

学位申請論文

メタボリックシンドローム動物モデルの  
病態特性の解明に関する研究

(Characteristics of a metabolic syndrome animal model)

2019年2月

麻布大学大学院 獣医学研究科  
獣医学専攻 博士課程  
動物応用科学専攻 博士後期課程

DA1604 滑川 淳一

## 目次

目次.....	2
序論.....	3
第 1 章.....	6
緒言.....	7
実験材料および実験方法.....	8
実験結果.....	11
考察.....	16
小括.....	18
第 2 章.....	19
緒言.....	20
実験材料および実験方法.....	21
実験結果.....	25
考察.....	35
小括.....	37
第 3 章.....	38
緒言.....	39
実験材料および実験方法.....	41
実験結果.....	45
考察.....	54
小括.....	57
総括ならびに結論.....	58
謝辞.....	61
引用文献.....	62
要旨.....	71
Abstract.....	74

## 序論

メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満に高血糖、高血圧、脂質代謝異常が組合わさった病態である[19, 26, 37]。日本では、ウエスト周囲径が男性 85 cm 女性 90 cm を超え、高血圧・高血糖・脂質代謝異常の 3 つのうち 2 つに当てはまるとメタボリックシンドロームと診断される。日本におけるメタボリックシンドロームの診断には、内臓脂肪の蓄積が必須条件で、それに加えて、血圧・血糖・血清脂質のうち 2 つ以上が基準値を超えていることが条件となっている[50]。メタボリックシンドロームが臨床上極めて重要な概念である理由は、内臓脂肪型肥満に加えて高血糖、高血圧、脂質代謝異常が軽症でも重積して存在すると、心臓病や 2 型糖尿病をまねきやすいからである。メタボリックシンドロームの患者数は近年増加しており、メタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発のための良質な実験動物モデルが必須であるが、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する実験動物モデルがない。

メタボリックシンドロームは遺伝要因と環境要因が組み合わさって発症すると考えられている。遺伝要因では、レプチンおよびレプチン受容体などの遺伝子変異がヒトで肥満を惹起することが報告されている[11, 28, 29]。環境要因では高脂肪食や高糖質食の食事の影響が大きく、糖質では甘味料として使用が急増しているフルクトースのメタボリックシンドローム発症への寄与が注目されている[5]。フルクトースは、主にショ糖の分解により、又は果物から生体へ取り込まれるが、最近ではソフトドリンクや菓子類に汎用されるコーンシロップに多く含まれることから、米国や日本において摂取量が増加している。フルクトースはグルコースとは異なる代謝的特性を有し、主に肝臓に取り込まれ代謝される。フルクトースはグルコース代謝のヘキソキナーゼに比べ遥かに高い酵素活性

を有するフルクトキナーゼにより、フルクトース 1-リン酸に変換された後、フルクトース 1-リン酸アルドラーゼにより、グリセリンアルデヒドとジヒドロキシアセトンリン酸に分割され、トリオースを経て解糖系へ一気に流入する[16, 25, 43]。この経路はグルコース代謝の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼを迂回するため、ATP やクエン酸によるネガティブフィードバックの制御を受けない。したがって、フルクトースの大量摂取は大量のアセチル CoA を供給することになり、それがグルコースや中性脂肪に変換される。また、最近ではフルクトース摂取と高中性脂肪血症、脂肪肝およびインスリン抵抗性との関連が報告されている[8, 12, 38, 40, 41, 45]。

WBKDF ラットは、肥満を伴わない 2 型糖尿病モデルである WBN/Kob に 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た新規コンジュニク ラットである[10]。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ことが明らかとなっており、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[1, 20, 30, 33]。

そこで本研究では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、以下に示す第 1～3 章の実験を実施した。

第 1 章では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、遺伝的要因により肥満および脂質異常症を自然発症する 2 型糖尿病モデル動物である WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷したときの肥満、脂質代謝および糖代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、糖代謝については高脂肪食と高フルクトース食で異なるプロファイルを示し、高血糖は高脂肪食負荷で増悪するのに対して、高フルクトース食負荷で軽減すること、血漿

中インスリン値は、高脂肪食負荷で標準食群と同様に減少するのに対して、高フルクトース食負荷では高値を維持することが明らかとなった。そこで、第 2 章では、WBKDF ラットに負荷した高フルクトース食の糖代謝に及ぼす影響を調べるため、糖代謝の主要臓器である膵臓および肝臓に対する作用について検討した。

第 1 章および第 2 章の結果から、WBKDF ラットに高フルクトース食を負荷することにより、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する種々の病態がみられることが明らかとなった。メタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発のための当該動物モデルの有用性を検証するためには、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている薬剤による改善作用が、当該動物モデルとヒトで類似するかどうかを検討する必要があると考える。Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) アナログであるリラグルチドは、GLP-1 受容体作動による血糖低下作用をもつ糖尿病治療薬で、2 型糖尿病患者でその有効性と安全性が確認されている[17, 24, 36]。また、GLP-1 アナログでは、血糖低下作用に加えて、体重減少、血圧低下、血中脂質低下などのメタボリックシンドロームでみられる種々の病態に対する多面的な作用も認められることが報告されている[4, 7, 15, 27, 47, 49]。そこで第 3 章では、高フルクトース食を負荷した WBKDF ラットを用いて、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドによる作用を検討した。

## 第 1 章

**WBKDF ラットにおける高脂肪食および高フルクトース食誘導性肥満に関する研究**

## 緒言

メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満に高血糖、高血圧、脂質代謝異常が組合わさった病態である[19, 26, 37]。メタボリックシンドロームの患者数は近年増加しており、メタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発のための良質な実験動物モデルが必須であるが、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する実験動物モデルがない。

メタボリックシンドロームは遺伝的要因と環境要因が組み合わさって発症すると考えられている。環境要因では高脂肪食や高糖質食の食事の影響が大きく、糖質では甘味料として使用が急増しているフルクトースのメタボリックシンドローム発症への寄与が注目されている[5]。

WBKDF ラットは、肥満を伴わない 2 型糖尿病モデルである WBN/Kob に 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た新規コンジュニックラットである[10]。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ことが明らかとなっており、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[1, 20, 30, 33]。

そこで本章では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、遺伝的要因により肥満および脂質異常症を自然発症する 2 型糖尿病モデル動物である WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷したときの肥満、脂質代謝および糖代謝に及ぼす影響を検討した。

## 動物

実験には日本 SLC 株式会社 (Hamamatsu, Japan) より入手した雄性 WBKDF ラットおよび Wistar ラットを使用した。動物の飼育は、麻布大学附属生物科学総合研究所のクリーンエリア動物実験室 (室温  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 5\%$ 、12 時間明暗周期) でプラスチックケージにて行った。なお、全ての動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号 110325-4)。

## 飼料

実験には、標準食として CE-2 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan)、高脂肪食として 45% kcal from fat (PMI Nutrition International, St. Louis. MO, USA)、高フルクトース食として 60% fructose purified diet (PMI Nutrition International, St. Louis. MO, USA) を使用した。飼料は自由摂取させた。ただし、実験期間終了時の採血日前日の夕方から採血日当日の安楽死までの期間 (約 18 時間) は絶食とした。なお、実験に用いた飼料は、ラットに肥満を誘導する際に一般的に使用されるものである [13, 39]。

## 実験プロトコール

動物を 5 週齢で搬入し、7 週齢で群分けした。なお、群分けまでは全ての動物に標準食を与えた。

WBKDF ラットを標準食群 (STD 群)、高脂肪食群 (HFD 群) および高フルクトース食群 (FRD 群) の 3 群 (n=8/群) に分け、それぞれ標準食、高脂肪食、高フルクトース食を 7 週齢から 11 週齢の 4 週間与えた。Normal 群として、Wistar ラットに標準食を 7 週齢から 11 週齢の 4 週間与えた。

実験期間中に体重、血糖値および血漿中インスリン値の測定を週 1 回実施した。血糖値および血漿中インスリン値の測定のための採血 (0.2 mL) は尾静脈より行い (午後)、遠心分離 (約 3000×g、15 分間、約 4° C) 後得られた血漿 (抗凝固剤:ヘパリンナトリウム) をサンプルとして測定まで冷凍保存 (-20° C) した。

実験期間終了時に、ペントバルビタールナトリウム (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) の腹腔内投与 (50 mg/kg) による麻酔下で腹部大静脈より血液を採取 (3 mL) し、遠心分離 (約 3000×g、15 分間、約 4° C) 後得られた血漿 (抗凝固剤:ヘパリンナトリウム) を血液生化学的検査のためのサンプルとして測定まで冷凍保存 (-20° C) した。採血後にペントバルビタールナトリウムの過量投与により動物を安楽死させた。精巣周囲脂肪および腸間膜脂肪を採取後、重量を測定した。

### 血糖値および血漿中インスリン値の測定

血糖値の測定は、自動分析装置 JCA-BM 2250 (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。血漿中インスリン値の測定はラットインスリン測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いて行った。

### 血液生化学的検査

血液生化学検査として、総コレステロール (T-Cho)、リン脂質 (PL) および中性脂肪 (TG) を測定した。測定は、自動分析装置 JCA-BM 2250 (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。

## 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表示した。体重、血糖値、血漿中インスリン値、血液生化学的検査および器官重量のデータについて、二元配置分散分析（two-way ANOVA）後に Tukey test を実施した（Wistar ラット vs WBKDF ラット、STD 群 vs HFD 群又は FRD 群）。有意水準は 5% とした。統計解析には GraphPad Prism 5 statistical software（GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA）を用いた。

## 実験結果

### 体重および器官重量

体重、精巣周囲脂肪重量および腸間膜脂肪重量の結果を Figure 1-1 に示す。

WBKDF ラットの体重は、高脂肪食又は高フルクトース食負荷開始時点（7 週齢）では群間差はみられなかった。WBKDF ラットの STD 群の体重は、7 週齢から 11 週齢で Normal 群と比較して高かった（ $P<0.01$ ）。WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を 4 週間負荷した後（11 週齢）の HFD 群および FRD 群の体重は、STD 群と比較して高かった（ $P<0.01$ ）。

WBKDF ラットの STD 群の精巣周囲脂肪重量および腸間膜脂肪重量は、Normal 群と比較して高かった（ $P<0.01$ ）。WBKDF ラットの HFD 群および FRD 群の精巣周囲脂肪重量および腸間膜脂肪重量は、STD 群と比較して高かった（ $P<0.01$ ）。

### 血液生化学的検査

血漿中 T-Cho、PL および TG の結果を Figure 1-2 に示す。

WBKDF ラットの STD 群の血漿中 T-Cho、PL および TG は、STD 群と比較して高かった（ $P<0.01$ ）。

WBKDF ラットの HFD 群および FRD 群の T-Cho および PL は、STD 群と比較して高かった（ $P<0.01$ ）。

HFD 群および FRD 群の TG は STD 群と比較して有意な差はみられなかった。

### 血糖値および血漿中インスリン値

血糖値および血漿中インスリン値の結果を Figure 1-3 に示す。

WBKDF ラットの STD 群の血糖値は、8 週齢より顕著に増加し、10 週齢で頭打ちとなった。

WBKDF ラットの HFD 群の血糖値は、STD 群よりも高く推移し、11 週齢で高かった ( $P<0.05$ )。一方、WBKDF ラットの FRD 群の血糖値は、11 週齢まで STD 群よりも低く推移した ( $P<0.01$ )。

WBKDF ラットの血漿中インスリン値は、高脂肪食又は高フルクトース食負荷開始時点 (7 週齢) で Normal 群と比較して高かった ( $P<0.01$ )。WBKDF ラットの STD 群および HFD 群の血漿中インスリン値は同程度で推移し、8 週齢から 11 週齢にかけて減少し、11 週齢で Normal 群と有意な差はみられなかった。一方、WBKDF ラットの FRD 群の血漿中インスリン値は、11 週齢まで Normal 群と比較して高値を推移した ( $P<0.01$ )。

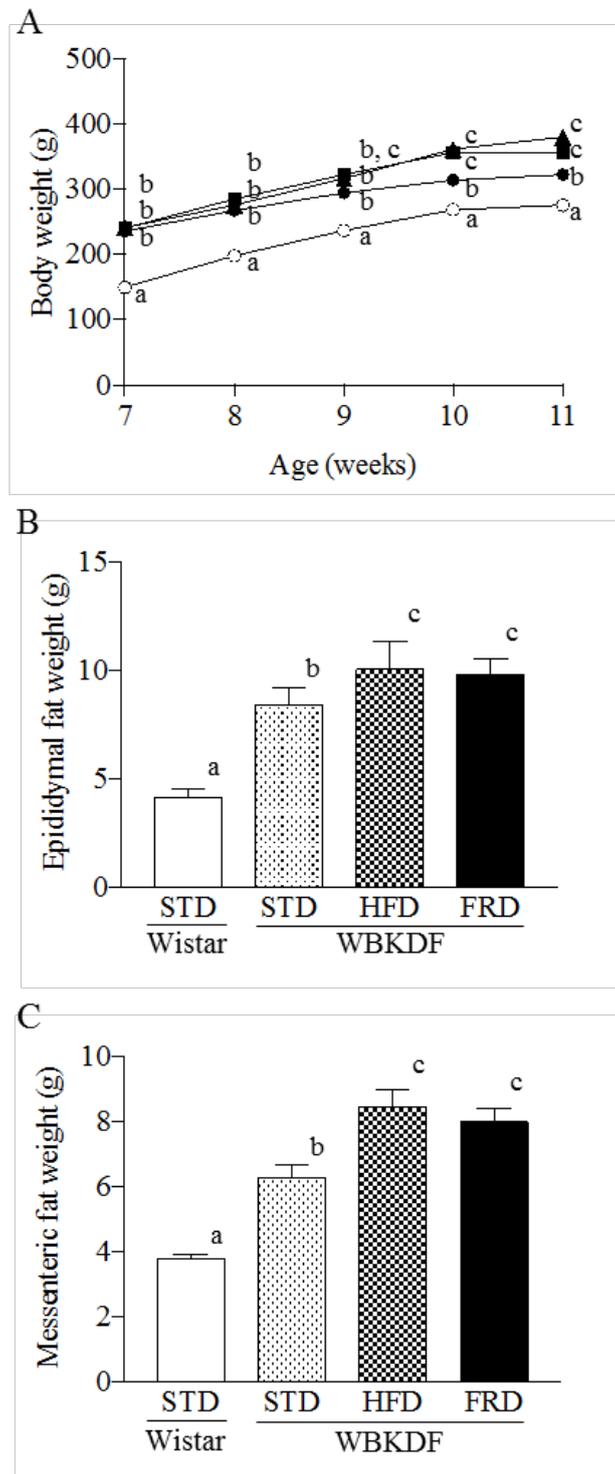


Figure 1-1 Effects of the 4-week feeding of HFD and FRD on (A) the body weights (open circle, Wistar-STD; closed circle, WBKDF-STD; closed square, WBKDF-HFD; closed triangle, WBKDF-FRD), and (B) epididymal and (C) mesenteric fat weights in WBKDF rats. The fat weights were determined at 11 weeks of age. Data are expressed as mean  $\pm$  SE (n=8). Different superscript letters (a, b, c) indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).

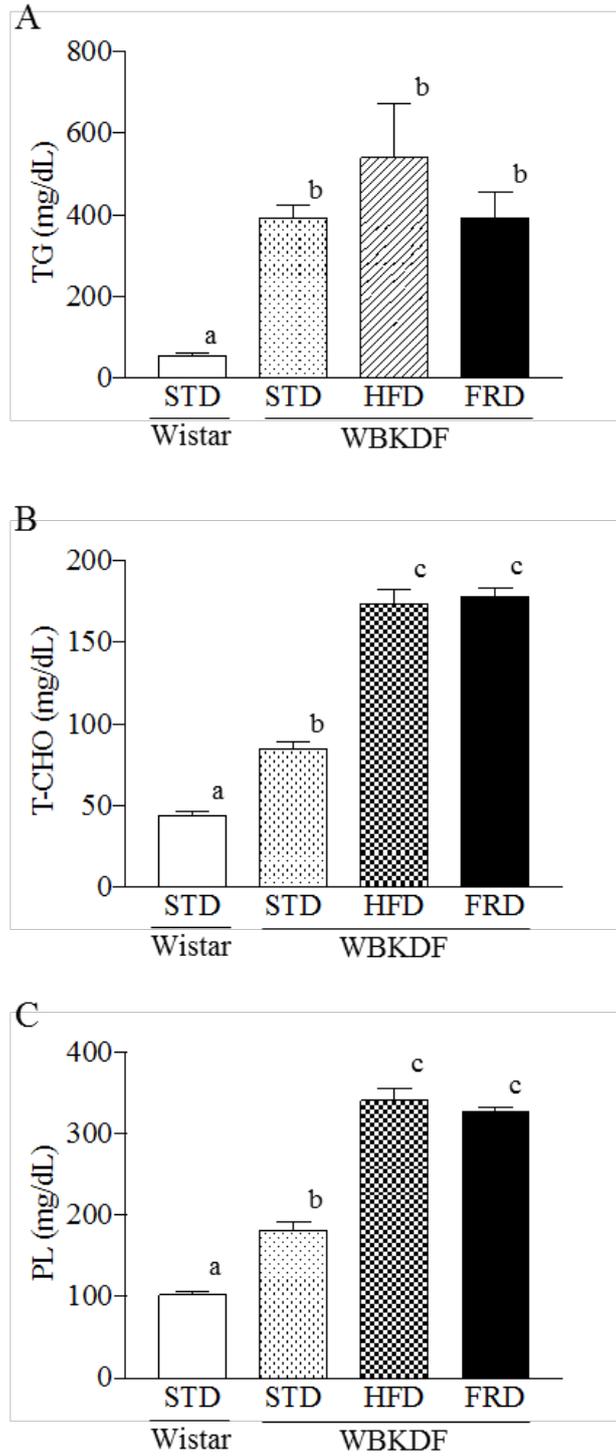


Figure 1-2 Effects of the 4-week feeding of HFD and FRD on plasma levels of (A) triglyceride, (B) total cholesterol and (C) phospholipid in WBKDF rats. Data are expressed as mean  $\pm$  SE (n=8). Different superscript letters (a, b, c) indicate significant differences between groups (p<0.05).

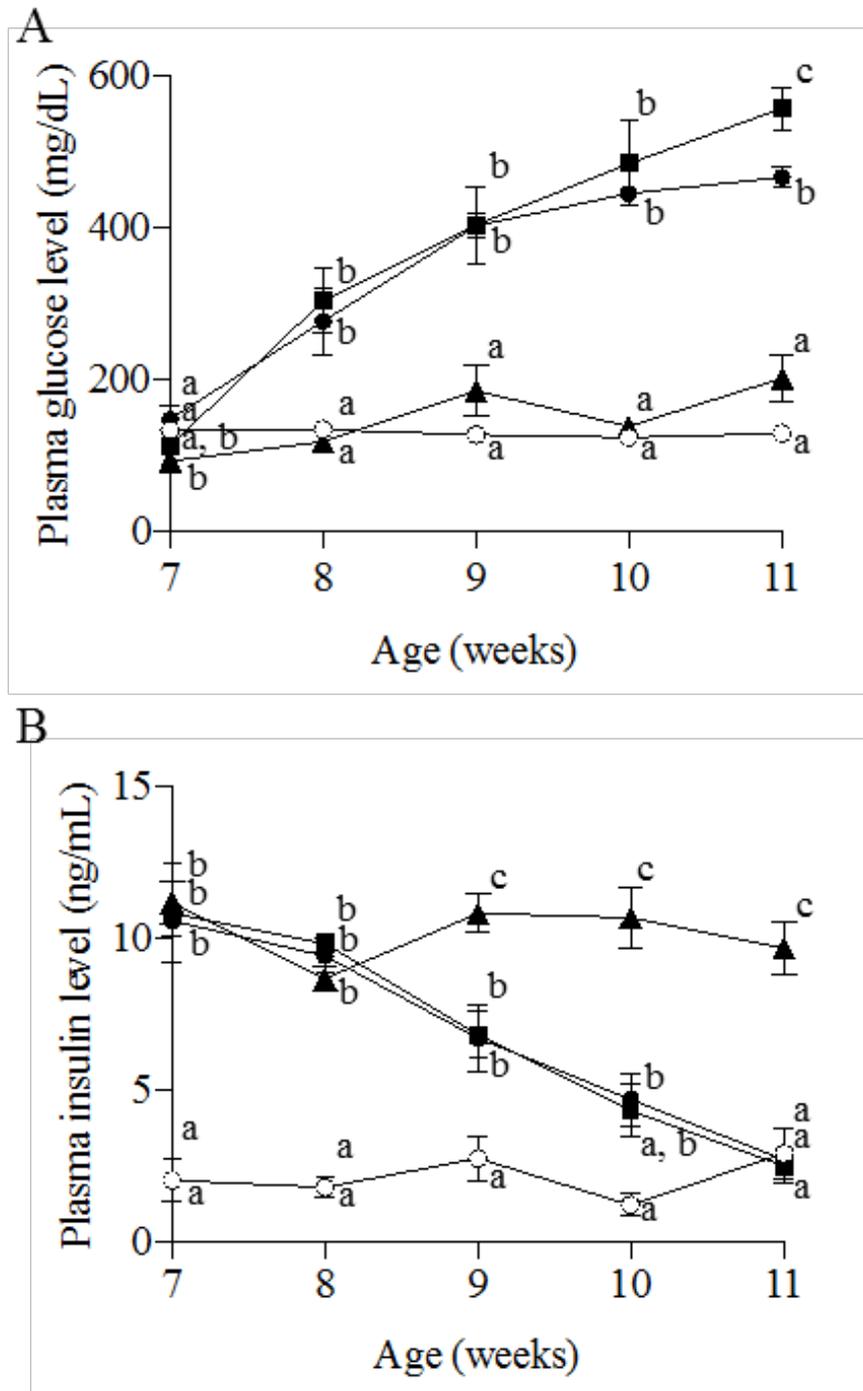


Figure 1-3 Effects of the 4-week feeding of HFD and FRD on (A) plasma glucose concentrations and (B) plasma insulin concentrations in WBKDF rats (open circle, Wistar-STD; closed circle, WBKDF-STD; closed square, WBKDF-HFD; closed triangle, WBKDF-FRD). Data are expressed as mean  $\pm$  SE (n=8). Different superscript letters (a, b, c) indicate significant differences between groups (p<0.05).

## 考察

第 1 章では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、遺伝的要因により肥満および脂質異常症を自然発症する 2 型糖尿病モデル動物である WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷したときの肥満、脂質代謝および糖代謝に及ぼす影響を検討した。なお、実験に使用した高フルクトース食に含まれる糖質のほとんどはフルクトースであるが、フルクトースは肝臓で速やかに代謝され、グルコース（～約 66%）、乳酸（～約 25%）などに変換され血中に放出されることが報告されていることから[5]、高フルクトース食による飼育は血中にグルコースが供給されにくい条件ではない。

本章では、1) WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷することにより遺伝性の肥満および脂質異常症が増悪すること、2) 高血糖については高脂肪食と高フルクトース食で異なるプロファイルを示し、高脂肪食負荷で増悪するのに対して、高フルクトース食負荷で軽減すること、3) 血漿中インスリン値は、高脂肪食負荷で STD 群と同様に減少するのに対して、高フルクトース食負荷では高値を維持することが明らかとなった。

WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を 4 週間負荷した後の HFD 群および FRD 群の体重、精巣周囲脂肪重量および腸間膜脂肪重量は、STD 群と比較して高かった ( $P < 0.01$ ) ことから、高脂肪食および高フルクトース食が WBKDF ラットにおける遺伝性の肥満を増悪することが示された。本実験は、2 型糖尿病モデルラットにおいてフルクトースが肥満を誘導することを示した最初の実験であると考えられる。なお、本実験でみられた高脂肪食による遺伝性の肥満の増悪は、ZDF ラットでの報告[44]と類似する。

WBKDFラットのHFD群およびFRD群のT-ChoおよびPLは、STD群と比較して高かった(P<0.01)

ことから、高脂肪食および高フルクトース食がWBKDFラットにおける遺伝性の脂質異常症を増悪することが示された。本実験でみられた高脂肪食および高フルクトース食による脂質異常症の増悪は、正常のげっ歯類で高脂肪食および高フルクトース食が脂質異常症を惹起するという文献報告[6, 13, 39]と類似する。高脂肪食による脂質異常症の増悪は、脂肪の過剰摂取が原因と考えられた。一方、フルクトースは肝細胞で脂質生合成を介して脂肪酸に変換されることが報告されており[5]、高フルクトース食による脂質異常症の増悪は、フルクトースの過剰摂取による脂肪酸合成の増加が原因である可能性が考えられた。

WBKDFラットは、週齢が進むにつれて膵疲弊に伴う膵β細胞の障害によるインスリン分泌不全と高血糖を発症することが報告されている[20, 30, 33]。本実験でみられたHFD群での高血糖の増悪は、高脂肪食の摂取と2型糖尿病発症の関連を示唆する文献報告[32]と一致する。一方、FRD群では血漿中インスリン値は高値のまま推移し、高血糖は軽減された。WBKDFラットにおいて週齢が進むにつれて膵β細胞の障害を発症すること[1, 33]を踏まえると、膵β細胞の障害を軽減させることが高フルクトース食による血漿中インスリン値の減少の抑制の発現機序として推察された。

## 小括

第 1 章では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、遺伝的要因により肥満および脂質異常症を自然発症する 2 型糖尿病モデル動物である WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷したときの肥満、脂質代謝および糖代謝に及ぼす影響を検討した。

本実験では、1) WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷することにより遺伝性の肥満および脂質異常症が増悪すること、2) 高血糖については高脂肪食と高フルクトース食で異なるプロファイルを示し、高脂肪食負荷で増悪するのに対して、高フルクトース食負荷で軽減すること、3) 血漿中インスリン値は、高脂肪食負荷で標準食群と同様に減少するのに対して、高フルクトース食負荷では高値を維持することが明らかとなった。

以上、WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷することにより、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する種々の病態がみられた。

## 第2章

### 高フルクトース食負荷 WBKDF ラットにおける病態解析

## 緒言

第1章では、1) WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷することにより遺伝性の肥満および脂質異常症が増悪すること、2) 高血糖については高脂肪食と高フルクトース食で異なるプロファイルを示し、高脂肪食負荷で増悪するのに対して、高フルクトース食負荷で軽減すること、3) 血漿中インスリン値は、高脂肪食負荷で標準食群と同様に減少するのに対して、高フルクトース食負荷では高値を維持することが明らかとなった。

WBKDF ラットにおいて週齢が進むにつれて膵β細胞の障害を発症すること[1, 33]を踏まえると、膵β細胞の障害を軽減させることが高フルクトース食による血漿中インスリン値の減少の抑制の発現機序として推察された。一方、肝臓での糖代謝に対するフルクトースの影響は未検討であるため、高フルクトース食による高血糖の軽減と血漿中インスリン値の減少抑制における肝臓の寄与は不明である。

そこで本章では、WBKDF ラットに負荷した高フルクトース食の糖代謝に及ぼす影響を調べるため、糖代謝の主要臓器である膵臓および肝臓に対する作用について検討した。

## 実験材料および実験方法

### 動物

実験には日本 SLC 株式会社 (Hamamatsu, Japan) より入手した雄性 WBKDF ラットおよび Wistar ラットを使用した。

### 飼料

実験には、標準食として CE-2 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan)、高フルクトース食として 60% fructose purified diet (PMI Nutrition International, St. Louis, MO, USA) を使用した。飼料は自由摂取させた。

### 実験プロトコール

本実験は、実験 1 および実験 2 に分けて実施した。

実験 1 の動物の飼育は、麻布大学附属生物科学総合研究所のクリーンエリア動物実験室（室温  $21 \pm 2^\circ \text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗周期）でプラスチックケージにて行った。なお、実験 1 の動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得た（承認番号 130314-3）。実験 1 では、5 週齢で搬入し、7 週齢で群分けを行った。Wistar ラットおよび WBKDF ラットを、それぞれ標準食群 (STD 群) および高フルクトース食群 (FRD 群) の計 4 群 ( $n=8/\text{群}$ ) に分け、それぞれ標準食、高フルクトース食を 7 週齢から 11 週齢の 4 週間与えた。実験期間中に体重および血糖値の測定を週 1 回、摂餌量の測定（各測定日間の重量差から、その期間の 1 日平均摂餌量を算出）を実施した。

実験 2 の動物の飼育は、帝人ファーマ株式会社生物医学総合研究所の飼育室（室温  $24 \pm 2^{\circ} \text{C}$ 、湿度  $55 \pm 15\%$ 、12 時間明暗周期）で自動洗浄ブラケットケージにて行った。なお、実験 2 の動物実験は、帝人ファーマ株式会社生物医学総合研究所の動物実験委員会の承認を得た（承認番号 A17-091）。実験 2 では、6 週齢で搬入し、7 週齢で群分けを行った。Wistar ラットおよび WBKDF ラットを、それぞれ標準食群（STD 群）および高フルクトース食群（FRD 群）の計 4 群（ $n=12/\text{群}$ ）に分け、それぞれ標準食、高フルクトース食を 7 週齢から 11 週齢の 4 週間与えた。剖検前日の夕方から一晩（約 17 時間）絶食させた後にペントバルビタールナトリウム（Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan）の腹腔内投与（ $50 \text{ mg/kg}$ ）による麻酔を行い、腹部大動脈より血液（約  $5 \text{ mL}$ ）を抗凝固剤（ヘパリンナトリウム）で処理した真空採血管を用いて採取した。採取した血液を遠心分離（約  $1200 \times g$ 、15 分間、室温）後、得られた血漿を血液生化学的検査のためのサンプルとして、測定まで冷凍保存（ $-20^{\circ} \text{C}$ ）した。血液生化学検査として、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、総コレステロール（T-Cho）、リン脂質（PL）、中性脂肪（TG）および遊離脂肪酸（NEFA）を測定した。測定は日立 7180 自動分析装置（Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan）を用いて行った。血液生化学検査のための採血後に動物を放血安楽死させた。肝臓を採取後、重量を測定した。肝臓の外側左葉を病理組織学的検査に、外側左葉以外を肝臓中 TG の定量に使用した。

### 静脈内糖負荷試験（IVGTT）

実験 1 では、11 週齢で静脈内糖負荷試験（IVGTT）を実施した。一晩（約 18 時間）絶食させた後にペントバルビタールナトリウム（Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan）の腹腔内投与（ $50 \text{ mg/kg}$ ）によ

る麻酔を行い、大腿静脈内に 0.5 g/kg の用量で糖（20% w/v; Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan）負荷を行った。糖負荷後 0、2、5、10 および 20 分に頸静脈より血液（0.2 mL/時点）を採取し、遠心分離（約 2000×g、15 分間、約 4° C）後得られた血漿を血糖値および血漿中インスリン値測定のためのサンプルとした。血糖値の測定は、自動分析装置 JCA-BM 2250（JEOL, Ltd., Tokyo, Japan）を用いて行った。血漿中インスリン値の測定はラットインスリン測定キット（Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan）を用いて行った。また、IVGTT における血糖値および血漿中インスリン値の時間曲線下面積（AUC）を台形公式により算出した。IVGTT のための血液採取後に腹部大動脈より放血安楽死させ、膵臓を採取した。

## 肝臓中 TG の定量

実験 2 で採取した肝臓の外側左葉以外を、液体窒素にて冷却した金属板を用いて押しつぶした後、液体窒素で冷却した乳鉢を用いて粉碎したものを凍結サンプルとした。凍結サンプルは肝臓中 TG の抽出まで凍結保存した。肝臓の凍結サンプルを秤量し、1 g の肝臓に対して 10 mL の容量となるように 2-プロパノールを加え、室温で約 1 時間振盪した。遠心分離（3000 min<sup>-1</sup>、10 分間、4°C）後、上清をチューブに採取し TG 抽出液試料とした。全ての試料について識別表示を行い、測定まで凍結保存した。測定には L タイプワコー TG・M（Wako-Pure Chemical Industry Co., Ltd., Osaka, Japan）を用いた。測定は duplicate で行い、平均値を肝臓中 TG 濃度として算出した。

## 病理組織学的検査

実験 1 で採取した膵臓を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬固定した。常法に従って、HE 染色

標本、免疫染色（インスリン）標本を作製した。膵臓の免疫染色後、画像解析ソフト ImageJ (Rasband, NIH) にて  $\beta$  細胞の面積を測定した。

実験 2 で採取した肝臓の外側左葉を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬固定した。常法に従って、凍結ブロックを作製し、HE 染色標本およびオイルレッド O 染色標本を作製した。凍結ブロックおよび各標本作製は株式会社札幌病理総合病理研究所に委託した。

## 統計解析

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。実験 1 の体重、血糖値、IVGTT、 $\beta$  細胞の面積、実験 2 の血液生化学的検査、器官重量、肝臓中 TG 量のデータについて、二元配置分散分析 (two-way ANOVA) 後に Tukey test を実施した (Wistar ラット vs WBKDF ラット、STD 群 vs FRD 群)。有意水準は 5% とした。実験 1 の統計解析には GraphPad Prism 5 statistical software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いた。実験 2 の統計解析には SAS 9.2 (SAS Insutitute Japan Ltd., Tokyo, Japan) およびその連動システム EXSUS Ver. 7.7.1 (CAC Croit Corporation, Tokyo, Japan) を用いた。

## 実験結果

### 体重、摂餌量および血糖値

体重、摂餌量および血糖値の結果を Figure 2-1 に示す。

Wistar ラットの体重では、11 週齢で FRD 群と STD 群の間に有意な差はみられなかった。WBKDF ラットの FRD 群の体重は、11 週齢で STD 群と比較して高かった ( $P<0.01$ )。

Wistar ラットの FRD 群の摂餌量は、8 週齢から 9 週齢で STD 群と比較して低かった ( $P<0.05$ )。WBKDF ラットの FRD 群の摂餌量は、10 週齢から 11 週齢で STD 群と比較して低かった ( $P<0.05$ )。

Wistar ラットの血糖値では、FRD 群と STD 群の間に有意な差はみられなかった。WBKDF ラットの FRD 群の血糖値は、11 週齢まで STD 群よりも低く推移した ( $P<0.01$ )。

### 静脈内糖負荷試験 (IVGTT)

IVGTT の結果を Figure 2-2 に示す。

血糖値は、全群において糖負荷後 2 分でピークに達し、その後は緩やかに減少した。Wistar ラットの血糖値では、FRD 群と STD 群の間に有意な差はみられなかった。WBKDF ラットの血糖値は、FRD 群で糖負荷前後に STD 群と比較して低値を示し、血糖値 AUC も FRD 群で低値を示した ( $P<0.01$ )。

血漿中インスリン値は、全群において糖負荷後 2 分でピークに達し、その後は緩やかに減少した。Wistar ラットの血漿中インスリン値は、FRD 群で STD 群と比較して高値を示し、糖負荷前と糖負荷後 20 分で有意差 ( $P<0.05$ ) がみられたが、血漿中インスリン値 AUC に有意差はみられなかった。WBKDF ラットの血漿中インスリン値および血漿中インスリン値 AUC に、FRD 群と STD 群で

有意差はみられなかったものの、FRD 群の血漿中インスリン値 AUC は、STD 群に対して 180% の高値を示した。

Wistar ラットの血漿中インスリン値 AUC/血糖値 AUC に、FRD 群と STD 群で有意差はみられなかった。WBKDF ラットの血漿中インスリン値 AUC/血糖値 AUC に、FRD 群と STD 群で有意差はみられなかったものの、FRD 群の血漿中インスリン値 AUC/血糖値 AUC は、STD 群に対して 222% の高値を示した。

### 膵臓の病理組織学的検査

代表的な膵臓の HE 染色像および免疫染色像並びに膵  $\beta$  細胞の面積の結果を Figure 2-3 に示す。

HE 染色標本を用いた病理組織学的検査では、WBKDF ラットの STD 群と FRD 群で出血、線維化などを伴う膵島の破壊がみられた。インスリンの免疫染色では、インスリン分泌細胞（膵  $\beta$  細胞）が FRD 群で STD 群と比較して多かった。WBKDF ラットの膵  $\beta$  細胞の面積は、FRD 群で STD 群と比較して高値を示した ( $P < 0.01$ )。

### 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Table 2-1 に示す。

Wistar ラットの血漿中 T-Cho は、FRD 群で STD 群と比較して高値を示した ( $P < 0.01$ )。WBKDF ラットの血漿中 AST、ALT、T-Cho および PL は、FRD 群で STD 群と比較して高値を示した ( $P < 0.01$ )。

## 肝臓の重量、肝臓中 TG 量および肝臓の病理組織学的検査

肝臓重量および肝臓の病理組織学的検査の結果を、それぞれ Table 2-1 および Table 2-2 に示す。

肝臓中 TG 量の結果を Figure 2-4 に示す。代表的な肝臓の HE 染色像およびオイルレッド O 染色像を Figure 2-5 に示す。

Wistar ラットの肝臓重量では、FRD 群と STD 群の間に有意な差はみられなかった。WBKDF ラットの肝臓の絶対重量および体重当りの相対重量は、FRD 群で STD 群と比較して高値を示した ( $P<0.01$ )。

Wistar ラットの肝臓中 TG 量では、FRD 群と STD 群の間に有意な差はみられなかった。WBKDF ラットの肝臓中 TG 量は、FRD 群で STD 群と比較して高値を示した ( $P<0.01$ )。

肝臓の病理組織学的検査では、Wistar ラットの FRD 群で軽微な脂肪変性がみられた。WBKDF ラットでは、STD 群で軽度～中等度の脂肪変性、FRD 群で中等度～重度の脂肪変性がみられた。

Table 2-1 Effects of the 4-week feeding of FRD on plasma levels of AST, ALT, T-Cho, PL, TG and NEFA and liver weight in Wistar and WBKDF rats.

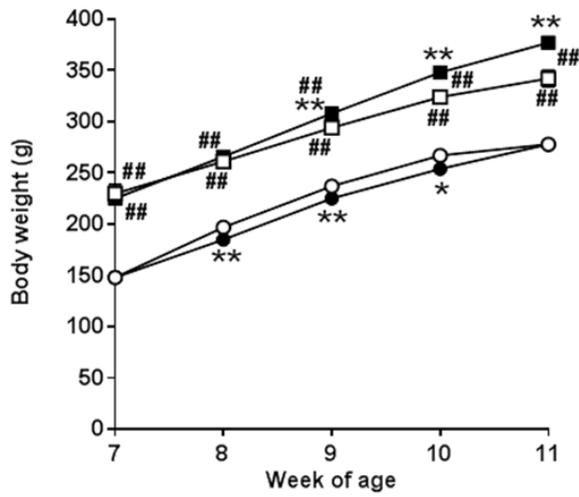
Variables	Wistar				WBKDF			
	STD		FRD		STD		FRD	
Plasma AST (U/L)	91 ± 4		68 ± 4		161 ± 32		933 ± 157	** , ##
Plasma ALT (U/L)	48 ± 4		36 ± 2		211 ± 45		751 ± 125	** , ##
Plasma T-Cho (mg/dL)	48 ± 2		67 ± 2	**	101 ± 4	##	197 ± 5	** , ##
Plasma PL (mg/dL)	98 ± 3		120 ± 2		221 ± 9	##	344 ± 10	** , ##
Plasma TG (mg/dL)	53 ± 7		92 ± 10		657 ± 34	##	553 ± 78	##
Plasma NEFA (mEq/L)	395 ± 48		407 ± 28		579 ± 27	##	663 ± 67	##
Absolute liver weight (g)	7.6 ± 0.2		6.8 ± 0.1		14.5 ± 0.7	##	22.8 ± 2.5	** , ##
Ratio of liver weight to body weight (%)	3.1 ± 0.0		3.1 ± 0.0		4.5 ± 0.1	#	6.7 ± 0.6	** , ##

Data are expressed as the mean ± SE (n = 12). AST: Aspartate aminotransferase, ALT: Alanine aminotransferase, T-Cho: total cholesterol, PL: phospholipid, TG: triglycerides, NEFA: non-esterified fatty acid. Significant differences between groups are indicated (\*\*: p<0.01 vs STD, #: p<0.05, ##: p<0.01 vs Wistar rats, Tukey test).

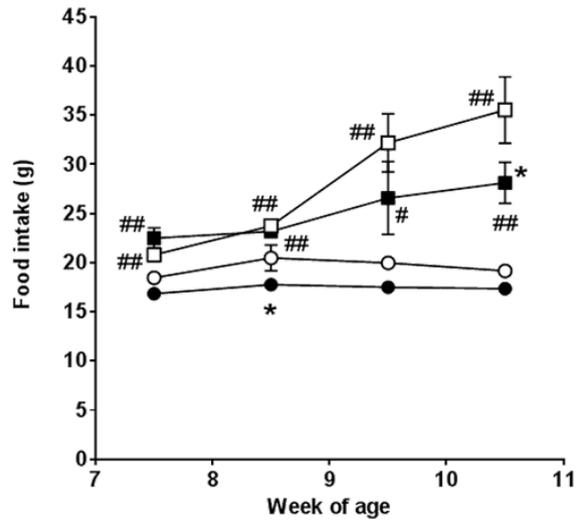
Table 2-2 Histopathological findings of livers in Wistar and WBKDF rats supplemented with a fructose-rich diet for 4 weeks.

Findings	Wistar		WBKDF	
	STD n=12	FRD n=12	STD n=12	FRD n=12
Fatty degeneration				
Minimal	0	12	0	0
Mild	0	0	10	0
Moderate	0	0	2	6
Marked	0	0	0	6

(A)



(B)



(C)

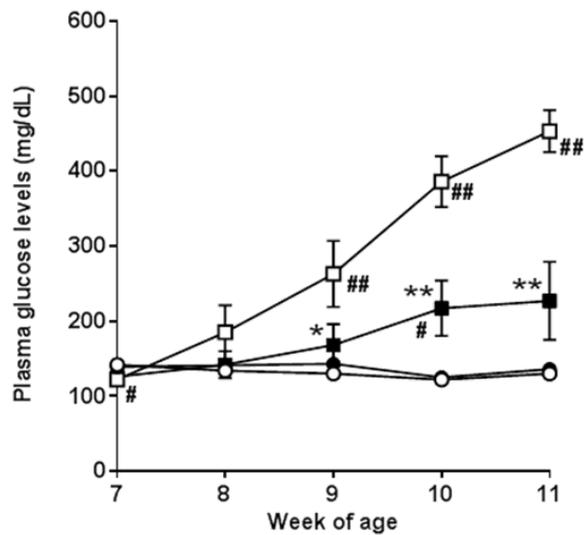


Figure 2-1 Effects of the 4-week feeding of FRD on the body weights (A), food intake (B) and plasma levels of glucose (C) in Wistar and WBKDF rats (open circle, Wistar-STD; closed circle, Wistar-FRD; open square, WBKDF-STD; closed square, WBKDF-FRD). Data are expressed as the mean  $\pm$  SE (n = 8). Significant differences between groups are indicated (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs STD, #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$  vs Wistar rats, Tukey test).

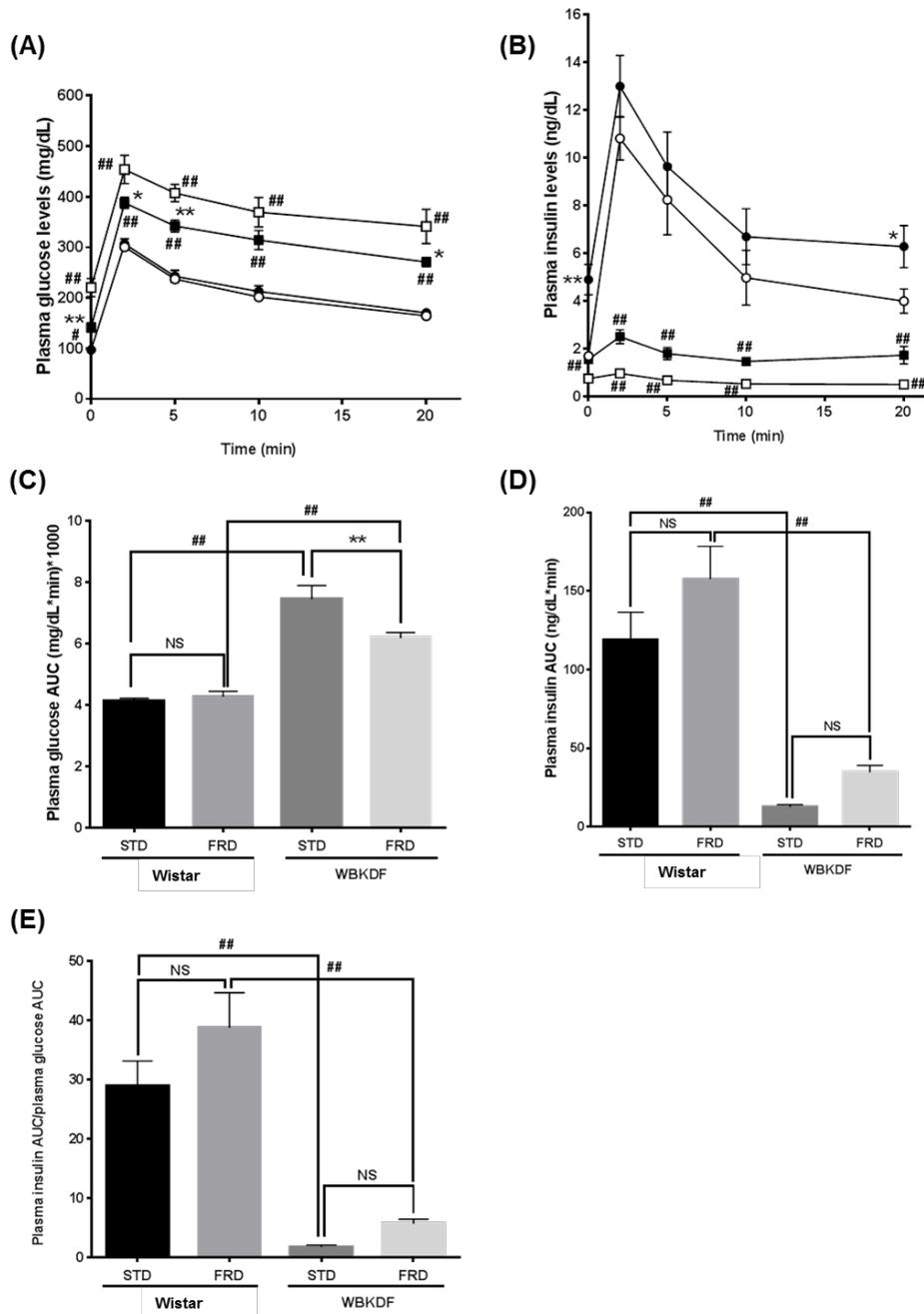


Figure 2-2 Effects of the 4-week feeding of FRD on glucose tolerance in Wistar and WBKDF rats. The IVGTT was performed as described in the Materials and Methods section. The plasma levels of glucose (A) and insulin (B) during IVGTT were measured at 11 weeks of age (open circle, Wistar-STD; closed circle, Wistar-FRD; open square, WBKDF-STD; closed square, WBKDF-FRD). The AUCs of plasma glucose (C) and plasma insulin (D) were calculated. The AUC of plasma insulin/AUC of plasma glucose (E) was calculated as described in the Materials and Methods section. Data are expressed as the mean  $\pm$  SE (n = 8). Significant differences between groups are indicated (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 vs STD, #: p<0.05, ###: p<0.01 vs Wistar rats, Tukey test). "NS" represents not significant.

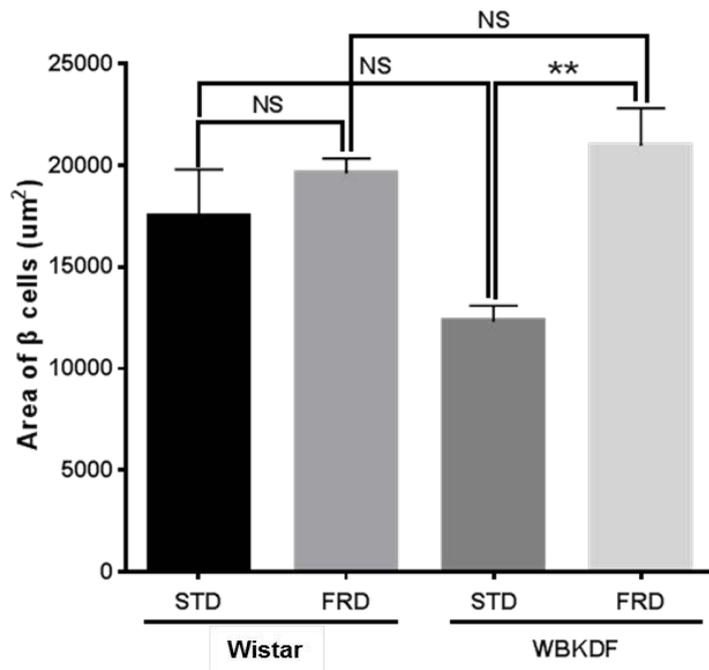
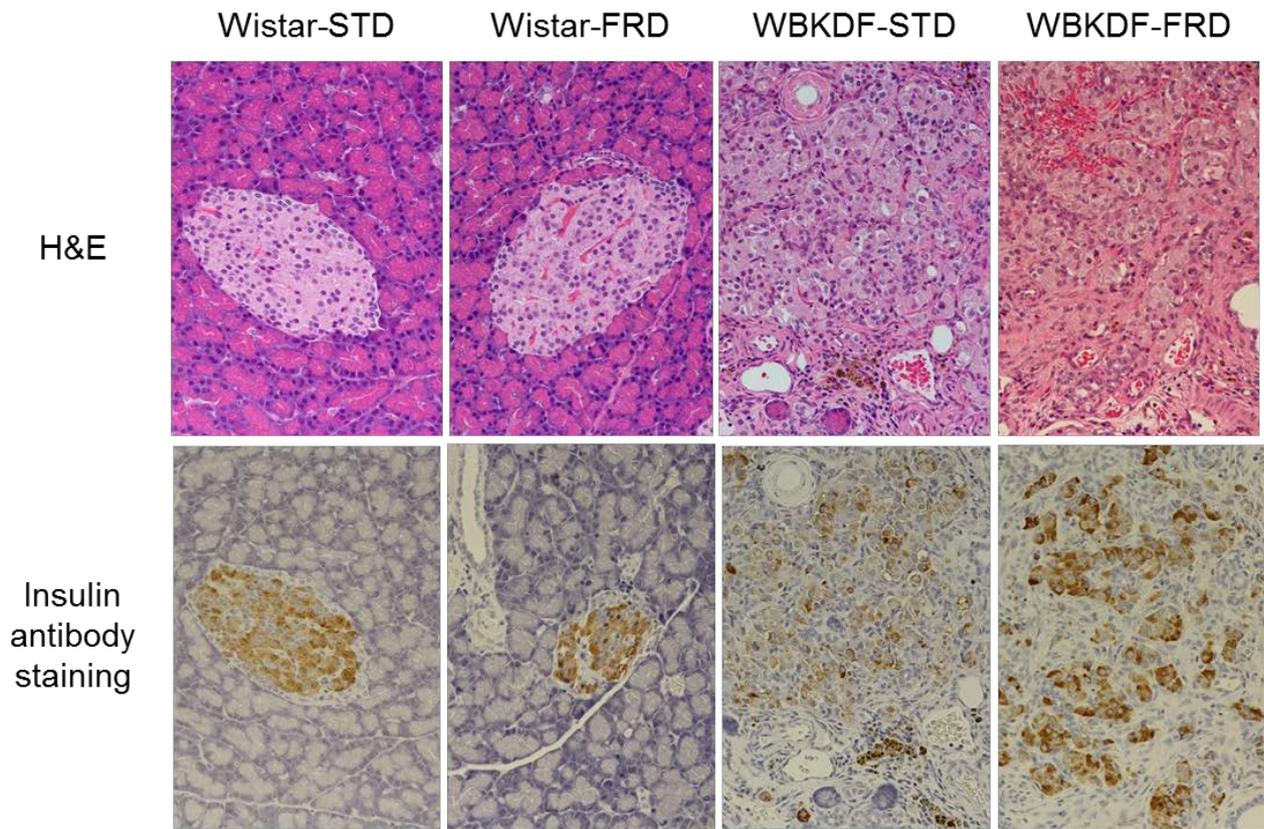


Figure 2-3 Effects of the 4-week feeding of FRD on pancreases of Wistar and WBKDF rats. Histopathological examination was performed as described in the Materials and Methods section. Data are expressed as the mean  $\pm$  SE (n = 8). Significant differences between groups are indicated (\*\*: p<0.01 vs STD, Tukey test). "NS" represents not significant.

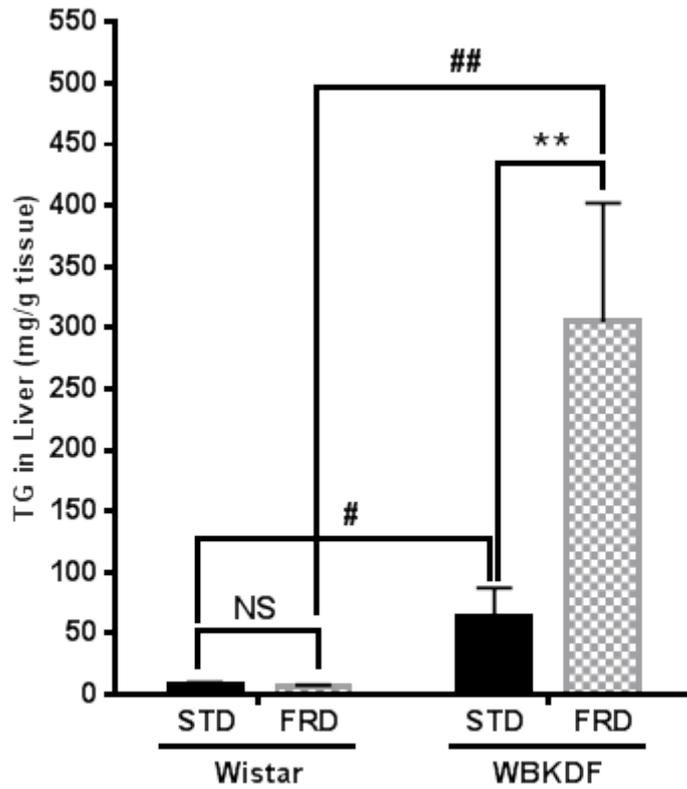


Figure 2-4 Effects of the 4-week feeding of FRD on hepatic TG level in Wistar and WBKDF rats. The hepatic TG level was measured as described in the Materials and Methods section. Data are expressed as the mean  $\pm$  SE (n = 12). Significant differences between groups are indicated (\*\*: p<0.01 vs STD, #: p<0.05, ##: p<0.01 vs Wistar rats, Tukey test). “NS” represents not significant.

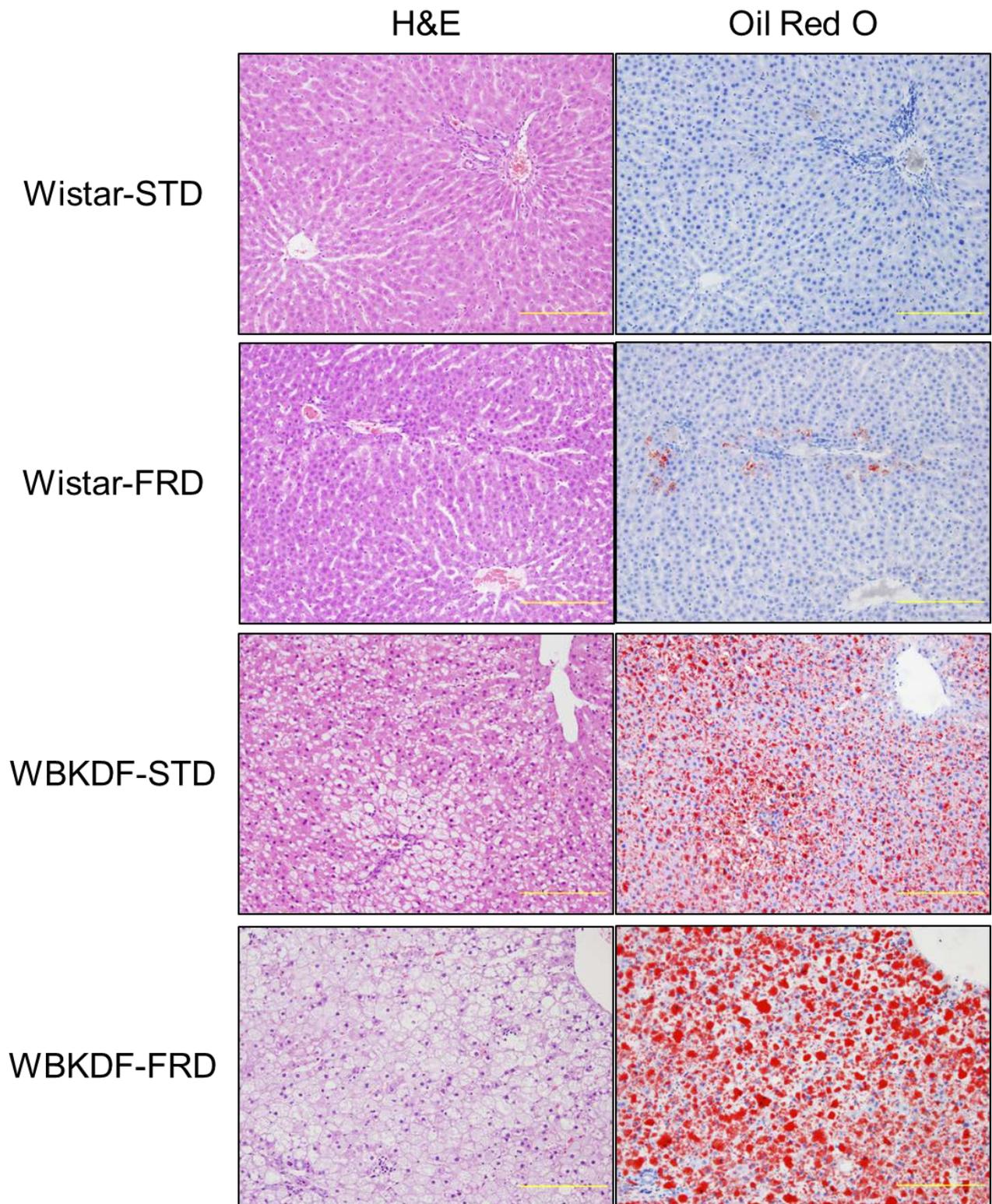


Figure 2-5 Effects of the 4-week feeding of FRD on livers of Wistar and WBKDF rats. Histopathological examination was performed as described in the Materials and Methods section. The scale bar represents 200  $\mu$ m.

## 考察

第2章では、WBKDFラットに負荷した高フルクトース食の糖代謝に及ぼす影響を調べるため、糖代謝の主要臓器である膵臓および肝臓に対する作用について検討した。

本章では、1) WBKDFラットに高フルクトース食を負荷することにより膵β細胞の破壊が軽減されること、2) WBKDFラットに高フルクトース食を負荷することにより脂肪肝が増悪することが明らかとなった。以上のことから、WBKDFラットにおける高フルクトース食による高血糖の軽減と血漿中インスリン値の減少抑制は、肝臓への影響によるのではなく、膵β細胞の障害進展を抑制することによることが示唆された。

第1章と同様にWBKDFラットでは、高フルクトース食負荷により遺伝性の肥満および脂質異常症が増悪されたものの、血糖値の上昇は顕著に抑制された。

WBKDFラットのFRD群の摂餌量は、STD群と比較して低値を示した ( $P<0.05$ )。実験に使用した標準食 (3.39 kcal/g) と高フルクトース食 (4.05 kcal/g) のカロリーに大きな差はないことも踏まえると、WBKDFラットにおける高フルクトース食による遺伝性の肥満および脂質異常症の増悪は、摂食促進やカロリー摂取量の増加によるものではないと考えられた。

WBKDFラットのIVGTTでは、FRD群の血糖値AUCは、STD群と比較して低値を示し ( $P<0.01$ )、耐糖能の悪化の軽減がみられた。また、FRD群の血漿中インスリン値AUCは、STD群に対して180%の高値を示し、インスリン分泌能の悪化の軽減がみられた。さらに、WBKDFラットに高フルクトース食を4週間負荷した後の膵β細胞の面積は、STD群と比較して高値 ( $P<0.01$ ) を示した。以上のことから、高フルクトース食によってWBKDFラットで膵β細胞の破壊が軽減され、耐糖能およ

びインスリン分泌能の悪化が軽減されることが示唆された。したがって、WBKDF ラットにおける高フルクトース食による高血糖の軽減と血漿中インスリン値の減少抑制の発現機序として、膵β細胞の障害進展の抑制が示唆された。なお、WBKDF ラットにおいて高フルクトース食が膵β細胞の障害進展を抑制する詳細な機序を検討する目的での研究は実施しておらず、その機序は不明である。WBN/Kob ラットにおいて、膵β細胞の障害進展とT細胞による自己免疫反応の関連が報告されており[1]、膵β細胞の障害進展の抑制の機序の1つとして、フルクトース摂取による自己免疫反応の抑制が推察された。

WBKDF ラットの肝臓中TG量は、FRD群でSTD群と比較して高値を示した ( $P<0.01$ )。また、肝臓の病理組織学的検査では、WBKDF ラットでは、STD群で軽度～中等度の脂肪変性、FRD群で中等度～重度の脂肪変性がみられた。さらに、WBKDF ラットの血漿中ASTおよびALTは、FRD群でSTD群と比較して高値を示した ( $P<0.01$ )。以上の結果から、WBKDF ラットに高フルクトース食を負荷することにより脂肪肝が増悪することが明らかとなった。本実験でみられた高フルクトース食による脂肪肝の増悪は、正常のラットで高フルクトース食が脂肪肝を惹起するという文献報告[22]と類似する。フルクトースは肝細胞での脂質生合成を増加させることが報告されており[5, 8, 12, 41]、フルクトースの過剰摂取による脂質生合成の増加が脂肪肝増悪の原因である可能性が考えられた。

## 小括

第2章では、WBKDFラットに負荷した高フルクトース食の糖代謝に及ぼす影響を調べるため、糖代謝の主要臓器である膵臓および肝臓に対する作用について検討した。

本章では、1) WBKDFラットに高フルクトース食を負荷することにより膵β細胞の破壊が軽減されること、2) WBKDFラットに高フルクトース食を負荷することにより脂肪肝が増悪することが明らかとなった。以上のことから、WBKDFラットにおける高フルクトース食による高血糖の軽減と血漿中インスリン値の減少抑制は、肝臓への影響によるのではなく、膵β細胞の障害進展を抑制することによることが示唆された。

## 第3章

高フルクトース食負荷 WBKDF ラットにおける

GLP-1 誘導体リラグルチドの作用に関する検討

## 緒言

ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、第 1 章および第 2 章において、遺伝的要因により肥満および脂質異常症を自然発症する 2 型糖尿病モデル動物である WBKDF ラットに高フルクトース食を負荷したときの肥満、脂質代謝および糖代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、WBKDF ラットに高フルクトース食を負荷することにより、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する種々の病態がみられることが明らかとなった。一方、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている薬剤が、ヒトと同様に有効性を示さないようでは、メタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発のために有用な動物モデルとは言えない。したがって、メタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発のための当該動物モデルの有用性を検証するためには、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている薬剤による改善作用が、当該動物モデルとヒトで類似するかどうかを検討する必要があると考える。

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) アナログであるリラグルチドは、GLP-1 受容体作動による血糖低下作用をもつ糖尿病治療薬で、2 型糖尿病患者でその有効性と安全性が確認されている[17, 24, 36]。また、GLP-1 アナログでは、血糖低下作用に加えて、体重減少、血圧低下、血中脂質低下などのメタボリックシンドロームでみられる種々の病態に対する多面的な作用も認められることが報告されている[4, 7, 15, 27, 47, 49]。

そこで本章では、高フルクトース食を負荷した WBKDF ラット (WBKDF-FRD ラット) を用いて、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている GLP-1 受容体作動薬であ

るリラゲルチドによる作用を検討した。

## 実験材料および実験方法

### 動物

実験には日本 SLC 株式会社 (Hamamatsu, Japan) より入手した雄性 WBKDF ラットを使用した。

動物の飼育は、麻布大学附属生物科学総合研究所のクリーンエリア動物実験室（室温  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 5\%$ 、12 時間明暗周期）でプラスチックケージにて行った。給餌および給水は自由摂取とした。

ただし、静脈内糖負荷試験前日の夕方から一晩（約 18 時間）は絶食とした。なお、全ての動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得た（承認番号 160303-8）。

### 飼料

実験には、標準食として CE-2 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan)、高フルクトース食として 60% fructose purified diet (PMI Nutrition International, St. Louis, MO, USA) を使用した。

### 化合物

リラグルチドは、Novo Nordisk Pharma Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。

### 実験プロトコール

WBKDF ラットを 5 週齢で搬入し、6 週齢から高フルクトース食を与え、7 週齢で群分けした。

なお、6 週齢までは標準食を与えた。

WBKDF ラットを対照群（溶媒：生理食塩液）、リラグルチド低用量群（75  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）およびリラ

グルチド高用量群 (300 µg/kg) の 3 群 (n=8/群) に分けた。リラグルチドの投与量は過去の試験結果[30, 31]を参考に設定した。生理食塩液又はリラグルチドを 7 週齢から 11 週齢の 4 週間、1 日 1 回 午後に皮下投与 (投与容量 : 1 mL/kg) した。実験期間中に体重、摂餌量、摂水量および血糖値の測定を週 1 回実施した。血糖値の測定のための採血 (0.2 mL) は尾静脈より行い (午後の投与前)、遠心分離 (約 3000×g、15 分間、約 4° C) 後得られた血漿 (抗凝固剤 : ヘパリンナトリウム) をサンプルとして測定まで冷凍保存 (-20° C) した。なお、血圧測定および肝臓の病理組織学的検査のための週齢をマッチングした無処置群として、標準食を与えた WBKDF ラット (n=8) を使用した。

## 血圧測定

7 週齢および 11 週齢で収縮期血圧の測定を実施した (午後の投与前)。収縮期血圧は、過去の実験[42]と同様の方法で、tail cuff blood pressure analyzer (BP98A-L, Softron, Tokyo, Japan)を用いて測定、算出した。

## 静脈内糖負荷試験 (IVGTT)

11 週齢で静脈内糖負荷試験 (IVGTT) を実施した。一晚 (約 18 時間) 絶食させた後にペントバルビタールナトリウム (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan) の腹腔内投与 (50 mg/kg) による麻酔を行い、大腿静脈内に 0.5 g/kg の用量で糖 (20% w/v; Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 負荷を行った。糖負荷後 0、2、5、10 および 20 分に頸静脈より血液 (0.2 mL/時点) を採取し、遠心分離 (約 2000×g、15 分間、約 4° C) 後得られた血漿を血糖値および血漿中インスリン値測定のためのサンプルとした。血糖値の測定は、自動分析装置 JCA-BM 2250 (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。血漿中イ

ンスリン値の測定はラットインスリン測定キット (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いて行った。また、IVGTTにおける血糖値および血漿中インスリン値の時間曲線下面積 (AUC) を台形公式により算出した。

インスリン抵抗性について、インスリン抵抗性指数 (homeostasis model assessment of insulin resistance : HOMA-IR) を用いて評価した。HOMA-IR は以下の式より算出した。空腹時血漿中インスリン値 ( $\mu\text{U/mL}$ )  $\times$  空腹時血糖値 ( $\text{mmol/L}$ ) / 22.5

### 血液生化学的検査

IVGTT 後に、下大静脈より血液 (3 mL) を採取し、遠心分離 (約  $3000\times g$ 、15 分間、約  $4^\circ\text{C}$ ) 後得られた血漿を血液生化学的検査のためのサンプルとして測定まで冷凍保存した。血漿中総コレステロール (T-Cho)、リン脂質 (PL) および中性脂肪 (TG) の測定は、自動分析装置 JCA-BM 2250 (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。

### 器官重量測定および病理組織学的検査

血液生化学的のための採血後にペントバルビタールナトリウムの過量投与により動物を安楽死させた。肝臓、精巣周囲脂肪および腸間膜脂肪を採取後、重量を測定した。肝臓を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液によって固定した。パラフィン包埋した肝臓を薄切し、常法に従ってヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を行い、病理組織学的検査のための標本とした。

## 統計解析

結果は平均値±標準誤差で表示した。体重、摂餌量、摂水量、血糖値、IVGTT（血糖値、血漿中インスリン値、血糖値の AUC、血漿中インスリン値の AUC、HOMA-IR）、血圧、血液生化学的検査および器官重量のデータについて、一元配置分散分析（one-way ANOVA）後に Dunnett's test を実施した。有意水準は 5% とした。統計解析には GraphPad Prism 5 statistical software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いた。

## 実験結果

### 体重および脂肪重量

体重、精巣集脂肪重量および腸間膜脂肪重量の結果を Figure 3-1 に示す。

リラグルチド投与開始前時点（7 週齢）の WBKDF-FRD ラットの体重に群間差はみられなかった。リラグルチド投与群の体重は、8 週齢から 11 週齢で対照群と比較して用量依存的な低値を示した。投与期間を通じた体重増加量は、リラグルチド投与群で対照群と比較して用量依存的な低値（ $P<0.01$ ）を示した。

精巣周囲脂肪重量および腸間膜脂肪重量は、リラグルチド高用量群で対照群と比較して低値を示した（ $P<0.01$ ）。

### 摂餌量および摂水量

摂餌量および摂水量の結果を Figure 3-2 に示す。

リラグルチド投与開始前時点（7 週齢）の WBKDF-FRD ラットの摂餌量および摂水量に群間差はみられなかった。投与期間中の摂餌量および摂水量は、リラグルチド投与群で対照群と比較して用量依存的な低値を示し、高用量群で 8 週齢以降に有意差（ $P<0.01$  又は  $P<0.05$ ）がみられた。

### 血糖値（非絶食下）

血糖値（非絶食下）の結果を Figure 3-3 に示す。

リラグルチド投与開始前時点（7 週齢）の WBKDF-FRD ラットの血糖値に群間差はみられな

った。対照群の血糖値は7週齢 ( $105 \pm 4$  mg/dL) より増加し、11週齢では  $333 \pm 42$  mg/dL であった。

一方、リラグルチド投与群では血糖値の増加が抑制され、9週齢から11週齢で対照群と比較して低値がみられた ( $P < 0.01$ )。

## IVGTT

IVGTTの結果を Figure 3-4 に示す。

空腹時の血糖値および血漿中インスリン値は、リラグルチド投与群で対照群と比較して低値を示した (血糖値：低用量群； $P < 0.05$ 、高用量群； $P < 0.01$ 、血漿中インスリン値： $P < 0.05$ )。

血糖値は、糖負荷後20分にリラグルチド高用量群で対照群と比較して低値を示した ( $P < 0.05$ )。

高用量群の血糖値 AUC は、対照群に対して14%の低値を示した ( $P < 0.05$ )。

血漿中インスリン値は、糖負荷後10分にリラグルチド高用量群で対照群と比較して高値を示した ( $P < 0.05$ )。血漿中インスリン値 AUC に統計学的有意差はみられなかったものの、高用量群の血漿中インスリン値 AUC は、対照群に対して17%の高値を示した。

インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は、リラグルチド投与群で対照群と比較して低値を示した ( $P < 0.05$ )。

## 血圧

血圧の結果 (11週齢) を Table 3-1 に示す。

7週齢の WBKDF-FRD ラットの収縮期血圧は、対照群、リラグルチド低用量群およびリラグルチド高用量群で、それぞれ  $123 \pm 5$ 、 $125 \pm 3$ 、 $122 \pm 4$  mmHg であり、群間差はみられなかった。対照

群の収縮期血圧は、11週齢（ $139 \pm 6$  mmHg）で7週齢（ $123 \pm 5$  mmHg）と比較して高値を示した。

リラグルチド投与群の収縮期血圧は、11週齢で対照群と比較して用量依存的な低値を示し、高用量群で有意差（ $P < 0.01$ ）がみられた。

標準食を与えた WBKDF ラットの収縮期血圧は、7週齢で  $121 \pm 4$  mmHg、11週齢で  $126 \pm 3$  mmHg であった。

## 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Table 3-1 に示す。

血漿中 T-Chol および PL は、リラグルチド高用量群で対照群と比較して低値を示した（ $P < 0.01$ ）。

血漿中 TG は、リラグルチド投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。

## 肝臓

肝臓重量の結果を Table 3-1 に示す。また、代表的な肝臓の HE 染色像を Figure 3-5 に示す。

肝臓重量は、リラグルチド投与群で対照群と比較して用量依存的な低値（ $P < 0.01$ ）を示した。

肝臓の病理組織学的検査では、対照群で重度な脂肪変性がみられ、リラグルチド投与群で用量依存的な脂肪変性の改善がみられた。

Table 3-1 Effects of low- and high-dose liraglutide on blood pressure, plasma lipids and liver weight in WBKDF rats supplemented with a fructose-rich diet for 4 weeks.

Variables	Control		Liraglutide			
			75 µg/kg		300 µg/kg	
Systolic blood pressure (mmHg)	139	± 6	132	± 6	116	± 2 **
Plasma T-Cho (mg/dl)	184	± 3	179	± 4	144	± 7 **
Plasma PL (mg/dl)	344	± 6	341	± 12	295	± 14 **
Plasma TG (mg/dl)	517	± 73	484	± 52	493	± 56
Absolute liver weight (g)	24.8	± 2.2	12.6	± 0.7 **	9.5	± 0.3 **
Ratio of liver weight to body weight (%)	7.2	± 0.8	3.9	± 0.1 **	3.4	± 0.1 **

Data are expressed as the mean ± SE (n = 8). T-Cho: total cholesterol, PL: phospholipid, TG: triglycerides. Significant differences from the control group are indicated (\*\*: p<0.01, Dunnett's test).

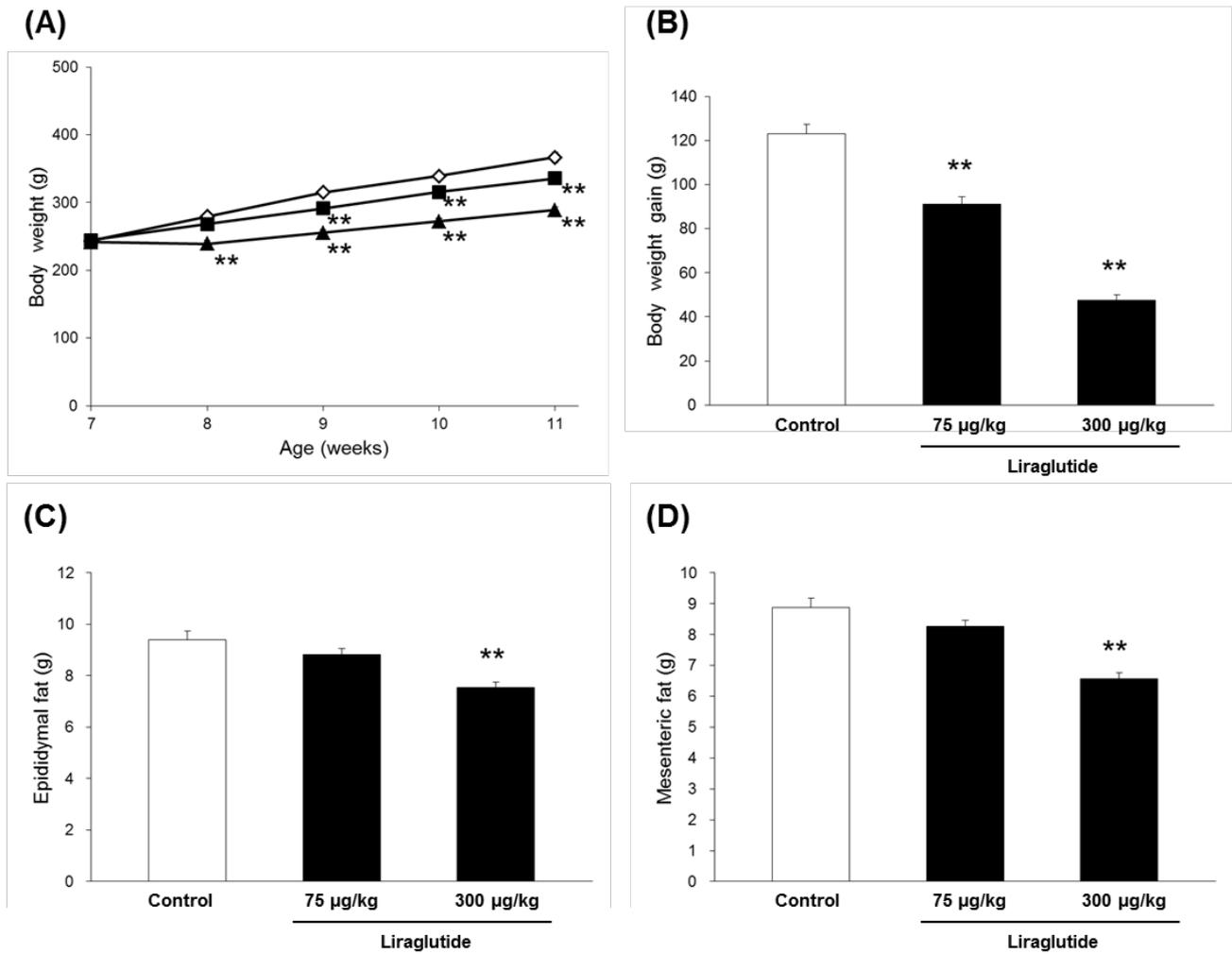


Figure 3-1 Effects of low- and high-dose liraglutide on body weight (A) (open diamond, control; closed square, 75 µg/kg of liraglutide; closed triangle, 300 µg/kg of liraglutide), body weight gain (B), epididymal fat weight (C) and mesenteric fat weight (D) in WBKDF rats supplemented with a fructose-rich diet for 4 weeks. The fat weights were measured at 11 weeks of age. Data are expressed as the mean ± SE (n = 8). Significant differences from the control group are indicated (\*\*: p<0.01, Dunnett's test).

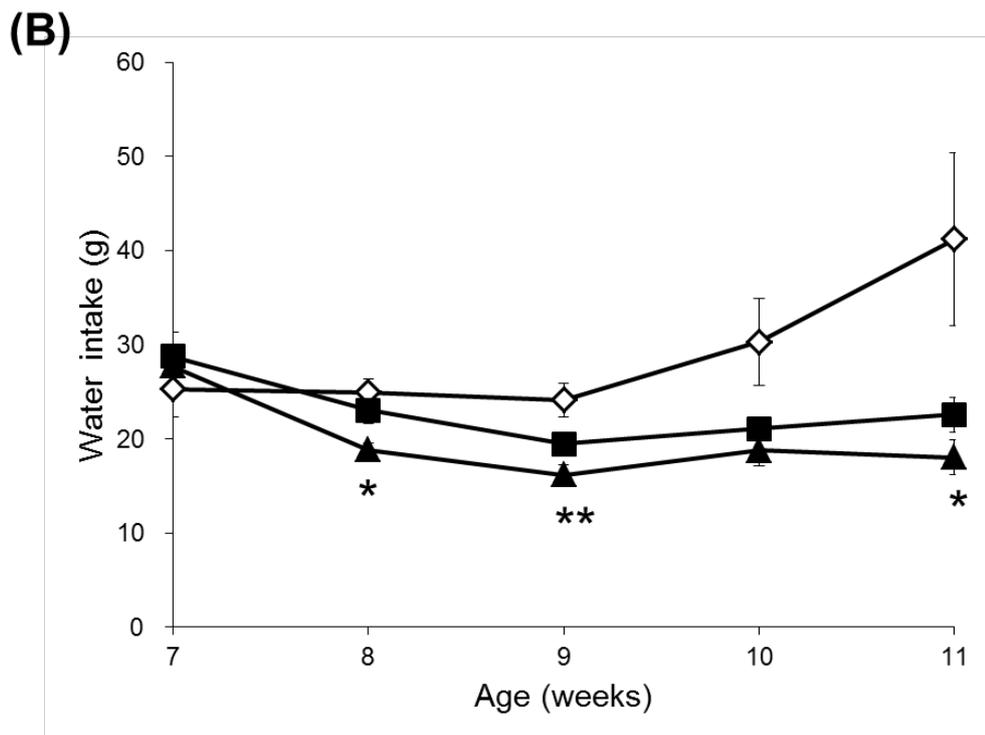
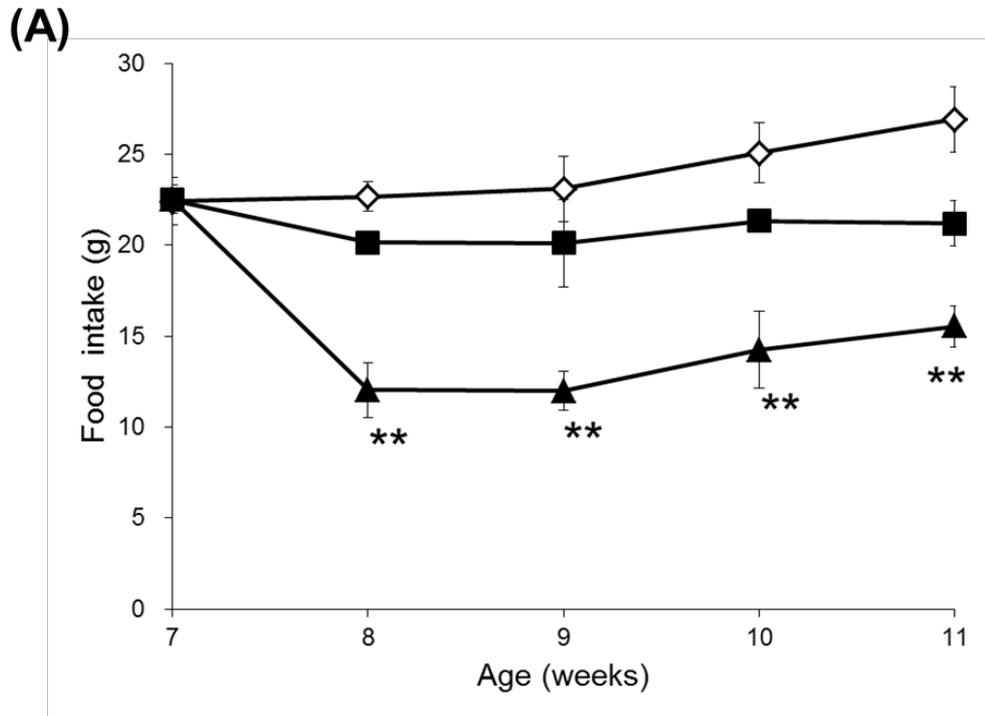


Figure 3-2 Effects of low- and high-dose liraglutide on food intake (A) and water intake (B) in WBKDF rats supplemented with a fructose-rich diet for 4 weeks (open diamond, control; closed square, 75 µg/kg of liraglutide; closed triangle, 300 µg/kg of liraglutide). Data are expressed as the mean ± SE (n = 8). Significant differences from the control group are indicated (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, Dunnett's test).

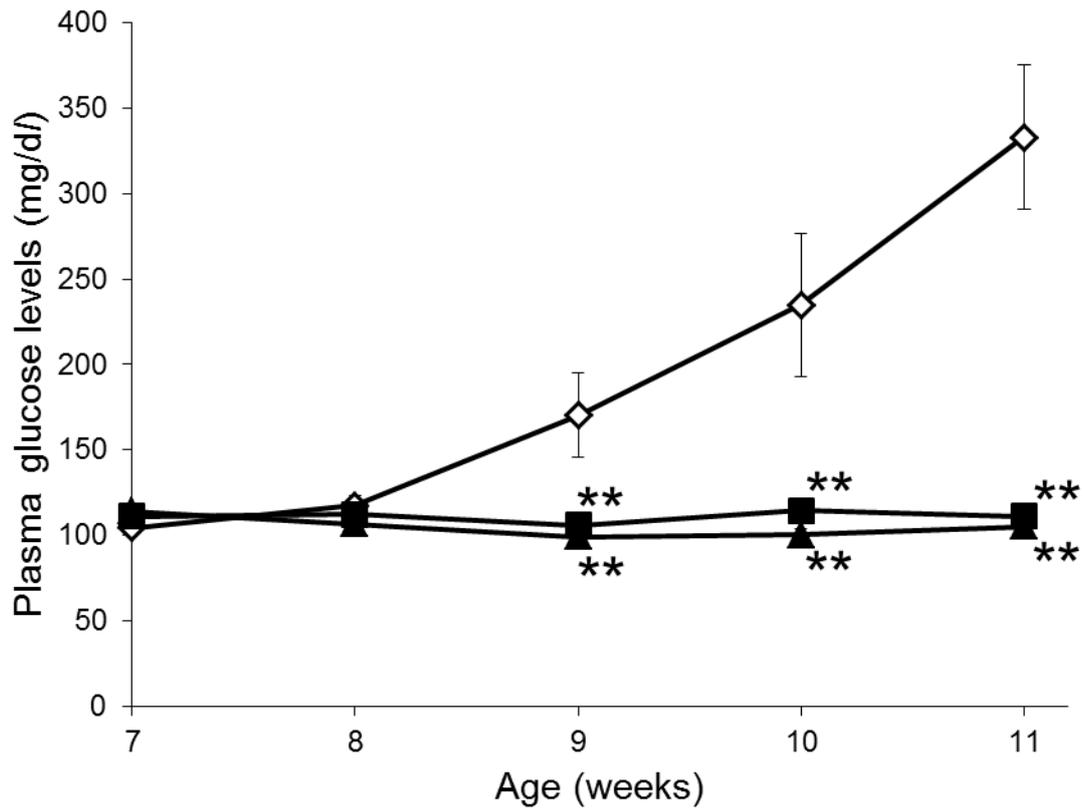


Figure 3-3 Effects of low- and high-dose liraglutide on non-fasting plasma glucose concentrations in WBKDF rats supplemented with a fructose-rich diet for 4 weeks (open diamond, control; closed square, 75 µg/kg of liraglutide; closed triangle, 300 µg/kg of liraglutide). Data are expressed as the mean ± SE (n = 8). Significant differences from the control group are indicated (\*\*: p<0.01, Dunnett's test).

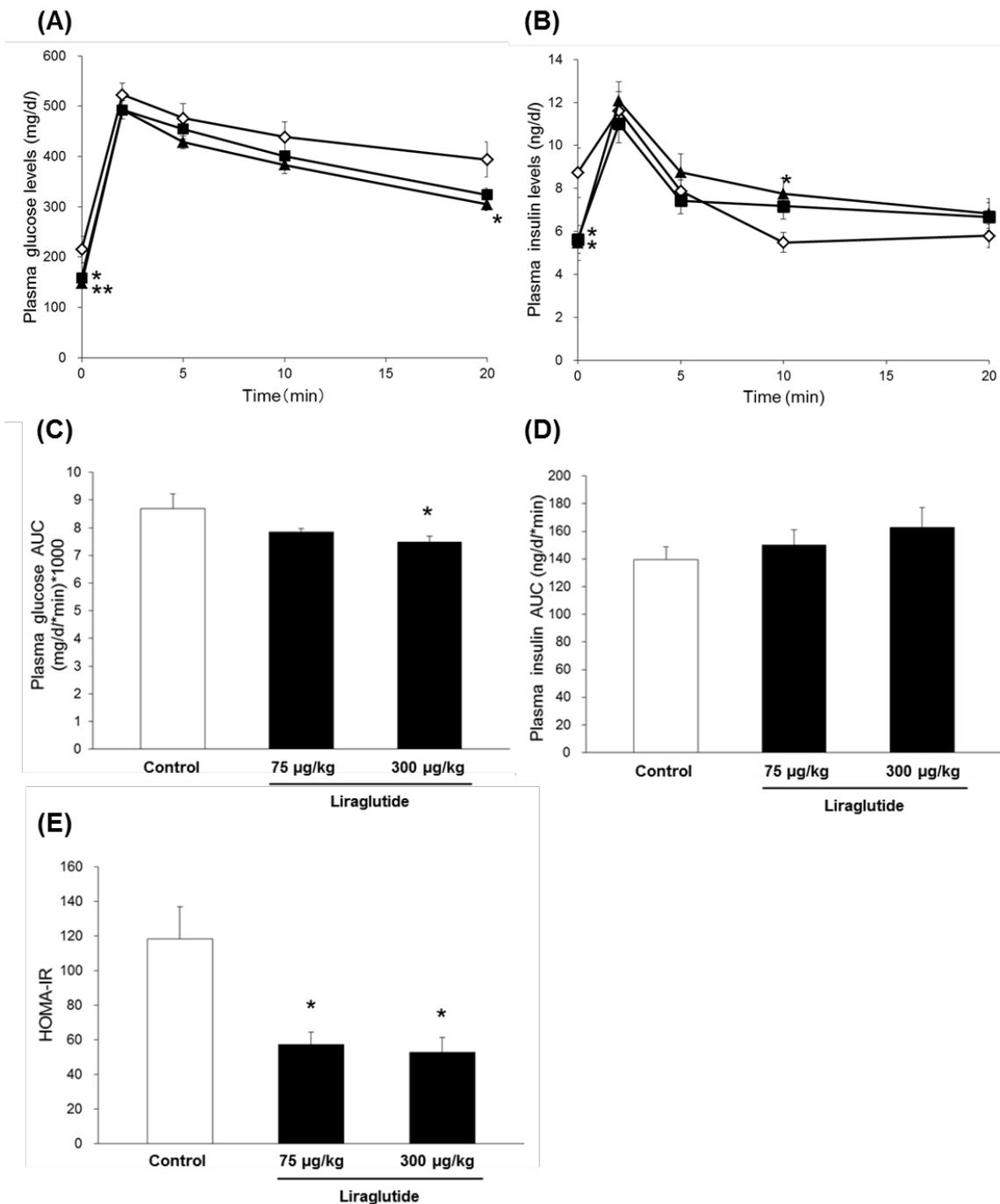


Figure 3-4 Effects of low- and high-dose liraglutide on glucose tolerance in WBKDF rats supplemented with a fructose-rich diet for 4 weeks. The IVGTT was performed as described in the Materials and Methods section. The plasma levels of glucose (A) and insulin (B) during IVGTT were measured at 11 weeks of age (open diamond, control; closed square, 75 µg/kg of liraglutide; closed triangle, 300 µg/kg of liraglutide). The AUCs of plasma glucose (C) and plasma insulin (D) were calculated. The HOMA-IR (E) was calculated as described in the Materials and Methods section. Data are expressed as the mean ± SE (n = 8). Significant differences from the control group are indicated (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, Dunnett's test).

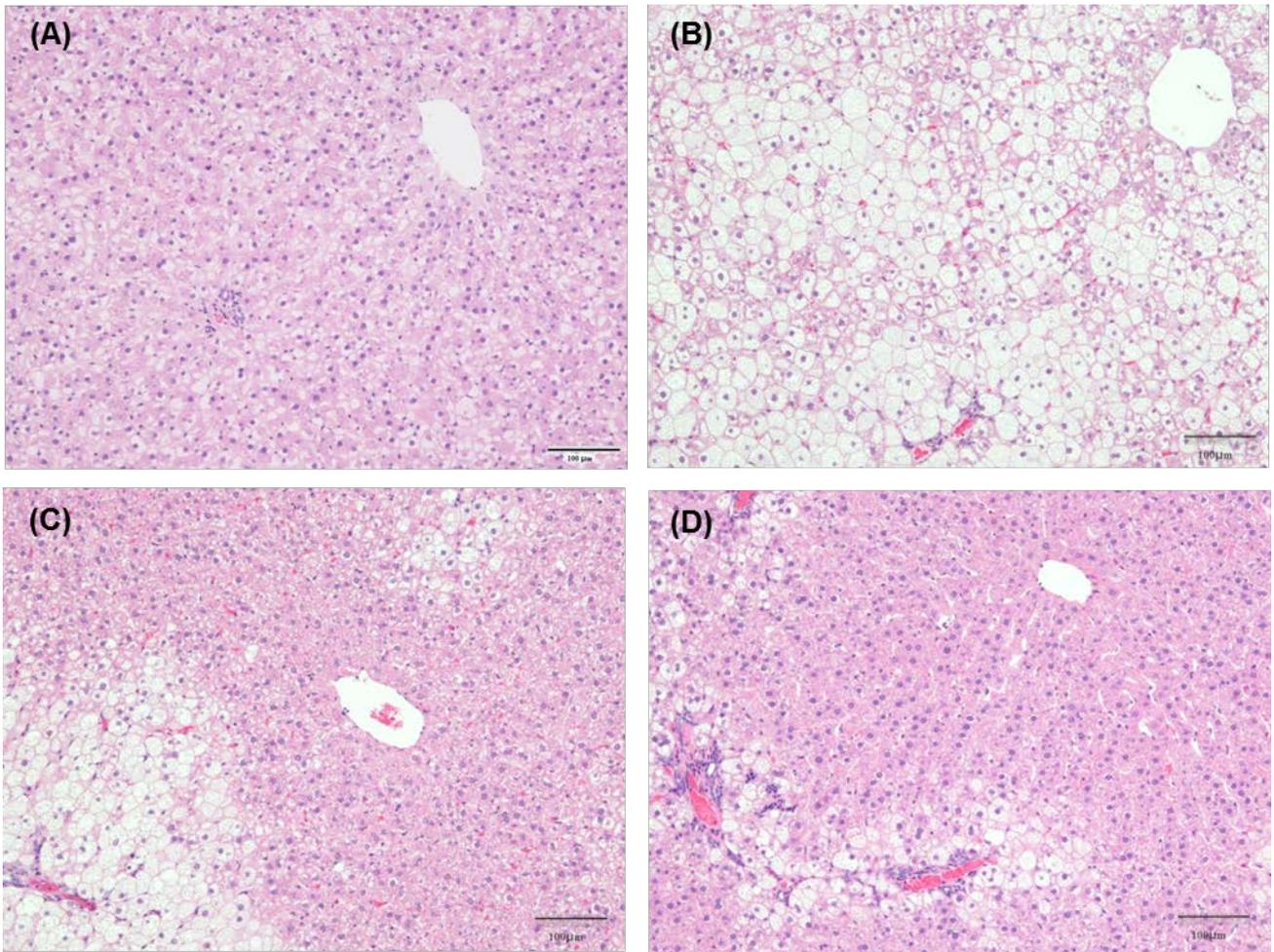


Figure 3-5 Effects of low- and high-dose liraglutide on livers of WBKDF rats supplemented with a fructose-rich diet for 4 weeks. Histopathological examination [WBKDF rats fed standard rat chow (A), control (B), 75 µg/kg of liraglutide (C) and 300 µg/kg of liraglutide (D)] was performed as described in the Materials and Methods section.

## 考察

第 1 章および第 2 章において、WBKDF ラットに高フルクトース食を負荷することにより、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する種々の病態がみられることが明らかとなった。メタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発のための当該動物モデルの有用性を検証するためには、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている薬剤による改善作用が、当該動物モデルとヒトで類似するかどうかを検討する必要があると考える。そこで第 3 章では、WBKDF-FRD ラットを用いて、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドによる作用を検討した。

本章では、1) WBKDF-FRD ラットにおいてメタボリックシンドロームの特徴である耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝がみられること、2) リラグルチドは、ヒトでの抗メタボリックシンドローム作用の報告と同様に WBKDF-FRD ラットの耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝を改善することが明らかとなった。

WBKDF ラットでみられる重度な高血糖が高フルクトース食で軽減されることを示した第 1 章および第 2 章の結果と同様に、対照群の WBKDF-FRD ラットでマイルドな高血糖がみられた。リラグルチドは WBKDF-FRD ラットのマイルドな高血糖を有意に抑制した。また、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR がリラグルチド高用量群で対照群と比較して有意な低値を示したことから、リラグルチドが WBKDF-FRD ラットのインスリン抵抗性を改善することが示された。これらの結果は、リラグルチドの血糖低下作用を示す臨床試験結果[17, 18, 24, 36]と類似する。

リラグルチドは WBKDF-FRD ラットの体重、精巣周囲脂肪重量および腸間膜脂肪重量を用量依

存的に減少させた。同様のリラグルチドによる体重減少は、2型糖尿病を合併する肥満患者を対象とした臨床試験においても報告されている[35, 48]。GLP-1 受容体作動による体重減少の主な機序は中枢における食欲抑制作用であると考えられている[34]。本実験でみられたリラグルチド投与群での摂餌量減少は、当該想定機序を支持する知見であると考えられる。

高フルクトース食はラットの収縮期血圧および平均動脈圧を増加させることが報告されており[9, 21]、WBKDF-FRD ラットでも収縮期血圧の軽度な増加がみられた。リラグルチドは WBKDF-FRD ラットの軽度な収縮期血圧の増加を抑制した。同様のリラグルチドによる収縮期血圧の減少は、2型糖尿病患者を対象とした臨床試験においても報告されている[14]。心臓での GLP-1 受容体は心房に局在しており、GLP-1 受容体の活性化は心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) を分泌し、血圧の低下を促進することが報告されている[23]。

第1章および第2章の結果と同様に、対照群の WBKDF-FRD ラットで血漿中 T-Chol、PL および TG の高値並びに肝臓での重度な脂肪変性がみられた。リラグルチドは WBKDF-FRD ラットの重度な脂肪変性を用量依存的に改善し、血漿中 T-Chol および PL を減少させた。同様のリラグルチドによる脂肪肝の改善は、非アルコール性脂肪性肝炎患者を対象とした臨床試験においても報告されている[3]。更に、非アルコール性脂肪性肝炎患者において、リラグルチドが肝臓での脂肪合成を抑制することが報告されている[2]。また、GLP-1 受容体作動薬による脂質異常症改善の作用機序として、肝臓での脂肪合成の抑制、小腸からのコレステロールやリポ蛋白の分泌抑制、エネルギー産生のための中性脂肪利用の亢進等が報告されている[46]。したがって、本実験でみられたリラグルチドによる脂質異常症および脂肪肝の改善は、肝臓での脂肪合成の抑制、小腸からのコレステロールやリポ蛋白の分泌抑制およびエネルギー産生のための中性脂肪利用の亢進、並びに摂餌量減少が原因と考

えられた。

## 小括

第3章では、WBKDF-FRD ラットを用いて、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドによる作用を検討した。

本章では、1) WBKDF-FRD ラットにおいてメタボリックシンドロームの特徴である耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝がみられること、2) リラグルチドは、ヒトでの抗メタボリックシンドローム作用の報告と同様に WBKDF-FRD ラットの耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝を改善することが明らかとなった。

以上、ヒトのメタボリックシンドローム患者で報告されているリラグルチドの抗メタボリックシンドローム作用が WBKDF-FRD ラットでもみられた。

## 総括ならびに結論

本研究では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、以下に示す第1～3章の実験を実施した。

第1章では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、遺伝的要因により肥満および脂質異常症を自然発症する2型糖尿病モデル動物であるWBKDFラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷したときの肥満、脂質代謝および糖代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、1) WBKDFラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷することにより遺伝性の肥満および脂質異常症が増悪すること、2) 高血糖については高脂肪食と高フルクトース食で異なるプロファイルを示し、高脂肪食負荷で増悪するのに対して、高フルクトース食負荷で軽減すること、3) 血漿中インスリン値は、高脂肪食負荷で標準食群と同様に減少するのに対して、高フルクトース食負荷では高値を維持することが明らかとなった。そこで、第2章では、WBKDFラットに負荷した高フルクトース食の糖代謝に及ぼす影響を調べるため、糖代謝の主要臓器である膵臓および肝臓に対する作用について検討した。その結果、1) WBKDFラットに高フルクトース食を負荷することにより膵 $\beta$ 細胞の破壊が軽減されること、2) WBKDFラットに高フルクトース食を負荷することにより脂肪肝が増悪することが明らかとなった。以上のことから、WBKDFラットにおける高フルクトース食による高血糖の軽減と血漿中インスリン値の減少抑制は、肝臓における糖代謝改善によるのではなく、膵 $\beta$ 細胞の障害進展を抑制することによることが示唆された。

第1章および第2章において、WBKDFラットに高フルクトース食を負荷することにより、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する種々の病態がみられることが明らかとなった。メタボリ

ックシンドロームの病態解明および治療薬開発のための当該動物モデルの有用性を検証するためには、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている薬剤による改善作用が、当該動物モデルとヒトで類似するかどうかを検討する必要があると考える。そこで、第3章では、WBKDF-FRD ラットを用いて、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドによる作用を検討した。その結果、1) WBKDF-FRD ラットにおいてメタボリックシンドロームの特徴である耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝がみられること、2) リラグルチドは、ヒトでの抗メタボリックシンドローム作用の報告と同様に WBKDF-FRD ラットの耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝を改善することが明らかとなった。

本研究において、WBKDF-FRD ラットはヒトのメタボリックシンドローム患者に類似する種々の病態を有するとともに、リラグルチドによる改善作用もヒトのメタボリックシンドローム患者に類似することが明らかとなった。当該動物モデルはヒトのメタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発に有用であることが示唆された。

本論文の一部は以下に公表した。

1. Namekawa, J., Takagi, Y., Wakabayashi, K., Nakamura, Y., Watanabe, A., Nagakubo, D., Shirai, M. and Asai, F. 2017. Effects of high-fat diet and fructose-rich diet on obesity, dyslipidemia and hyperglycemia in the WBN/Kob-*Lep<sup>fa</sup>* rat, a new model of type 2 diabetes mellitus. J. Vet. Med. Sci. 79: 988-991.

DOI: 10.1292/jvms.17-0136

2. Namekawa, J., Nemoto, S., Sunada, G., Takanashi, Y., Fujio, S., Shirai, M. and Asai, F. 2018. Characteristics of WBN/Kob diabetic fatty rats supplemented with a fructose-rich diet as a metabolic syndrome model: response to a GLP-1 receptor agonist. J. Vet. Med. Sci. 80: 1515-1523.

DOI: 10.1292/jvms.18-0306

## 謝辞

本稿作成に際し、懇篤なご指導、ご助言を賜りました、麻布大学獣医学部 薬理学研究室 浅井史敏 教授、白井明志 准教授、栄養学研究室 勝俣昌也 教授に深甚たる謝意を表します。

## 引用文献

1. Akimoto, T., Nakama, K., Katsuta, Y., Zhang, X. J., Ohsuga, M., Ishizaki, M., Sawai, N. and Ozawa, H. 2008. Characterization of a novel congenic strain of diabetic fatty (WBN/Kob-Lepr(fa)) rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**: 556-562.
2. Armstrong, M. J., Hull, D., Guo, K., Barton, D., Hazlehurst, J. M., Gathercole, L. L., Nasiri, M., Yu, J., Gough, S. C., Newsome, P. N. and Tomlinson, J. W. 2016. Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **64**: 399-408.
3. Armstrong, M. J., Gaunt, P., Aithal, G. P., Barton, D., Hull, D., Parker, R., Hazlehurst, J. M., Guo, K.; LEAN trial team, Abouda, G., Aldersley, M. A., Stocken, D., Gough, S. C., Tomlinson, J. W., Brown, R. M., Hübscher, S. G. and Newsome, P. N. 2016. Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet* **387**: 679-690.
4. Astrup, A., Carraro, R., Finer, N., Harper, A., Kunesova, M., Lean, M. E., Niskanen, L., Rasmussen, M. F., Rissanen, A., Rössner, S., Savolainen, M. J. and Van, Gaal, L. 2012. Safety, tolerability and sustained weight loss over 2 years with the once-daily human GLP-1 analog, liraglutide. *Int. J. Obes. (London)* **36**: 843-854.
5. Bidwell, A. J. 2017. Chronic Fructose Ingestion as a Major Health Concern: Is a Sedentary Lifestyle Making It Worse? A Review. *Nutrients* **9**: E549.

6. Buettner, R., Schölmerich, J. and Bollheimer, L.C. 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* **15**: 798-808.
7. Buse, J. B., Drucker, D. J., Taylor, K. L., Kim, T., Walsh, B., Hu, H., Wilhelm, K., Trautmann, M., Shen, L. Z. and Porter, L. E. 2010. DURATION-1: exenatide once weekly produces sustained glycemic control and weight loss over 52 weeks. *Diabetes Care* **33**: 1255–1261.
8. Carmona, A. and Freedland, R.A. 1989. Comparison among the lipogenic potential of various substrates in rat hepatocytes: the differential effects of fructose-containing diets on hepatic lipogenesis. *J Nutr.* **119**: 1304-1310.
9. Catena, C., Giacchetti, G., Novello, M., Colussi, G., Cavarape, A. and Sechi, L. A. 2003. Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am. J. Hypertens.* **16**: 973-978.
10. Chua, S. C. Jr., White, D. W., Wu-Peng, X. S., Liu, S. M., Okada, N., Kershaw, E. E., Chung, W. K., Power-Kehoe, L., Chua, M., Tartaglia, L. A. and Leibel, R. L. 1996. Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes* **45**: 1141-1143.
11. Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougnères, P., Lebouc, Y., Froguel, P. and Guy-Grand, B.

1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398-401.
12. Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J.M., Periasamy, R., Park, S. and Tappy, L. 2005. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*. **54**: 1907-1913.
13. Fellmann, L., Nascimento, A.R., Tibiriça, E. and Bousquet, P. 2013. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacol. Ther.* **137**: 331-340.
14. Fonseca, V. A., Devries, J. H., Henry, R. R., Donsmark, M., Thomsen, H. F. and Plutzky, J. 2014. Reductions in systolic blood pressure with liraglutide in patients with type 2 diabetes: insights from a patient-level pooled analysis of six randomized clinical trials. *J. Diabetes Complications* **28**: 399-405.
15. Gill, A., Hoogwerf, B. J., Burger, J., Bruce, S., Macconell, L., Yan, P., Braun, D., Giaconia, J. and Malone, J. 2010. Effect of exenatide on heart rate and blood pressure in subjects with type 2 diabetes mellitus: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Cardiovasc. Diabetol.* **9**: 6.
16. Havel, P.J. 2005. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev.* **63**: 133-157.

17. Henry, R. R., Buse, J. B., Sesti, G., Davies, M. J., Jensen, K. H., Brett, J. and Pratley, R. E. 2011. Efficacy of antihyperglycemic therapies and the influence of baseline hemoglobin A(1C): a meta-analysis of the liraglutide development program. *Endocr. Pract.* **17**: 906-913.
18. Holst, J. J., Vilsboll, T. and Deacon, C. F. 2009. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol. Cell Endocrinol.* **297**: 127-136.
19. Kahn, S. E., Cooper, M. E. and Del, Prato, S. 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* **383**: 1068-1083.
20. Kaji, N., Okuno, A., Ohno-Ichiki, K., Oki, H., Ishizawa, H., Shirai, M. and Asai, F. 2012. Plasma profiles of glucose, insulin and lipids in the male WBN/Kob-Lepr(fa) rat, a new model of type 2 diabetes with obesity. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 1185-1189.
21. Katakam, P. V., Ujhelyi, M. R., Hoenig, M. E. and Miller, A. W. 1998. Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. *Am. J. Physiol.* **275**: R788-R792.
22. Kawasaki, T., Igarashi, K., Koeda, T., Sugimoto, K., Nakagawa, K., Hayashi, S., Yamaji, R., Inui, H., Fukusato, T. and Yamanouchi, T. 2009. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J. Nutr.* **139**: 2067-2071.

23. Kim, M., Platt, M. J., Shibasaki, T., Quaggin, S. E., Backx, P. H., Seino, S., Simpson, J. A. and Drucker, D. J. 2013. GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat. Med.* **19**: 567-575.
24. King, A. B., Montanya, E., Pratley, R. E., Blonde, L., Svendsen, C. B., Donsmark, M. and Sesti, G. 2013. Liraglutide achieves A1C targets more often than sitagliptin or exenatide when added to metformin in patients with type 2 diabetes and a baseline A1C <8.0%. *Endocr. Pract.* **19**: 64-72.
25. Lê, K.A. and Tappy, L. 2006. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **9**: 469-475.
26. Liu, J., Grundy, S. M., Wang, W., Smith, S. C. Jr., Vega, G. L., Wu, Z., Zeng, Z., Wang, W. and Zhao, D. 2007. Ten-year risk of cardiovascular incidence related to diabetes, prediabetes, and the metabolic syndrome. *Am. Heart J.* **153**: 552-558.
27. Meier, J. J., Gethmann, A., Gotze, O., Gallwitz, B., Holst, J. J., Schmidt, W. E. and Nauck, M. A. 2006. Glucagon-like peptide 1 abolishes the postprandial rise in triglyceride concentrations and lowers levels of non-esterified fatty acids in humans. *Diabetologia* **49**: 452-458.
28. Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B. and O'Rahilly, S. 1997. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **387**: 903-908.

29. Mutch, D.M. and Clément, K. 2006. Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet.* **2**: e188.
30. Nagakubo, D., Shirai, M., Nakamura, Y., Kaji, N., Arisato, C., Watanabe, S., Takasugi, A. and Asai, F. 2014. 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.* **64**: 121-127.
31. Nagakubo, D., Shirai, M., Wakabayashi, K., Nakamura, Y., Kaji, N. and Asai, F. 2016. Therapeutic effects of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 analog, in diabetic WBN/Kob-Lepr<sup>fa</sup> rats with obesity and chronic pancreatitis. *Integr Obesity & Diabetes.* **2**: 265-270.
32. Nagao, M., Asai, A., Sugihara, H. and Oikawa, S. 2015. Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocr J* **62**: 561-572.
33. Okuno, A., Kaji, N., Takahashi, A., Nagakubo, D., Ohno-Ichiki, K., Shirai, M. and Asai, F. 2013. Role of insulin resistance in the pathogenesis and development of type 2 diabetes in WBN/Kob-Lepr(fa) rats. *J. Vet. Med. Sci.* **75**: 1557-1561.
34. Ottney, A. 2013. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists for weight loss in adult patients without diabetes. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **70**: 2097-2103.
35. Overgaard, R. V., Petri, K. C., Jacobsen, L. V. and Jensen, C. B. 2016. Liraglutide 3.0 mg for Weight Management: A Population Pharmacokinetic Analysis. *Clin. Pharmacokinet.* **55**: 1413-1422.

36. Pinelli, N. R. and Hurren, K. M. 2011. Efficacy and safety of long-acting glucagon-like peptide-1 receptor agonists compared with exenatide twice daily and sitagliptin in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Pharmacother.* **45**: 850-860.
37. Rask, Larsen, J., Dima, L., Correll, C. U. and Manu, P. 2018. The pharmacological management of metabolic syndrome. *Expert. Rev. Clin. Pharmacol.* **11**: 397-410.
38. Rebrin, K., Steil, G.M., Getty, L. and Bergman, R.N. 1995. Free fatty acid as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. *Diabetes.* **44**: 1038-1045.
39. Rosini, T.C., Silva, A.S. and Moraes, Cd. 2012. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **58**: 383-387.
40. Rutledge, A.C. and Adeli, K. 2007. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev.* **65**: S13-23.
41. Schwarz, J.M., Noworolski, S.M., Wen, M.J., Dyachenko, A., Prior, J.L., Weinberg, M.E., Herraiz, L.A., Tai, V.W., Bergeron, N., Bersot, T.P., Rao, M.N., Schambelan, M. and Mulligan, K. 2015. Effect of a High-Fructose Weight-Maintaining Diet on Lipogenesis and Liver Fat. *J Clin Endocrinol Metab.* **100**: 2434-2442.

42. Takagi, Y., Kadowaki, H., Kobayashi, I., Ito, K., Ito, K., Shirai, M. and Asai, F. 2017. Effects of high-sodium intake on systemic blood pressure and vascular responses in spontaneously diabetic WBN/Kob-Leprfa/fa rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **44**: 305-312.
43. Tappy, L. and Lê, K.A. 2010. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* **90**: 23-46.
44. Teague, J., Gyte, A., Peel, J.E., Young, K.C., Loxham, S.J., Mayers, R.M. and Poucher, S.M. 2011. Reversibility of hyperglycaemia and islet abnormalities in the high fat-fed female ZDF rat model of type 2 diabetes. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **63**: 15-23.
45. Ter, Horst, K.W. and Serlie, M.J. 2017. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients* **9**: E981.
46. Tsimihodimos, V. and Elisaf M. S. 2017. Incretins And Lipid Metabolism. *Curr. Med. Chem.* **24**: 1-7.
47. Vilsboll, T., Christensen, M., Junker, A. E., Knop, F. K. and Gluud, L. L. 2012. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on weight loss: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ* **344**: d7771.
48. Wilding, J. P., Overgaard, R. V., Jacobsen, L. V., Jensen, C. B. and le, Roux, C. W. 2016. Exposure-response analyses of liraglutide 3.0 mg for weight management. *Diabetes Obes. Metab.* **18**: 491-499.

49. Zinman, B., Gerich, J., Buse, J. B., Lewin, A., Schwartz, S., Raskin, P., Hale, P. M., Zdravkovic, M. and Blonde, L. 2009. Efficacy and safety of the human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in combination with metformin and thiazolidinedione in patients with type 2 diabetes (LEAD-4 Met + TZD). *Diabetes Care* **32**: 1224-1230.

50. 厚生労働省 生活習慣病予防のための健康情報サイト

URL: <https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/metabolic>

## 要旨

メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満に高血糖、高血圧、脂質代謝異常が組合わさった病態である。メタボリックシンドロームの患者数は近年増加しており、メタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発のための良質な実験動物モデルが必須であるが、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する実験動物モデルがない。

メタボリックシンドロームは遺伝要因と環境要因が組み合わさって発症すると考えられている。環境要因では高脂肪食や高糖質食の食事の影響が大きく、糖質では甘味料として使用が急増しているフルクトースのメタボリックシンドローム発症への寄与が注目されている。

WBKDF ラットは、肥満を伴わない 2 型糖尿病モデルである WBN/Kob に 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た新規コンジェニックラットである。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ことが明らかとなっており、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。

そこで本研究では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、以下に示す第 1～3 章の実験を実施した。

第 1 章では、ヒトのメタボリックシンドロームの病態特性に類似する動物モデルを探索するため、遺伝的要因により肥満および脂質異常症を自然発症する 2 型糖尿病モデル動物である WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷したときの肥満、脂質代謝および糖代謝に及ぼす影

響を検討した。その結果、1) WBKDF ラットに高脂肪食又は高フルクトース食を負荷することにより遺伝性の肥満および脂質異常症が増悪すること、2) 高血糖については高脂肪食と高フルクトース食で異なるプロファイルを示し、高脂肪食負荷で増悪するのに対して、高フルクトース食負荷で軽減すること、3) 血漿中インスリン値は、高脂肪食負荷で標準食群と同様に減少するのに対して、高フルクトース食負荷では高値を維持することが明らかとなった。そこで、第 2 章では、WBKDF ラットに負荷した高フルクトース食の糖代謝に及ぼす影響を調べるため、糖代謝の主要臓器である膵臓および肝臓に対する作用について検討した。その結果、1) WBKDF ラットに高フルクトース食を負荷することにより膵β細胞の破壊が軽減されること、2) WBKDF ラットに高フルクトース食を負荷することにより脂肪肝が増悪することが明らかとなった。以上のことから、WBKDF ラットにおける高フルクトース食による高血糖の軽減と血漿中インスリン値の減少抑制は、肝臓における糖代謝改善によるのではなく、膵β細胞の障害進展を抑制することによることが示唆された。

第 1 章および第 2 章において、WBKDF ラットに高フルクトース食を負荷することにより、ヒトのメタボリックシンドロームに類似する種々の病態がみられることが明らかとなった。メタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発のための当該動物モデルの有用性を検証するためには、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている薬剤による改善作用が、当該動物モデルとヒトで類似するかどうかを検討する必要があると考える。そこで、第 3 章では、WBKDF-FRD ラットを用いて、ヒトで抗メタボリックシンドローム作用があることが報告されている GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドによる作用を検討した。その結果、1) WBKDF-FRD ラットにおいてメタボリックシンドロームの特徴である耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝がみられること、2) リラグルチドは、ヒトでの抗メタボリックシンドローム作用の報告と

同様に WBKDF-FRD ラットの耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝を改善することが明らかとなった。

本研究において、WBKDF-FRD ラットはヒトのメタボリックシンドローム患者に類似する種々の病態を有するとともに、リラグルチドによる改善作用もヒトのメタボリックシンドローム患者に類似することが明らかとなった。当該動物モデルはヒトのメタボリックシンドロームの病態解明および治療薬開発に有用であることが示唆された。

## Abstract

Metabolic syndrome (MS) is composed of visceral fat obesity, hyperglycemia, hypertension and dyslipidemia. An increase in metabolic syndrome patients worldwide has stimulated the development of useful animal models for investigating the causal mechanism and new medical agents against MS. However, it is still challenging to find a dietetic model that closely approximates human MS.

MS is a multi-factorial disorder influenced by interactions between genetic and environmental factors. Higher consumption of foods rich in fat and carbohydrates greatly influence the onset of MS. As for carbohydrates, the rapid increase in fructose consumption as a sweetener has focused attention on its contribution to the onset of MS.

The WBKDF rat is a new congenic strain developed by introduction of the *fa* allele of the Zucker fatty rat into the parental WBN/Kob rat genome. The leptin receptor fatty gene (*Lepr<sup>fa</sup>*) is a recessive mutation that leads to leptin receptor deficiency, and homozygous animals (*fa/fa*) exhibit obesity and hyperphagia, in addition to insulin resistance. Previous reports demonstrated that WBKDF rats develop obesity and insulin resistance, both of which lead to T2DM. These data also suggest that WBKDF rats may be a useful model to simulate human MS.

Therefore, in this research, the experiments comprised of 3 chapters were performed in order to find the animal model that closely approximates human MS.

In the Chapter 1, we examined the effects of a high-fat diet (HFD) and fructose-rich diet (FRD) on obesity, dyslipidemia and T2DM in WBKDF rats, which spontaneously develop obesity, dyslipidemia and T2DM due to genetic factor in the search of the animal model that closely approximates human MS. The main findings of this

study were that 1) HFD and FRD aggravated obesity and dyslipidemia spontaneously developed in WBKDF rats; 2) feeding of HFD and FRD leads to a distinct phenotype in glucose metabolism in WBKDF rats. Hyperglycemia spontaneously developed in WBKDF rats was aggravated by HFD, but inversely inhibited by FRD; 3) the plasma insulin levels of WBKDF-FRD rats remained high whereas those of WBKDF rats fed standard diet (STD) and HFD were comparable and had a tendency to decrease. Therefore, in the Chapter 2, we examined the effects of FRD on glucose metabolism in pancreases and livers of WBKDF rats. The main findings of this study were that 1) FRD attenuated injury of the pancreatic  $\beta$ -cells in WBKDF rats; 2) FRD aggravated hepatic steatosis in WBKDF rats. These findings suggest that the mechanism by which FRD attenuated hyperglycemia and inhibited reduction of plasma insulin levels in WBKDF rats is not improvement of hepatic glucose metabolism, but attenuation of injury of the pancreatic  $\beta$ -cells.

The findings in the Chapter 1 and 2 demonstrated that feeding of FRD resulted in several features of MS in WBKDF rats. In order to verify the usefulness of animal models for investigating the causal mechanism and new medical agents against MS, we need to examine whether the pharmacological responses of WBKDF-FRD rats to anti-MS agent are similar with those of human MS patients. Therefore, in the Chapter 3, we examined the pharmacological response of WBKDF-FRD rats to liraglutide, a clinically-used GLP-1 receptor agonist for MS patients. The main findings of this study were that 1) feeding of FRD resulted in several features of MS, including glucose tolerance, obesity, hypertension, dyslipidemia and hepatic steatosis in WBKDF rats; 2) Liraglutide improved glucose tolerance, obesity, hypertension, dyslipidemia, and hepatic steatosis associated with MS in WBKDF-FRD rats.

This research demonstrated that WBKDF-FRD rats exhibited signs of human MS, including glucose tolerance,

obesity, hypertension, dyslipidemia and hepatic steatosis. The pharmacological responses of WBKDF-FRD rats to liraglutide are similar with those of human MS patients. WBKDF-FRD rats may be a useful model to investigate the etiology of human MS.