

	なかのりょうすけ
氏名（本籍地）	中野亮介
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生第6号
学位授与年月日	平成18年11月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
最終学歴	平成8年3月26日 東北大学大学院理学研究科（化学第二専攻） 博士課程前期2年の課程修了
博士論文題目	Effects of synthetic peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands on fat, liver, and kidney in diabetic rodents. (合成 peroxisome proliferator-activated receptor γ リガンドの糖尿病モデル動物の脂肪, 肝臓および腎臓に対する作用)
論文審査委員	(主査) 教授 清水 透 教授 十川 和博 教授 水野 健作

論文内容の要旨

第1章：緒言

糖尿病は慢性的な高血糖を特徴とする代謝性疾患である。糖尿病は単一の疾患ではなく、種々の遺伝因子と種々の環境因子により、血糖低下ホルモンであるインスリンの作用が不足することにより発症する。糖尿病はその成因から、1型糖尿病、2型糖尿病に大きく分類される。1型糖尿病は多くの場合、インスリン産生臓器である膵臓β細胞が自己免疫により破壊され、結果としてインスリン分泌不全に陥り発症する。一方、2型糖尿病は全糖尿病患者の9割を占め、膵臓β細胞からのインスリンの分泌不全と各組織でのインスリン抵抗性を基本的な病態とする。

2型糖尿病は近年、全世界で急増しており、各国での主要な死亡原因になりつつある。このような世界的規模での糖尿病患者の急増は、各国の医療経済に対し大きな負担となるため、今後の予防策および治療法の確立が急務となっている。

2型糖尿病は遺伝的要因と環境的要因の複合により発症する。膵臓β細胞のインスリン分泌不全は主に遺伝的要因によるものである。環境要因としては肥満、過食および運動不足などが挙げられる。これらの環境要因はインスリンの標的臓器である脂肪、筋肉そして肝臓でのインスリン抵抗性を引き起こす。遺伝的要因による膵臓β細胞からのインスリン分泌低下と環境要因による各組織でのインスリン抵抗性が複合することで、インスリンの作用不足が引き起こされる。インスリンの作用不足が継続し慢性高血糖状態に至る。これが2型糖尿病発症の基本的メカニズムである。

薬剤による2型糖尿病の治療のアプローチとしては、インスリン抵抗性の解除と膵臓β細胞からのインスリン分泌促進を行うという2通りの方法がある。インスリン抵抗性を解除する主要な薬剤としては、チアゾリジン誘導体(TZDs)やビッグアニド剤といった薬剤が挙げられる。

TZDsはインスリン抵抗性を解除する薬剤として新規に開発された経口血糖低下薬である。このTZDsの標的分子は当初不明であった。1990年にIssemannらのグループにより Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)と名づけられた新規のステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する受容体が見出された。その後、PPARのサブタイプの1つであるPPAR γ がTZDsの標的分子であることが判明した。

PPAR γ はリガンド依存的に活性化される転写調節因子である。これまでの研究からPPAR γ は生体内での脂質代謝および糖代謝に関与していると考えられている。PPAR γ の発現は脂肪組織がもっとも高く、骨格筋や肝臓にもある程度発現が認められる。TZDsはPPAR γ に直接結合し転写能の活性化することが知られている。このTZDsによるPPAR γ 活性化能は糖尿病モデルマウスの血糖低下作用と相関することが報告され

ている。しかしながら、PPAR γ の糖代謝などにおける生理学的な役割については未だ明らかになっていない。

このような PPAR γ の生理的役割を解明する手法の1つとして PPAR γ の合成リガンドをマウスなどの動物に投与することが挙げられる。本研究は PPAR γ のアンタゴニスト、アゴニストを糖尿病モデル動物に投与し、その作用を調べることで PPAR γ の生理的役割を解明することを目的とした。

GW9662は PPAR γ のアンタゴニストである。これまでに GW9662を用いた *in vivo*の検討はなされていなかった。本研究では PPAR γ の生体内での役割解明を目的として、高脂肪食を負荷した肥満糖尿病モデルマウスに対し GW9662を投与し、解析を行った(第2章)。

一方、YM440はオキサゾリジン誘導体であり、PPAR γ のリガンドである。YM440はTZDsに比べ、特有の性質を *in vitro*, *in vivo*において有することが既に認められている。しかしながら、YM440の標的臓器については明らかになっていない。本研究ではグルコースクランプ法を用いて、YM440の標的臓器を検討した(第3章)。

糖尿病態では脂質代謝異常が認められる。また、糖尿病合併症の1つである腎症の発症・進展には高脂血症が関与していることも報告されている。本研究ではYM440が脂質代謝異常および腎症の発症・進展にどのように影響を与えるかを検討した(第4章)。

第2章：GW9662の高脂肪食負荷マウスの肥満に対する影響

PPAR γ は肥満とインスリン感受性に重要な働きをしていることが知られている。合成リガンドを用いた PPAR γ の拮抗作用については *in vivo*での検討はこれまでほとんどなされていない。本研究では合成 PPAR γ のフルアンタゴニストである GW9662を高脂肪食負荷マウスに投与し、肥満および糖代謝に対する影響を調べた。

まず、*in vitro*の検討では GW9662の PPAR γ への高い結合能が確認されたが、転写活性化能は全く認められなかった。さらに TZDs である Rosiglitazone による脂肪細胞分化促進を阻害することが確認された。以上の *in vitro* 評価結果から、GW9662はアンタゴニストとしての性質を有していることが確認された。

*in vivo*においては GW9662を投与した高脂肪食負荷マウスでは摂餌量に影響を与えることなく、体重の増加が抑制された。GW9662投与マウスの内臓脂肪重量が低下していたことから、PPAR γ アンタゴニストの投与は高脂肪食による肥満を抑制することが示唆された。

第3章：YM440の Zucker fatty rat の肝臓インスリン抵抗性に対する作用

新規経口血糖低下薬である YM440は PPAR γ のリガンドである。YM440は既存の TZDs とは異なる薬理作用を有することがこれまでの *in vitro*, *in vivo*の検討から示されている。しかしながら、YM440が肝臓お

よび末梢組織に対し、どのような作用を有するかについては不明であった。本研究では糖尿病モデルラットである Zucker fatty (ZF) ラットの肝臓と末梢組織（脂肪、筋肉）のインスリン感受性に対する YM440 の効果をグルコースクランプ法を用いて検討した。YM440 を 300 mg/kg/day の用量で 2 週間反復経口投与したところ、高血糖と高インスリン血症の有意な改善が認められた。また、グルコースクランプ試験において肝臓のインスリン感受性の指標である hepatic glucose production (HGP) が改善していることが観察された。一方、末梢組織でのインスリン感受性の指標である glucose disposal rate (GDR) の変化は観察されなかった。これらの結果から YM440 は主に肝臓のインスリン抵抗性を改善し、末梢組織のインスリン抵抗性には作用を示さないという既存の TZDs とは異なる性質を有することが示唆された。

第 4 章：YM440 の Zucker fatty rat の高脂血症および腎症に対する作用

YM440 は第 3 章で示したように肝臓のインスリン抵抗性に効果を示す。肝臓のインスリン抵抗性は糖尿病態の高脂血症の原因である。また、高脂血症は腎障害発症のリスクファクターである。本研究では YM440 の長期投与による ZF ラットの高脂血症および腎障害への作用について検討した。Zucker fatty rat に YM440 を 100 mg/kg/day の用量で 16 週間連投した。YM440 連投により、Zucker fatty rat の血漿中トリグリセリド濃度が有意に低下した。また、YM440 はアルブミン尿およびタンパク尿の進展を著しく低下させた。尿細管上皮細胞の障害の程度を反映する尿中 NAG 活性は YM440 投与により正常レベルまで低下していた。また、対照群で認められた腎臓の肥大も YM440 投与により抑制された。血漿中トリグリセリド濃度と尿パラメータ（尿中タンパク濃度およびアルブミン濃度）について回帰分析を行ったところ、有意な正の相関が認められた。本検討から YM440 は高脂血症の進展を予防し、腎障害の発生を抑制していることが示唆された。YM440 は糖尿病患者の血糖管理のみならず、高脂血症および腎障害の予防に対しても有用であることが示唆された。

第 5 章：総括

5.1. GW9662 の作用

PPAR γ は脂肪、肝臓、筋肉でのインスリン感受性に関与し、生体内での糖・脂質代謝に重要な働きをしていると考えられている。特に脂肪組織のインスリン感受性および肥大において中心的な役割を果たしていると考えられている。PPAR γ アンタゴニストである GW9662 の *in vivo* での結果から、(1) PPAR γ は高脂肪食負荷による脂肪組織の肥大に中心的な役割を果たしていることが、合成アンタゴニストを用いた検討によっても確認された、(2) PPAR γ の拮抗は耐糖能の悪化を引き起こさないことが示された、(3) PPAR γ アンタゴニストが肥満の予防および治療薬になる可能性が示唆された。

5.2. YM440 の作用

ZF ラットに対する YM440 の作用の検討結果から,(1) YM440 は肝臓のインスリン抵抗性を改善する,(2) YM440 は高脂血症を改善する,(3) YM440 は直接または間接的に腎臓に働き腎障害の進展を抑制することが示された。これらの結果から, YM440 は糖尿病患者の血糖コントロールだけでなく腎症発症も抑制し得る薬剤であることが示唆された。

以上のように、2 種の合成 PPAR γ リガンドを糖尿病モデル動物に使用することで、PPAR γ が脂肪、肝臓および腎臓において重要な役割を果たしていることが確認された。

論文審査結果の要旨

2 型糖尿病の新規な治療薬として、チアゾリジン誘導体 (TZD) が近年注目されている。Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) と名づけられた、新規のステロイドホルモン受容体ファミリーに属する核内受容体のサブタイプである PPAR γ が、TZD の標的分子であることが知られている。

PPAR γ はリガンド依存的に活性化される転写調節因子である。これまでの研究から PPAR γ は生体内の糖・脂質代謝に関与していると考えられている。しかし、PPAR γ の生理的な役割の詳細については明らかになっていない。本研究では PPAR γ の各臓器での生理的役割を解明することを目的とし、PPAR γ のアンタゴニスト及びアゴニストを糖尿病モデル動物に投与し、その作用について検討した。

第二章で用いた GW9662 は PPAR γ のアンタゴニストである。GW9662 を含め、PPAR γ アンタゴニストを用いた *in vivo* の検討報告はこれまでなされていない。第二章では高脂肪食負荷マウスに GW9662 を投与し、脂肪組織に対する作用を検討した。検討の結果、GW9662 が高脂肪食負荷による肥満を抑制し、糖代謝を悪化させない、という新たな知見を得ることに成功している。

第三章および四章で用いた YM440 は、新規なオキサゾリジン誘導体であり、PPAR γ アゴニストとして血糖低下作用を有することが認められている。しかし、YM440 の標的臓器は、これまで不明であった。第三章では YM440 を連投した糖尿病ラットに対し、グルコースクランプ法を用いて、YM440 の標的臓器の検討を行った。検討の結果、YM440 の標的臓器が肝臓であり、末梢組織（脂肪・筋肉）に対する作用が小さいことを見出している。この結果は YM440 が既存の TZD とは作用機序の違いを示す新規な発見である。

第四章では糖尿病ラットでの脂質代謝異常および腎症の発症・進展に対する、YM440 の作用を検討した。検討の結果、YM440 が血糖低下だけでなく、高脂血症および糖尿病性腎症の改善に有効であることを新たに見出している。

以上の結果は、糖・脂質代謝における PPAR γ の生理的役割の解明に貢献するものであり、著者が自立して研究活動を行うに必要な能力を有することを示している。従って中野亮介提出の博士論文は博士（生命科学）の学位論文として合格と認める。