

氏名(本籍)	奥野 晃(大阪府)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第 429 号
学位授与年月日	平成 25 年 12 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題名	抗糖尿病薬トログリタゾンのインスリン抵抗性改善作用に関する研究
論文審査委員	(主査) 浅井 史敏 (副査) 山下 匡 折戸 謙介

論文内容の要旨

糖尿病は 1 型糖尿病と 2 型糖尿病に大別されるが、その糖代謝の調節には膵臓のランゲルハンス島 β 細胞より分泌されるインスリンが重要な役割を担っている。1 型糖尿病の成因は膵臓 β 細胞の破壊にともなうインスリンの絶対的な分泌不足であるのに対し、2 型糖尿病の主な成因はインスリン分泌障害と、インスリンの作用が減弱するインスリン抵抗性であると考えられている。近年、糖尿病の有病率の急激な上昇は世界的に深刻な問題となっているが、患者数では 2 型糖尿病が圧倒的多数を占めている。その為、新たな 2 型糖尿病治療薬の開発が強く望まれている。

2 型糖尿病に適用される抗糖尿病薬には、インスリン分泌促進薬や糖吸収阻害薬およびインスリン抵抗性改善薬がある。インスリン抵抗性改善剤として世界で初めて上市された薬物であるトログリタゾンは、チアゾリジンジオン誘導体の一つであり、その临床上の有用性が期待されたが、特異体質性肝障害により市場からの撤退を余儀なくされた。従って、本剤はその後の作用機序の解析が十分行われなかった。しかし、本領域におけるその後の研究の進展のために、トログリタゾンの作用機序の解明は重要と考えられた。

高血糖につながるインスリン抵抗性の主因が骨格筋におけるインスリン作用不全によると考えられている。このことから、トログリタゾンは、骨格筋におけるインスリンの糖取り込み促進作用を増強している可能性が示唆された。一方、チアゾリジンジオン誘導体は、主に脂肪組織に発現し、脂肪細胞の遺伝子発現と細胞機能を調整するとされる核内転写促進因子 $PPAR\gamma$ のリガンドであることが報告された。更に、チアゾリジンジオン誘導体の $PPAR\gamma$ に対する結合親和性と抗糖尿病作用の効力はよく相関していることから、チアゾリジンジオン誘導体の抗糖尿病作用においては $PPAR\gamma$ が機能的な受容体であると考えられている。これらのことから、トログリタゾンには骨格筋における糖取り込みを促進する作用と脂肪組織を介した作用の両方があると考えられる。

本研究では、トログリタゾンの作用機序として、骨格筋における糖代謝に対する作用と、脂肪組織

における PPAR γ を介すると考えられる遺伝子発現調節を介した作用の両面から検討した。前者の作用については、インスリンの作用組織である骨格筋を含むラット後肢灌流系を用い、骨格筋におけるインスリン刺激による糖取り込みと糖代謝に対する作用を、インスリン非存在あるいは存在下で比較検討した（第 1 章）。後者の作用については、インスリン抵抗性を呈する肥満動物モデルである Zucker 肥満ラットを用い、遺伝子発現の変化を伴った効果発現までにはある程度の時間が必要であることを考慮し、トログリタゾンを 2~3 週間投与後に白色脂肪組織における作用を検討した（第 2 章）。さらに、新規に作出された糖尿病モデル動物である WBN/Kob-*Lepr*^{fa} ラットの病態特性を明らかにするため、インスリン抵抗性を改善するトログリタゾンを投与し、糖尿病の病態およびその進行におけるインスリン抵抗性の関与を検討した（第 3 章）。

第 1 章 Sprague-Dawley ラット後肢灌流系の糖代謝に対するトログリタゾンの作用

Sprague-Dawley ラット後肢灌流系において、トログリタゾン (20 μ M) をインスリン (250 μ U/mL) とともに 30 分間注入すると、インスリン刺激による糖取り込みがトログリタゾンの注入 30 分後に有意に増加し、この増加はトログリタゾンの注入中止後も更に増大した。インスリンとトログリタゾン併用処置群ではトログリタゾン注入中止 30 分後の骨格筋のグリコーゲン含量は、インスリン単独処置群の骨格筋よりも有意に低下していた。インスリン非存在下では、トログリタゾンは高濃度 (50 μ M) においても糖取り込みに影響を与えなかった。しかし、トログリタゾン (≥ 20 μ M) は乳酸とピルビン酸の放出を増加させ、ピルビン酸に対する乳酸の比 (L/P 比) は低下し、酸素消費は増加した。後肢骨格筋において、トログリタゾンは、インスリン非存在下において、フルクトース 2,6-ビスリン酸の含量を変化させずに、グリコーゲン含量を低下させた。トログリタゾンは、インスリン非存在下では糖取り込みを引き起こさないが、インスリン存在下においてはインスリンによる糖取り込みを増加させ、この増加はトログリタゾン注入中断後も更に亢進した。インスリン存在下にトログリタゾンを作用させると、後肢骨格筋のグリコーゲン含量が減少した。このグリコーゲン含量の減少は、筋収縮あるいはエピネフリン処置で観察されるものに類似しており、インスリン刺激による糖取り込みの増強を引き起こしていると考えられる。

第 2 章 インスリン抵抗性モデル動物 Zucker 肥満ラットの脂肪組織におけるトログリタゾンの作用

インスリン抵抗性モデル動物である Zucker 肥満ラットに、トログリタゾンを 2~3 週間混餌投与すると、軽度の高血糖と顕著な高インスリン血症が正常化した。血漿中性脂肪はトログリタゾン投与により肥満ラットおよび非肥満ラットのいずれにおいても低下した。トログリタゾンは、肥満ラットの白色脂肪の総量を変化させなかったが、後腹膜及び皮下脂肪組織の小型脂肪細胞 (< 2,500 μ m²) の数をおよそ 4 倍に増加させた。トログリタゾンはまた、大型脂肪細胞 (> 5,000 μ m²) の数を 50%まで低下させた。実際に、トログリタゾンを処置した後腹膜脂肪組織中のアポトーシスを示す核の割合は、対照群に比べ、2.5 倍高かった。それに付随して、トログリタゾンは、肥満ラットの後腹膜と腸間膜白

色脂肪組織でそれぞれ 2 倍と 1.4 倍に上昇している TNF α の発現レベルを正常化した。また、トログリタゾンは肥満ラットの白色脂肪で 4~10 倍に上昇しているレプチンの発現レベルも顕著に低下させた。これらのことから、トログリタゾンを作用させると、白色脂肪組織において、小型脂肪細胞の数を増加させ、大型脂肪細胞の数を減少させると考えられる。トログリタゾン処置肥満ラットの白色脂肪組織における小型脂肪細胞の数の増加と大型脂肪細胞の数の減少は、増加した TNF α の発現レベルと血漿中性脂肪を正常化し、インスリン抵抗性を改善に導く重要な機序であることが示唆された。

第 3 章 2 型糖尿病モデル動物 WBN/Kob-*Lepr^{fa}* ラットの糖尿病の病態とその進行における インスリン抵抗性の役割

WBN/Kob-*Lepr^{fa}* (*fa/fa*) ラットは、WBN/Kob ラットに Zucker 肥満ラットの肥満遺伝子 (*Lepr^{fa}*) を導入した新規コンジェニックラットであり、肥満を伴い高血糖や膵炎などの病態を示す糖尿病モデル動物である。本研究では、*fa/fa* ラットを用いて糖尿病の発症および進展におけるインスリン抵抗性の関与を検討した。インスリン抵抗性およびインスリン分泌能は、それぞれ、インスリン抵抗性指数および静脈内糖負荷耐糖能試験後のインスリン値の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) を指標として評価した。*fa/fa* ラットは Wistar ラットに比べ、5 週齢からインスリン抵抗性が顕著であった。*fa/fa* ラットのインスリン分泌能は 5 週齢では Wistar ラットよりも高かったが、9 週齢および 11 週齢では約半分に低下した。トログリタゾンをラット飼料に 0.2% wt/wt の割合で混合し、予防実験では糖尿病発症前の 7 週齢より、治療実験では糖尿病発症後の 12 週齢より、4 週間投与した。トログリタゾン投与は予防実験と治療実験のいずれにおいても、インスリン抵抗性を顕著に減少させた。また、予防試験では高血糖の発症を完全に抑制し、治療試験では高血糖を軽減させた。これらの成績から *fa/fa* ラットの呈する 2 型糖尿病にはインスリン抵抗性の関与が大きいことが示された。

本研究の結果から、インスリン抵抗性改善薬であるトログリタゾンは骨格筋においてインスリンによる糖取り込みを増強し、脂肪組織においては小型脂肪細胞の数の増加と大型脂肪細胞の数の減少によってインスリン抵抗性を改善していることが明らかとなった。これらの作用により、トログリタゾンは 2 型糖尿病の成因の一つであるインスリン抵抗性を軽減し、高血糖を改善すると考えられた。本研究成果はチアゾリジンジオン系インスリン抵抗性改善薬の作用機序を明らかにしたとともに、WBN/Kob-*Lepr^{fa}* ラットにおけるインスリン抵抗性の重要性を示した。また、本研究成果は、更なる 2 型糖尿病の病態メカニズムの解明研究、新規 2 型糖尿病モデル動物の開発、新規作用メカニズムに基づくインスリン抵抗性改善薬の開発に貢献すると期待される。

論文審査の結果の要旨

近年、生活習慣の変化に伴い糖尿病の有病率の急激な上昇が世界的に深刻な問題となっている。糖尿病は1型糖尿病と2型糖尿病に大別される。糖代謝の調節には膵臓のランゲルハンス島 β 細胞より分泌されるインスリンが重要な役割を担っている。1型糖尿病の成因は膵臓 β 細胞の破壊にともなうインスリンの絶対的な分泌不足であるのに対し、2型糖尿病の主な成因はインスリン分泌障害とインスリンの作用が減弱するインスリン抵抗性がいまったものと考えられている。

糖尿病患者数の大部分を占めているのが2型糖尿病であることから、これまで多くの2型糖尿病治療薬の開発が進められてきた。しかし、現在、2型糖尿病に適用される抗糖尿病薬の大半はインスリン分泌促進薬であり、インスリン抵抗性改善薬はチアゾリジンジオン誘導体のみである。インスリン抵抗性改善薬として世界で初めて上市された薬物であるトログリタゾンは、チアゾリジンジオン誘導体の一つである。トログリタゾンの治療効果は多くの臨床試験で証明されたものの、特異体質性肝障害により市場からの撤退を余儀なくされた。トログリタゾンをはじめとするチアゾリジンジオン誘導体は、脂肪細胞の遺伝子発現と細胞機能を調整するとされる核内転写促進因子 PPAR γ のリガンドであることが報告されたが、トログリタゾンの作用機序の解析は十分行われなかった。しかし、本領域におけるその後の研究の進展のためにトログリタゾンの作用機序の解明は重要と考えられる。本研究の目的は、ラットを用いてトログリタゾンのインスリン抵抗性改善作用の機序を明らかにすることである。

第1章では、正常血糖の Sprague-Dawley ラットを用いて骨格筋の糖代謝に対するトログリタゾンの作用を検討した。これは、高血糖につながるインスリン抵抗性の主因が骨格筋におけるインスリン作用不全によると考えられていることによる。後肢灌流実験において灌流液に添加したトログリタゾンは、インスリン非存在下では後肢筋のグルコースの取り込みを増加させなかったが、解糖系を促進させてグリコーゲン含量を減少させた。これらの変化は、細胞質の NAD⁺/NADH 比の低下もしくは酸素消費の増加の結果として生じたと考えられる。一方、インスリン存在下においてはインスリンによるグルコース取り込みを増加させ、この増加はトログリタゾン注入中断後も更に亢進した。これらのことから、トログリタゾンがインスリン刺激によるグルコース取り込みの増強を引き起こしていることが示唆された。

第2章では、インスリン抵抗性モデル動物である Zucker 肥満ラットの脂肪組織におけるトログリタゾンの作用について検討した。核内転写促進因子 PPAR γ は主に脂肪組織に発現し、脂肪細胞の遺伝子発現と細胞機能を調整するとされ、チアゾリジンジオン誘導体の機能的な受容体であると示唆されている。インスリン抵抗性モデル動物である Zucker 肥満ラットにトログリタゾンを混餌投与すると、軽度な高血糖と顕著な高インスリン血症が正常化した。血漿中性脂肪はトログリタゾン投与により肥満ラットおよび非肥満ラットのいずれにおいても低下した。トログリタゾンは肥満ラットの白色脂肪の総量を変化させなかったが、後腹膜及び皮下脂肪組織の小型脂肪細胞数を増加させ、大型脂肪細胞数

を低下させた。また、トログリタゾンは肥満ラットの後腹膜と腸間膜白色脂肪組織で上昇している TNF α およびレプチンなどのアディポサイトカインの発現レベルも顕著に低下させた。これらのことから、トログリタゾンを肥満ラットに投与すると、白色脂肪組織において PPAR γ を介して大型脂肪細胞のアポトーシスを誘導し、小型脂肪細胞への分化を促進することにより小型脂肪細胞数を増加させると考えられる。トログリタゾン処置により肥満ラットにおける白色脂肪組織の小型脂肪細胞数の増加と大型脂肪細胞数の減少がおり、これによってインスリン抵抗性を惹起するアディポサイトカインの発現レベルならびに血漿中性脂肪が正常化されることによってインスリン抵抗性が改善される機序が示唆された。

第3章では、トログリタゾンを用いて WBN/Kob-*Lepr*^{fa} ラットの糖尿病におけるインスリン抵抗性の役割について検討した。WBN/Kob-*Lepr*^{fa} (*fa/fa*) ラットは、WBN/Kob ラットに Zucker 肥満ラットの肥満遺伝子 (*Lepr*^{fa}) を導入した新規コンジェニックラットであり、肥満とともに高血糖や膵炎などの病態を示す糖尿病モデル動物である。インスリン抵抗性およびインスリン分泌能をインスリン抵抗性指数および静脈内糖負荷耐糖能試験後のインスリン値の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) を指標としてトログリタゾンの効果を検討した。*fa/fa* ラットは Wistar ラットに比べ、若齢 (5 週齢) よりインスリン抵抗性が顕著であった。また、インスリン分泌能も若齢では高かったが、9 週齢以降では約半分に低下した。トログリタゾンを予防実験では糖尿病発症前より、治療実験では糖尿病発症後より 4 週間投与したところ、トログリタゾン投与は予防実験と治療実験のいずれにおいてもインスリン抵抗性を顕著に減少させた。また、予防試験では高血糖の発症を完全に抑制し、治療試験では高血糖を軽減させた。これらの成績から *fa/fa* ラットの呈する 2 型糖尿病にはインスリン抵抗性の関与が大きいことが示された。

本研究の結果から、抗糖尿病薬トログリタゾンは骨格筋においてインスリンによる糖取り込みを増強することが明らかとなった。また、脂肪組織においては脂肪細胞への分化促進作用によって小型脂肪細胞数を増加させ、インスリン抵抗性を改善していることが明らかとなった。これらのことから、トログリタゾンのインスリン抵抗性改善作用は骨格筋における糖取り込みを促進する作用および脂肪組織における脂肪細胞の良性化を介した作用に基づくと考えられる。また、トログリタゾン投与により WBN/Kob-*Lepr*^{fa} ラットの糖尿病が予防ならびに治療されることから本ラットの糖尿病にはインスリン抵抗性の関与の大きいことが明らかとなった。以上のことから、本研究は糖尿病学の発展ならびに新規 2 型糖尿病の治療薬および糖尿病モデル動物の開発に大いに貢献し、意義の高い内容と判断されることから、博士 (獣医学) の学位を授与するのにふさわしい業績であると判定した。