

【22】

氏 名	平 尾 潤
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第787号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (内科学（腎臓・高血圧）)
学位論文題目	V-ATPase blockade reduces renal gluconeogenesis and improves insulin secretion in type 2 diabetic rats (V-ATPase阻害は、2型糖尿病ラットの腎糖新生を減少させ、インスリン分泌を改善させる。)
論文審査委員	(主査) 教授 麻 生 好 正 (副査) 教授 白 瀧 博 通 教授 杉 本 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

Vacuolar type H⁺-ATPase (V-ATPase) は、酸塩基平衡、エンドサイトーシスとリソソーム酵素の活性化、受容体とチャネルの膜再循環、破骨細胞の活性化や癌転移に重要な役割をしている。糖新生は肝臓と腎臓でのみなされ、特に腎糖新生はアシドーシスと飢餓によって増強され、飢餓状態での血糖維持に重要である。1型糖尿病ラットでbafilomycin (BFM) によるV-ATPaseの抑制により近位尿細管でphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の発現と活性を低下させ、腎細胞質のグルコースを低下させた。またV-ATPaseは、小胞内のプレホルモンの処理と分泌に関与している。

【目 的】

本研究では、2型糖尿病 (T2DM) ラットにBFMを投与し、V-ATPase阻害が腎糖新生の抑制とインスリン分泌に影響し、血糖を改善するかを検討した。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て施行した (17-918)。

自然糖尿病鳥居 (Spontaneously diabetic Torii : SDT) ラット (オス18匹) は18~24週齢で血糖値200mg/dLを超え2型糖尿病を発症した (T2DMラット)。T2DMラット9匹をBFM B1 (100 nmol/kg/day腹腔内) で治療した (T2DM+BFMラット)。年齢を一致させたSprague-Dawleyラット9匹を対照群とした。自由飲水摂食下で、0日目 (D0) と6日目 (D6) に代謝ケージを使用して24時間尿と血液サンプルを採取し、7日目 (D7) に飢餓下で、代謝ケージで24時間蓄尿した。1.5%イソフルラン吸入

液で麻酔し、内頸動脈カテーテルを留置して血圧を測定した。頸静脈カテーテルから採血後、グルコース (0.7 g/kg体重) と速効型インスリン (0.175 ユニット/kg体重) を静注してインスリン負荷試験 (ITT) を行った。10% イソフルラン吸入で安楽死させ、腎臓、肝臓、膵臓を取り出し、Western blotおよび免疫組織染色、電子顕微鏡による観察を行なった。腎臓のグルコース代謝のプロテオミクス分析を飛行時間型質量分析法 (TOF-MS) で行った。血糖、HbA1c、ラットインスリン、アンモニウムを測定した。グループ間の比較には、Steel-Dwass事後検定を使用したKruskal-Wallis分析を使用した。静脈内ITTの血糖値は、反復測定分散分析によって解析し、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

【結 果】

血糖値は摂食下 (D6) ではT2DMラットとT2DM+BFMラットの間で有意差はなかった。しかし、24時間飢餓下 (D7) ではT2DM+BFMラットでT2DMラットと比較して血糖が有意に低下した。近位尿細管の刷子縁膜に局在するV-ATPaseの発現は、対照ラットに比較してT2DMラットで増加していた。T2DM+BFMラットではV-ATPaseの発現が減少し、尿中アンモニウム排泄が減少したが、血漿アンモニアレベルには有意な変化はなかった。24時間飢餓後、対照腎臓と比較してT2DMの腎臓でアンモニア生成酵素と糖新生酵素が増加した。T2DM+BFMラットでは、T2DMラットと比較して腎臓のTCA回路と糖新生酵素が減少した。ミトコンドリア電子伝達系に關与する酵素は、T2DMラットの腎臓で増加し、ATP合成の増強を示した。BFM治療によりミトコンドリア電子伝達系酵素の腎臓発現が低下した。複合体IVの免疫染色反応と電子顕微鏡観察による近位尿細管のミトコンドリアサイズは、T2DMラットで対照ラットに比べ増加し、BFM治療で減少した。T2DMラットの肝臓は、オイルレッド染色で脂質の蓄積を示した。BFM治療により肝臓の脂質蓄積を対照レベルまで減少した。ランゲルハンス島細胞はV-ATPaseを発現し、その免疫反応性は対照ラットよりもT2DMラットで強かった。インスリン顆粒の数は、対照ラットと比較してT2DMラットで減少した。BFM治療は、膵島細胞のV-ATPase免疫反応性を低下させ、インスリン顆粒は保存された。インスリン感受性は、対照ラットと比較してT2DMラットで減少し、BFM治療はインスリン感受性を回復させた。

【考 察】

腎糖新生は飢餓下での総糖新生の約40%に寄与しているが、本研究ではBFMが腎糖新生を抑制し、摂食下ではなく絶食下で血糖を低下することを明らかにした。T2DMラットで増加していたTCA回路とミトコンドリアの電子伝達系酵素は、BFMによって抑制された。肝臓での糖新生はコルチゾール、グルカゴン、アドレナリンで増加し、インスリンで抑制されるのに対し、腎臓での糖新生はアシドーシスと飢餓で増加する。24時間絶食下で増加した腎糖新生酵素は尿細管小胞内pH4以下で活性が高くなるので、BFMで小胞のV-ATPaseを抑制すると小胞内pHが上昇し、糖新生酵素の活性が抑制される。またミトコンドリアの電子伝達系は H^+ 勾配によりATPを産生するが、BFMにより H^+ 勾配が減少し、エネルギー代謝が抑制される。さらに、インスリン分泌は膵臓 β 細胞の小胞内V-ATPaseによるpH調節によりインスリンを分泌しており、BFMにより糖尿病におけるインスリンの減少が抑制された。さらに、インスリンの感受性もBFMにより改善した。これらのBFMの効果で、2型糖尿病ラットの血糖が、絶食下で有意に改善したと考えられる。本研究にはBFMによ

る低血糖や長期的な副作用など解明すべき点が残っている。BFMの投与量は、ストレプトゾトシン誘発1型糖尿病ラットでの実験に基づいて決定したため2型糖尿病ラットでは多すぎた可能性がある。BFM投与で食物摂取量の減少を来したが、BFMの腹腔内注射による腸管損傷や腸管直接作用の可能性も考えられる。しかし、腎糖新生酵素やミトコンドリアのTCA回路酵素、電子伝達系の抑制は、食物摂取量の減少だけでは説明できない。BFMの血糖降下作用は、腎臓または膵臓に特異的なV-ATPaseの阻害を標的とした新たな糖尿病の治療戦略として、今後の展開が期待される。

【結 論】

BafilomycinによるV-ATPaseの阻害は、腎糖新生酵素を阻害し、膵臓のインスリン分泌を改善し、24時間絶食後の血糖値の低下をもたらした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

Vacuolar type H⁺-ATPase (V-ATPase) は、酸塩基平衡、エンドサイトーシスとリソソーム酵素の活性化、受容体とチャネルの膜再循環、破骨細胞の活性化と癌転移に重要な役割をしている。腎臓の糖新生はアシドーシスと飢餓によって増強され、腎臓は飢餓状態で血糖を維持する上で重要な役割を果たす。小胞内のプレホルモンの処理と血中への分泌を行っており、実際にインスリン放出にはV-ATPase活性が必要であることが示されている。

本研究では、2型糖尿病モデルラットにバフィロマイシンを投与し、V-ATPaseの阻害が腎糖新生の阻害だけでなく、インスリン分泌とインスリン感受性の影響によっても血糖を改善するかを検討した。

雄性自然発症2型糖尿病鳥居 (Spontaneously diabetic Torii : SDT) ラットにバフィロマイシンを1週間腹腔内注射にて投与し、代謝ケージにて24時間絶食下で蓄尿した後、腎臓、肝臓、膵臓を蛋白質質量分析および形態学的研究のために摘出し、それぞれ調べた。

V-ATPaseの腎臓での発現と活性は、コントロールに比べ2型糖尿病ラットの近位尿細管の刷子縁膜で増加した。バフィロマイシンによるV-ATPaseの抑制により、2型糖尿病ラットで増加していた腎V-ATPase活性と尿中アンモニウムが減少した。また、バフィロマイシンによる治療は、2型糖尿病ラットで増加していた腎糖新生酵素とミトコンドリア電子伝達系酵素を抑制し、腎細胞質内グルコースレベルを低下させた。インスリン分泌指数と膵臓インスリン顆粒は、膵島細胞でのV-ATPase発現の増加とともに2型糖尿病ラットで減少し、バフィロマイシンによる治療はこれらの変化に拮抗し、インスリン分泌指数を増加させた。2型糖尿病ラットの脂肪肝は、バフィロマイシンによって改善された。結果として、バフィロマイシンによる治療は、2型糖尿病ラットの24時間絶食後の血漿グルコースレベルを有意に低下させた。

結論として、V-ATPase阻害薬のバフィロマイシンは腎糖新生およびミトコンドリア代謝を阻害し、インスリン分泌や脂肪肝を改善することにより、2型糖尿病ラットの血漿グルコースレベルを改善した。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、雄性SDTラットを対象とし、指針に

従って行われた。

実験の全ての手順は獨協医科大学での動物実験ガイドラインに従って実施された。得られたデータは客観的に統計解析されており、その方法も適切であり、本研究の方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

V-ATPaseは骨粗鬆症や癌細胞の転移・増殖に関与しており、V-ATPase阻害薬は骨粗鬆症や癌治療薬として期待されているが、本研究でV-ATPase阻害薬のバフィロマイシンによる血糖低下作用を認め、腎臓の糖新生の制御という全く新しい機序の糖尿病治療薬となりうることを示した。さらにバフィロマイシンが脂肪肝やインスリン分泌を改善することを明らかにしており、V-ATPase阻害薬の血糖低下作用に着目し、新たな糖尿病治療薬として期待される点が新奇性・独創性に優れており臨床での応用も期待できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、V-ATPase阻害薬は2型糖尿病において腎糖新生およびミトコンドリアエネルギー代謝を抑制し、脂肪肝・膵インスリン分泌を改善する新たな糖尿病治療薬として期待されることを結論としている。この結論は糖尿病の生化学的機序や病態生理において認められる所見にも矛盾がなく、妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、V-ATPase阻害薬の2型糖尿病ラットにおける血糖降下作用について検討がなされている。糖尿病治療薬は多くの薬が開発されているが、新規作用機序の糖尿病治療薬として期待される報告であり、当該分野において意義のある研究である。V-ATPase阻害薬のヒトにおける作用や細胞内シグナル伝達メカニズムの解明、特異的に腎臓・膵臓のV-ATPaseを阻害する研究などが必要であるが、新規の糖尿病治療薬として期待される。

【申請者の研究能力】

申請者は腎臓病学に関し幅広い学識を有しており、V-ATPaseを阻害することにより血糖低下作用を得られる新たな糖尿病治療薬が期待される研究に着手している。データの収集方法やその統計学的解析・評価も適切であり、そこから得られる情報に関し適切な考察を行い意義のある結論を出している。よって、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は、2型糖尿病モデルラットにおいて新たな作用機序から新規の糖尿病治療薬の可能性を検討した点で独創的かつ優れた研究内容であり、今後の糖尿病治療薬開発に有用かつ当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判断した。

（主論文公表誌）

Hypertension Research

(43 : 1079-1088, 2020)