

氏名(本籍)	高木善市(静岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第151号
学位授与年月日	平成29年9月30日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	肥満を伴う2型糖尿病モデルWBN/Kob- <i>Lepr^{fa/fa}</i> 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
論文審査委員	(主査) 浅井史敏 (副査) 代田欣二 白井明志

論文内容の要旨

【緒言】

内臓に脂肪が過度に蓄積する内臓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 Kobori Diabetic Fatty (WBKDF, WBN/Kob-*Lepr^{fa/fa}*) 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^{fa}*)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 ラットの循環系および糖代謝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、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、著明に増強した。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プルシドによる弛緩反応は減弱した。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_{2a} 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食塩感受性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

第 1 章の結果から、WBKDF ラットでは高食塩食の摂取により Wistar ラットに比べ顕著な食塩感受性を有することが明らかとなった。第 2 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。

第1章の研究でみられたと同様に、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2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。

【総括】

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発症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。

メカニズム検討から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アディポネクチン血中濃度調節作用についてのメカニズムを解明するには更なる研究が望まれる。

本研究の成果は、食塩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を加えるとともに、WBKDF ラットが2型糖尿病を有する高血圧症患者の病態を解明する研究において有

用な実験動物となりうることを示唆する。

本論文の一部は、以下の論文に公表した。

Takagi Y. et al. Clin Exp Pharmacol Physiol. 44 : 305-312. 2017.

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

本論文は、肥満を伴う 2 型糖尿病モデルの Wistar Bonn Kobori diabetic fatty (WBKDF, WBN/Kob-*Lepr^{fa/fa}*) ラットにおける高食塩食負荷の心血管代謝系に及ぼす影響に関するものである。申請者は、食塩大量摂取が高血圧の発症を促進する一方で、2 型糖尿病の発症を抑制するという相反する作用を併せ持つことを示す新しい知見を得た。

2. 論文審査

1) テーマのたて方

申請者は、生活習慣病が重積したメタボリックシンドロームの病態解明にはモデル動物を用いた実験が有用と考えるとともに、食塩大量摂取の心血管代謝系に対する影響を明らかにすることは科学的独自性および社会的意義が大きいと考えた。

2) 研究の背景

近年、メタボリックシンドロームの罹患率が著しく上昇しており、その対策が急務となっている。申請者は、高血圧の危険因子として食塩過剰摂取が知られているが、2 型糖尿病と食塩の関連については不明な点が多いことに着目した。

3) 研究の方法

申請者は肥満を伴う 2 型糖尿病モデル WBKDF ラットに高食塩食を長期間負荷し、心血管代謝に対する影響を解析した。

4) 研究の結果

本研究で得られた主な成果は以下のとおりである。①WBKDF ラットは高食塩食負荷により重篤な高血圧症を発症した。②WBKDF ラットが自然発症する 2 型糖尿病は高食塩食負荷により顕著に抑制されるとともに肝臓におけるインスリン抵抗性の改善がみられた。

5) 考察と結論

申請者は WBKDF ラットが高い食塩感受性を有し、高食塩食は酸化ストレスおよび血中ナトリウムに起因する異常血管反応性を介して高血圧発症を促進すると考察した。また、高食塩食がアディポネ

クチン産生を亢進することにより肝インスリン抵抗性を改善すると考察した。食塩大量摂取はメタボリックシンドロームの発症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示唆された。

6) 引用論文

十分かつ適切に既報論文が引用されていた。

本論文の内容と審査会での質疑に対する回答を考慮すると、本研究の立案・実施・論文作成に申請者自らが主体的な役割を担ったこと、背景知識・専門知識を十分有することが認められた。

3. 審査結果

以上の点から、本論文は博士（獣医学）の学位を申請するに十分な価値があると判断した。