

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：山田 将平

専攻分野：内科学（腎臓・高血圧内科）

指導教授：柴垣 有吾

主論文の題目：

Renoprotective Effect of GLP-1 Receptor Agonist, Liraglutide, in Early-Phase Diabetic Kidney Disease in Spontaneously Diabetic Torii Fatty Rats

（自然発症肥満 2 型糖尿病モデルラットにおける早期糖尿病性腎臓病に対する GLP-1 受容体作動薬(リラグルチド)の腎保護作用の検討)

共著者：

Jun Tanabe, Yuji Ogura, Yoshio Nagai, Takeshi Sugaya, Keiichi Ohata, Yasunori Natsuki, Daisuke Ichikawa, Shiika Watanabe, Kazuho Inoue, Seiko Hoshino, Kenjiro Kimura, Yugo Shibagaki, Atsuko Kamijo-Ikemori

緒言

グルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1) は、食後に腸内分泌 L 細胞から分泌されるインクレチンホルモンであり、膵臓の GLP-1 受容体へ結合し、インスリン分泌を増加させる。このため、その作用を模倣する GLP-1 受容体作動薬は、糖尿病治療薬として開発され、実地診療で使用されている。最近、腎臓においても、GLP-1 受容体の発現が認められたことから、GLP-1 受容体作動薬による腎保護効果(抗酸化作用、抗炎症作用、ナトリウム利尿作用、腎血管拡張作用、オートファジーの促進)が注目されている。そこで、本研究では、ヒトの病態に極めて近い自然発症 2 型糖尿病モデルラット (Spontaneously Diabetic Torii fatty rats: SDT fatty rats) を使用し、早期の糖尿病性腎臓病における GLP-1 受容体作動薬 (リラグルチド) の腎保護作用を検討した。

方法・対象

2型糖尿病に加え、肥満、高血圧、高脂血症を認める雄 SDT fatty rats を使用した。GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドを、8週齢から16週齢までの8週間、1日2回皮下に投与した(Lira 群)。予備検討により、リラグルチドが、血糖値及び血圧を低下させたことから、リラグルチドの腎保護作用が、血糖値・血圧に非依存性であることを明らかにするため、インスリン及びヒドララジン投与群(Ins-Hyd 群)を作成した。また、SDT fatty rats の無治療群(Cont 群)、非糖尿病モデルの Sprague-Dawley (SD) rats (SD 群)を対照群とした。4週毎に体重、食事摂取量、血圧、血糖を測定し、採尿を行い、16週齢で採血、腎臓の摘出を行った。

血清では、腎機能評価として、シスタチンCを、尿では、尿アルブミンに加え、尿細管マーカーの尿L-FABPを測定した。

右腎は、糸球体と尿細管間質の組織学的評価と腎蛋白発現解析に使用し、左腎は、糸球体単離後、糸球体蛋白発現解析に使用した。組織学的評価は、一般的な染色(PAS染色)と免疫組織学的染色{糸球体硬化(type IV コラーゲン)、マクロファージ浸潤(CD68)、間質線維化(α SMA、type I, type III コラーゲン)}で行った。腎蛋白ではオートファジー関連分子(mTOR, LC3B, ATG5)のリン酸化を、糸球体蛋白では、オートファジー関連分子(mTOR, LC3B, ATG5)に加え、血管内皮細胞機能に関連する分子(AMPK, eNOS)のリン酸化を、ウエスタンブロット法で評価した。

統計・解析は、統計解析ソフト{JMP® software v13.0.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)}を使用し、Kruskal-Wallis test 後に Steel test、Mann-Whitney U test を行った。なお、本研究は、聖マリアンナ医科大学動物実験委員会(承認1812002-C, 1908010-C, 2008013)の承認を得た。

結果

Lira 群は、Cont 群と比較し、体重、食事摂取量、血糖値、血圧が有意 ($p < 0.05$) に低値であったが、血糖値と血圧は Ins-Hyd 群と同程度であった。腎機能指標のシスタチン C は、SDT fatty rats のすべての群で SD 群と同等であった。尿アルブミン、尿 L-FABP は、経過中、SD 群と比較し、SDT fatty rats のすべての群で有意 ($p < 0.05$) に高値であったが、Lira 群は、経過とともに低下し、Cont 群、Ins-Hyd 群と比較して、有意 ($p < 0.05$) に低値であった。

腎組織評価では、SDT fatty rats のすべての群で、糸球体硬化 (PAS 染色、type IV コラーゲン免疫染色) および尿細管障害 (PAS 染色)、間質炎症 (CD68 免疫染色) を認めたが、Lira 群では、Cont 群、Ins-Hyd 群と比較して、有意 ($p < 0.05$) にその程度が軽減された。その一方で、間質線維化 (type I, type III コラーゲン, α SMA 免疫染色) は、SD 群と比較し、Cont 群で有意に強く認められたが、Lira 群での有意な間質線維化抑制作用は認められなかった。

糸球体蛋白の血管内皮細胞機能に関連する分子 (AMPK と eNOS) のリン酸化は、SDT fatty rats 群間において Lira 群で有意 ($p < 0.05$) に亢進しており、SD 群と同程度であった。リラグルチドにより、糸球体内皮細胞の機能が維持されたことを示している。

腎蛋白のオートファジー関連分子 mTOR のリン酸化は、SD 群と比較し、Cont 群、Ins-Hyd 群で有意 ($p < 0.01$) に亢進したが、Lira 群では、有意 ($p < 0.01$) に抑制され、SD 群と同程度であった。LC3B-II/I 発現は、SD 群と比較し、SDT fatty rats の全群で有意 ($p < 0.05$) に抑制されたが、Lira 群では、Cont 群、Ins-Hyd 群と比較して、有意 ($p < 0.05$) にその発現が亢進した。その一方で ATG5 は全ての群で同程度であった。また、糸球体蛋白では、LC3B-II/I 発現および ATG5 発現は、全群で同程度であった。これらの結果は、リラグルチドにより、腎尿細管で、オートファジーが維持されたことを示している。

考察

本研究では、GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドが、尿マーカーの尿中アルブミンと尿中 L-FABP を低下させ、糸球体硬化、尿細管障害、間質の炎症を抑制することが示された。また、血糖値と血圧が、Lira 群と同程度であった Ins-Hyd 群では同様の効果が認められなかったことより、リラグルチドによる腎保護効果は、血糖や血圧に非依存的であった。リラグルチドによる腎保護効果のメカニズムは、糸球体における AMPK のリン酸化を介した eNOS の活性化による糸球体内皮機能の維持と、mTOR のリン酸化の抑制による LC3B-II の発現増加によるオートファジーの維持による可能性が示された。

結論

GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチドは、血糖と血圧とは非依存的に、糸球体内皮細胞の機能とオートファジーの維持を介して早期の糖尿病性腎臓病の進行を抑制する可能性が示された。