

氏名(本籍)	滑川 淳一(東京都)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第75号
学位授与年月日	平成31年3月15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	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
論文審査委員	(主査) 白井 明志 (副査) 浅井 史敏 勝 俣 昌也

## 論文内容の要旨

### 【研究の背景】

メタボリックシンドローム(MS)とは、内臓脂肪型肥満に加えて高血糖、高血圧、脂質代謝異常のうちいずれか2つ以上を合わせもった状態をいう。MSの患者数は近年増加しており、MSの病態解明および治療薬開発には良質な実験動物モデルが必須であり、ヒトのMSに類似する実験動物モデルの開発が切望されている。MSの発症進展には遺伝的要因および環境要因の関与が大きい。環境要因では高脂肪食や高糖質食などの食事の影響が大きいとされ、ファストフードの甘味料としての使用量が近年急増しているフルクトースのMS発症への関与が注目されている。WBKDFラットは、WBN/KobとZucker肥満ラットの戻し交配により、肥満およびインスリン抵抗性に関連するレプチンレセプター肥満遺伝子(*Lepr<sup>fa</sup>*)を導入した新規コンジェニックラットである。本研究では、遺伝的要因によりMSを自然発症するWBKDFラットに環境要因として糖質のフルクトースを負荷してヒトのMSに類似する動物モデルとしての妥当性を検討した。

### 【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】

#### 【研究目的】

実験動物を用いてMSモデルを作製する手段として高脂肪食(HFD)および高フルクトース食(FRD)の負荷が汎用される。本章では、WBKDFラットに負荷した高脂肪食あるいは高フルクトース食が肥満、脂質代謝および糖代謝に及ぼす影響を比較検討した。

#### 【材料および方法】

実験には日本SLC株式会社より入手した雄性WBKDFラットおよび雄性Wistarラットを使用した。WBKDFラットを標準食(STD)群、HFD群およびFRD群の3群(n=8/群)に分け、それぞれSTD

(CE-2)、HFD (45%脂肪) および FRD (60%フルクトース) を 7 週齢から 11 週齢までの 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 週齢までの 4 週間与えた。実験期間中に体重、血糖値および血中インスリン値の測定を週 1 回実施した。

#### 【結果】

実験開始前の WBKDF ラットの体重は Normal 群と比較して高かった ( $P<0.01$ )。WBKDF ラットに HFD または FRD を 4 週間負荷した後の体重は、いずれも STD 群に比べて高かった ( $P<0.01$ )。また、内臓脂肪重量も、HFD 群および FRD 群では STD 群よりも高かった ( $P<0.01$ )。血中脂質濃度は、WBKDF-STD 群の総コレステロール (T-Cho)、リン脂質 (PL) および中性脂肪 (TG) が Normal 群と比較して高く ( $P<0.01$ )、HFD 群および FRD 群の T-Cho および PL が STD 群よりも高かった ( $P<0.01$ )。

STD 群では 8 週齢より顕著な血糖値の増加がみられ、HFD 群の血糖値は STD 群よりもさらに高く推移したのに対し、FRD 群の血糖値は実験期間中を通じて STD 群よりも低かった ( $P<0.01$ )。血中インスリン値は 7 週齢の WBKDF ラットで Normal 群と比較して高値がみられ ( $P<0.01$ )、STD 群および HFD 群の血中インスリン値は 8 週齢から 11 週齢にかけて減少した。これに対して、FRD 群の血中インスリン値は 11 週齢まで Normal 群と比較して高値を推移した ( $P<0.01$ )。

#### 【結論】

WBKDF ラットにおいて HFD 負荷あるいは FRD 負荷はともに遺伝性の肥満および脂質異常症を増悪することが明らかとなった。しかし、高血糖に対して、HFD と FRD は異なるプロファイルを示し、HFD 負荷では血糖上昇を増幅したが、FRD 負荷は血糖上昇を軽度に抑制した。血中インスリン値は、HFD 負荷で STD 群と同様に週齢を経るにしたがい減少したが、FRD 負荷では高値を維持することが明らかとなった。

### 【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】

#### 【研究目的】

前章において、FRD 負荷は HFD 負荷と同様に WBKDF ラットの遺伝性肥満および脂質異常症を増悪するものの、HFD とは異なり高血糖を抑制することが明らかとなった。そこで本章では、WBKDF ラットに負荷した FRD が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。

#### 【材料および方法】

実験には雄性 WBKDF ラットおよび雄性 Wistar ラットを使用した。Wistar ラットおよび WBKDF ラットを、それぞれ STD 群および FRD 群の計 4 群 ( $n=8$  又は  $12/$ 群) に分け、それぞれ STD、FRD を 7 週齢から 11 週齢までの 4 週間与えた。静脈内糖負荷試験、膵臓の病理組織学的検査、肝臓中 TG の定量および肝臓の病理組織学的検査を行った。

## 【結果】

Wistar ラットでは、STD 群と FRD 群の間には体重および血糖値ともに差はみられなかった。第 1 章と同様に WBKDF ラットでは、FRD 負荷により食餌誘導性肥満が惹起されたものの、血糖値の上昇は顕著に抑制された。

Wistar ラットにおける糖負荷試験 (IVGTT) では FRD 負荷による軽度のインスリン分泌能の促進がみられた。また、WBKDF ラットでは、FRD 群において耐糖能およびインスリン分泌能の悪化の軽減がみられた。膵臓の病理組織学的検査では、FRD による影響は Wistar ラットでは見られなかったが、WBKDF ラットでは FRD 群で膵β細胞の面積の高値がみられた ( $P<0.01$ )。

一方、FRD 負荷により Wistar ラットでは血中 T-Cho が増加したにとどまったのに対して、WBKDF ラットでは血中 AST、ALT、T-Cho および PL が増加した。肝臓の病理組織学的検査より、Wistar ラットでは FRD 群で軽微な脂肪肝がみられた。WBKDF ラットの肝臓では、STD 群で軽度～中等度の脂肪肝、FRD 群で中等度～重度の脂肪肝がみられた。WBKDF ラットの肝臓中 TG 量は、FRD 群において STD 群と比較して高値を示した ( $P<0.01$ )。

## 【結論】

WBKDF ラットに FRD を負荷することにより、膵β細胞の破壊が軽減されたのに対して脂肪肝は増悪した。これらの成績は、WBKDF ラットにおける FRD による血糖の上昇の抑制ならびに血中インスリン値の減少の抑制は、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を示唆している。

## 【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】

### 【研究目的】

ヒトで抗 MS 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、MS 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、当該動物モデルの有用性を検証するためには、ヒトで抗 MS 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。そこで、本章では、FRD を負荷した WBKDF ラット (WBKDF-FRD ラット) を用いて、ヒトで抗 MS 作用の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。

### 【材料および方法】

雄性 WBKDF ラットに 6 週齢から FRD を負荷した。7 週齢の WBKDF ラットを対照群 (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 ( $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) の 3 群 ( $n=8/\text{群}$ ) に分け、7 週齢から 11 週齢までの 4 週間リラグルチドを 1 日 1 回皮下投与した。

### 【結果】

WBKDF ラットに FRD を負荷することにより、MS の特徴である耐糖能異常、肥満、脂質異常症に加え、軽度な高血圧ならびに脂肪肝が発症した。

リラグルチド投与群の体重、精巣集脂肪重量および腸間膜脂肪重量は、対照群と比較して低値を示した ( $P<0.01$ )。

対照群のラットは 11 週齢で軽度な高血糖 ( $333\pm 42$  mg/dL) を示したのに対して、リラグルチド投与群では、対照群と比較して低値がみられた ( $P<0.01$ )。

リラグルチド投与群の空腹時の血糖値および血中インスリン値は、対照群と比較して低値を示した ( $P<0.01$  または  $P<0.05$ )。高用量のリラグルチド投与群の血糖値 AUC は、対照群に対して低く ( $P<0.05$ )、耐糖能が改善された。高用量リラグルチド投与群の血中インスリン値 AUC は、対照群に対して高く (17%)、インスリン分泌能の改善を示した。また、インスリン抵抗性指標である 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 ( $P<0.05$ )。

また、リラグルチド投与群の収縮期血圧 (tail-cuff 法にて測定) 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。

さらに、血中 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 ( $P<0.01$ )。リラグルチド投与群の肝臓重量は、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肝がみられ、リラグルチド投与群で用量依存的な脂肪肝の改善がみられた。

#### 【結論】

WBKDF-FRD ラットはヒト MS 患者で見られると同様の耐糖能、内臓脂肪型肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝の症状を示した。これらの症状は、ヒト MS 患者で抗 MS 作用が報告されているリラグルチドを投与することで改善された。

#### 【総括】

本研究の成績より、WBKDF-FRD ラットはヒト MS 患者と類似する種々の病態を有するとともに、GLP-1 誘導体リラグルチドによる改善作用もヒト MS に類似することが明らかとなった。このように、WBKDF-FRD ラットはヒト MS の病態解明および治療薬開発の研究に有用である。

#### 【公表論文】

1. Namekawa, et al.: Effects of high-fat diet and fructose-rich diet on obesity, dyslipidemia and hyperglycemia in the WBN/Kob-*Lepr<sup>fa</sup>* rat, a new model of type 2 diabetes mellitus.  
*The Journal of Veterinary Medical Science*, 79: 988-991, 2017
2. Namekawa, et al.: 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.  
*The Journal of Veterinary Medical Science*, 80: 1515-1523, 2018

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 論文内容

本論文は、ヒトのメタボリックシンドローム（MS）の病態特性に類似するモデル動物の探索に関するものである。申請者は、遺伝要因により肥満、脂質異常症、2型糖尿病を自然発症する Wistar Bonn Kobori diabetic fatty (WBKDF, WBN/Kob-*Lepr<sup>fa/fa</sup>*) ラットに、環境要因として糖質のフルクトースを負荷して、ヒトの MS に類似するモデル動物としての妥当性を検討した。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 MS 患者でみられると同様の耐糖能異常、内臓脂肪型肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝の症状を示すことが明らかとなった。さらに、これらの症状は、ヒト MS 患者で抗 MS 作用が報告されているリラグルチドを投与することで改善されることが明らかとなった。以上の試験成績は、ヒト MS の病態解明および治療薬開発の研究に高フルクトース食を負荷した WBKDF ラット (WBKDF-FRD ラット) が有用であることを示す新しい知見である。

### 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 MS の病態解明および治療薬開発にはモデル動物を用いた実験が極めて有用と考えることから、ヒトの MS の病態に類似し、かつ、ヒトで有効性が確認されている既存薬でヒトと同様の治療効果がみられるモデル動物を確立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、MS 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、ヒトの MS の発症には過食等の遺伝要因に加えて、高糖質食などの食事の影響が大きいこと、とりわけコーンシロップなどで近年使用量が急増しているフルクトースの MS 発症への寄与が報告されていることに着目した。

#### 3) 研究の方法

申請者は WBKDF ラットに高フルクトース食を4週間負荷し、肥満、脂質代謝および糖代謝に対する影響を解析した。さらに、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 MS 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。

#### 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 ラットは高フルクトース食負荷によりヒトの MS に典型的な耐糖能異常、肥満、高血圧、脂質異常症および脂肪肝を発症した。②WBKDF-FRD

ラットでは、膵β細胞の障害進展が抑制されており、みられた耐糖能異常はヒトの MS と同様の軽度のものであった。③ヒトで報告されているリラグチドの抗 MS 作用が WBKDF-FRD ラットにおいても同様にみられた。

#### 5) 考察と結論

申請者は、ヒトと WBKDF-FRD ラットの病態およびリラグチドへの反応性が類似することから、WBKDF-FRD ラットはヒトの MS の病態解明および治療薬開発に有用なモデル動物であると考察した。また、高フルクトース食負荷でみられた高血糖の軽減は、膵β細胞の障害進展を抑制することによって示唆された。

#### 6) 引用論文

十分かつ適切に既報論文が必要な数だけ引用されていた。

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（学術）の学位を申請するに十分な価値があると判断した。