



|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 2 型糖尿病分子メカニズムの解明と核酸医薬への展望 [論文内容及び審査の要旨]                                                                                   |
| Author(s)           | 山内, 順                                                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(薬科学)                                                                                                                   |
| Dissertation Number | 甲第11851号                                                                                                                  |
| Issue Date          | 2015-03-25                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/59272">https://hdl.handle.net/2115/59272</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Jun_Yamauchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                        |



## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 山内 順

## 学 位 論 文 題 名

### 2型糖尿病分子メカニズムの解明と核酸医薬への展望

インスリン非依存性の2型糖尿病は複数の要因が絡み合って生じる多因子疾患であり、日本における患者数は890万人に上ると推定されている。発症原因は未だ特定されておらず、今まさに解明が進められている状況である。一方で、基礎研究で探索された新規治療標的因子を治療薬へと発展させる際には、新たな応用技術が必要となる。この事が糖尿病分子メカニズムの解明と、治療を目的とした医薬品開発の研究進捗に大きなギャップを生み出し、糖尿病の根治を困難としている。糖尿病発症メカニズム解明と、核酸医薬等の最新創薬研究を連携させて行うことができれば、発症メカニズムに則した新規糖尿病治療薬の開発が可能になると考えられる。本研究では、米国ピッツバーグ大学における糖尿病分子メカニズム解明と、当研究室で進められてきた核酸医薬開発研究の各技術を融合することで、2型糖尿病新規治療システムを開発することを目標としている。

当研究室では糖尿病研究を進展させる基礎技術を持たないため、世界最先端の糖尿病研究を行う研究室への留学により、各実験手法の習得及び、2型糖尿病についての知識を深めることが可能であると考えた。共同研究先であるピッツバーグ大学のDong准教授は、2011年にforkhead転写調節因子の*Foxo6*遺伝子が2型糖尿病治療の新たな標的となる可能性を報告した。*Foxo6*は、通常時の肝臓での発現が低く、また血糖及び血中インスリン濃度が上昇する摂食時の発現が著しく低いことから、糖尿病との関連性が薄いと考えられてきた。しかしDongらは、2型糖尿病患者の肝臓での糖合成経路が異常亢進していることに着目し、糖新生と呼ばれるこの経路が活性化する絶食時に*Foxo6*発現が5倍上昇すること、さらに肥満や糖尿病モデルマウスでは8倍もの発現上昇が認められることを明らかとした。また*Foxo6*は糖新生関連酵素の発現を制御していた。さらに、遺伝子工学的に*Foxo6*発現を亢進させた*Foxo6*過剰発現マウスが高血糖症状を呈すること、及び*Foxo6* mRNA発現抑制を誘起するshRNA導入マウスでは高血糖症状を改善することから、*Foxo6*が肝臓における糖代謝を制御しており、2型糖尿病発症に強く関与していることが明らかとなった。

一方、*Foxo6*発現抑制により糖新生を抑制することで糖尿病症状の改善が認められるものの、どのような分子機構を介してこのような現象が生じるのかについては未だ明らかになっていない。そこでピッツバーグにあるDong研究室にて2013年1月から2014年9月まで留学し、糖尿病発症の分子メカニズムに関してより詳細な解明を行った。

生後4週齢から高脂肪食を与え続け、肥満を誘導したインスリン抵抗性獲得モデルマウスを用いて、*Foxo6*の欠損がインスリン抵抗性や糖代謝異常を抑制できるかについて検証した。野生型(WT)マウスでは高脂肪食摂取による糖代謝の異常と、それに伴った空腹時血糖値及び血中インスリン濃度の上昇が認められた。一方、高脂肪食を与えた*Foxo6*-KOマウスでは、2 g/kg body weightのglucose腹腔内投与時の有

意な糖代謝改善と顕著な摂食時及び絶食時血糖値の低下が認められた。これらの結果は、インスリン感受性やインスリン抵抗性の改善によるものであると考えられる。ピルビン酸負荷試験時の血糖値推移と糖新生関連遺伝子発現の評価から、*Foxo6*-K0 マウスで認められた空腹時血糖値の低下が、肝臓糖新生の抑制効果によるものであることを証明した。

次に、高脂肪食摂取 *Foxo6*-K0 マウスにおける、糖代謝及び摂食時血糖値の改善が、インスリン感受性またインスリン抵抗性の改善によるものであることを検証した。まず、インスリン負荷試験を行った。1.5 IU のインスリンを腹腔内から投与後、経時的に血糖値推移を評価した。その結果、*Foxo6*-K0 マウスは WT マウスと比較して、有意な血糖値の低下を示し、インスリン感受性を改善することが明らかとなった。さらに血中インスリン濃度の測定および、インスリン抵抗性の指標となる The Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR) 値を算出したところ、*Foxo6*-K0 マウスは WT マウスと比較していずれにおいても顕著な低下を示し、インスリン抵抗性を改善することが明らかになった。

近年、インスリン抵抗性獲得時の肥満や2型糖尿病において、肝臓や脂肪組織といった末梢組織で軽度の炎症反応が生じており、特にマクロファージの集積が認められるとの報告がある。そこで、*Foxo6*-K0 で見られたインスリン抵抗性の改善が、末梢組織のマクロファージ浸潤抑制に由来するのではないかと考えた。マクロファージマーカーである *F4/80* を免疫染色し、マクロファージ集積量を定性的に評価した。その結果、*Foxo6* 欠損は高脂肪食摂取肥満マウスで、有意に肝臓と脂肪組織でのマクロファージの浸潤を減少させることが明らかとなった。肝 *F4/80* の mRNA 発現量を qRT-PCR により評価したところ、有意差がないものの低下傾向を認め、マクロファージ等の単球マーカーとして知られる *Cd68* 値は有意に低下していた。また、C-C chemokine receptor2 (CCR2) は末梢組織でのマクロファージ細胞の動員を制御する重要な因子として知られているが、*Foxo6*-K0 マウスの肝臓で *Ccr2* mRNA 発現量の有意な低下が認められた。以上の結果より、*Foxo6* の欠損は、肝臓でマクロファージ及び炎症マーカーの発現低下をもたらすことが明らかとなった。さらに脂肪細胞面積に関して着目したところ、驚くべきことに、*Foxo6* を欠損したマウスでは脂肪細胞面積が著しく減少していることがわかった。これは全身におけるインスリン感受性を増大させ、糖代謝を改善した結果であると考えられる。また、マクロファージの浸潤に関して、脂肪組織の間質細胞を単離し qRT-PCR を行った結果、脂肪組織でも肝臓と同様に *F4/80* と *Cd68* の mRNA 発現量の低下が認められ、さらに *Ccr2* の mRNA 発現量も顕著に低下していた。

本研究を総括する。*Foxo6* の欠損は絶食時高血糖や高インスリン血症の改善をもたらすとともに、食事由来のインスリン抵抗性や糖代謝異常を抑制可能であることを明らかにした。これにより、*Foxo6* が2型糖尿病治療の有用標的遺伝子である可能性が強く示唆された。

糖尿病の根本治療を達成するためには、糖尿病の発症や進行を支配する遺伝子、タンパク質の発現を厳密に制御する必要がある。従って、これらの物質を効率よく送達させる薬物送達技術は極めて有用であると考えられる。しかしながら、現在ではウイルスベクターを用いたメカニズムの解明は著しく進むものの、臨床応用を想定した糖尿病用のキャリア開発を行うグループは存在しない。今後、当研究室で構築した肝臓標的型ナノキャリアを用いて肝臓選択的 *Foxo6* のノックダウンを達成することで、核酸医薬への応用へと発展させたい。