

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 土門 綾華

申請者の所属する研究室において、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において、重篤な高血糖と多飲多尿などの糖尿病病態を示す雄ラットが 2016 年に発見された。この雄ラットを創始動物とした兄妹交配において、糖尿病個体が生まれ、本症が遺伝性であることが確認された。起源となった PET 系統では糖尿病が認められないことから、本糖尿病は *pet* 遺伝子とは独立して遺伝的に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、腎臓サイズの増大を示すため、本ラットは **Diabetes with Enlarged Kidney (DEK)** と命名され、新規の糖尿病モデルとして系統化が行われた。本論文は、DEK ラットの特性を明らかにするために申請者が行った一連の研究を纏めたものである。

第 1 章において申請者は、糖尿病に関する基本的な情報と近年の動向、並びに代表的な糖尿病のモデル動物について示している。糖尿病患者の約 9 割を占める 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とされているが、背景にある患者の生活習慣や病因は一樣でないため、画一的な治療法には限界がある。これに対し、作用機序の異なる糖尿病治療薬を開発する必要があり、そのため、種々の要因に基づく異なった糖尿病の病態モデルが作出されている。近年、腎尿細管での糖の再吸収を抑制することで血糖値を低下させる **sodium glucose cotransporter-2 (SGLT2)** 阻害剤が糖尿病治療薬として脚光を浴びており、腎臓が糖代謝において担う役割が注目されるようになった。すなわち、腎臓は高血糖によって障害される器官というだけでなく、糖尿病の発症に関連する器官として位置づけることができる。本章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、申請者は第 2 から 4 章の一連の研究を実施し、第 5 章で DEK ラットの病態と有用性について考察している。

第 2 章において申請者は、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ている。DEK ラットでは多因子遺伝の様式で雄のみに非肥満型 2 型糖尿病が発症する。糖尿病を発症した DEK ラット(DEK-DM)は、高血糖と多飲多尿を示すとともに、腎臓のサイズが著しく増大していた。さらに DEK-DM では、加齢とともに進行性の腎肥大、尿細管の拡張、尿細管間質の線維化を示すものの、糸球体は構造的に正常であり、血中のクレアチニンと電解質の値も正常な DEK ラット(DEK-cont)と同等であったことから、DEK-DM の腎機能は正常に保たれていると考えられた。従って、DEK ラットは腎保護効果、つまり糖尿病による糸球体障害に対する抵抗性を有している可能性がある。また、DEK-DM はインスリン分泌不全を呈し、膵島のインスリン陽性シグナルは減弱していた。これらの表現型は既存の糖尿病モデルとは明らかに異なっており、申請者は DEK ラットが新規の糖尿病モデルであると結論している。

第3章において申請者は、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ている。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低下させただけでなく、過食および多飲多尿を改善した。すなわち、エンパグリフロジンを投与した糖尿病発症のDEKラット(DM-empa)では、体重が増加し、腎周囲脂肪が残存しことに加えて、血中総タンパク質(TP)の上昇、尿素窒素(UN)排泄量の低下、筋のエネルギー源となる分岐鎖アミノ酸のバリンやイソロイシンの血中濃度の低下が認められた。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し、タンパク質の異化亢進状態が軽減したことを示している。さらに、血中インスリン濃度の上昇は観察されなかったが、DM-empaの膵臓組織では糖尿病を発症した無処置群(DM-cont)と比べて、明瞭なインスリン陽性シグナル像が観察され、糖負荷試験においてもDM-empaではDM-contよりも低い血糖値が維持された。さらに、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、尿量は減少し、電解質排泄量が低下したことから、尿細管機能が全般的に改善していた。また、血中アルブミン(Alb)と総コレステロール(Tcho)の低値が回復しており、エネルギーバランスの改善とともに、尿細管でのタンパク質とアミノ酸の再吸収の改善により、肝臓のタンパク質合成が促進されたと考えられる。さらに、DM-empaでの骨密度の低下も軽減しており、尿細管でのカルシウム再吸収が改善したことにより骨吸収が抑制されたと考えられる。これらの結果から、申請者は、エンパグリフロジンは慢性的な高血糖からの脱出と尿細管機能の改善をもたらす複数の経路で作用することで、DEKラットの病態を軽減させたと結論している。

第4章において申請者は、DEKラットの増大した腎臓の特徴を解析すると共に、腎実質の量と高血糖との関係を調査している。DEK-DMの腎重量は糖尿病の期間および重篤度と関連していた。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、腎重量と糸球体数が血糖値と相関していた。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と同等であったことから、DEK-DMの腎サイズの増大は糸球体の肥大や過剰濾過を伴っておらず、個々のネフロンの肥大よりも、ネフロン数の増加によってもたらされていると考えられた。ラットの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が枯渇している。このため、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する傾向があると考えられる。また、拡大した皮質領域の糸球体密度が低下しており、腎実質の90%を占める腎尿細管が相対的に増加していた。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成長の亢進が腎実質の増加を引き起し、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となっている可能性が考えられた。一方、DEK-DMでは、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、糖尿病腎症の進行が抑制されていると考えられた。以上の結果から、申請者はDEKラットの腎臓が糖尿病発症を促進するという仮説を立てて、それを検証するために片側腎摘出(1/2Nx)を行った。1/2Nxを行ったDEK-DMは、術後28日間正常血糖値を維持し、その後も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も改善し、これは第3章で示したSGLT2阻害剤の投与結果と一致していた。しかし、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の部分的抑制と削除によってもたらされたものと考えられる。さらに、1/2Nx は Tcho、Na、Alb、TP の血漿濃度の増加と、糖、UN、タンパク質の尿中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 阻害剤の投与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尿細管機能の改善である。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亢進させる能力があることを示唆している。これらの結果から申請者は、DEK-DM の腎臓が糖尿病の発症と関連するだけでなく、糖尿病性腎症に対する抵抗性を有していると結論している。

第5章において申請者は、膵臓と腎臓それぞれの側から DEK における糖尿病の発症メカニズムについて考察している。膵島内分泌細胞の機能不全は、膵島に影響を及ぼす外的要因だけではなく、膵島内分泌細胞の自己性が失われるという内的要因によっても引き起こされる。申請者は予備実験において、DEK-DM の膵臓で二次的に膵島を破壊する炎症や線維化などの所見を伴わない膵島構造の乱れを観察した。このことから、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ある。一方、2から4章の研究は、DEK ラットの腎臓の構造的および機能的変化が、糖尿病の発症や進行に関わることを示唆した。すなわち、DEK-DM の腎重量は糖尿病の進行や病期の長さに関連し、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は継続した。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、この仮説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。一般に腎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、糖尿病性腎症の重篤化に伴い、腎臓は線維化し、その機能は失われていく。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増大を続けた。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、腎臓は尿細管で糖を吸収し、肝臓に次ぐ糖新生能を持ち、インスリン分解に寄与する器官である。腎実質の増加に伴う腎機能の亢進は全身の糖代謝制御に影響を及ぼし、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検証されていない。申請者は最後に、DEK ラットを用いた将来の糖尿病研究がインスリン分泌不全に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可能性があるとして述べている。

以上のように、本論文は新規の糖尿病モデル動物の特性を明らかにするとともに、日本人に多い非肥満型2型糖尿病に関する新規の発症メカニズムを提唱しており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。

# 最終試験の結果の要旨

申請者氏名 土門 綾華

成績：合格

審査委員一同は、令和 3年 1月 27日、学位論文審査申請者に対し、論文の内容ならびに関連事項について試験を行った結果、本申請者が博士（獣医学）の学位を受けるに必要な学識を有するものと認め、合格と判定した。

# 論 文 目 録

報 告 番 号	博 獣 甲 第 号	申 請 者 氏 名	土 門 綾 華
学位論文 1. 題目 <sup>1)</sup> 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)  2. 印刷公表の方法及び時期 <sup>2) 3)</sup>			
公 表 年 月 日	出 版 物 の 種 類 及 び 名 称 <sup>4)</sup>		
令和 1年 7月	Characterization of novel non-obese type 2 diabetes rat model with enlarged kidneys		
公 表 内 容	[英文]		
全 文	Journal of Diabetes Research 2019; 8153140. (Domon A, Katayama K, Tochigi Y, Suzuki H)		
公表 (予定) 年月日	Empagliflozin ameliorates symptoms of diabetes and renal tubular		
令和 3年 3月	dysfunction in a rat model of diabetes with enlarged kidney (DEK)		
公 表 内 容	[英文]		
全 文	PLOS ONE (令和2年12月投稿済) (Domon A, Katayama K, Tochigi Y, Suzuki H)		
公表 (予定) 年月日	Characterization of enlarged kidneys and their potential for		
令和 3年 5月	inducing diabetes in DEK rats		
公 表 内 容	[英文]		
全 文	Physiological Reports (令和3年3月投稿予定) (Domon A, Katayama K, Tochigi Y, Suzuki H)		
3. 冊 数		1 編	

参 考 論 文 <sup>5)</sup>	
公 表 年 月 日	Cellular expression and subcellular localization of Wwox protein during testicular development and spermatogenesis in rats
令和 3年 1月	[英文]
公 表 内 容	Journal of Histochemistry & Cytochemistry (Al Mahmud MA, Noguchi M, Domon A, Tochigi Y, Katayama K, Suzuki H)
全 文	

- 注 1 学位論文の題目が外国語の場合は、日本語訳を併記する。
- 2 論文は公表予定を含め、すべて併記する。
- 3 論文は発表年代順に記載する。
- 4 共著者全員の氏名を記載する。和文の場合は姓だけでもよい。
- 5 参考論文がある場合は、学位論文の公表の記載に準じて表示する。