

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 病態病理学教育研究分野 氏名 稲葉 渉
<p>(論文題目)</p> <p>Effects of long-term treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin on endocrine cells in non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats (非肥満型 2 型糖尿病モデル後藤-柿崎ラットの膵内分泌細胞に対するジペプチジルペプチダーゼ 4 阻害薬ビルダグリプチンによる長期治療の効果)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><b>【背景】</b> グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1:GLP-1) は消化管ホルモンであるインクレチンの一種である。GLP-1 は食事摂取により小腸 L 細胞から分泌され、膵 β 細胞の受容体と結合し食事摂取時のインスリン分泌を促進する。さらに、GLP-1 は β 細胞の増殖因子として知られている。しかしながら、GLP-1 は血中のジペプチジルペプチダーゼ-4 (dipeptidylpeptidase-4:DPP-4) により分単位で分解されてしまうため、これまで臨床応用されていなかった。これに対し、近年、DPP-4 阻害薬などのインクレチン関連薬が開発された。従来、2 型糖尿病 (T2DM) における β 細胞容積の低下に対して治療法は確立されていなかった。しかしながら、インクレチン関連薬の開発により T2DM におけるインスリン分泌不全のみならず、β 細胞容積の改善も期待されている。特に、日本人に多い非肥満型 T2DM では β 細胞容積の低下がその病態の中心を占めている。そのため、インクレチン治療薬により T2DM の根治の可能性さえもある。これまで、肥満型 T2DM モデルの β 細胞容積に対する DPP-4 阻害薬の効果は検討されているが、非肥満型モデルに対しては未だ検討されていない。そこで今回、自然発症 T2DM モデルラットである後藤-柿崎 (GK) ラット β 細胞容積低下に対する DPP-4 阻害薬による改善効果を検討した。</p> <p><b>【方法】</b> 4 週齢の雄性 GK ラット (GK) と対照動物として Wistar ラット (W) を用いた。各々の投与群 (GK+V、W+V) に DPP-4 阻害薬 (Vildagliptin) 15mg/kg を 1 日 2 回、18 週間ゾンデにて経口投与した。投与期間中、体重と随時血糖、空腹時血糖を測定した。投与後 8 週と 18 週に 2g/Kg 経口糖負荷試験 (OGTT) /インスリン分泌試験を行った。投与期間終了後に麻酔下に採血後、膵臓を摘出し、その一部で膵インスリン含量を測定し、残りをパラフィン包埋切片とした。H&amp;E 染色後に免疫染色で検討した。抗インスリン-グルカゴンの二重免疫染色は、膵島の形態計測と新生膵島 (4 個以下の細胞からなる β 細胞集塊) 数の評価に用いた。抗 Ki-67 染色では、膵島細胞の Ki-67 陽性率を算出して細胞増殖能を検討した。また、TUNEL 法を用いて膵島細胞のアポトーシスの有無を検討した。GLP-1 受容体シグナルの標的分子マーカーとして、抗 pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1)、抗 phospho-molecule of target of rapamycin (p-mTOR)、抗 phospho-S6 ribosomal protein (p-S6RP)、抗 forkhead box protein O1 (FoxO1) に対する免疫染色を行い、それら染色強度 (陰性=0、弱陽性=1、陽性=2、強陽性=3) を半定量した。抗 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) 染色では、陽性率を算出して酸化ストレスの程度を評価した。Iba1 に対する免疫染色により、膵島に浸潤したマクロファージ数 (1 単位膵島面積) を計測した。</p> <p><b>【結果】</b> DPP-4 阻害薬による体重の変化は GK、W とともに認められなかった。投与 18 週間後で、W に比し GK の随時血糖は約 2.6 倍高値を示した (<math>p&lt;0.01</math>) が、V により</p>	

GK の約 0.6 倍に低下した ( $p<0.01$ )。投与 8 週、18 週後の OGTT では、GK に比べ GK+V では糖負荷後 15 分以降の血糖値が有意に低下した ( $p<0.01$ )。この時、GK+V のグルコース応答性インスリン分泌は GK の約 1.6 倍高値を示した。血清グルカゴンは GK では W に比し約 160% 高値を示したが、GK+V では約 30% 低下した ( $p<0.01$ )。一方、血清活性型 GLP-1 は GK に比し GK+V が約 2 倍高値を示した。 ( $p<0.01$ )。膵インスリン含量を測定した結果、GK では W の約 30% 程度であるが、GK+V では GK の約 2 倍まで改善した ( $p<0.01$ )。投与期間終了後の膵島形態計測では、GK では、膵島体積密度 ( $V_i$ ) が W の約 50%、 $\beta$  細胞体積密度 ( $V_\beta$ ) が約 60% 減少していた ( $p<0.01$ )。V 投与により、 $V_i$  と  $V_\beta$  は GK の約 2 倍に改善していた ( $p<0.01$ )。 $\alpha$  細胞体積密度は各群間で差は認められなかった。一方、 $\beta$  細胞と  $\alpha$  細胞の増殖能を比較すると、GK に比べ GK+V では  $\beta$  細胞で約 2 倍、 $\alpha$  細胞で約 3 倍高値を示した ( $p<0.01$ )。TUNEL 法による膵島細胞のアポトーシスは検出されなかった。新生  $\beta$  細胞集塊数は、W に比べて GK は約 1.8 倍多かったが ( $p<0.01$ )、V 投与によりさらに多い (約 3.6 倍) 新生  $\beta$  細胞集塊が形成されていた ( $p<0.01$  vs GK)。膵島細胞における GLP-1 シグナルを検討したところ、PDX-1 の核内、p-mTOR、p-S6RP の細胞質染色強度は、W に比し GK では 50% 以下に低下していた ( $p<0.01$ )。一方、GK+V では GK 比しそれぞれ約 2 倍程度高値を示した ( $p<0.05$ )。FoxO1 の核内染色強度は、GK で W の約 2 倍であるが ( $p<0.01$ )、GK+V では約 20% 低値を示した ( $p<0.05$ )。8OHdG の染色強度は、W に比し GK では約 3 倍高値を示していたが ( $p<0.01$ )、GK+V では GK の約 70% まで低下していた ( $p<0.05$ )。Iba1 に対する免疫染色による膵島浸潤マクロファージ数の検討では、W では陽性細胞がほとんど認められなかった。それに対し、GK では約  $3.5 (\times 10^3/\mu\text{m}^2)$  個認められ、一方、GK+V では約 30% 減少していた ( $p<0.01$ )。

【結語】DPP-4 阻害薬は GK ラット  $\beta$  細胞容積およびインスリン分泌を著明に改善した。その機序には、DPP-4 阻害薬による  $\beta$  細胞での GLP-1 受容体シグナルの活性化、それに伴う酸化ストレスや炎症反応の軽減、 $\beta$  細胞増殖の促進、新生膵島数の増加が考えられた。今回の結果では、非肥満型 T2DM モデルにおいても DPP-4 阻害薬は  $\beta$  細胞容積改善効果を示したことから、日本人 T2DM 患者でも同様の治療効果が得られる可能性が期待された。

- ※1 乙の場合、○○領域○○教育研究分野にかえて、所属の○○講座を記入すること。  
※2 論文題目が英文の場合は ( ) 内に和訳を付記すること。