

This(Chapter 1 part of this dissertation) is the peer reviewed version of the following article: [Clin Exp Pharmacol Physiol. 2017 Feb; 44(2):305-312.], which has been published in final form at [doi: 10.1111/1440-1681.12700.].

This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Self-Archiving.

This(Chapter 2 part of this dissertation) is the peer reviewed version of the following article: [Journal of Diabetes Research. 2018 Mar; ID3671892.], which has been published in final form at [doi: org/10.1155/2018/3671892.]. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Hindawi Terms and Conditions for Self-Archiving.

肥満を伴う 2 型糖尿病モデル

WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* ラットの心血管代謝系に及ぼす

高食塩食負荷の影響に関する研究

Cardio-metabolic consequences of high-salt intake in  
WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* rats, a new model of type 2 diabetic  
mellitus with obesity

2017 年 8 月

麻布大学大学院 獣医学研究科

獣医学専攻 博士課程

獣医薬理学

DV1362 高木 善市



第 4 章	総括	52
謝辞		53
参考文献		54
要旨		64
Abstract		69
出典		74

## 緒言

生活習慣病であるメタボリックシンドロームの構成因子として肥満と同様に糖尿病や循環器系疾患は世界的な問題となっている。国際糖尿病連合によると世界の糖尿病人口（推計値）は、2016年に約4億1,500万人であり、2040年までに6億4,200万人に増加すると予想されている（International Diabetes Federation 2016）。さらに、糖尿病患者の半数以上が、微小血管障害が根底の原因と考えられている糖尿病性の腎症、末梢神経障害、網膜症などの合併症を発症しており、QOL(クオリティ・オブ・ライフ)の低下が懸念されている。我が国でも、食の欧米化や急速な高齢化に伴い、糖尿病や循環器系疾患は著しく増加しており、その適切な管理・治療が重要な課題となっている。

血管は弛緩と収縮のバランスによって、その張力を調節している。血管内皮細胞から産生される主要な血管弛緩因子の一酸化窒素(NO)は、血管内皮細胞内でNO合成酵素(eNOS)により産生され、血管平滑筋細胞に拡散することによりcyclic GMP合成酵素に結合してこの酵素を活性化させ、上昇したcyclic GMPによって血管弛緩反応が引き起こされると考えられている。糖尿病のモデル動物では、血管弛緩反応が減弱しているという報告が複数存在する(Cheng *et al.*, 2001; Gupte *et al.*, 2010)。このように、糖尿病の合併症の発症メカニズムの一つに、血管収縮・弛緩反応の異常に基づく微小血管障害が考えられている。

高血圧は肥満および糖尿病と重積する頻度が高いことは周知の事実である(Tuck *et al.*, 1990)。その中でも、食事性の食塩の過剰摂取が引き起

こす食塩感受性高血圧は、我々の生活と密接に関係する。食塩による血圧上昇には、遺伝素因とともに環境因子が深く関与することが知られており、その発症機序として、腎機能障害、交感神経の亢進、血管系の異常などの要因が報告されている (Simonson *et al.*, 1988; Sowers *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 2015)。食塩感受性は、2型糖尿病を罹患していると高くなることが、ヒトの臨床や動物実験から得られたデータにより示されている (Tuck *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2001)。しかし、食塩を過剰摂取することで高血圧を引き起こすことが指摘されているものの、糖尿病における食塩過剰摂取の影響については不明な点が多い。

近年、食塩と糖尿病との関連性についての様々な知見が報告されている。ヒトや実験動物に食塩を過剰摂取させるとインスリン抵抗性が増大するという報告がある (Ogihara *et al.*, 2002a; Ogihara *et al.*, 2002b)。その一方で、食塩によりヒトや実験動物のインスリン抵抗性が低減したという知見および食塩制限により2型糖尿病患者のインスリン抵抗性が増大した知見など相反する報告も存在する (Petrie *et al.*, 1998; Melander, 2000)。このように、現在のところ糖尿病発症に対する食塩の影響については、未だ一定の見解が得られていない。

メタボリックシンドロームとして集積した生活習慣病の相乗的な病態増悪メカニズムに関しては、未だ不明な点が多い。また、食塩の過剰摂取が高血圧を引き起こす要因であることはよく知られているものの、糖尿病における食塩過剰摂取の影響については統一的な見解は得られていない。メタボリックシンドロームの病態の全容解明には、骨格筋、脂肪組織、膵臓、肝臓、血管そして中枢神経系をも含めてエネルギー代謝調節臓器間の

協調的な機能連関を包括的にとらえる必要がある。しかし、メタボリックシンドロームの複雑な病態を試験管内で再現することは極めて困難であることから、メタボリックシンドロームの病態を反映した良質なモデル動物の開発は急務となっている。

Wistar Bonn Koberi Diabetic Fatty (WBKDF, WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>*) ラットは、肥満を伴わない 2 型糖尿病モデルラットである WBN/Kob に肥満モデルである Zucker 肥満ラットのレプチンレセプター肥満遺伝子 (*Lepr<sup>fa</sup>*) を戻し交配により導入し作出された新規の肥満を伴う糖尿病モデルである (Nakama *et al.*, 1985; Akimoto *et al.*, 2008)。レプチンレセプター肥満遺伝子は、レプチン受容体の機能不全を生じ、ホモの個体は、肥満、インスリン抵抗性を示すことが知られている (Zucker, 1965)。以前の研究より、WBKDF ラットは、5 週齢で高トリグリセリド血症、7 週齢で肥満、9 週齢で高血糖を発症する。血漿中のインスリン値は 5 週齢で著しく高くなるが、11 週齢では減少することが知られている (Kaji *et al.*, 2012; Okuno *et al.*, 2013; Nagakubo *et al.*, 2014)。また、加齢とともに、膵臓において炎症細胞の浸潤、線維化、膵島細胞の消失が生じることが知られている (Akimoto *et al.*, 2012)。2 型糖尿病患者では、高インスリン血症が引き金となり、膵  $\beta$  細胞の機能不全を生じ、最終的には持続する膵島の萎縮、線維化に至ることが知られている (Butler *et al.*, 2003)。従って、WBKDF ラットは、ヒトの 2 型糖尿病の病態をよく反映しており、2 型糖尿病に関連する病態研究に有用なモデルとして期待されている。しかし、これまでのところ WBKDF ラットの血圧をはじめとする循環器系の特性については明らかにされていない。

本研究では、WBKDF ラットの循環系および代謝系に対する高食塩食負荷の影響を調べ、2型糖尿病と食塩の関連性を解明することを目的とした。第1章ではWBKDF ラットにおける高食塩食負荷の血圧および血管反応性への影響を検討した。さらに、第2章ではWBKDF ラットの2型糖尿病発症に対する高食塩食負荷の影響について検討した。



## 第 1 章 WBKDF ラットにおける高食塩食負荷の血圧および血管反応性への影響

### 小序

2 型糖尿病と高血圧症の罹患率は、世界中で爆発的に増加している。2 型糖尿病患者の 63% が罹患しているとされる高血圧症を伴うことにより、糖尿病患者における心血管病のリスクは、2 倍に膨れ上がる (Saydah *et al.*, 2004)。2 型糖尿病と高血圧症の病態は、遺伝および環境因子が重要な役割を果たしている (Phillips, 2013)。ヒトの臨床や動物実験から得られたデータでは、毎日の食塩摂取量と高血圧に因果関係があることを示している (Dahl *et al.*, 1962; MacGregor *et al.*, 1982)。多くの研究では、食塩の過剰摂取が引き起こす食塩感受性高血圧がヒトと動物で発症することが明らかとなっている (Kawasaki *et al.*, 1978)。糖尿病患者がよく併発する食塩感受性高血圧は、心血管死のリスクを増加させることとの関連が報告されている (Tuck *et al.*, 1990)。食塩感受性を誘発する病理学的なメカニズムは複雑で、遺伝的および環境的素因が関与しているだろうと考えられてきた。しかし、最近の研究では、食塩感受性高血圧の発症に血管収縮弛緩反応の異常が関与していることを示している (Choi *et al.*, 2015)。先述の通り、WBKDF ラットは、2 型糖尿病モデルラットである WBN/Kob に肥満モデルである Zucker 肥満ラットのレプチンレセプター肥満遺伝子 (*Lepr<sup>fa</sup>*) を戻し交配により導入し作出された (Akimoto *et al.*, 2008)。仮に、WBKDF ラットが食塩感受性を有すれば、2 型糖尿病と高血圧症の関連に重要な知

見が得られる可能性がある。しかし、**WBKDF** ラットの血圧をはじめとする循環器系の特性については十分に分かっていない。今回の検討では、2型糖尿病モデル動物としての価値をさらに高めるために、**WBKDF** ラットにおける高食塩食負荷の血圧および血管反応性への影響について **Wistar** ラットと比較検討した。

## 実験材料および方法

### 実験プロトコール

6週齢の雄性 WBKDF ラットおよび同週齢の Wistar ラット (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) をプラスチックケージで飼育し、標準食 (0.26% NaCl) または高食塩食 (8% NaCl) および水道水を給与し、自由摂取とした。室温は、 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 50~60%とし、照明は午前 7 時~午後 7 時までの 12 時間照明とした。動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を受けた。

WBKDF ラット (N=14) および同週齢の Wistar ラット (N=14) は、6 週齢より標準食群と高食塩食群の 2 群に分け飼育した (各群 N=7)。群分けは、以下の通りである。①標準食を給与した Wistar ラット (Wistar 標準食群) ②高食塩食を給与した Wistar ラット (Wistar 高食塩食群) ③標準食を給与した WBKDF ラット (WBKDF 標準食群) ④高食塩食を給与した WBKDF ラット (WBKDF 高食塩食群)。体重、摂餌量、摂水量は、午前 10 時から午後 2 時の間に測定した。収縮期血圧 (SBP, systolic blood pressure) および心拍数は、無麻酔下で尾動脈走行部位より非観血式血圧計 (BP98A-L, Softron, Tokyo, Japan) を用いて測定した。3 回連続して測定し、その平均値を収縮期血圧、心拍数として算出した。収縮期血圧の曲線下面積 (AUC) は、台形法 (trapezoidal rule) によって算出した。

実験開始から 14 週間後、すなわち 20 週齢のラットをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg IP; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) による麻酔下で全採血を実施し安楽死させた。その後、摘出胸部大動脈を用いて張力実

験を行った。最後に、腎臓を採取し重量を測定した。

#### 摘出胸部大動脈を用いた張力実験

張力実験は、Ito らの方法 (Ito *et al.*, 2007) に従い実施した。張力実験のために、胸部大動脈から採取した各々の動脈リング (長さ: 3 mm) 標本を作製した。Tyrode 液 (mM: 136.8 NaCl, 5.4 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.0 MgCl<sub>2</sub> 11.9 NaHCO<sub>3</sub>, and 5.5 glucose) の入ったマグヌス管内に L 字型の金属棒で吊るし、95% O<sub>2</sub> と 5% CO<sub>2</sub> の混合ガスにさらして 37°C で pH7.3~7.5 に維持した。等尺張力はトランスジューサー (Nihon-Kohden Co. Ltd., Tokyo, Japan) とポリグラフを用いて測定し、レコーダー上に記録した。KCl (60 mM) による収縮反応およびパパベリン (100 μM) による弛緩反応をそれぞれ 100% とした。最初に、各々の動脈を KCl (60 mM) にさらした際の収縮反応を測定した。それから、弛緩反応の用量反応曲線を得るためにフェニレフリン (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) による前収縮後、内皮依存性弛緩剤であるアセチルコリン (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) および内皮非依存性であるニトロプルシド (Wako Pure Chemicals Co., Osaka, Japan) による段階的濃度に対する変化を測定した。最大反応の 50% を引き起こすアゴニストのモル濃度の負の対数 (pD<sub>2</sub>) は、各個体の用量反応曲線から算出した。

#### 血液生化学的解析

ヘパリン処理した血漿は、血液を 10 分間 3000×g の遠心分離により採取した。血漿中のグルコース、ナトリウム、カリウムおよびクロライドを含

む電解質を自動分析装置 (JCA-BM 2250; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) により測定した。血漿中インスリン値は、ラット用の ELISA キット (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Yokohama, Japan) を用いて測定した。血漿中 8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> 値は、8-iso-prostaglandin F<sub>2α</sub> ELISA キット (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) にて測定した。

#### 腎臓の組織学的解析

採材した腎臓は 10% 中性緩衝ホルマリン液で 2 日間固定し、パラフィンにより包埋した。作製した腎臓切片 (5 μm) は、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE 染色) を施し、病理組織学的に観察した。

#### 統計検定

データは平均値±標準誤差で表示した。統計学的解析には 2 way-ANOVA with post hoc を用いた。また、繰り返しのデータに関しては、2 way-ANOVA with repeated measures を用いた。P 値<0.05 の場合に統計学的有意差があるとした。解析には、PRISM (GRAPHPAD, San Diego, CA, USA) を使用した。

## 結果

### 血圧および心拍数

WBKDF 標準食群および Wistar 標準食群の SBP では、実験期間中著しい変化はみられなかった (120-130 mmHg)。そして、系統間において SBP の有意な差は観察されなかった (Figure 1A)。一方、高食塩食負荷により WBKDF ラットおよび Wistar ラットともに 7 週齢以降 SBP の有意な上昇がみられ、SBP の上昇の程度は、WBKDF ラットのほうが Wistar ラットに比べ有意に (180-220 mmHg、 $P<0.01$ ) 高かった (Figure 1A, B)。心拍数は、標準食群および高食塩食群共に、WBKDF ラットでは、Wistar ラットよりも著しく ( $P<0.01$ ) 低かった (Figure 1C)。高食塩食負荷による著明な ( $P<0.01$ ) 心拍数の上昇は、WBKDF ラットのみでみられた (Figure 1C)。

### 摂餌量および摂水量

WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、摂餌量は著しく ( $P<0.01$ ) 高かった。対照的に、高食塩食負荷の両群では、摂餌量に有意な差はみられなかった (Table 1)。すなわち、高食塩食負荷の両群では、同等の食塩を摂取していた。WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、摂水量は著しく ( $P<0.01$ ) 高かった (Table 1)。高食塩食負荷の両群では、摂水量は顕著に ( $P<0.01$ ) 増加したが、両群に差は認められなかった。

### 体重および臓器重量

6週齢の WBKDF ラットでは標準食群および高食塩食群共に、同週齢の Wistar ラットと比較し、有意に体重が増加していた（WBKDF 標準食群  $194.9 \pm 4.3$  g; Wistar 標準食群  $133.3 \pm 5.5$  g、 $P < 0.01$ ; WBKDF 高食塩食群  $193.5 \pm 3.6$  g; Wistar 高食塩食群  $193.5 \pm 3.6$  g、 $P < 0.01$ ）。しかし、実験開始から14週間後には、全ての群間で有意な体重の差はみられなかった。

#### 血液生化学解析

WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、血糖値は著しく（ $P < 0.01$ ）高かった。しかし、WBKDF 高食塩食群では、高血糖の発症はみられなかった。4群間で、血漿中インスリン値に有意な差は観察されなかった。

血漿中のカリウムおよびクロライドは、4群間において有意な差はみられなかった。しかし、WBKDF 高食塩食群では、血漿中のナトリウム濃度はわずかではあるが、有意に（ $P < 0.01$ ）上昇していた。

酸化ストレスマーカーである 8-isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$  の血漿中濃度は、各々の飼料を負荷した Wistar ラットと比べ、WBKDF ラットで有意に（ $P < 0.05$ ）高い値を示した。さらに、8-isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$  の血漿中濃度は、両系統において高食塩食により上昇する傾向がみられた。

#### 摘出胸部大動脈を用いた張力実験

$\alpha_1$  アドレナリン受容体作動薬であるフェニレフリンに対する摘出胸部大動脈の  $pD_2$  値は、WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、有意な差はみられなかった（Figure 2A, Table 2）。WBKDF ラットの高食塩食

群では、標準食群と比較し、収縮反応は顕著 ( $P<0.01$ ) に増強した。一方、Wistar ラットでは、標準食群と高食塩食群の間に有意な差はみられなかった (Figure 2A, Table 2)。

動脈標本をあらかじめフェニレフリンで収縮させた後、アセチルコリンおよびニトロプルシドに対する弛緩反応を測定した。アセチルコリンおよびニトロプルシドに対する弛緩反応は共に、Wistar 標準食群と比較し WBKDF 標準食群では、著明 ( $P<0.01$ ) に減弱した (Figure 2B, C)。アセチルコリンに対する摘出胸部大動脈の  $pD_2$  値は、WBKDF 標準食群と Wistar 標準食群との間に有意な差はみられなかったが、ニトロプルシドに対する  $pD_2$  値は、Wistar 標準食群と比較し、WBKDF ラット標準食群では有意に ( $P<0.01$ ) 減少した (Table 2)。アセチルコリンおよびニトロプルシドによる弛緩反応は、高食塩食負荷により WBKDF ラットで顕著に ( $P<0.01$ ) 減弱した (Table 2)。

#### 腎臓の病理組織学解析

Figure 3 に示したように、WBKDF 標準食群では、糖尿病性腎症における特徴的な形態学的所見である尿細管の糖原変性 (Armanni-Ebstein 変性) がみられた。一方、Wistar 標準食群では、同様の所見は観察されなかった。両系統の高食塩食群では、尿細管における円柱の形成がみられた。さらに、WBKDF 高食塩食群では、腎皮質の間質性の炎症細胞浸潤 (矢印) および糸球体におけるメサンギウム基質の拡大 (矢頭) がわずかに観察された。しかし、WBKDF 標準食で観察された Armanni-Ebstein 変性は認められなかった (Figure 3)。



## 考察

本章では、WBKDF ラットにおける高食塩食負荷の血圧および血管反応性への影響について Wistar ラットと比較検討し、以下のことを見いだした。

①高食塩食負荷により両系統ともに SBP が上昇し、食塩感受性高血圧を発症した。その昇圧の程度は Wistar ラットに比べ、WBKDF ラットで顕著であった。

②高食塩食により両系統共に、フェニレフリンに対する摘出胸部大動脈の収縮反応の増強ならびにアセチルコリンとニトロプルシドによる弛緩反応の減弱がみられた。

③WBKDF ラットでは、Wistar ラットと比較し、8-isoprostaglandin F<sub>2α</sub> の血中濃度が著しく高かった。

本章において、2 型糖尿病を早期に自然発症する WBKDF ラットにおける食塩感受性について Wistar ラットと比較検討した。過去の報告 (Akimoto *et al.*, 2008; Kaji *et al.*, 2012; Okuno *et al.*, 2013) と同様に標準食で飼育された WBKDF ラットは、著しい高血糖を発症した。一方、高食塩食により高血糖の程度は著しく減弱した。実験期間を通して、WBKDF ラットおよび Wistar ラットの標準食群では、SBP に有意な変化は観察されなかった。

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty ラットや Spontaneously Diabetic Torri-Lep<sup>fa</sup> ラットでは加齢性の高血圧を発症するとの報告がある (Takatori *et al.*, 2014; Ishii *et al.*, 2010)。一方、非肥満の 2 型糖尿病モデルの Goto Kakizaki ラットおよび Zucker diabetic fatty ラットでは、高血圧は発症しないとの報告がある (Janssen *et al.*, 1999 ;Retaillieu *et al.*, 2010)。従って、今回の検討で、2 型糖尿病を自然発症するラットでは加齢性の高血圧を必ずしも発症しないことが明らかとなった。

今回の検討で、Wistar ラットを由来とする WBKDF ラットの対照として Wistar ラットを使用した。一般的に Wistar ラットや Sprague-Dawley ラットのような動物実験で使用されるラットは、食塩負荷に対して非感受性であると考えられている。しかし、これらのラットについて食塩非感受性であるとの報告だけでなく、食塩感受性を有するとの報告も存在する (dos Santos *et al.*, 2006; Hirabara *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2013; Crestani *et al.*, 2014)。今回の実験に使用した Wistar ラットは食塩感受性を示した。Wistar ラットの食塩感受性に関するデータの相違の原因は不明であるが、高食塩食の食塩含有量や負荷期間の違いによるものかもしれない。

糖尿病モデルでは、1 型糖尿病モデルのストレプトゾトシン誘発糖尿病モデル動物、2 型糖尿病モデルの Goto Kakizaki ラットや Spontaneously Diabetic Torri-*Lepr<sup>fa</sup>* ラットでは、いずれも食塩感受性をもつと報告されている (Hirabara *et al.*, 2007; Danda *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2001; Katsuda *et al.*, 2014)。本章における実験では、高食塩食負荷により WBKDF ラットおよび Wistar ラットともに SBP が上昇し、食塩感受性高血圧を発症した。その昇圧の程度は、Wistar ラットに比べ、WBKDF ラットで著明であった。従って、WBKDF ラットは極めて高い食塩感受性を持つことが示された。

これまでの研究から、高食塩食負荷による血圧上昇のメカニズムとして、多くの要因が挙げられているが、その一つとして血管収縮弛緩反応の調節異常がよく知られている (Adegunloye *et al.*, 1997; Chamarthi *et al.*, 2010)。今回の検討で、高食塩食負荷した WBKDF ラットでは、フェニレフリンによる血管収縮反応が増強し、アセチルコリンおよびニトロプルシドに対する血管弛緩反応は減弱した。一方、Wistar ラットでは、高食塩食負荷によ

りニトロプルシドに対する血管弛緩反応のみ減弱した。これらの結果は、食塩過剰摂取は血管収縮反応の増強または血管弛緩反応の減弱により血管の機能異常を生じるという仮説と合致する。糖尿病に罹患している患者の血管では、アセチルコリンに対する血管弛緩反応が減弱するとの報告が多い (Cheng *et al.*, 2001; Gupte *et al.*, 2010)。これらの成績は、2型糖尿病では血管内皮の機能不全が生じていることを示していると思われる。また、両系統のラットでアセチルコリンに比べ、ニトロプルシドに対する弛緩反応の減弱が顕著であった。すなわち、**WBKDF** 高食塩食群では、過去の報告と同様に血管内皮細胞内での NO 産生のみならず NO 活性の低下が顕著であったのかもしれない (McIntyre *et al.*, 1999)。Wistar 高食塩食群と比較し、**WBKDF** 高食塩食群でみられた NO に対する弛緩能の減弱が大きかったことは、高血圧の程度が **WBKDF** 高食塩食群で重篤であったことと関連する可能性が考えられる。すなわち、本章で観察された血管反応性の調節異常が **WBKDF** ラットで生じた食塩感受性高血圧に関与する可能性が強く示唆された。しかし、今回みられた **WBKDF** ラットの血管反応性の変化が、比較的長期間の食塩感受性高血圧の二次的な結果である可能性が否定できない。**WBKDF** ラットでみられた血管反応性の変化が食塩感受性高血圧の原因または結果であるのかに関して、食塩負荷した早期の段階での血管反応性の変化を今後検討することが必要かもしれない。

酸化ストレスとは、生体における活性酸素種の産生の増加と定義されている (Danaei *et al.*, 2011)。今回の検討では、**WBKDF** ラットの標準食群および高食塩食群共に、Wistar ラットと比較し、酸化ストレスマーカーである 8-isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$  の血中濃度が著しく高かった。また、両系統とも

に高食塩食負荷によって 8-isoprostaglandin F<sub>2α</sub> の血中濃度は上昇した。これらの成績は、酸化ストレスの亢進が、糖尿病および高血圧患者の血管の反応性を悪化させるという実験例およびヒトの臨床例と一致している (Grattagliano *et al.*, 1998; Lenda *et al.*, 2000; Kizhakekuttu *et al.*, 2010)。一般的に酸化ストレスの増加は、血管内皮細胞から NO 産生を減少させると同時に血管壁での NO を不活化することにより、血管弛緩反応を悪化させることが知られている (McIntyre *et al.*, 1999; Kizhakekuttu *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2007)。本実験において、高食塩食負荷による酸化ストレスの増大が、血管反応性の調節に影響を与え、食塩感受性の高血圧に関与した可能性が示唆された。

今回の検討において、WBKDF 高食塩食群では、Wistar 高食塩食群にはみられなかった血漿中ナトリウムの上昇と腎臓における炎症細胞浸潤が認められた。腎臓が重要な役割を担うナトリウム代謝の調節異常が、血漿中ナトリウム濃度の上昇に関与しているのかもしれない。血漿中ナトリウム濃度の上昇は、血管内皮の機能不全に伴い血管壁を固くすると同時に NO 濃度を減少させることが報告されている (Oberleithner *et al.*, 2007; Safar *et al.*, 2003)。このことから、WBKDF 高食塩食群でみられた重篤な食塩感受性高血圧に、ナトリウム代謝の調節異常が関与した可能性が考えられる。

今回の検討ではいくつかの課題が残されている。①食塩感受性の発症機序として、腎機能障害、交感神経の亢進、血管系の異常など多くの要因が関与するとされるが (Choi *et al.*, 2015)、本実験では、血管系の異常に焦点を当てたため、他の要因に関しては今後の検討課題である。②WBKDF 標準食群ではみられなかった WBKDF 高食塩食群の著明な心拍数の上昇は、

圧受容器反射の悪化が関与していることが推測されるが、詳細については今後の検討を要するであろう。③本実験では、食塩感受性高血圧と糖尿病との関係を調べるために、糖尿病発症後ではなく発症前の **WBKDF** ラットを使用した。④**WBKDF** ラットが自然発症する高血糖が、高食塩食により著しく減弱した。ヒトと実験動物では、食塩摂取とインスリン抵抗性の関連が既に報告されており (Melander *et al.*, 2000; Parada *et al.*, 2000)、今回の結果は、糖尿病患者に関連するかもしれないため、重要な検討課題であろう。従って、高食塩食負荷による **WBKDF** の高血糖減弱したメカニズムを解明するために、さらなる研究が望まれる。

本章の検討において、高血糖を自然発症する **WBKDF** ラットは **Wistar** ラットに比べ顕著な食塩感受性の高血圧を発症することが明らかとなった。また、高食塩食負荷による高血圧には血管反応性の変化が関与することが示された。**WBKDF** ラットは糖尿病と高血圧の関連を解明するためのモデル動物として有用である可能性が示唆された。

## 小括

本章の検討において、高血糖を自然発症する WBKDF ラットは Wistar ラットに比べ顕著な食塩感受性の高血圧を発症することが明らかとなった。また、高食塩食負荷による高血圧には血管反応性の変化が関与することが示された。

Table 1. Body parameters and blood chemical parameters in each group at 20 weeks of age

	Wistar-NS (N=7)	Wistar-HS (N=7)	WBKDF-NS (N=7)	WBKDF-HS (N=7)	ANOVA (Strain)	ANOVA (Treatment)
Food intake (g/day)	18.3 ± 0.1	23.4 ± 0.1 ††	28.5 ± 0.5 **	26.9 ± 1.9	P<0.0001	P=0.0948
Water intake (g/day)	26 ± 1.4	117 ± 3.6 ††	103 ± 5.2 **	114 ± 6.1 †	P<0.0001	P<0.0001
Body weight (g)	381 ± 4.5	337 ± 6.2	393 ± 9.7	363 ± 24.3	P=0.1854	P=0.0111
Kidney weight (%)	0.32 ± 0.01	0.42 ± 0.01 ††	0.36 ± 0.01	0.30 ± 0.01 **††	P=0.0007	P=0.0536
Glucose (mg/dL)	165 ± 9.7	113 ± 17.6	545 ± 12.8 **	210 ± 22.1 **††	P<0.0001	P<0.0001
Insulin (ng/dL)	6.9 ± 0.7	4.2 ± 1.1	7.8 ± 1.9	4.2 ± 0.9	P=0.6953	P=0.0171
Electrolyte						
Sodium (mEq/L)	144 ± 0.4	146 ± 0.5	145 ± 1.0	149 ± 1.4 *††	P=0.0366	P=0.0036
Potassium (mEq/L)	4.4 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.3 ± 0.3	P=0.3797	P=0.4689
Chlorine (mEq/L)	105 ± 0.5	104 ± 0.9	101 ± 0.6	102 ± 2.2	P=0.0242	P=0.9725
8-iso-prostaglandin F2α (pg/mL)	120 ± 13.0	261 ± 28.8	331 ± 38.1 *	439 ± 70.0 *	P=0.0001	P=0.0073

Values are mean ± SEM (n=7 in each group). \*P<0.05 versus Wistar rats on the same diet; \*\*P<0.01 versus Wistar rats on the same diet; †P<0.05 versus the same strain of rats on the NS diet; ††P<0.01 versus the same strain of rats on the NS diet. WBN/Kob-*Lep<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) rat and Wistar rats at 6 weeks of age were each divided into two groups fed either NS diet or HS diet for 14 weeks. Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium.

Table 2. pD<sub>2</sub> values of PE, ACh and SNP in thoracic aorta rings

	Wistar-NS (N=7)	Wistar-HS (N=7)	WBKDF-NS (N=7)	WBKDF-HS (N=7)	ANOVA (Strain)	ANOVA (Treatment)
<i>Contraction</i>						
PE	5.76 ± 0.71	6.26 ± 0.31	5.93 ± 0.41	7.64 ± 0.20	P=0.0964	P=0.0213
<i>Relaxation</i>						
ACh	8.12 ± 0.26	7.04 ± 0.99	6.31 ± 0.47	3.23 ± 0.46 **††	P=0.0001	P=0.0023
SNP	9.93 ± 0.27	7.85 ± 0.32 ††	8.32 ± 0.24 **	6.73 ± 0.20 *††	P<0.0001	P<0.0001

Values are mean ± SEM (n=7 in each group). \*P<0.05 versus Wistar rats on the same diet; \*\*P<0.01 versus Wistar rats on the same diet; ††P<0.01 versus the same strain of rats on the NS diet. WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) rat and Wistar rats at 6 weeks of age were each divided into two groups fed either NS diet or HS diet for 14 weeks. PE, phenylephrine; ACh, acetylcholine; SNP, nitroprusside; Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high- sodium.



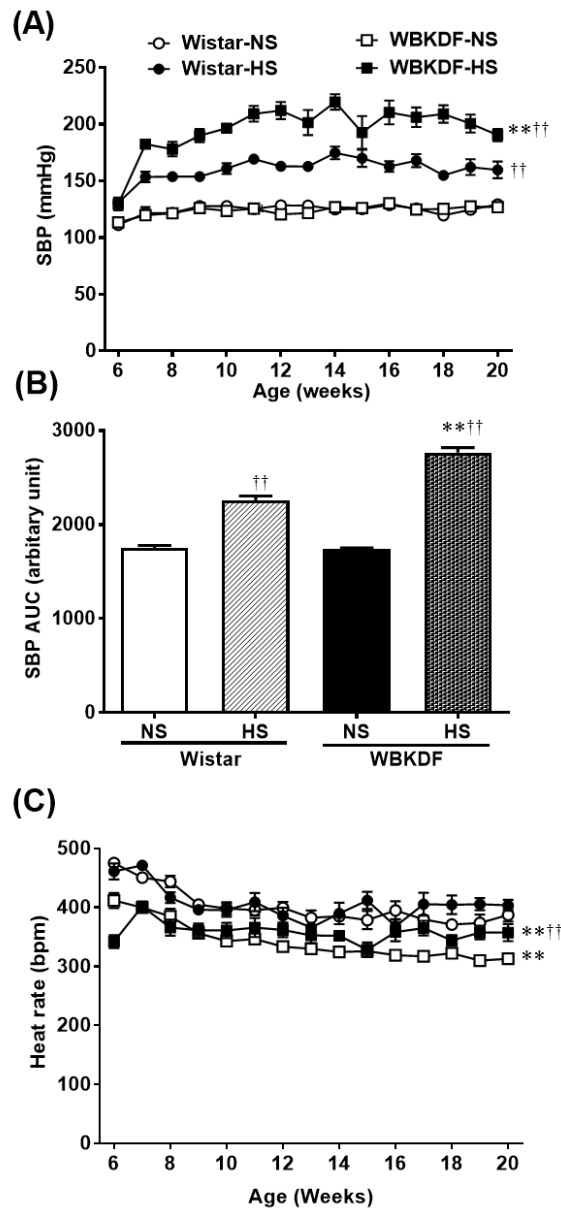


Figure 1. Comparison of changes in systolic blood pressure (SBP) (A), the area under the curve (AUC) of SBP (B) and heart rate (C) in each group.

WBN/Kob-*Lep<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) rat and Wistar rats at 6 weeks of age were each divided into two groups fed either NS diet or HS diet for 14 weeks. Values are mean  $\pm$  SEM (n=7 in each group). \*: P<0.05 vs Wistar rats on the same diet; \*\*: P<0.01 vs Wistar rats on the same diet; †: P<0.05 vs the same strain of rats on the NS diet; ††: P<0.01 vs the same strain of rats on the NS diet. Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium.

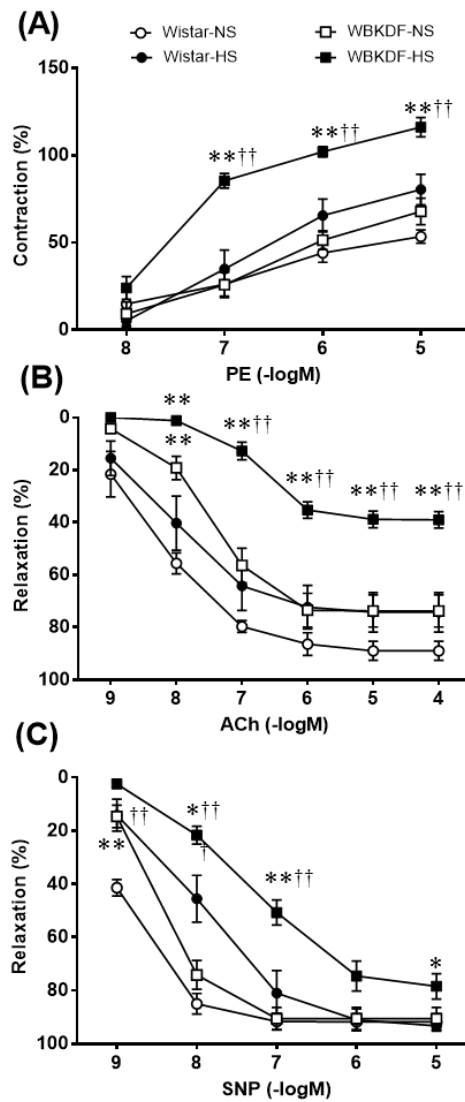


Figure 2. Comparison of PE-induced contractions (A) and ACh- (B) and SNP-induced (C) relaxations in thoracic aorta rings with intact endothelium. Contractions induced by 60 mM KCl and relaxations induced by papaverine (100  $\mu$ M) were taken as 100%. WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) rat and Wistar rats at 6 weeks of age were each divided into two groups fed either NS diet or HS diet for 14 weeks. Values are mean  $\pm$  SEM (n=7 in each group). \*: P<0.05 vs Wistar rats on the same diet; \*\*: P<0.01 vs Wistar rats on the same diet; †: P<0.05 vs the same strain of rats on the NS diet; ††: P<0.01 vs the same strain of rats on the NS diet. Data on thoracic aorta rings were from 7 animals. PE, phenylephrine; ACh, acetylcholine; SNP, nitroprusside; Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium.

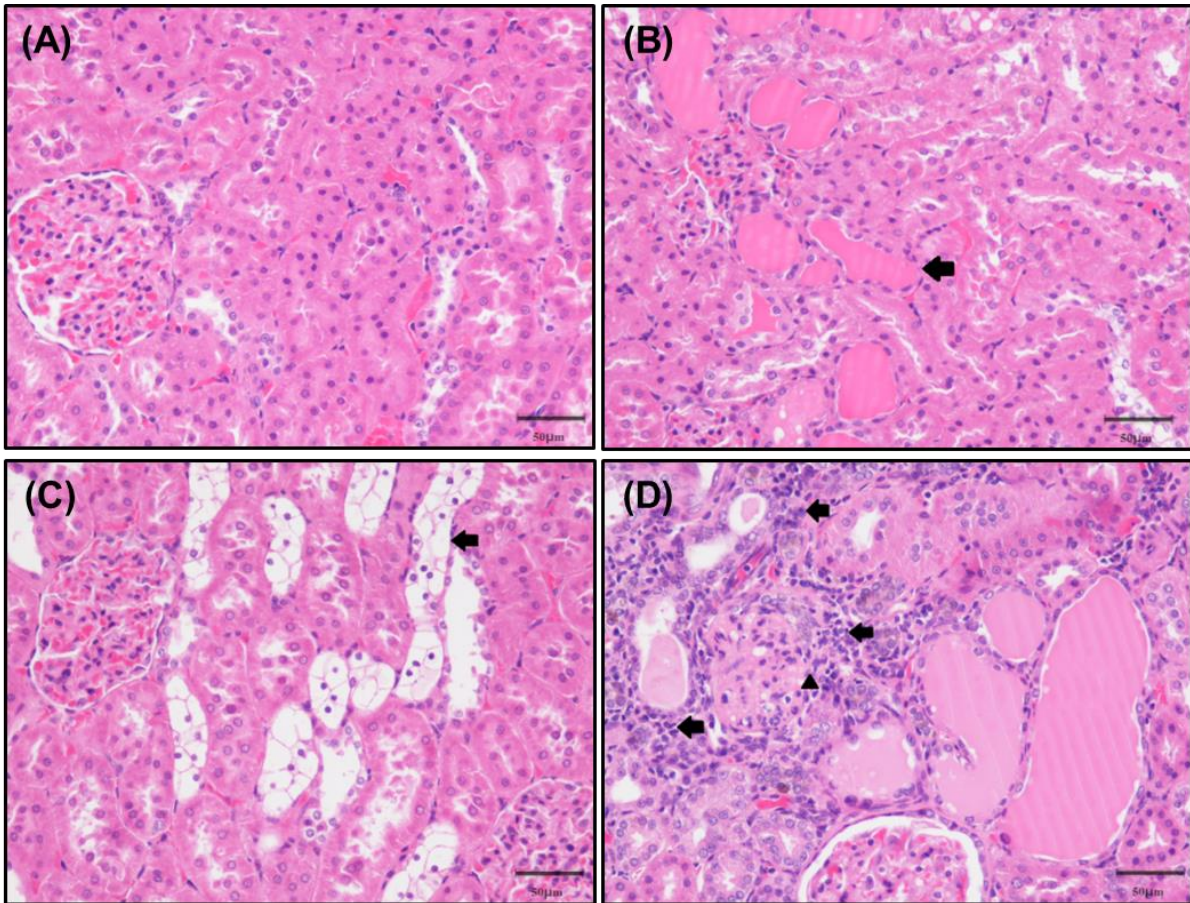


Figure 3. Comparison of histopathological appearance of the kidneys from WBN/Kob-*Lep<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) rat and Wistar.

Hematoxylin and eosin staining (A – D). Wistar-NS (A): Normal tubule and glomerulus of the renal cortex; Wistar-HS (B): Hyaline casts (arrow); WBKDF-NS (C): Armanni-Ebstein changes (arrow); WBKDF-HS (D): Predominantly small round cell infiltration of the interstitium (arrows) and hyaline casts with tubular dilation, and mesangial expansion in glomeruli (arrowhead). Scale bars = 50  $\mu$ m. Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium.

## 第 2 章 WBKDF ラットの 2 型糖尿病発症に対する高食塩食負荷の影響

### 小序

第 1 章の結果から、WBKDF ラットでは血管収縮・弛緩反応の異常が関与する著しい食塩感受性高血圧を発症し、高い食塩感受性を有することが明らかとなった。高血圧症は、2 型糖尿病、脂質異常症ならびに肥満と併発した際、心血管病の発症率および死亡率が極めて高くなるためその治療は最重要課題の一つといえる (Titze and Luft, 2017)。高血圧症を制御するための生活習慣として昔から食塩が注目されており、2 型糖尿病患者では減塩が推奨されている (Quader et al., 2017)。しかし、食塩摂取とグルコースホメオスタシスの関連は不明な点が多く存在する。

前述の通り、第 1 章では WBKDF ラットは血管反応性の異常と酸化ストレスの増加が関与する食塩感受性高血圧を発症することが明らかとなった。本章では、メタボリックシンドロームモデルとしての WBKDF ラットの有用性を更に確認するために、WBKDF ラットの高食塩食摂取のグルコースホメオスタシスに対する影響を Wistar ラットと比較検討した。

## 実験材料および方法

### 動物

5週齢時の雄性 WBKDF ラットおよび同週齢の Wistar ラット (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) をプラスチックケージで飼育し、標準食 (0.26% NaCl) または高食塩食 (8% NaCl) および水道水を給与し、自由摂取とした。室温は、 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は 50~60% とし、照明は午前 7 時~午後 7 時までの 12 時間照明とした。動物実験は麻布大学動物実験委員会の承認を得た。

### 実験プロトコール

WBKDF ラット (N=16) および同週齢の Wistar ラット (N=16) は、標準食群と高食塩食群の 2 群に分けし、6 週齢より 13 週齢まで飼育した (各群 N=8)。群分けは、以下の通りである。①Wistar 標準食群②Wistar 高食塩食群③WBKDF 標準食群④WBKDF 高食塩食群。採血は、非絶食下でラットの尾静脈より実施し、抗凝固剤としてヘパリンナトリウム (Mitsubishi Tanabe Pharma, Tokyo, Japan) を用いて処理を行った。ラットを代謝ケージ内で餌および水を自由摂取させた状態で 24 時間畜尿を実施し、尿量の計測を行った。実験終了時に静脈内糖負荷試験を実施した後、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg IP; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) による麻酔下で全採血を実施し安楽死させた。最後に、肝臓、膵臓、脂肪 (腸間膜脂肪および精巣周囲脂肪) を採取し重量を測定した。

## 体重、摂餌量および収縮期血圧ならびに心拍数

体重および摂餌量は、6週齢から13週齢までの間に週1回、午前10時から午後2時の間に測定した。SBPおよび心拍数は、12週齢時に無麻酔下で尾動脈走行部位より非観血式血圧計（BP98A-L, Softron, Tokyo, Japan）を用いて測定した。3回連続して測定し、その平均値をSBP、心拍数として算出した。

## 血液および尿の生化学解析

ヘパリン処理した血漿は、血液を10分間3000×gの遠心分離により採取した。血漿中のグルコース、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT, alanine aminotransferase）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST, aspartate aminotransferase）総コレステロール（T-CHO, total cholesterol）、トリグリセリド（TG, triglyceride）、およびリン脂質（PL, phospholipids）ならびに尿中のグルコースを自動分析装置（JCA-BM 2250; JEOL Ltd., Tokyo, Japan）により測定した。血漿中インスリン値は、ラット用のELISAキット（Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Yokohama, Japan）を用いて測定した。また、血漿中アディポネクチン値は、ラット用のELISAキット（Otsuka Pharmaceutical Co, Ltd, Tokyo, Japan）を用いて測定した。

## 静脈内糖負荷試験

静脈内糖負荷試験は、実験終了時の13週齢時に実施した。18時間の絶食後、ペントバルビタール（50～60 mg/kg, IP）を用い麻酔を施した。糖負荷前の血液を頸静脈から0.2 mL採取した。その後、大腿静脈内にグルコ

ース（20% w/v; Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan）を投与（0.5 g/kg）した。糖負荷後 2 分、5 分、10 分、20 分に頸静脈より血液を採取（0.2 mL）した。抗凝固剤としてヘパンリンナトリウムを用い、遠心分離（2000 × g, 15min）によって血漿を分離した。静脈内糖負荷試験（IVGTT, Intravenous glucose tolerance tests）における血漿グルコース値の AUC を耐糖能の指標とし、IVGTT における血漿インスリン値の AUC をインスリン分泌能の指標として用いた。また、インスリン抵抗性の指標としてインスリン抵抗性指数（HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance）および膵β細胞のインスリン分泌能の指標として homeostasis model assessment of β-cell function（HOMA-β）を用いた。HOMA-IR および HOMA-β は以下の式より算出した。

HOMA-IR = 空腹時インスリン値（μU/mL）× 空腹時血糖値（mg/dL） / 405

HOMA-β = [空腹時インスリン値(μU/mL)×360] / [空腹時血糖値(mg/dL)-63]

#### 病理組織学解析

採材した膵臓および肝臓は 10% 中性緩衝ホルマリン液で 2 日間固定し、パラフィンにより包埋した。作製した切片（5μm）は、ヘマトキシリン-エオジン染色（HE 染色）、PAS（periodic acid schiff）染色およびオイルレッド O 染色を施し、病理組織学的に観察した。

#### 統計検定

データは平均値±標準誤差で表示した。統計学的解析には 2 way-ANOVA

with post hoc を用いた。また、繰り返しのデータに関しては、2 way-ANOVA with repeated measures を用いた。P 値<0.05 の場合に統計学的有意差があるとした。解析には、PRISM (GRAPHPAD, San Diego, CA, USA) を使用した。



## 結果

### 体重および餌の消費

WBKDF 標準食群の体重は、Wistar 標準食群に比べ、著しく ( $P<0.01$ ) 高かった。高食塩食による体重への影響は、両系統ともに認められなかった (Figure 4A, B)。WBKDF 標準食群の摂餌量および摂取カロリー量は、Wistar 標準食群に比べ、著しく ( $P<0.01$ ) 多かった。高食塩食による摂餌量および摂取カロリー量への有意な影響は両系統で認められなかった (Figure 4C, D)。

### 臓器重量

精巣周囲脂肪や腸間膜脂肪重量は、WBKDF 標準食群では Wistar 標準食群と比較し、有意に ( $P<0.01$ ) 高かった。高食塩食により Wistar ラットのみに、精巣周囲脂肪重量 ( $P<0.05$ ) ならびに腸間膜脂肪重量 ( $P<0.01$ ) 共に著しく減少した (Table 3)。

また、WBKDF 標準食群の肝重量は、Wistar 標準食群と比較し、有意に ( $P<0.01$ ) 高かった。一方、WBKDF ラットでは、高食塩食により肝重量が有意に ( $P<0.01$ ) 低下した。膵重量は、WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、有意に ( $P<0.01$ ) 高かった。しかし、高食塩食による影響は両系統ともに観察されなかった (Table 3)。

### 収縮期血圧および心拍数

WBKDF ラットおよび Wistar ラットの標準食群では、実験期間中 SBP に有意な変化はなく、両群に有意な差は観察されなかった。一方、WBKDF ラットおよび Wistar ラットの高食塩食群では、著しい ( $P<0.01$ ) SBP の上昇がみられ、その程度は、WBKDF 高食塩食群でより顕著 ( $P<0.01$ ) であった。心拍数は、WBKDF ラットでは標準食群および高食塩食群共に、Wistar ラットよりも著しく低かった (Table 3)。

#### 血液生化学

WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、血漿中 ALT 値は有意に ( $P<0.01$ ) 高かった。しかし、WBKDF 高食塩食群と Wistar 高食塩食群の血液中 ALT 値はほぼ同じ程度であった。一方、血漿中 AST 値は、すべての群間で明らかな違いはみられなかった (Table 3)。

WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群に比べ、脂質代謝のパラメータである血漿中 T-CHO、TG ならびに PL 値が顕著に高値を示した。両系統共に高食塩食によるこれらのパラメータへの影響は観察されなかった (Table 3)。

WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、脂肪細胞から分泌される蛋白質である血漿中アディポネクチン濃度が有意に ( $P<0.01$ ) 高かった。Wistar ラットでは高食塩食により血漿中アディポネクチン濃度の増加は軽度にとどまったが、WBKDF ラットでは高食塩食負荷により有意な ( $P<0.05$ ) 増加がみられた (Table 3)。

#### 血糖値および血中インスリン (非絶食下)

Wistar ラットでは標準食群ならびに高食塩食群共に、13 週齢時の非絶食下の血糖値に有意な差はみられなかった。一方、WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、13 週齢時に非絶食下の血糖値の著明な ( $P<0.01$ ) 増加がみられ、高血糖を発症した。しかし、WBKDF 高食塩食負荷群では血糖値の上昇は全くみられなかった (Table 3)。

WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、13 週齢時に血漿中インスリン値が有意 ( $P<0.01$ ) に高く、高インスリン血症を呈していた。両系統の標準食群と高食塩食群との間に、血漿中インスリン濃度に明らかな違いはみられなかった (Table 3)。

#### 静脈内糖負荷試験 (IVGTT)

13 週齢の WBKDF および Wistar ラットに対して、18 時間の絶食後に IVGTT を実施した。グルコース注射前の血糖値は、4 群間で有意な差はみられなかった。WBKDF 標準食群および高食塩食群では、グルコース投与後の血糖値が、Wistar ラットと比較し、有意 ( $P<0.01$ ) に高かった。しかし、両系統ともに高食塩食による血糖値に対する影響はみられなかった (Figure 5A)。グルコース注射前の血漿中インスリン値は、4 群間で有意な差はみられなかった。グルコース注射後の血漿中インスリン値は、WBKDF 標準食群では Wistar 標準食群と比較し、有意に ( $P<0.01$ ) 低かった。高食塩食により Wistar ラットのみ、血漿中インスリン値の著しい ( $P<0.01$ ) 低下がみられた (Figure 5B)。

IVGTT におけるグルコース AUC を算出し、耐糖能の指標として用いた。WBKDF ラットの標準食群および高食塩食群では、Wistar ラットと比較し、

グルコース AUC は有意に ( $P<0.01$ ) 高く、耐糖能異常が認められた。しかし、WBKDF 高食塩食群では、WBKDF 標準食群と比較し、グルコース AUC の減少 ( $P=0.0513$ ) が観察された (Figure 5C)。IVGTT におけるインスリン AUC を算出し、インスリン分泌能の指標として用いた。WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、インスリン AUC は有意に ( $P<0.01$ ) 低かった。高食塩食により両系統で、インスリン AUC の減少が観察され、Wistar ラットでは統計学的に有意 ( $P<0.05$ ) であった (Figure 5D)。

WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR が著しく ( $P<0.05$ ) 高かった。Wistar ラットでは、高食塩食による HOMA-IR への影響は見られなかった。一方、WBKDF ラットでは、高食塩食により HOMA-IR の著しい ( $P<0.01$ ) 低下が観察され、インスリン抵抗性の改善が認められた (Figure 5E)。一方、インスリン分泌能の指標である HOMA- $\beta$  は 4 群間で有意な差はみられなかった (Figure 5F)。

#### 尿量および尿糖値

13 週齢時の Wistar 高食塩食群では、Wistar 標準食群に比べ、著明な尿量の増加がみられたが、いずれの時点においても尿糖は検知されなかった。一方、13 週齢時の WBKDF 標準食群では、血糖値の上昇に伴い顕著な ( $P<0.01$ ) 尿量の増加と尿糖が観察された。これに対し、WBKDF 高食塩食群では、顕著な尿量の増加がみられたが尿糖はみられなかった (Table 3)。

## 病理組織学解析

WBKDF ラット標準食群では、崩壊/消失した腓島に腓島細胞が軽度に観察された (Figure 6A)。一方、Wistar 標準食群では、同週齢の腓島に著変はみられなかった (Figure 6B)。両系統で、高食塩食による形態学的な変化は観察されなかった (Figure 6C, D)。

Wistar 標準食群および Wistar 高食塩食群では、肝組織に明らかな異常は観察されなかった。一方、WBKDF 標準食群では、WBKDF 高食塩食群と比較し、肝小葉中心から周辺にかけて脂肪沈着の増加がみられた (Figure 7A, B)。また、WBKDF 標準食群では、WBKDF 高食塩食群と比較し、グリコーゲン沈着の減少が認められた (Figure 7C)。

## 考察

2 型糖尿病患者では非糖尿病患者と比較し、食塩感受性の増加により高血圧症を発症しやすいことが知られている (Imanishi *et al.*, 2001; O'Hare *et al.*, 1985)。高食塩食負荷の影響を調べた研究は、高血圧患者ならびに高血圧の動物モデルに限定されており、糖尿病未発症のメタボリックシンドロームモデルでの報告はほとんどされていない。本章の検討で使用した雄性 WBKDF ラットは、肥満、脂質異常症および 2 型糖尿病を発症する新規のメタボリックシンドロームモデルであることが報告されている (Akimoto *et al.*, 2008; Okuno *et al.*, 2013; Kaji *et al.*, 2012)。さらに、第 1 章では WBKDF ラットが食塩感受性高血圧を発症することを示し、それにより WBKDF ラットがメタボリックシンドロームモデルとしての有用性が示唆された。

本章では、高食塩食負荷の糖尿病に及ぼす影響を調べるために、肥満を伴う 2 型糖尿病を自然発症する WBKDF ラットに高食塩食を 7 週間与え、以下の成績を得た。①高食塩食により両系統のラットともに著しい SBP の上昇ならびに尿量の増加がみられた。②両系統ともに標準食群と高食塩食群の間に、体重および摂餌量への影響は観察されなかった。③WBKDF 高食塩食群では、WBKDF 標準食群でみられた高血糖および尿糖の発現がみられなかった。④血漿中のアディポネクチンは、WBKDF 標準食群より WBKDF 高食塩食群で顕著に高かった。⑤WBKDF 高食塩食群では WBKDF 標準食群と比較し、肝組織においてグリコーゲン沈着の増加および脂肪滴の減少が認められた。⑥WBKDF 高食塩食群では、WBKDF 標準食群でみ

られた悪化した耐糖能ならびにインスリン抵抗性の指標である高い HOMA-IR の改善が認められた。

第 1 章の結果でも示されたように、8%の NaCl 濃度の高食塩食は、実験動物で長期的な高食塩食の作用を評価するには適している (Simon, 2003)。第一章と同様に、高食塩食により WBKDF 高食塩食ラットでは、7 週間の負荷期間中、著しい SBP の上昇が観察された。しかし、WBKDF 高食塩食群では、食塩感受性高血圧を発症したものの、WBKDF 標準食群でみられた高血糖の発症が完全に抑制された。高食塩食負荷の 2 型糖尿病モデルにおける作用については報告がほとんどないが、本章の成績は肥満を伴う T2DM モデルラットである SDT-*Lepr<sup>fa</sup>* において高食塩食負荷が血糖値を下げたとする報告と合致する (Katsuda *et al.*, 2014)。

WBKDF ラットは、レプチン受容体の機能不全を生じるレプチンレセプター肥満遺伝子を保有し、ホモの個体は、過食、肥満、インスリン抵抗性ならびに耐糖能異常を示すことが知られている (Okuno *et al.*, 2013; Kaji *et al.*, 2012)。今回の検討では、糖尿病の指標である非絶食時の血糖値を調べた。その結果、WBKDF 標準食群では、WBKDF 高食塩食群と比較し、非絶食時の血糖値は著しく高かった。一方、絶食時の血糖値は、WBKDF 標準食群と WBKDF 高食塩食群との間に明らかな差がみられなかった。また、以前の研究において、WBKDF ラットの摂餌量を制限すると高血糖の発症を抑制することが報告されている (Akimoto *et al.*, 2010)。これらの成績は、WBKDF ラットの高血糖は、摂餌量に大きく依存していることを示唆する (Nagakubo *et al.*, 2014)。しかしながら、本研究では高食塩食負荷は Wistar ラットおよび WBKDF ラットいずれにおいても摂餌量および摂取カロリー

量に影響を及ぼさなかった。これらのことから、高食塩食による高血糖の発症抑制は摂餌量の低下によるものではないと考えられる。

尿細管において sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT2) はナトリウムおよび糖の再吸収に重要な役割を果たしている (Mather and Pollock, 2011)。SGLT2 阻害薬は、尿細管での糖の再吸収を抑制することにより 2 型糖尿病の治療薬として臨床応用されている (Chrysant, 2017)。今回の検討において、高食塩食負荷による尿細管での糖の再吸収に対する影響を調べるために尿量と尿中グルコース濃度を測定した。13 週令の WBKDF 標準食群では糖尿病の特徴である多尿および尿糖がみられたのに対し、WBKDF 高食塩食群では多尿ではあったが、尿糖はみられなかった。従って、高食塩食により WBKDF ラットの高血糖が抑制したメカニズムは、SGLT2 阻害作用を介したのではないことが明らかとなった。

GLP-1 誘導体がインスリン分泌促進を介して WBKDF ラットの高血糖を抑制することが報告されている (Nagakubo *et al.*, 2014)。今回の検討において、正常血糖値を維持していた WBKDF 高食塩食群では、高血糖を発症した WBKDF 標準食群より血漿中インスリンの濃度が低く、両群の膵  $\beta$  細胞の障害の程度に差もみられなかった。本成績は、ヒトで高食塩食により絶食時血糖値と血中インスリン値が有意に減少したとする成績と合致する (Melander *et al.*, 2000)。WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、インスリン AUC は著しく低かった。これらの成績より、WBKDF ラットでは、慢性膵炎による膵  $\beta$  細胞機能不全が生じていたためインスリン分泌能は低下していたと考えられる。さらに、血漿中インスリン濃度ならびに HOMA- $\beta$  は、両系統のラットの標準食群および高食塩食群で有意な差は



みられなかった。従って、高食塩食による WBKDF ラットにおける耐糖能異常や高血糖に対する改善効果は、血漿中インスリン濃度の上昇によるものとは異なる可能性が示された。

過去の報告と同様に本章の実験では、WBKDF ラットは HOMA-IR が著しく高いことが示された (Kaji *et al.*, 2012; Okuno *et al.*, 2013)。すなわち WBKDF ラットは 2 型糖尿病に特徴的な高いインスリン抵抗性を有することが明らかである。本章での IVGTT で、高食塩食負荷により WBKDF ラットのインスリン抵抗性が改善されたことが示された。肥満およびインスリン抵抗性は、脂肪肝と密接な関係をもつことが知られている (Dongiovanni and Valenti, 2017)。また、肥満は脂肪細胞や肝細胞に脂肪の蓄積を誘発し、肝臓での脂肪酸合成と血漿中 TG の増加はインスリン抵抗性に関与することも知られている。本章において、WBKDF ラットの肝臓では、著しい脂肪の蓄積ならびにグリコーゲンの減少が観察され、WBKDF ラットの肝臓ではインスリン抵抗性が生じていることを示唆された。一方、高食塩食により WBKDF 標準食群でみられた肝臓の病理組織学的変化が改善したことは、肝臓でのインスリン抵抗性が改善された可能性を示唆する。これらの成績から、高食塩食負荷は WBKDF ラットのインスリン抵抗性を改善することにより高血糖の発症を抑制したと考えられる。

WBKDF ラットとは対照的に、Wistar ラットの標準食群および高食塩食群との間で、インスリン抵抗性に有意な差はみられなかった。高食塩食とインスリン抵抗性の関連は、糖尿病時に問題とされる (DiNicolantonio *et al.*, 2013)。本章でみられた、高食塩食負荷によりインスリン抵抗性が改善されたことは、高食塩食によりラットのインスリン抵抗性が増加したとの報

告 (Donovan *et al.*, 1993; Ogihara *et al.*, 2001; Premilovac *et al.*, 2014) と明らかに相反する。このデータの不一致の理由は明らかではないが、ラットの系統、食塩感受性およびインスリン感受性、さらには食塩濃度や負荷期間などの実験条件の違いが可能性として考えられる。上述した高食塩食によりインスリン抵抗性が生じたとする研究に使用された Sprague-Dawley ラットは、一般的に食塩非感受性であると考えられている (Wainford and Kapusta, 2010)。

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌される蛋白質であり、インスリン感受性因子としてよく知られている (Achari and Jain, 2017)。今回の検討では、高食塩食により WBKDF ラットと Wistar ラット共にアディポネクチン濃度が増加した。この結果は、ヒトならびに実験動物で高食塩食により血中アディポネクチン濃度が増加したとの報告と一致する (Lely *et al.*, 2007; Kamari *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2016)。これまでのアディポネクチンの研究から、アディポネクチンの主な標的臓器は肝臓であること、また、アディポネクチンは、AMPK、PPAR- $\alpha$  ならびに他の未知な経路を介して、インスリン感受性を増加させることが報告されている (Ruan and Dong, 2016)。アディポネクチン投与が肝腫大や脂肪肝を劇的に改善するとともに、血清中 ALT の上昇を抑制することが、遺伝的なレプチンの産生異常により高インスリン血症、インスリン抵抗性ならびに脂肪肝を自然発症する肥満モデルの *ob/ob* マウスで既に報告されており、今回の実験結果と一致している (Xu *et al.*, 2003; Campfield *et al.*, 1996)。これらのことから、高食塩食負荷が WBKDF ラットの肝臓のインスリン抵抗性を改善した可能性が示唆された。

第 1 章では、WBKDF 高食塩食群は血管障害ならびに酸化ストレスの上昇が関与していることが推測される腎障害と高血圧を発症した。自然発症性の高血圧ラットでは、高食塩食により腎尿細管障害を生じることや腎臓でのレニンアンジオテンシン系の活性化により近位尿細管におけるアンジオテンシン II が上昇することが他の研究グループより報告されている (Hosokawa *et al.*, 2016; Nath *et al.*, 1992)。更に、アンジオテンシン II がアディポネクチン濃度を上昇させることは広く知られている (Lely *et al.*, 2007; Kamari *et al.*, 2010)。従って、高食塩食による腎臓のレニンアンジオテンシン系の活性化を経由したアンジオテンシン II の上昇は、食塩感受性高血圧ならびに WBKDF 高食塩食群におけるインスリン抵抗性を軽減させるために十分な血漿中のアディポネクチン濃度の上昇に寄与していることが推測される。この仮説を立証するために更なる検討が必要となるであろう。

今回の検討には、いくつかの問題点が残されている。①インスリン抵抗性と 2 型糖尿病の発症には、アディポネクチンと同様に脂肪細胞から分泌されるレジスチンおよびビスファチンなどのアディポカインも関与するとされる (Elekofehinti *et al.*, 2017)。従って、本章でみられた WBKDF ラットの高食塩食による高血糖発症の抑制が、アディポネクチンだけによるものかについてはさらなる検討が必要であろう。②WBKDF 標準食群では、Wistar 標準食群と比較し、血漿中アディポネクチン濃度は著しく高かった。このことは、血漿中アディポネクチン濃度の減少が 2 型糖尿病の発症に関与するとの報告と矛盾している。WBKDF 標準食群の高い血漿中アディポネクチン濃度の原因として、WBKDF ラットがもつ高いインスリン抵抗性

の代償性反応の結果である可能性が考えられる。高食塩食負荷によるアディポネクチン濃度のメカニズムについては、細胞生物学的ならびに分子生物学的な検討が有用であろう。

本章の研究により、高食塩食を負荷した **WBKDF** ラットでは高血糖の発症が抑制されるとともにインスリン抵抗性を改善することが明らかとなった。そのメカニズムとして血圧上昇とは無関係に血漿中のアディポネクチン濃度が上昇したことによる可能性が示唆された。**WBKDF** ラットは、食塩感受性高血圧と2型糖尿病の関連を解明するためのモデル動物として有用である可能性が示唆された。

## 小括

本章の研究により、高食塩食を負荷した **WBKDF** ラットでは高血糖の発症が抑制するとともにインスリン抵抗性を改善することが明らかとなった。そのメカニズムとして血圧上昇とは無関係に血漿中のアディポネクチン濃度が上昇したことによる可能性が示唆された。

Table 3. Cardio-metabolic parameters in each group

	Wistar-NS (N=8)	Wistar-HS (N=8)	WBKDF-NS (N=8)	WBKDF-HS (N=8)	ANOVA (Strain)	ANOVA (Treatment)
Organ weight (% body weight)						
Liver	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.0	3.8 ± 0.1 **	3.2 ± 0.1 ††	P<0.0001	P=0.0017
Pancreas	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0 **	0.2 ± 0.0 **	P<0.0001	P=0.3124
Mesenteric fat pad	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1 ††	2.2 ± 0.1 **	1.9 ± 0.0 **	P<0.0001	P<0.0001
Epididymal fat pad	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1 †	2.9 ± 0.0 **	2.9 ± 0.1 **	P<0.0001	P=0.0285
Heart rate (bpm)	390.6 ± 13.3	395.8 ± 17.9	326.4 ± 5.1 **	346.3 ± 9.6 *	P<0.0001	P=0.3203
SBP (mmHg)	127.9 ± 2.2	151.2 ± 3.9 †	120.7 ± 4.1	192.0 ± 8.2 **††	P=0.0027	P<0.0001
Blood						
Glucose (mg/dL)	115.1 ± 3.5	115.0 ± 4.3	344.8 ± 44.2 **	127.0 ± 8.8 ††	P<0.0001	P<0.0001
Insulin (ng/dL)	2.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2	15.0 ± 1.5 **	13.2 ± 0.9 **	P<0.0001	P=0.2161
AST (U/L)	67.4 ± 4.0	68.8 ± 7.6	74.6 ± 21.4	50.0 ± 2.7	P=0.6212	P=0.3262
ALT (U/L)	36.5 ± 2.7	32.1 ± 2.4	109.6 ± 24.3 **	71.6 ± 8.6	P=0.0002	P=0.1145
T-CHO (mg/dL)	56.5 ± 2.6	47.5 ± 3.8	95.9 ± 5.7 **	106.6 ± 10.6 **	P<0.0001	P=0.8960
TG (mg/dL)	27.1 ± 4.5	26.8 ± 3.1	304.4 ± 34.7 **	315.8 ± 36.4 **	P<0.0001	P=0.8279
PL (mg/dL)	103.9 ± 2.4	92.9 ± 4.9	206.0 ± 7.8 **	237.6 ± 13.7 **	P<0.0001	P=0.2272
Adiponectin (ng/mL)	1432 ± 84	1716 ± 105	2182 ± 195 **	2687 ± 65 **†	P<0.0001	P=0.0033
Urine						
Volume (mL/24h)	6.3 ± 0.5	85.1 ± 1.5 ††	23.8 ± 4.7 *	108.8 ± 7.5 **††	P<0.0001	P<0.0001
Glucose (g/24h)	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0	127.9 ± 39.5 **	0.0 ± 0.0 ††	P=0.0031	P=0.0031

Data are expressed as mean ± SEM (n=8 in each group). Heart rate and systolic blood pressure (SBP) are for rats at 12 weeks of ages. Other parameters are for rats at 13 weeks. \*P<0.05 versus Wistar rats on the same diet; \*\*P<0.01 versus Wistar rats on the same diet; †P<0.05 versus the same strain of rats on the NS diet; ††P<0.01 versus the same strain of rats on the NS diet. Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium; SBP, systolic blood pressure; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; T-CHO, total cholesterol; TG, triglyceride; PL, phospholipid.

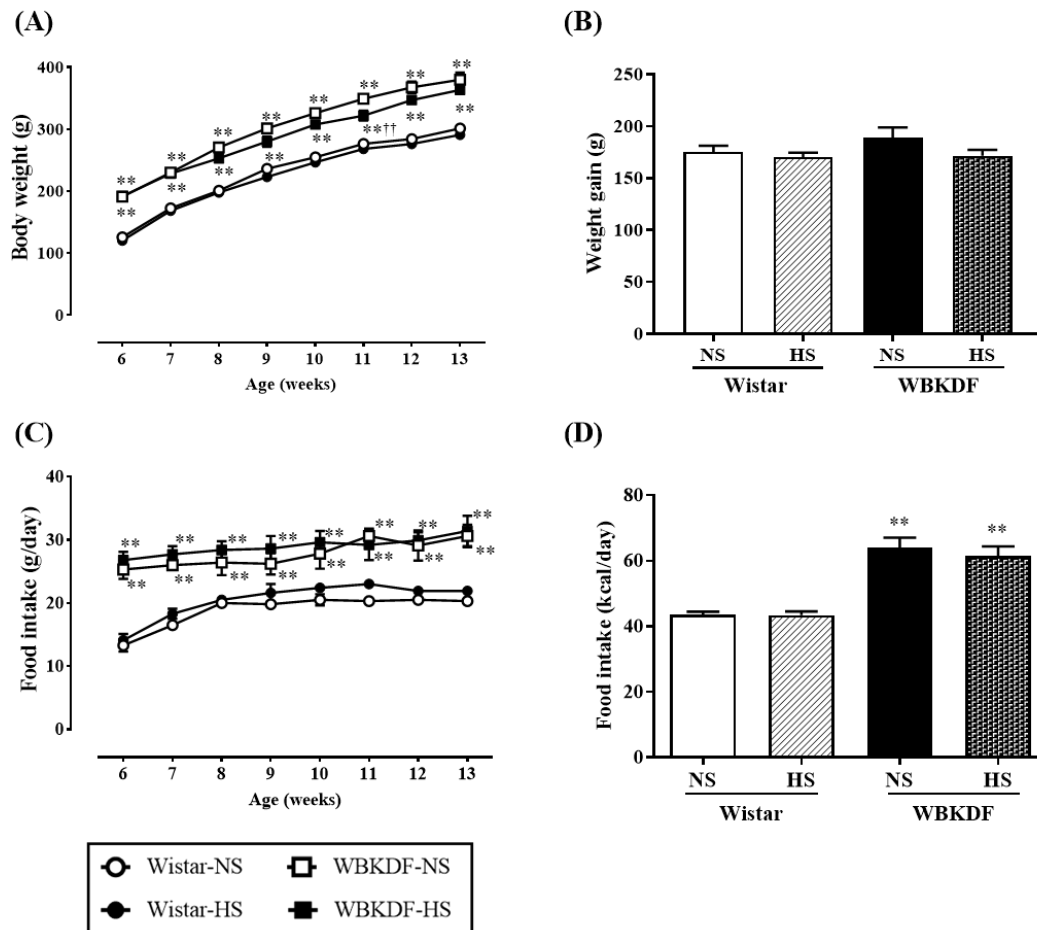


Figure 4. Effects of high-salt intake on body weight (A), weight gain (B), food intake (g/day) (C) and food intake (kcal/day) (D) in WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) and Wistar rats.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=8 in each group). \*P<0.05 versus Wistar rats on the same diet; \*\*P<0.01 versus Wistar rats on the same diet; †P<0.05 versus the same strain of rats on the NS diet; ††P<0.01 versus the same strain of rats on the NS diet. Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium.

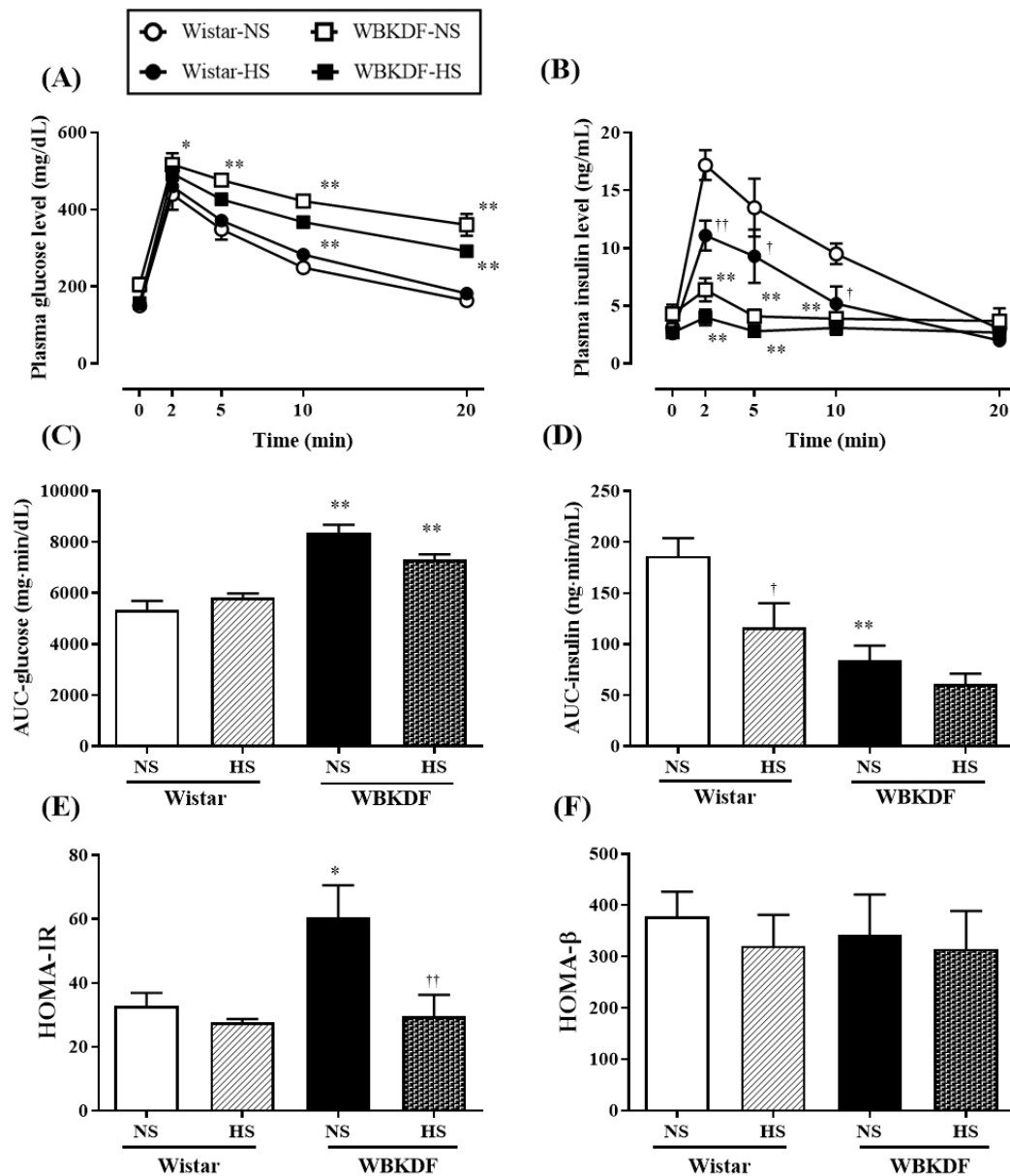


Figure 5. Effects of high-salt intake on plasma glucose concentration (A), plasma insulin concentration (B), AUC-glucose (C), AUC-insulin (D), HOMA-IR (E) and HOMA- $\beta$  (F) during the intravenous glucose tolerance test (IVGTT) in WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) and Wistar rats.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=8 in each group). \*P<0.05 versus Wistar rats on the same diet; \*\*P<0.01 versus Wistar rats on the same diet; †P<0.05 versus the same strain of rats on the NS diet; ††P<0.01 versus the same strain of rats on the NS diet. Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium.



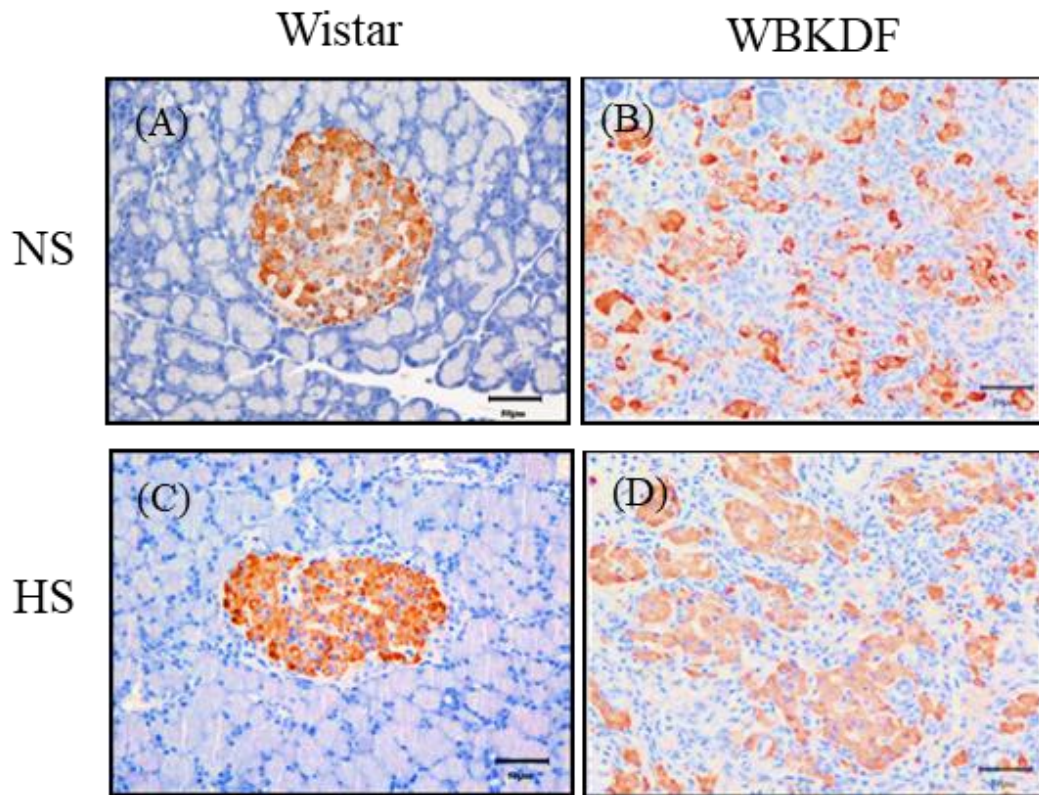


Figure 6. Histopathological examination on the pancreas in WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) and Wistar rats fed NS or HS diet.

Representative immunostaining of insulin in (A) Wistar-NS, (B) WBKDF-NS, (C) Wistar-HS and (D) WBKDF-HS. Scale bars= 50  $\mu$ m. Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium.

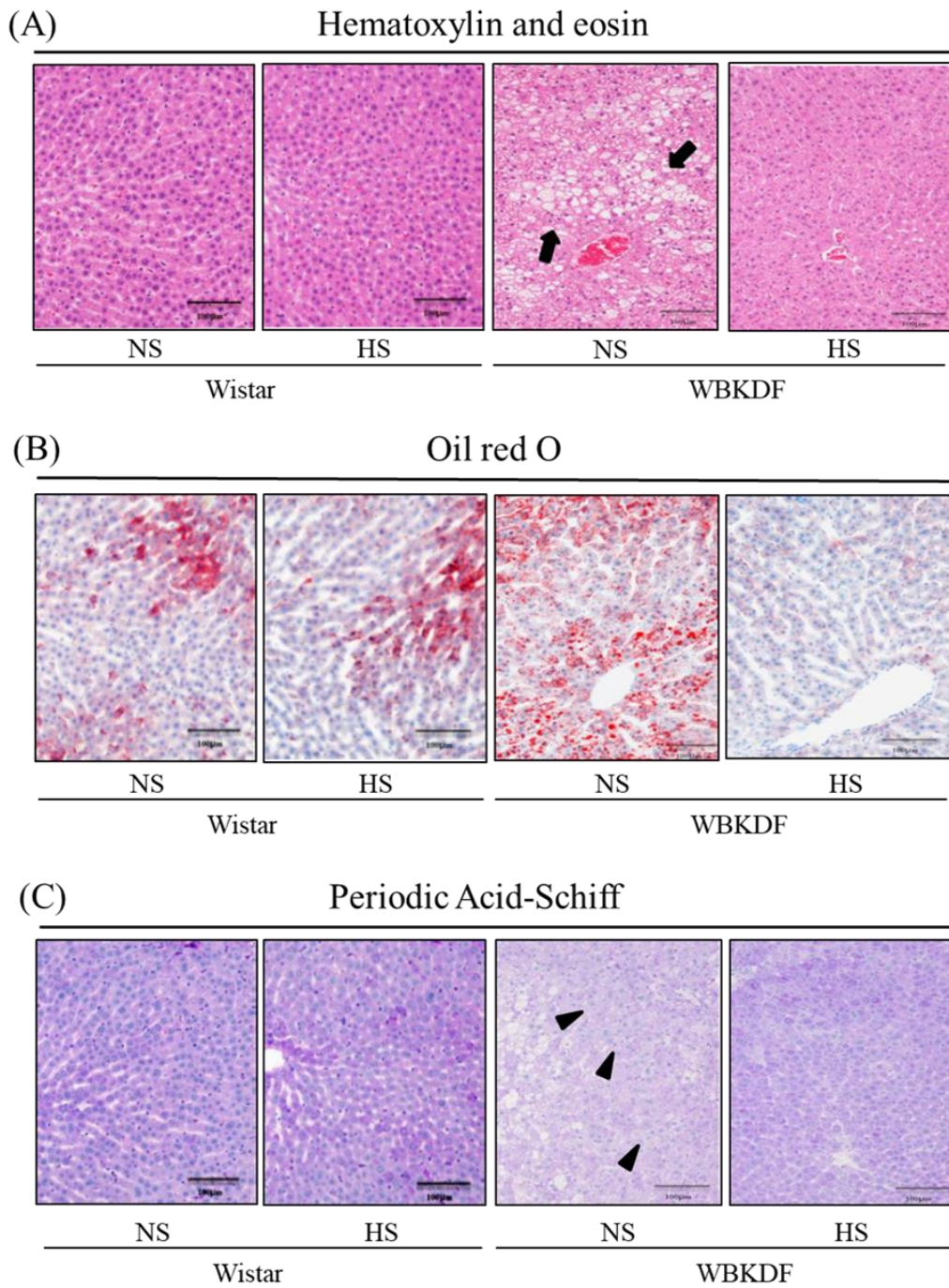


Figure 7. Histopathological examination on the liver in WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* (WBKDF) and Wistar rats fed NS or HS diet.

Representative immunostaining of (A) Hematoxylin and eosin (HE): Hepatic lipid deposits (arrow) (B) Oil red O and (C) Periodic acid-Schiff (PAS) in WBKDF and Wistar rats. Scale bars= 50 µm. Wistar-NS, Wistar rats on NS diet; Wistar-HS, Wistar rats on HS diet; WBKDF-NS, WBKDF rats on NS diet; WBKDF-HS, WBKDF rats on HS diets; NS, normal-sodium; HS, high-sodium.

### 第 3 章 総合考察

近年、食生活の欧米化と運動不足により肥満者が急増し、その結果メタボリックシンドロームとそれに伴う心血管疾患は社会的な問題となっている。メタボリックシンドロームの主要な構成因子の一つである高血圧症は、食塩感受性高血圧を呈することが多いものの、その発症機序は明らかではない。そのため、ヒトのメタボリックシンドロームの高血圧症の病態を反映した外挿性の高いモデル動物の開発が期待されている。

WBKDF ラットは、これまでの研究によりヒトの肥満を伴う 2 型糖尿病の病態をよく反映するだけでなく、メタボリックシンドロームの病態研究に有用な新規モデル動物としても期待されている。しかしながら、WBKDF ラットの血圧をはじめとする循環器系の特性については明らかにされていない。そこで、本研究では、肥満を伴う 2 型糖尿病モデルである WBKDF ラットの循環代謝系に対する高食塩食負荷の影響を調べ、2 型糖尿病と食塩の関連性を解明した。

#### 第 1 章 WBKDF ラットにおける高食塩食負荷の血圧および血管反応性への影響

本章において WBKDF ラットは、Wistar ラットに比べて重篤な高血圧を発症したことから、食塩感受性は極めて高いといえる。食塩感受性高血圧の臨床的特徴として肥満、インスリン抵抗性を基盤とするメタボリックシンドロームを呈することが報告されている (Uzu *et al.*, 2006)。WBKDF ラットもこれまでの研究により肥満ならびにインスリン抵抗性を若齢から

発症することが明らかとなっており (Kaji *et al.*, 2012; Okuno *et al.*, 2013; Nagakubo *et al.*, 2014)、本章でみられた WBKDF ラットの食塩感受性高血圧はヒトの病態をよく反映しているといえる。メタボリックシンドロームの食塩感受性高血圧は、血管反応性の異常やレニンアンジオテンシン系が関与するナトリウム貯留がその発症機序として報告されている (Simonson *et al.*, 1988; Sowers *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 2015)。本章では高食塩食を負荷した WBKDF ラットでは、酸化ストレスが亢進すると共にナトリウム貯留がみられた。このことより、WBKDF ラットの食塩感受性高血圧発症機序として血管反応性の異常のみならずナトリウム貯留が関与している可能性は高いと考えられる。今後、WBKDF ラットの食塩感受性高血圧発症機序としてレニンアンジオテンシン系の関与を明らかにすることで、メタボリックシンドロームと食塩感受性高血圧を解明するためのツールとしての WBKDF ラットの価値をさらに高めることが可能であろう。

## 第 2 章 WBKDF ラットの 2 型糖尿病発症に対する高食塩食負荷の影響

本章において、高食塩食を負荷した WBKDF ラットの高血糖発症抑制には肝臓でのインスリン抵抗性改善に対するアディポネクチンの関与が明らかとなった。メタボリックシンドロームでは、内臓脂肪から産生分泌される種々のアディポカインであるインスリン感受性因子とインスリン抵抗性因子の分泌のバランス異常によりインスリン抵抗性が生じるとされている (Elekofehinti *et al.*, 2017)。本研究でみられた WBKDF ラットの高食塩食による高血糖発症抑制への他のインスリン感受性および抵抗性関連因子の関与ならびにアディポネクチンの臓器間でのインスリン抵抗性

に対する作用を検討すると共に、高食塩食負荷による血中のアディポネクチンの制御機構のメカニズムを解明することが必要であろう。内臓肥満、高血圧症、脂質異常症ならびに糖尿病などを併せもつメタボリックシンドロームにおいては、個々に対する治療も重要であるが、その病態を全体として捉えた治療戦略が必要となる。本章で得られた成績は、食塩とメタボリックシンドロームに対する影響を包括的に捉えた知見として、その病態解明ならびに新たな治療薬の開発へ役立つものになるであろう。

#### まとめ

本研究より、肥満を伴う 2 型糖尿病モデルの **WBKDF** ラットは高食塩食負荷により重篤な高血圧症を発症する食塩感受性を有することが明らかとなった。一方、**WBKDF** ラットが自然発症する 2 型糖尿病は高食塩食の負荷により顕著に抑制された。**WBKDF** ラットにおいて高食塩食はメタボリックシンドロームの成立に促進的に働くとともに抑制的な作用も合わせ持つことが明らかとなった。

本研究の成績を短絡的にヒトのメタボリックシンドロームに外挿することには注意を要するであろう。本研究では糖尿病発症前の **WBKDF** ラットを用いて高食塩食の影響を検討したが、ヒトや伴侶動物のメタボリックシンドロームの病態特性に関する類似性については、糖尿病発症後の **WBKDF** ラットに対する高食塩食の影響を検討することが必要である。**WBKDF** ラットのメタボリックシンドロームモデルとしての価値を高めるために、エネルギー代謝調節臓器間の協調的な機能連関を解明しヒトの病態との類似性を明らかにするための更なる研究が望まれる。

しかし、本研究の成果は食塩の過剰摂取のメタボリックシンドロームに対する影響について新しい知見と加えるとともに、WBKDF ラットが 2 型糖尿病含むメタボリックシンドロームを有する高血圧症患者の病態解明に有用なツールとなりうることを示唆すると考えられる。

## 第 4 章 総括

肥満を伴う 2 型糖尿病モデルの WBKDF ラットにおいて、高食塩食の作用と作用機序について探究した結果、血管反応性の変化が関与する重篤な食塩感受性高血圧を発症すること、その一方で肝臓でのインスリン抵抗性を改善し高血糖の発症を抑制している可能性が明らかとなった。本研究は、WBKDF ラットの循環代謝系に対する高食塩食負荷の影響に関して新しい知見を加えるとともに、2 型糖尿病患者と食塩の関連性を解明するための有用な基礎情報になると考える。

## 謝辞

本論文を書き終えるにあたり、本研究を行うに際し、終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました麻布大学薬理学研究室 浅井史敏教授に深謝致します。また、本論文をご校閲いただきました同学部病理学研究室 代田欣二教授ならびに同学部薬理学研究室 白井明志准教授に心よりお礼申し上げます。そして、公表した論文を書き終えるにあたり、ご指導とご校閲をいただきました宮崎大学 伊藤勝昭名誉教授、千葉大学附属病院 伊藤薫先生に謝意を示します。

本研究は麻布大学薬理学研究室における研究テーマの一環としておこなわれたものであり、ご討論ならびにご協力いただきました同研究室の皆様へ感謝致します。



## 参考文献

1. Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I *et al.* Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension*. 2001; **37**: 433-439.
2. Gupte S, Labinskyy N, Gupte R, Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG. Role of NAD(P)H oxidase in superoxide generation and endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki (GK) rats as a model of nonobese NIDDM. *PLoS. One*. 2010; **5**: e11800.
3. Tuck M, Corry D, Trujillo A. Salt-sensitive blood pressure and exaggerated vascular reactivity in the hypertension of diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 1990; **88**: 210-216.
4. Simonson DC. Etiology and prevalence of hypertension in diabetic patients. *Diabetes Care*. 1988; **11**: 821-827.
5. Sowers JR, Levy J, Zemel MB. Hypertension and diabetes. *Med Clin North Am*. 1988; **72**: 1399-1414.
6. Choi HY, Park HC1, Ha SK. Salt Sensitivity and Hypertension: A Paradigm Shift from Kidney Malfunction to Vascular Endothelial Dysfunction. *Electrolyte. Blood. Press.* 2015; **13**: 7-16.
7. Ogihara T, Asano T, Ando K *et al.* Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension*. 2002a; **40**: 872-879.

8. Ogiwara T, Asano T, Ando K *et al.* High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2002b; **40**: 83-89.
9. Petrie JR, Morris AD, Minamisawa K *et al.* Dietary sodium restriction impairs insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; **83**: 1552-1557.
10. Melander O, Groop L, Hulthén UL. Effect of salt on insulin sensitivity differs according to gender and degree of salt sensitivity. *Hypertension*. 2000; **35**: 827-831.
11. Nakama K, Shichinohe K, Kobayashi K *et al.* Spontaneous diabetes-like syndrome in WBN/KOB rats. *Acta Diabetol Lat*. 1985; **22**: 335-342.
12. Akimoto T, Nakama K, Katsuta Y *et al.* Characterization of a novel congenic strain of diabetic fatty (WBN/Kob-*Lepr<sup>fa</sup>*) rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; **366**: 556-562.
13. Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci*. 1965; **131**: 447-458.
14. Kaji N, Okuno A, Ohno-Ichiki K *et al.* Plasma profiles of glucose, insulin and lipids in the male WBN/Kob-*Lepr<sup>fa</sup>* rat, a new model of type 2 diabetes with obesity. *J. Vet. Med. Sci*. 2012; **74**: 1185-1189.
15. Okuno A, Kaji N, Takahashi A *et al.* Role of insulin resistance in the pathogenesis and development of type 2 diabetes in WBN/Kob-*Lepr<sup>fa</sup>* rats. *J. Vet. Med. Sci*. 2013; **75**: 1557-1561.

16. Nagakubo D, Shirai M, Nakamura Y *et al.* Prophylactic effects of the glucagon-like Peptide-1 analog liraglutide on hyperglycemia in a rat model of type 2 diabetes mellitus associated with chronic pancreatitis and obesity. *Comp. Med.* 2014; **64**: 121-127.
17. Akimoto T, Terada M, Shimizu A. Progression of pancreatitis prior to diabetes onset in WBN/Kob-*Lepr<sup>fa</sup>* rats. *J Vet Med Sci.* 2012; **74**: 65-70.
18. 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.* 2003; **52**: 102-110.
19. Saydah SH, Fradkin J, Cowie CC. Poor control of risk factors for vascular disease among adults with previously diagnosed diabetes. *JAMA.* 2004; **291**: 335-342.
20. Phillips CM. Nutrigenetics and metabolic disease: current status and implications for personalised nutrition. *Nutrients.* 2013; **5**: 32-57.
21. Dahl LK, Heine M, Tassinari L. Effects of chronic salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension. *J. Exp. Med.* 1962; **115**: 1173-1190.
22. MacGregor GA, Markandu ND, Best FE *et al.* Double-blind randomised crossover trial of moderate sodium restriction in essential hypertension. *Lancet.* 1982; **1**: 351-355.
23. Kawasaki T, Delea CS, Bartter FC, Smith H. The effect of high-sodium and low-sodium intakes on blood pressure and other related variables in

- human subjects with idiopathic hypertension. *Am. J. Med.* 1978; **64**: 193-198.
24. Ito MK, Okayasu M, Koshimoto C *et al.* Impairment of endothelium-dependent relaxation of aortas and pulmonary arteries from spontaneously hyperlipidemic mice (*Apodemus sylvaticus*). *Vascular Pharmacol.* 2007; **47**: 166-173.
25. Takatori S, Fujiwara H, Zamami Y, Hashikawa-Hobara N, Kawasaki H. Decreased perivascular CGRP-containing nerves in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats with insulin resistance and hypertension. *Hypertens. Res.* 2014; **37**: 398-404.
26. Ishii Y, Maki M, Yamamoto H, Sasase T, Kakutani M, Ohta T. Evaluation of blood pressure in Spontaneously Diabetic Torii-*Lep<sup>fa</sup>* rats. *Exp. Anim.* 2010; **59**: 525-529.
27. Janssen U, Phillips AO, Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes. *J. Nephrol.* 1999; **12**: 159-172.
28. Retailliau K, Belin de Chantemèle EJ, Henrion D *et al.* Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane A2 reduce angiotensin II type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries. *Hypertension.* 2010; **55**: 339-344.
29. dos Santos L, Gonçalves MV, Vassallo DV, Oliveira EM, Rossoni LV. Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation. *Life. Sci.* 2006; **78**: 2272-2279.

30. Hirabara Y, Araki M, Fukuda M *et al.* A high-sodium diet in streptozotocin-induced diabetic rats impairs endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilation. *J. Pharmacol. Sci.* 2007; **4**: 402-405.
31. Franco M, Tapia E, Bautista R *et al.* Impaired pressure natriuresis resulting in salt-sensitive hypertension is caused by tubulointerstitial immune cell infiltration in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2013; **304**: F982-990.
32. Crestani S, Gasparotto Júnior A, Marques MC *et al.* Enhanced angiotensin-converting enzyme activity and systemic reactivity to angiotensin II in normotensive rats exposed to a high-sodium diet. *Vascul. Pharmacol.* 2014; **60**: 67-74.
33. Danda RS, Habiba NM, Rincon-Choles H *et al.* Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes. *Kidney. Int.* 2005; **68**: 2562-2571.
34. Katsuda Y, Kemmochi Y, Maki M *et al.* Physiological changes induced by salt intake in female Spontaneously Diabetic Torii-*Lepr<sup>fa</sup>* (SDT fatty) rat, a novel obese type 2 diabetic model. *Anim. Sci. J.* 2014; **85**: 588-594.
35. Adegunloye BJ, Sofola OA. Effect of dietary salt loading and high-calcium diet on vascular smooth muscle responses and endothelium function in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1997; **24**: 814-818.
36. Chamarthi B, Williams JS, Williams GH. A mechanism for salt-sensitive hypertension: abnormal dietary sodium-mediated vascular response to angiotensin-II. *J. Hypertens.* 2010; **28**: 1020-1026.

37. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999; **34**: 539-545.
38. Danaei G, Finucane MM, Lu Y *et al*. Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011; **378**: 31-40.
39. Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F *et al*. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. *Free. Radic. Biol. Med.* 1998; **25**: 369-372.
40. Lenda DM, Sauls BA, Boegehold MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2000; **279**: 7-14.
41. Kizhakekuttu TJ, Widlansky ME. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. *Cardiovasc. Ther.* 2010; **28**: 20-32.
42. Schmidt TS, Alp NJ. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin. Sci* . 2007; **113**: 47-63.
43. Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; **104**: 16281-16286.

44. Safar ME, Benetos A. Factors influencing arterial stiffness in systolic hypertension in the elderly: role of sodium and the renin-angiotensin system. *Am. J. Hypertens.* 2003; **16**: 249-258.
45. Melander O, Groop L, Hulthén UL. Effect of salt on insulin sensitivity differs according to gender and degree of salt sensitivity. *Hypertension.* 2000; **35**: 827-831.
46. Prada P, Okamoto MM, Furukawa LN, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension.* 2000; **35**: 424-429.
47. Titze J, Luft FC. Speculations on salt and the genesis of arterial hypertension. *Kidney Int.* 2017; **91**: 1324-1335.
48. Quader ZS, Cogswell ME, Fang J, Coleman King SM, Merritt RK. Changes in primary healthcare providers' attitudes and counseling behaviors related to dietary sodium reduction, DocStyles 2010 and 2015. *PLoS One.* 2017; **12**: e0177693.
49. Imanishi M, Yoshioka K, Okumura M *et al.* Sodium sensitivity related to albuminuria appearing before hypertension in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2001; **24**: 111-116.
50. O'Hare JA, Ferriss JB, Twomey BM, Cole M, Brady D, O'Sullivan DJ. Blood pressure may be sodium-dependent in diabetic patients without overt nephropathy. *Ir J Med Sci.* 1985; **154**: 455-460.
51. Simon G. Experimental evidence for blood pressure-independent vascular effects of high sodium diet. *Am J Hypertens.* 2003; **16**: 1074-1078.

52. Akimoto T, Terada M, Shimizu A, Sawai N, Ozawa H. The influence of dietary restriction on the development of diabetes and pancreatitis in female WBN/Kob-fatty rats. *Exp Anim.* 2010; **59**: 623-630.
53. Mather A, Pollock C. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int Suppl.* 2011; **120**: S1-6.
54. Chrysant SG. Promising cardiovascular and blood pressure effects of the SGLT2 inhibitors: a new class of antidiabetic drugs. *Drugs Today (Barc).* 2017; **53**: 191-202.
55. Dongiovanni P, Valenti L. A Nutrigenomic Approach to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2017; **16**: 18(7).
56. DiNicolantonio JJ, Niazi AK, Sadaf R, O' Keefe JH, Lucan SC, Lavie CJ. Dietary sodium restriction: take it with a grain of salt. *Am J Med.* 2013; **126**: 951-955.
57. Donovan DS, Solomon CG, Seely EW, Williams GH, Simonson DC. Effect of sodium intake on insulin sensitivity. *Am J Physiol.* 1993; **264**: E730-734.
58. Ogihara T, Asano T, Ando K *et al.* Insulin resistance with enhanced insulin signaling in high-salt diet-fed rats. *Diabetes.* 2001; **50**: 573-583.
59. Premilovac D, Richards SM, Rattigan S, Keske MA. A vascular mechanism for high-sodium-induced insulin resistance in rats. *Diabetologia.* 2014; **57**: 2586-2595.



60. Wainford RD, Kapusta DR. Hypothalamic paraventricular nucleus G alpha q subunit protein pathways mediate vasopressin dysregulation and fluid retention in salt-sensitive rats. *Endocrinology*. 2010; **151**: 5403-5414.
61. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. *The International Journal of Molecular Sciences*. 2017; **18**. E1321.
62. Lely AT, Krikken JA, Bakker SJ *et al*. Low dietary sodium and exogenous angiotensin II infusion decrease plasma adiponectin concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; **92**: 1821-1826.
63. Kamari Y, Shimoni N, Koren F, Peleg E, Sharabi Y, Grossman E. High-salt diet increases plasma adiponectin levels independent of blood pressure in hypertensive rats: the role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Hypertens*. 2010; **28**: 95-101.
64. Zhao W, Wu C, Li S, Chen X. Adiponectin protects palmitic acid induced endothelial inflammation and insulin resistance via regulating ROS/IKK $\beta$  pathways. *Cytokine*. 2016; **88**: 167-176.
65. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol*. 2016; **8**: 101-109.
66. Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest*. 2003; **112**: 91-100.

67. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res.* 1996; **28**: 619-632.
68. Hosohata K, Yoshioka D, Tanaka A, Ando H, and Fujimura. A, Early urinary biomarkers for renal tubular damage in spontaneously hypertensive rats on a high salt intake. *Hypertension Research.* 2016; **39**: 19-26.
69. Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *American Journal of Kidney Diseases.* 1992; **20**: 1-17.
70. Elekofehinti OO, Ejelonu OC, Kamdem JP, Akinlosotu OB, Adanlawo IG. Saponins as adipokines modulator: A possible therapeutic intervention for type 2 diabetes. *World J Diabetes.* 2017; **8**: 337-345.
71. Uzu T, Kimura G, Yamauchi A *et al.* Enhanced sodium sensitivity and disturbed circadian rhythm of blood pressure in essential hypertension. *J Hypertens.* 2006; **24**: 1627-1632.

## 要旨

内臓に脂肪が過度に蓄積する内蔵脂肪型肥満症を基盤として、糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病が集積するメタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群あるいは代謝症候群とも呼ばれる）がヒトのみならず伴侶動物においても急増している。メタボリックシンドロームとして集積した生活習慣病の相乗的な病態増悪メカニズムに関しては、未だ不明な点が多い。また、食塩の過剰摂取が高血圧を引き起こす要因であることはよく知られているものの、糖尿病における食塩過剰摂取の影響については統一的な見解は得られていない。メタボリックシンドロームの病態の全容解明には、骨格筋、脂肪組織、膵臓、肝臓、血管そして中枢神経系をも包括するエネルギー代謝調節臓器間の協調的な機能連関を包括的にとらえる必要がある。しかし、メタボリックシンドロームの複雑な病態を試験管内で再現することは極めて困難であることから、メタボリックシンドロームの病態を反映した良質なモデル動物の開発は急務となっている。Wistar Bonn Koberi Diabetic Fatty (WBKDF, WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>*) ラットは、肥満を伴わない 2 型糖尿病モデルラットである WBN/Kob に肥満モデルである Zucker 肥満ラットのレプチンレセプター肥満遺伝子 (*Lepr<sup>fa</sup>*) を戻し交配により導入し作出された。レプチンレセプター肥満遺伝子は、レプチン受容体の機能不全を生じ、ホモの個体は過食、肥満およびインスリン抵抗性を示すことが知られている。これまでの研究により、WBKDF ラットはヒトの肥満を伴う 2 型糖尿病の病態をよく反映するだけでなく、メタボリックシンドロームの病態研究に有用な新規モデル動物としても期待されて

いる。しかしながら、WBKDF ラットの血圧をはじめとする循環器系の特性については明らかにされていない。本研究では、WBKDF ラットの循環代謝系に対する高食塩食負荷の影響を調べ、食塩感受性の有無とともに 2 型糖尿病と食塩の関連性を解明することを目的とした。

## 第 1 章 WBKDF ラットにおける高食塩食負荷の血圧および血管反応性への影響

食塩感受性高血圧には遺伝的要因の関与が大きいことが知られていることから、WBKDF ラットにおける高食塩食負荷の血圧および血管反応性への影響について Wistar ラットと比較検討した。6 週齢の雄性 WBKDF および Wistar ラットを各 2 群 (N=7 ずつ) に分け、各々標準食 (0.26% NaCl) および高食塩食 (8% NaCl) で 20 週齢まで飼育し、尾部カフ法により非麻酔下で血圧を測定した。実験終了時に、胸部大動脈および血液を採取し、マグヌス法により胸部大動脈リング標本を用いて血管反応性を測定するとともに、血液生化学解析を行った。また、腎臓の病理組織学解析を行った。

WBKDF 標準食群のラットは高血糖を発症したが、高食塩食群では高血糖の程度は極めて軽度であった。標準食を給与した両系統の収縮期血圧は実験期間中に有意な変化はみられなかった。一方、高食塩食により両系統ともに収縮期血圧が上昇し、食塩感受性高血圧を発症した。その昇圧の程度は Wistar ラットに比べ、WBKDF ラットで顕著 ( $P<0.01$ ) であった。フェニレフリンに対する摘出胸部大動脈の収縮反応は、WBKDF ラットにおいて標準食群と比較し高食塩食群で、顕著 ( $P<0.01$ ) に増強した。アセチルコリンおよびニトロプルシドによる弛緩反応は、Wistar 標準食群と比較

し WBKDF 標準食群において、有意に ( $P<0.01$ ) に減弱した。WBKDF 高食塩食群では、WBKDF 標準食群と比較し、アセチルコリンおよびニトログリセリンによる弛緩反応は顕著に ( $P<0.01$ ) 減弱した。WBKDF 高食塩食群では、Wistar 高食塩食群と比較し、酸化ストレスマーカーである 8-isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$  およびナトリウムの血中濃度が有意に ( $P<0.05$ ) 高かった。WBKDF 高食塩食群では、WBKDF 標準食群で観察された糖尿病性腎症における特徴的な形態学的所見である尿細管の Armanni-Ebstein 変性はみられなかったが、腎皮質の間質性炎症細胞浸潤ならびに尿細管の尿円柱形成が認められた。本研究から、高血糖を自然発症する WBKDF ラットは、高食塩食負荷により Wistar ラットに比べ顕著な高血圧を発症し、高い食塩感受性を有することが明らかとなった。WBKDF ラットにおける重度な高血圧の要因として、酸化ストレスおよび血中ナトリウム濃度の上昇に関連すると考えられる血管の収縮反応の増強および弛緩反応の抑制による可能性が示唆された。

## 第 2 章 WBKDF ラットの 2 型糖尿病発症に対する高食塩食負荷の影響

続いて本章では、WBKDF ラットが自然発症する 2 型糖尿病に対する高食塩食負荷の影響を正常血糖の Wistar ラットと比較検討した。6 週齢の雄性 WBKDF および Wistar ラットを各 2 群 ( $N=8$  ずつ) に分け、13 週齢まで標準食 (0.26% NaCl) または高食塩食 (8% NaCl) で飼育し、摂餌量、体重および尾部カフ法により非麻酔下で血圧を測定し、採血ならびに採尿を実施した。実験終了時に静脈内糖負荷試験を行い、血液と尿の生化学解析および肝臓と膵臓の病理組織学解析を行った。前回の検討と同様に、高食塩食により両系統のラットともに著しい ( $P<0.01$ ) 収縮期血圧の上昇お

よび尿量の顕著な増加がみられた。両系統ともに標準食群と高食塩食群の間に、体重および摂餌量（重量ならびにカロリー数）への影響は観察されなかった。WBKDF 標準食群では週齢を経るにしたがって高血糖ならびに尿糖の発現がみられたが、WBKDF 高食塩食群では実験期間中、高血糖も尿糖もともにみられなかった。脂肪細胞から分泌される蛋白であり、インスリン感受性を上げる作用を有するアディポネクチンの血漿中濃度は、WBKDF 標準食群より WBKDF 高食塩食群で有意に ( $P<0.05$ ) 高かった。WBKDF 高食塩食群では WBKDF 標準食群と比較し、肝重量の有意な ( $P<0.01$ ) 低下、ALT の低下および肝組織においてグリコーゲン沈着の増加と脂肪滴の減少が認められた。WBKDF 高食塩食群では WBKDF 標準食群と比較し、インスリン抵抗性指数 (HOMA-IR : Homeostasis model assessment-Insulin Resistance) の著しい ( $P<0.01$ ) 低下が認められた。一方、WBKDF 高食塩食群のインスリン分泌能ならびに膵組織は WBKDF 標準食群と明らかな差異は認められなかった。第二章では、高食塩食を負荷した WBKDF ラットでは高血糖の発症が抑制されるとともにインスリン抵抗性指数が減弱することが明らかとなった。WBKDF 高食塩食群ではインスリン抵抗性との関連が強いグリコーゲン沈着および脂肪滴の蓄積が減少するとともに血漿中アディポネクチン濃度の上昇が認められた。以上の成績より、高食塩食負荷により血中濃度の上昇したアディポネクチンが肝臓でのインスリン抵抗性を改善し、高血糖発症の抑制に寄与した可能性が示唆された。

本研究において、肥満を伴う 2 型糖尿病モデルの WBKDF ラットは高食塩食負荷により重篤な高血圧症を発症する食塩感受性を有することが明

らかとなった。一方、**WBKDF** ラットが自然発症する 2 型糖尿病は高食塩食の負荷により顕著に抑制された。**WBKDF** ラットにおいて高食塩食はメタボリックシンドロームの成立に促進的に働くとともに抑制的な作用も合わせ持つことが明らかとなった。メカニズム検討では高食塩食による高血圧の発症には酸化ストレスおよび血中ナトリウム濃度の上昇に関連すると考えられる血管反応の異常が大きく寄与することが示唆された。また、高食塩食の 2 型糖尿病の抑制には、アディポネクチンによる肝臓のインスリン抵抗性の改善が寄与することが示唆された。本研究の成績を短絡的にヒトまたは伴侶動物のメタボリックシンドロームに外挿することには注意を要するであろう。本研究では糖尿病発症前の **WBKDF** ラットを用いて高食塩食の影響を検討したが、ヒトや伴侶動物のメタボリックシンドロームの病態特性に関する類似性については、糖尿病発症後の **WBKDF** ラットに対する高食塩食の影響を検討することが必要であろう。また、高食塩食負荷による血中のアディポネクチンの制御機構のメカニズムを解明するには更なる研究が望まれる。しかしながら、本研究の成果は食塩の過剰摂取のメタボリックシンドロームに対する影響について新しい知見と加えらるとともに、**WBKDF** ラットが 2 型糖尿病を有する高血圧症患者の病態解明に有用な動物モデルとなりうることを示唆すると考えられる。

## Abstract

The prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and hypertension has markedly increased worldwide. The risk of cardiovascular disease in diabetic individuals is doubled by concomitant hypertension, which occurs in an estimated 63% of T2DM patients. Genetic and environmental factors play important roles in the pathogenesis of T2DM and hypertension. Evidence from clinical trials and animal studies shows a causal relationship between dietary salt intake and hypertension. Many studies have suggested that blood pressure responses to dietary salt intake vary considerably among people and animals, which is a well-known phenomenon described as salt sensitivity of blood pressure. Salt sensitivity of blood pressure occurs frequently in individuals with T2DM and is associated with an increased risk for cardiovascular death. The pathophysiological mechanisms that promote salt sensitivity are complicated, and genetic and environmental factors are involved. However, recent studies have indicated a role of vascular dysfunction in driving the development of salt-sensitive hypertension.

The Wistar Bonn Koberi Diabetic Fatty (WBKDF, WBN/Kob-*Lep<sup>fa/fa</sup>*) rat is a new congenic strain established by introducing the *fa* allele in Zucker fatty rats into the WBN/Kob (lean) rat genome. Previous studies have shown that the WBKDF rat is a spontaneous model of T2DM that shows obesity, hyperglycemia, and dyslipidemia from a young age, resulting in the early onset of diabetic complications. Thus, WBKDF rats are particularly relevant to human



T2DM. If WBKDF rats are salt-sensitive, these rats may serve as a useful model for investigating the etiology of hypertension with T2DM. However, this rat model is not very well characterized in terms of cardiovascular responses. In the present study, we examined the effects of high-salt intake on cardio-metabolic responses in WBKDF rats in comparison with age-matched Wistar rats.

#### Chapter 1: The Effects of High-Sodium Intake on Systemic Blood Pressure and Vascular Responses in Spontaneously Diabetic WBN/Kob-*Lep<sup>fa/fa</sup>* Rats

The prevalence of T2DM and hypertension has markedly increased worldwide. The purpose of the present study was to examine the effects of a high-salt intake on the systolic blood pressure (SBP) and vascular responses in WBKDF rats, a new spontaneous animal model of T2DM. Male WBKDF rats and age-matched Wistar rats at 6 weeks of age were each divided into two groups and fed either a normal-sodium (0.26%, NS) diet or high-sodium (8%, HS) diet for 14 weeks: 1) Wistar rats on NS diet (Wistar-NS); 2) Wistar rats on HS diet (Wistar-HS); 3) WBKDF rats on NS diet (WBKDF-NS); 4) WBKDF rats on HS diets (WBKDF-HS). Neither WBKDF-NS nor Wistar-NS rats showed significant changes in SBP throughout the experiment, but both WBKDF-HS and Wistar-HS exhibited significant elevation of SBP, which was more prominent ( $P < 0.01$ ) in WBKDF-HS than in Wistar-HS. Phenylephrine-induced contractions of isolated thoracic aortic rings were significantly ( $P < 0.01$ ) enhanced in WBKDF-HS and Wistar-HS compared with the respective strain of rats on the NS diet. In contrast, acetylcholine- and nitroprusside-induced relaxation were significantly ( $P < 0.01$ )

diminished in both WBKDF-HS and Wistar-HS, and these HS diet-induced changes were more profound ( $P < 0.01$ ) in WBKDF rats than in Wistar rats. Significantly ( $P < 0.05$ ) higher plasma concentrations of 8-iso-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and sodium ions were observed in WBKDF-HS than in Wistar-HS. The current study demonstrated that WBKDF-HS rats developed salt-sensitive hypertension associated with vascular dysfunction. The WBKDF rat may be a useful model for investigating the etiology of hypertension with T2DM.

Chapter 2: High-sodium intake ameliorates hyperglycemia and insulin resistance in WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* rats, a new model of type 2 diabetes

High sodium intake is a major risk factor for developing hypertension in T2DM, but the connection between sodium intake and glucose homeostasis remains elusive. We previously found that high-salt intake induces hypertension in WBKDF rats, a new model of T2DM. In the present study, we examined the effects of a high salt intake on glucose homeostasis in WBKDF rats. Male WBKDF rats and age-matched Wistar rats at 6 weeks of age were each divided into two groups and fed either a NS (0.26%) diet or HS (8%) diet for 7 weeks. SBP and urine volume were increased in WBKDF-HS and Wistar-HS. Body weight gain and food consumption was comparable between NS and HS in both strains. Plasma and urine glucose levels were significantly increased in WBKDF-NS, but not in WBKDF-HS. HOMA-IR, a parameter of insulin resistance, in WBKDF-HS was significantly lower compared with WBKDF-NS. The high plasma adiponectin level in WBKDF-NS compared with Wistar-NS

was further enhanced in WBKDF-HS. Glycogen deposits and fat droplets in the livers of WBKDF-HS were reduced compared with WBKDF-NS. The present study demonstrated that HS intake ameliorated hyperglycemia and insulin resistance in WBKDF rats, which may be due to enhanced plasma levels of adiponectin.

The present study found that the HS diet produced severe systemic hypertension in the WBKDF rat, a new model of T2DM with obesity, suggesting that WBKDF rats have high salt-sensitivity. In contrast, the HS diet completely inhibited hyperglycemia in WBKDF rats. These results demonstrated that high-salt intake produced opposite effects on hypertension and T2DM, both of which comprise metabolic syndrome. The current study suggested that salt-sensitive hypertension in WBKDF rats was associated with vascular dysfunction, which may be mainly due to enhanced plasma levels of oxidative stress and sodium ions. It also suggested that inhibition of hyperglycemia by high-salt intake in WBKDF rats was likely due to improvement in hepatic insulin resistance via elevation of plasma adiponectin levels.

However, no rodent model will fully represent the complex clinical spectrum of metabolic syndrome in humans or companion animals. In the present study, WBKDF rats under the pre-diabetic stage were used; therefore, effects of high-salt intake in WBKDF rats with developed T2DM should be examined. In addition, further studies are needed to elucidate the mechanism of the elevation in plasma adiponectin by high-salt intake. The present study

provided new and valuable evidence about the effects of high-salt intake on metabolic syndrome using WBKDF rats. It also suggested that WBKDF rats may be a good model for examining the etiology of T2DM with salt-sensitive hypertension.

## 出典

本論文の一部は、以下に公表した。

Takagi Y, Kadowaki H, Kobayashi I, Ito K, Ito K, Shirai M, Asai F. Effects of high-sodium intake on systemic blood pressure and vascular responses in spontaneously diabetic WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017; **44**: 305-312.

Takagi Y, Sugimoto T, Kobayashi M, Shirai M and Asai F. High-Salt Intake Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Resistance in WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>* Rats, a New Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*. 2018; ID 3671892.