

(様式4)

学位論文の内容の要旨

澁澤 良 印

(学位論文のタイトル)

Dapagliflozin rescues endoplasmic reticulum stress-mediated cell death

(ダパグリフロジンは小胞体ストレスを介した細胞死を軽減する)

(学位論文の要旨)

近年、生活習慣の変化等により糖尿病患者は増加傾向にあり、糖尿病によって引き起こされる重大な合併症の予防や進展抑制のための治療の模索が急務である。そして、糖尿病の3大合併症の1つである糖尿病性腎症は、古典的には糸球体の障害が原因とされてきたが、近年になり尿細管障害の関与の報告が相次いでいる。一方で2型糖尿病治療薬SGLT2阻害薬は近位尿細管において糖尿病状態で発現が上昇するとされるナトリウム・グルコース共役輸送体を阻害し尿中にグルコースを排泄する事で血糖降下作用を有する薬剤であり、大規模臨床試験において腎保護作用が報告されているが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。一方で、小胞体は蛋白を適正に分泌系に送り出しているが、低酸素やカルシウム濃度変化、遺伝子変異等により蛋白の過剰合成や異常蛋白が産生され、それらが小胞体に蓄積し細胞を障害する状態を小胞体ストレスと言う。初期には小胞体ストレス応答にて細胞の恒常性を保とうとするが、小胞体ストレスが長期化あるいは過度のストレスが加わると、最終的にアポトーシスが誘導される。そして細胞内のグルコースホメオスタシスの変化は小胞体ストレス応答を惹起することが知られている。そのため、今回SGLT2阻害薬が細胞内グルコース濃度の変化を介して小胞体ストレス応答を調節し、そのことが糖尿病性腎症における腎保護に繋がる可能性を検討した。

はじめに、SGLT2阻害薬であるDapagliflozinの近位尿細管細胞株HK-2細胞における小胞体ストレス調節機構に対する役割とその効果を検討した。HK-2細胞にDapagliflozinを添加後、標準グルコース濃度 (100 mg/dl) で培養した後に細胞内の糖の濃度の変化をfluorometric assayで検討した結果、2 μ M のDapagliflozinを添加し24から48時間培養した状態で最も細胞内の糖の濃度が低下していた。そこで、今回の実験ではHK-2細胞に2 μ M のDapagliflozinを添

加し24から48時間培養した状態で小胞体ストレスマーカーの解析を行う事とした。この条件下で小胞体ストレス応答の上流であるelf2 α のリン酸化、ATF6の切断、IRE1 α のリン酸化をウエスタンブロット法で解析した結果、elf2 α のリン酸化のみがDapagliflozin添加により低下していることが判明した。このことから、Dapagliflozinはelf2 α 以下の小胞体ストレス応答のみを制御する可能性が示唆された。次にelf2 α の下流であるATF4、CHOPの発現に関して定量的PCR法で解析した結果、その低下を認めた。さらにCHOPは小胞体ストレス応答による細胞死を調節するとされている為、その生理学的意義を検討する為にアポトーシスマーカーであるcaspase3活性をfluorometric assayで解析した結果、低下していることも判明した。これらのシグナルの糖尿病性腎症の病態への関与を検討する為に、糖尿病性腎症で上昇しその病態に関与するとされるスフィンゴ脂質であるC2 ceramideを用い同様の検討を行った。その結果、両群で細胞膜上のグルコース輸送体であるGLUT2やSGLT2の発現は変化なかったが、C2 ceramide添加群にてelf2 α 以下のみの小胞体ストレスマーカーやcaspase3活性が上昇し、Dapagliflozinによりそれらが低下することも確認された。

さらにこの検討を*in vivo*に展開した。糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスに担体であるメチルセルロースのみ、もしくはメチルセルロースに懸濁した0.5mg/kgのDapagliflozinを1週間経口ゾンデ法で連日投与すると、両群で体重の変化は認めなかったが、投与群で血糖値の低下を認めた。このマウスをsacrificeし摘出した腎臓を破碎した後、SGLT2の発現や小胞体ストレスマーカー、caspase3活性をウエスタンブロット法、定量的PCR法、fluorometric assayで解析した結果、両群でSGLT2の発現に変化は認めなかったが、投与群でelf2 α 以下のみの小胞体ストレスマーカーとcaspase3活性が低下していた。以上の結果よりDapagliflozinは、近位尿細管において細胞内の糖の濃度を調節し、elf2 α 以下のみの小胞体ストレス応答やcaspase3活性を調節する事や、糖尿病状態のマウスの腎臓でも同様の結果が得られた事から、糖尿病性腎症において起こる細胞死を抑制する事が示唆された。この結果は、これまで不明であったSGLT2阻害薬に期待されている糖尿病性腎症の予防や進展抑制効果の機序解明に寄与する可能性があると考えられる。