性ラットを発見できたことである。このことは、糖尿病発症の見地からヒトの膵島の機能を理解するうえで重

要な知見を提供するのみならず、予防法・治療法の開発においても意義深いものと考えられる。また、WTC ラットを用いた糖尿病合併症の症状の継時的変化について検討し、合併症の発症についても程度および進行速度がより緩やかなものであることが判明した。今後、WTC ラットを用いた糖尿病研究の発展、さらにはウサギやヒトなど、他の動物種との比較検討が行われることで、応用性の観点からもより本研究の価値が高まるものと期待される。