

Characterization of novel diabetic rat model (Diabetes with  
Enlarged Kidney: DEK) and studies on the role of the kidney in  
onset and progression of diabetes

(新規糖尿病モデルラット(DEK)の表現型の解析および糖尿病の発症と進行  
における腎臓の役割に関する研究)

Summary of Doctoral Thesis

Ayaka Domon

Graduate School of Veterinary Medicine and Life Science

Nippon Veterinary and Life Science University

## 要約

筆者らは胸腺低形成を伴う矮小症(*petit*)を呈するラット系統(PET)の原因遺伝子(*pet*)を LEA 系統に導入した LEA-PET-*pet* コンジェニック系統の中から、重篤な高血糖および多飲多尿などの糖尿病病態を示す雄ラットを 2016 年に発見した。この雄ラットを創始個体とした兄妹交配から、本糖尿病は遺伝形質であることが示された。また、PET 系統では糖尿病が認められないことから、本ラットが呈する糖尿病は *pet* 遺伝子とは独立して遺伝的に自然発症すると考えられた。さらに、糖尿病を発症するラットは一貫して、腎臓サイズの増加を示すため、筆者らは本ラットを Diabetes with Enlarged Kidney (DEK) と命名し、新規糖尿病ラットモデルとして系統化を行った。

第 1 章では糖尿病に関する基本的な情報、近年の動向、および代表的な糖尿病モデル動物について示されている。多くの糖尿病患者が分類される 2 型糖尿病では、インスリン抵抗性やインスリン不足によって高血糖が生じる点は共通しているが、背景にある患者の生活習慣や病因はそれぞれ異なる。そのため、画一的な治療法には限界がある。この問題に対して、作用の異なる糖尿病治療薬が多く開発されているだけでなく、種々の要因に基づく異なった病態の糖尿病モデル動物が作出されている。近年上市された SGLT2 阻害剤の普及は、腎臓が糖代謝において担う役割の重要性への再認識を促した。すなわち、腎臓は高血糖によって単に障害される臓器ではなく、糖尿病の発症に関連する臓器として考慮する必要がある。ここでまとめた糖尿病研究の動向や、既存のモデル動物の情報を踏まえ、本博士論文では DEK ラットの新規糖尿病モデル動物としての有用性について考察した。

第 2 章では、DEK ラットの発見と系統化、基本的な表現型と遺伝的特性についてまとめられている。DEK ラットは雄でのみ多因子遺伝の遺伝様式によって伝達される非肥満型 2 型糖尿病を発症することが示された。糖尿病を発症してから 15 週間以上経過したラットは全て、高血糖と多飲多尿の他に著しくサイズの増大した腎臓を有していた。糖尿病を発症した DEK(DEK-DM)では、加齢とともに進行性の著しい腎肥大と尿細管の拡張、および尿細管間質の線維化を呈する一方、糸球体の構造や、血中クレアチニン、電解質の値は正常な DEK ラット(DEK-cont)と差がないことから、発症個体の腎機能は概ね正常に保たれていると考えられた。そのため、DEK では腎保護効果もしくは糖尿病による糸球体

障害に対して抵抗性をもたらす遺伝的要因を有している可能性が示唆された。また、DEK-DMはインスリン分泌不全を呈し、膵臓組織におけるインスリン陽性シグナルは減弱していた。これら DEK の表現型は既存の糖尿病モデル動物とは異なっており、DEK ラットは新規の糖尿病モデルであることが示された。

第3章では、SGLT2 阻害剤の一つであるエンパグリフロジンの長期投与が DEK ラットの病態に及ぼす効果を調査した。エンパグリフロジンは糖尿病発症個体の血糖値を正常レベルにまで低下させただけでなく、過食および多飲多尿の改善をもたらした。エンパグリフロジンを投与した糖尿病発症 DEK(DM-empa)において体重の増加や腎周囲脂肪の残存が観察されたことに加え、血中総タンパク質(TP)の上昇や尿素窒素(UN)排泄量の低下、バリリンやイソロイシンの血中濃度の低下も認められた。これらの結果はエンパグリフロジンの長期投与により、体内のエネルギーバランスが改善され、タンパク質の異化亢進が是正されたことを示唆している。さらに、血中インスリン濃度を上昇させるには至らなかったが、DM-empa の膵臓組織では糖尿病を発症した無処置群(DM-cont)よりも明瞭なインスリン陽性シグナル像が観察され、経口糖負荷試験においても DM-empa は DM-cont よりも低い血糖値を維持し続けた。結果として、エンパグリフロジンの長期投与による慢性高血糖の解除は、体内の糖代謝を改善させた可能性がある。また、DM-empa では腎重量の増大や尿細管の拡張は抑制されなかったが、尿量や電解質の排泄量の低下、および電解質の部分排泄率の低下によって裏付けられるように、尿細管機能が全般的に改善した。また、血中アルブミン(Alb)と総コレステロール(Tcho)の低値が回復したのは、エネルギーバランスの改善や尿細管におけるタンパク質およびアミノ酸の再吸収能力の改善を通じて、肝臓のタンパク質合成が促進されたためと考えられた。さらに、DM-empa による骨密度低下の抑制は、尿細管におけるカルシウム再吸収の改善により、骨吸収が抑制されたためと考えられる。これらの結果をまとめると、エンパグリフロジンは慢性的な高血糖状態の解除と尿細管機能の改善をもたらす複数の経路を介して、DEK ラットが呈する糖尿病の症状を軽減させたと考えられる。

第4章では、DEK ラットにおいてサイズが増大した腎臓の特徴を解析すると共に、腎臓のサイズと高血糖の関係性を調査した。DEK-DM では糖尿病の重篤度や期間に依存して腎重量が増加した。また DEK-DM のネフロン数は DEK-cont よりも多く、DEK-DM においてのみ、血糖値に対して腎重量と糸球体数がそれぞれ正の相関を示した。DEK-DM の糸球体サイズやクレアチニンクリアラ

ンスは DEK-cont と同程度であったことから、腎サイズの増大は糸球体の肥大や過剰濾過を伴うものではなかった。そのため、DEK-DM においては個々のネフロンの肥大よりも、ネフロン数の増加が腎サイズの増大に寄与することが示唆された。ラットにおいてネフロン形成は生後早期に完了し、成熟した腎臓では幹細胞は枯渇しているため、DEK-DM では血糖値の上昇がネフロン数を増加させたのではなく、もともとネフロン数の多い腎臓を有する個体が糖尿病を発症していると考えられた。また、拡大した皮質領域において糸球体密度の低下が確認され、腎実質の 90%を占める腎尿細管の相対的な増加が示唆された。これらの結果から、DEK では胎生期から生後初期のネフロン形成期におけるネフロン数の増加と、その後の尿細管の成長が促進されることで腎実質の増加が引き起こされており、これらの変化が DEK における腎サイズの増加と糖尿病発症の前提条件であると考えられた。一方、DEK-DM では腎実質が増加し、糖尿病が進行しても、糸球体サイズは均一で、病理学的な肥大を示さないことから、腎保護能力が高く、糖尿病腎症の進行が抑制されていると考えられた。

さらに、DEK ラットの腎臓が糖尿病発症を促進するという仮説を直接的に検証するために片側腎摘出を行った(1/2Nx)。1/2Nx を行った DEK-DM は、術後 28 日間正常血糖値を示し、その後も 84 日間に至るまで偽手術個体と比較して低い血糖値を維持した。さらに 1/2Nx では多飲多尿や、過食などの改善も見られ、これは第 3 章で示した腎臓における糖の再吸収を抑制した SGLT2 阻害剤投与の実験結果と一致していた。本研究で血糖値の低下をもたらしたいずれの処置においても、インスリン分泌は改善しなかったことから、血糖値の低下はインスリンシグナルの増強ではなく、血糖値の上昇に寄与する腎機能を部分的に抑制したことによってもたらされたものと考えられる。さらに、1/2Nx は血漿中の Tcho、Na、Alb、TP の増加と尿中への糖、UN、タンパク質の排泄量の減少を引き起こした。これらの結果も第 3 章で示した SGLT2 阻害剤投与の結果と類似しており、これらの変化を説明する共通のメカニズムは、糖尿病状態の改善による負のエネルギーバランスおよび浸透圧利尿の是正であると考えられる。DEK-DM で観察された尿細管上皮における PCNA 陽性細胞と腎重量の増加は 1/2Nx によってさらに増強した。このことは、DEK-DM の腎実質がさらに増大して機能を向上させる能力があることを示唆している。これらの結果をまとめると、DEK-DM の腎臓は糖尿病発症と関連しており、一方で糖尿病性腎症に抵抗性を有していることが示された。

最終章では、膵臓と腎臓それぞれの側から糖尿病の発症につながるメカニズムについて考察した。膵島内分泌細胞の機能不全は、膵島に影響を及ぼす外的な要因だけではなく、膵島内分泌細胞の自己性が失われるという内的な要因によっても引き起こされる。DEK-DMの膵臓において二次的に膵島を破壊する炎症や線維化などの病理所見を伴わない膵島構造の乱れが見られたことから、DEK-DMラットは正常な膵島の構造と機能を維持するのに必要な遺伝子に異常を持つ可能性が示唆された。次に、DEKラットの尿細管の構造的および機能的変化も、糖尿病の発症や進行に関わる要因であることが示唆された。DEK-DMの腎重量は糖尿病病態の進行や病期の長さに依存して増加し、エンパグリフロジンによって高血糖を解除しても、尿細管の増生を伴う重量の増加が継続した。このことから、糖尿病が腎臓の変化を引き起こしているのではなく、腎臓の変化が糖尿病発症に関わるという仮説が立てられ、これは片側腎摘出によって、糖尿病の発症が抑制されたことで立証された。腎臓サイズの増大を伴う尿細管の過形成は、糖尿病の最初期の腎病理学的変化の一つと考えられているが、DEK-DMでは糖尿病の進行や片側腎摘出などの負荷があっても、末期腎不全に至らずに腎実質は成長を続けた。腎実質の大きさは腎予備能力を反映するため、DEK-DMの腎臓は成長を続けることによって腎機能不全の進行を遅らせている可能性がある。一方で、腎臓は肝臓に次ぐ糖代謝能を持つ臓器であるため、腎実質の増加に伴う腎機能の亢進は全身の糖制御に強く影響し、腎臓が高血糖を引き起こす要因として働く可能性が示唆される。DEKラットではこれらの膵臓と腎臓の糖尿病発症に関わる要因が複合的に関与することで高血糖が発症し、糖尿病が進行している可能性がある。このような糖尿病の発症メカニズムはこれまでに解析されていない。DEKラットを用いた糖尿病研究は、インスリン分泌不全へ至る膵臓内メカニズムを解明し、腎臓が糖尿病の発症と悪化に関わるという仮説を検証する上で有用な情報を提供するだろう。