

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 12 年度 博士課程 入学

氏 名 高取 敦志

指導教官名 吉川 泰弘

論文題目 Establishment of medicinal treatments and safety assessment system using a diabetic model of hamster with its complication

(糖尿病合併症モデルハムスターを用いた薬物治療法および安全性評価系の確立)

高齢化社会を迎えて、生活習慣病の深刻さが指摘されている昨今、特に糖尿病はその患者数の急増および慢性長期化傾向による致命的な合併症増加のため、社会的問題となっている。糖尿病はその病態・発生機序の複雑さのため治療には多剤投与を行うことが多く、薬物の副作用に加え薬物相互作用による人体への悪影響が医療の現場で問題となっている。こうした疾病に対する安全で有効な治療法の開発には適切な動物モデルの開発研究、およびそれを用いた多剤投与による副作用予測を視野に入れた安全性評価が必要である。これまで糖尿病発症機序を解明する動物モデルとしては I 型および II 型いずれにおいても良いモデル系が開発されてきたが、合併症の動物モデルに関しては適した実験系は開発されてこなかった。また、糖尿病モデル動物を用いた糖尿病治療薬の詳細な安全性評価は未だに少ない。

APA 系シリアンハムスター (APA ハムスター) は糖尿病誘発剤であるストレプトゾトシン (SZ) を単回投与することで高血糖・高脂血症を誘発でき、さらにその病態を長期にわたり維持する系統である。これにより APA ハムスターは短期間で糖尿病性腎症および大動脈粥状動脈硬化症を発症

する。また、シリアンハムスターはヒトと同一の脂質代謝系モデル動物であることから、本モデルは糖尿病・高脂血症およびその合併症による代謝障害機構を解明するうえで格好のモデルである。本研究では、このモデルを用いて薬物投与による β 細胞再生機序を解明し、糖尿病が薬物代謝系に与える影響を明らかにすることを目的とした。本論文は2章(各章3節)から構成される。以下に各章の要約と意義を述べる。

第1章はSZ誘発糖尿病状態下におけるAPAハムスターの膵島 β 細胞の障害・再生機序について述べている。第1-1節では、膵島について機能的・組織化学的に検索を行い、本モデルがどのようなメカニズムで糖尿病状態を長期にわたって維持しているかを明らかにした。耐糖能試験の結果、糖尿病APAハムスターではグルコース反応性インスリン分泌はほとんどみられなかった。免疫組織化学的検索の結果、SZ投与後1、3、6ヶ月では多くの膵島で少数の空胞変性を示す細胞がみられ、それらの細胞はPAS染色で陽性を示した。また空胞変性を示す細胞は主に抗インスリン抗体に対して陽性であった。さらに空胞変性細胞の周辺ではPCNA陽性細胞が多くみられ、一方TUNEL陽性細胞はみられなかった。以上から、①膵島の β 細胞の再生が起こること、②しかし増殖した β 細胞は高血糖・高脂血症によるグリコーゲン沈着などのストレスによって持続的に変性・壊死に陥ること、③従ってインスリン分泌は低いレベルにとどまり、その結果6ヶ月以上糖尿病状態を維持したまま、インスリン治療なしに生存することを明らかにした。

第1-2節では、本モデルの膵島において病変の進展を促す因子を同定するために、糖尿病急性期および慢性期において抗酸化作用を持つ抗高脂血症薬であるプロブコール(PB)を投与し、その影響について検索した。耐糖能試験の結果、急性期の糖尿病APAハムスターにおいてPB投与により耐糖能異常の改善がみられた。免疫組織化学的検索の結果、急性期および慢性期においてPB投与によりインスリン陽性面積比に有意な増加がみられた。また、酸化ストレスマーカーである4HNE陽性細胞は急性期におけるPB投与によって減少する傾向がみられた。インスリンとPCNAの二重染色の結果、インスリン陽性細胞に占めるPCNA陽性細胞数の割合はPB投与糖尿

病 APA ハムスターの膵島において増加する傾向がみられた。半定量 RT-PCR 法による検索の結果、急性期および慢性期の糖尿病 APA ハムスターにおいて Reg (Regenerating gene) および INGAP (islet neogenesis associated protein) 遺伝子の発現量が対照群に比べ有意に増加した。また慢性期糖尿病における Reg 遺伝子の発現量は PB 投与により有意に減少していた。以上から、SZ 誘発糖尿病 APA ハムスターに対する PB 投与は膵臓におけるその抗酸化作用と Reg および INGAP 遺伝子の発現誘発により β 細胞機能を部分的に回復させることが示された。

第 1-2 節で得られた結果は PB のもつ抗酸化作用によるものであることが示唆されたので、第 1-3 節ではよく知られている抗酸化物質である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC)、aminoguanidine (AG) および pyridoxamine (PM) の投与による影響を検索した。血液生化学的検索および免疫組織化学的検索の結果、NAC および PM 投与において酸化ストレスマーカー値の軽減がみられた。耐糖能試験および免疫組織化学的検索の結果、NAC および PM 投与において糖尿病状態の顕著な改善、インスリン陽性面積比およびインスリン陽性細胞増殖率の有意な増加がみられた。このことから、抗酸化物質投与は β 細胞機能の回復に効果があり、それは β 細胞の再生を伴うことから、 β 細胞の再生・新生を促すことにより糖尿病を治療できる可能性が示され、本モデルは糖尿病治療薬のスクリーニングに有用なモデルであることが示された。

第 2 章では、薬物投与あるいは様々な病態によって機能が変化する薬物代謝機構のうち特に第 I 相で主に働くチトクロム P450 (P450) の糖尿病における発現の変化について述べている。第 2-1 節では、APA ハムスターにおいて P450 の肝臓における発現が加齢によって受ける影響について検索した。その結果、①ハムスターの P450 発現は加齢によりその発現量が増加すること、②分子種それぞれの肝小葉における局在がそれまで報告のあるラットなどとは異なることを明らかにした。

第 2-2 節では、APA ハムスターにおいて糖尿病による P450 発現量および局在性の変化を主に western blot および免疫組織化学法を用いて検索した。その結果、糖尿病状態において P450

発現量が増加すること、および糖尿病によって肝 P450 発現の局在性が変化することを初めて示した。中にはこれまでに報告されている他の動物における発現量の変化とは異なる結果を示した分子種もあった。このことは糖尿病状態下において薬物代謝能には正常時とは異なる変化があり、そのことが薬物投与による治療にも影響を与えることを示唆している。

薬物相互作用による副作用の多くは生体異物 (xenobiotics) の第 I 相代謝に働く P450 分子種の誘導または阻害によって起こることが知られている。糖尿病が P450 発現の薬物による誘導または阻害に対して影響を及ぼすかどうかを明らかにするため、第 2-3 節では P450 の誘導剤としてよく知られている薬物であるフェノバルビタール (Phe) とデキサメタゾン (Dex) を用いて P450 の主要な分子種である CYP2E1 および CYP3A の発現の糖尿病状態における変化を検索した。HPLC、western blot 法および RT-PCR 法を用いて活性、タンパク発現量および mRNA 発現量を検索した結果、対照群と糖尿病群では CYP2E1 および CYP3A の発現誘導が異なることを明らかにした。特に糖尿病 Phe 投与群における CYP2E1 発現において、mRNA および活性の増加はみられるにもかかわらずタンパクの増加がみられないことや Dex による CYP3A 活性の増加は mRNA およびタンパクの発現増加を伴わないことを初めて示した。これらの結果は、糖尿病状態における P450 発現制御は正常状態とは異なり、糖尿病治療薬の有効性および安全性評価は適切な糖尿病モデルを用いて詳しく行う必要があることを示している。

上記の通り、本論文は糖尿病合併症モデル動物として用いられてきた SZ 誘発糖尿病 APA ハムスターが糖尿病治療薬のスクリーニングおよび安全性評価系に有用であることを示した。生活習慣病に代表されるような、多剤投与が必要とされる疾病が増加する中、安全で有効な治療法の開発には適切な動物モデルの開発研究およびそれを用いた多剤投与による副作用予測を視野に入れた安全性評価が必要である。本論文は今後の糖尿病治療薬の詳細な安全性評価系の確立に有益な情報を提供した。今後、さらに P450 発現制御のメカニズムを明らかにすることにより、医療の現場で問題となっている薬物相互作用の解決につながると考えられる。