

## 審査の結果の要旨

氏名 唐澤博史

現代のライフスタイルは、慢性的なエネルギー過剰により肥満を発症させインスリン抵抗性を惹起する。さらに、膵β細胞のインスリン分泌機能が異常を来すことにより、インスリン抵抗性状態から2型糖尿病に移行するが、この過程には個人差及び民族差が大きく、膵β細胞の耐性は主に遺伝因子によって規定される。2型糖尿病の研究には優れた動物モデルが必要である。これまでに、ヒトの2型糖尿病に病因・病態の類似したモデルとして、C57BL/6 (B6) 正常マウスに高脂肪食を与えて肥満を誘導した食事誘導性モデルが報告されているが、その病態は肥満及びインスリン抵抗性病態にとどまっており、2型糖尿病の発症には至っていない。

B6マウスは、代表的な正常マウス系統として汎用されているが、本系統は膵β細胞の耐性が強い遺伝的背景を持つため、2型糖尿病モデルとしては不向きである。一方、C57BLKs (BKs) やDBA/2は膵β細胞の耐性が弱い遺伝的背景を持つことが示唆されている。マウス系統における糖尿病発症の違いが遺伝的に規定された膵β細胞の耐性の差に起因するとすれば、BKsやDBA/2マウスは高脂肪食負荷による食餌性肥満の誘導により糖尿病を発症し、優れた2型糖尿病マウスモデルになることが期待される。唐澤は、理想的な2型糖尿病マウスモデルの確立には、膵β細胞が脆弱な遺伝的背景を持つマウスにおいて、重度の肥満を誘導することによりインスリン抵抗性状態から2型糖尿病発症に至らしめることが重要である、と考えた。本研究で唐澤は、2つの異なる手法を用いて従来モデルの問題点を克服し、正常マウスが肥満から糖尿病を発症する2型糖尿病マウスモデルを確立した。さらに、確立した2型糖尿病マウスモデルを用いて、膵β細胞機能異常と糖尿病発症にかかわる原因遺伝子を探索し、候補遺伝子を同定した。以下にその結果を述べる。

1. 高脂肪食負荷 BDF1 マウス 2型糖尿病マウスモデル： B6マウスは高脂肪食負荷によって著しい肥満を発症するが、膵β細胞の耐性が強く糖尿病を発症しない。一方、DBA/2マウスは膵β細胞の耐性が弱いが高脂肪食負荷によって十分に肥満しない。本研究で唐澤は、両マウス系統の交配により、高脂肪食負荷により肥満する形質と膵β細胞の耐性が弱く肥満糖尿病を発症しやすい形質とを両立させることで、2型糖尿病モデルの確立を試みた。B6マウスとDBA/2マウスのF1雑種であるBDF1マウス(雄性)に、通常食または高脂肪食を与えて肥満と糖尿病の発症を検討した。高脂肪食を与えたBDF1マウスは、著明な体重増加と脂肪蓄積を呈する肥満を形成した後に、著しい高血糖と糖尿、及びHbA<sub>1c</sub>上昇を呈する糖尿病を発症した。血漿インスリン濃度も上昇しインスリン抵抗性を示した。これらのマウスは経口糖負荷試験において著しい耐糖能異常を示すとともに、糖負荷直後のインスリン

分泌応答不全を呈した。膵ランゲルハンス島のインスリン含量も低下していた。これらの結果から唐澤は、BDF1 マウスは B6 マウスの肥満しやすい形質と DBA/2 マウスの膵  $\beta$  細胞が脆弱な形質を併せ持つことにより、高脂肪食負荷により肥満糖尿病を発症することを示した。本モデルは、病的には正常動物が高脂肪食によって肥満から糖尿病を発症する点で、またインスリン抵抗性から  $\beta$  細胞機能異常により糖尿病を発症する点で、ヒトの 2 型糖尿病に類似していると考えられた。従って本モデルは、2 型糖尿病の発症メカニズムの解明およびその治療薬の薬効評価に有用と期待される。

GTG 処置過食肥満マウス 2 型糖尿病マウスモデル： DBA/2 マウスや BKs マウスは膵  $\beta$  細胞が脆弱な遺伝的背景を持ち、肥満から 2 型糖尿病に移行しやすいと考えられるが、高脂肪食負荷による肥満誘導には抵抗性を示す。唐澤は、満腹中枢の存在する視床下部内側核のグルコース受容ニューロンを選択的に破壊する事により過食肥満を誘導し、2 型糖尿病マウスモデルの確立を試みた。雄性の B6、DBA/2、BKs、及び BDF1 マウス各系統のグルコース受容ニューロン選択的破壊マウスは、いずれも過食性の肥満を呈し、対照群に対する体重増加および体脂肪率の上昇は 4 系統でほぼ同様であった。このとき、DBA/2、BKs、及び BDF1 系統の GTG 処置マウスは、体重増加に伴って著しい血糖値上昇を示す糖尿病を発症した。これらの結果から、膵  $\beta$  細胞の耐性が弱い遺伝的背景を持ち、肥満から糖尿病に移行しやすいと考えられた DBA/2 マウスおよび BKs マウスが、過食による肥満誘導によって肥満糖尿病を発症することが示された。また、第 2 章にて同様の形質が示唆された BDF1 マウスも糖尿病を発症した。糖尿病を発症した 3 系統では、糖負荷試験におけるインスリン分泌低下と、膵ランゲルハンス島のインスリン含量低下が認められ、膵  $\beta$  細胞の機能不全が肥満糖尿病の発症の重要な原因と示唆された。なお、本検討では通常食において糖尿病を発症したことから、膵  $\beta$  細胞の機能不全の原因は脂質の過剰摂取による代謝異常ではなく、肥満とインスリン抵抗性によることが示唆される。本モデルの病態はヒトの 2 型糖尿病に類似していると考えられ、2 型糖尿病の発症メカニズムの解明および、その治療薬の薬効評価に有用と期待される。

DNA マイクロアレイを用いた Raldh3 の同定と機能解析： 高脂肪食負荷 BDF1 マウスで発症した糖尿病は、膵  $\beta$  細胞の機能異常に基づくと考えられる。唐澤は、DNA マイクロアレイを用いて膵ランゲルハンス島の遺伝子発現解析を行い、肥満糖尿病で特異的に発現の上昇する遺伝子として Retinaldehyde dehydrogenase 3 (Raldh3) を同定した。Raldh3 はレチナールからレチノイン酸への変換を触媒する酵素であり、レチノイン酸合成組織で発現が認められるものの、その生理的機能は不明な部分が多い。高脂肪食負荷によって糖尿病を発症した BDF1 マウスの膵島における Raldh3 の発現レベルは、通常食を与えた対照と比較して約 7 倍に上昇していた。また、遺伝的糖尿病モデルである *db/db* マウスの膵島においても、糖尿病の発症前後で約 20 倍の著しい Raldh3 発現上昇が認められた。また、膵  $\beta$  細胞と  $\alpha$  細胞に由来する MIN6 細胞と alphaTC1 clone 9 細胞を、高血糖を模した高グルコース条件

で培養すると、いずれの細胞でも Raldh3 発現が著しく亢進したことから、Raldh3 は高血糖条件下において、膵  $\beta$  細胞と  $\alpha$  細胞で発現が亢進することが示唆された。MIN6 細胞と alphaTC1 clone 9 細胞に Raldh3 を強制発現させた結果、MIN6 細胞からのインスリン分泌が低下する一方で、alphaTC1 clone 9 細胞からのグルカゴン分泌が増加し、Raldh3 がインスリン分泌を抑制しかつ、抗インスリンホルモンであるグルカゴンの分泌を亢進させることにより糖代謝を悪化させる可能性が示唆された。

以上のように唐澤は本研究において、高脂肪食で肥満しやすい B6 マウスとの交配、及び視床下部の満腹中枢を破壊する薬物の使用、の 2 種類の手法により、正常マウスが肥満から糖尿病を発症する新しい 2 型糖尿病マウスモデルを確立した。さらに、高脂肪食負荷 BDF1 マウスの膵ランゲルハンス島を用いた網羅的遺伝子解析により、2 型糖尿病発症の関連遺伝子として、Raldh3 を同定し、その機能の一部を明らかにした。これらは、膵  $\beta$  細胞の機能異常や 2 型糖尿病の発症メカニズムの解明に寄与するとともに、肥満および 2 型糖尿病の新たな治療法の開発に貢献するものと期待される。従って、本研究は、博士（薬学）に充分値するものと判断した。