

博士論文

糖尿病合併症に対する新規治療戦略開拓

に関する研究

Studies on Development of Novel Therapeutic

Strategy for Diabetes Complications

小島 直季

原著論文

本学位論文は、以下の原著論文に基づき作成されたものである。

第 I 部

Role of cyclooxygenase in vasodilation of retinal blood vessels induced by bradykinin in Brown Norway rats.

Vascul Pharmacol. 2009; 51(2-3): 119-124.

Naoki Kojima, Maki Saito, Asami Mori, Kenji Sakamoto, Tsutomu Nakahara, Kunio Ishii

第 II 部

Effects of a new SGLT2 inhibitor, luseogliflozin, on diabetic nephropathy in T2DN rats.

J Pharmacol Exp Ther. 2013; 345(3): 464-472.

Naoki Kojima, Jan M. Williams, Teisuke Takahashi, Noriyuki Miyata, Richard J. Roman

Renoprotective effects of combined SGLT2 and ACE inhibitor therapy in diabetic Dahl S rats.

Physiol Rep. 2015; 3(7). pii: e12436.

Naoki Kojima, Jan M. Williams, Tiffani N. Slaughter, Sota Kato, Teisuke Takahashi, Noriyuki Miyata, Richard J. Roman

目次

序論	1
第 I 部： <u>糖尿病網膜症に対する新規治療戦略の探索</u>	
新規ラット蛍光眼底像撮影法を用いた bradykinin の網膜血管拡張機序の解明	
1-1. 緒言	3
1-2. 方法	8
1-3. 結果	14
1-4. 考察	18
第 II 部： <u>糖尿病性腎症に対する新規治療戦略の探索</u>	
糖尿病性腎症モデルラットを用いた SGLT2 阻害薬の糖尿病性腎症に対する効果	
2-1. 緒言	26
2-2. Dahl-STZ ラットにおける SGLT2 阻害薬および ACE 阻害薬の糖尿病性腎症 に対する効果の検討	
2-2-1. 研究方法	34
2-2-2. 結果	39
2-2-3. 考察	52

2-3.	T2DN ラットにおける SGLT2 阻害薬および ACE 阻害薬の糖尿病性腎症 に対する効果の検討	
2-3-1.	研究方法	57
2-3-2.	結果	61
2-3-3.	考察	73
2-4.	総合考察	79
	総括	83
	参考文献	88
	謝辞	108

序論

本邦における「糖尿病が強く疑われる者」と「糖尿病の可能性を否定できない者」を合わせた推定人数は約 2,050 万人に上ることが報告されている（厚生労働省 平成 24 年 国民健康・栄養調査）。さらに、2015 年から 2040 年の推定糖尿病患者数は日本を含む西太平洋地域において約 40%の増加が見込まれていることから、今後も増加の一途を辿ることが懸念されている（IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015）。糖尿病はインスリン分泌不全とインスリン抵抗性によるインスリン作用不足が原因となり、慢性的な高血糖状態を主徴とする代謝性疾患である。この糖尿病に特徴的な症状は、持続的な高血糖による口渇、多飲、多尿などであるが、それ以外の自覚症状が乏しいために糖尿病患者は病識を持たないことが多い。一方、慢性的な高血糖や代謝異常の持続は、糖尿病網膜症や糖尿病性腎症などの糖尿病細小血管合併症および動脈硬化性疾患の発症および進展の原因となり、これら糖尿病合併症が患者の生活の質や生命予後を著しく低下させることが懸念される。そのため糖尿病治療の最終的な目標は、高血糖による自覚症状を改善することに留まらず、糖尿病合併症の発症や進展を抑制することであると考えられる。このような背景から、様々な標的分子やシグナル経路を狙った新規治療薬の創薬および開発が進められているが、糖尿病合併症を根本的に治療し得る治療戦略については未だ確立していないのが現状である。そのため糖尿病合併症は、アンメットメディカルニーズの高い疾患領域であることが考えられる。このように糖尿病合併症に対する有効な治療戦略が確立していない原因の一つとして、その病態生理学的な発症機序が十分解明されていないことが考えられる。そこで著者は、糖尿病によって惹起される網膜および腎臓の病態生理学的な変化に着目し、糖尿病網膜症および糖尿病性腎症に対する新規治療戦略の探索を行った。

第 I 部

糖尿病網膜症に対する新規治療戦略の探索

新規ラット蛍光眼底像撮影法を用いた

bradykinin の網膜血管拡張機序の解明

1-1. 緒言

糖尿病網膜症は、我が国における主要な視覚障害原因の一つである。糖尿病患者における糖尿病網膜症有病率を検討した疫学的研究においては、糖尿病網膜症の有病率は約35%であり、視力を脅かす危険のある網膜症の有病率は約10%にも上ることが報告されている (Yau et al., 2012)。さらに生活習慣や食生活の変化に伴い、糖尿病患者数は世界的に増加傾向にあり、糖尿病網膜症患者は今後も増加することが懸念されている。以上の背景から、糖尿病網膜症はアンメットメディカルニーズの高い疾患であり、本症の発症および進展を抑制する新規治療戦略を開拓することは、極めて重要であると考えられる。

糖尿病患者では、慢性的な高血糖などが原因となり、網膜血管のバリア機能が破綻することで浮腫や出血などの症状を呈し (単純網膜症)、さらに病態が進行すると網膜細小血管が狭窄または閉塞して網膜血流が低下することで慢性的な虚血状態が生じて、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) などの血管新生促進因子が分泌される (前増殖網膜症)。このような病態進行を辿って形成される病的な血管新生は、硝子体出血や牽引性網膜剥離を引き起こし、最終的には失明などの重大な視力障害を招くことが知られている (増殖網膜症) (Figure 1)。

近年、VEGF を標的とした治療法として VEGF 阻害薬の硝子体内注射が糖尿病黄斑浮腫に適応となり、これら薬剤による糖尿病黄斑浮腫の治療が主流となりつつある (Brown et al., 2013, Korobelnik et al., 2014, Schmidt-Erfurth et al., 2014, Brown et al., 2015)。さらに大規模臨床試験の解析から、VEGF 阻害薬は糖尿病網膜症の悪化に対しても抑制効果を発揮することが期待されている (Korobelnik et al., 2014, Schmidt-Erfurth et al., 2014)。その一方で、VEGF 阻害薬により、網膜における無灌流領域の増大を遅延させることはできるものの、糖尿病網膜症を完全に抑制することはできないという可能性も

示唆されている (Campochiaro et al., 2014). さらに, VEGF 阻害薬による治療は一過性に血管新生を抑制する対症療法であることから, 再発を繰り返す症例に対しては VEGF 阻害薬の頻回投与が必要となる可能性があり, 感染などの合併症, 患者への身体的な負担, 医療費の増大につながることを懸念されている. また, VEGF 阻害薬は, 網膜血管新生を抑制することはできるものの, 網膜虚血を改善することはできないことから, 糖尿病網膜症の根本治療となり得るかという点については, 未だ議論の余地が残る. これらの事実を背景として, 経口投与または末梢投与により, 糖尿病網膜症を根本的に治療することができる新規薬剤の開発が望まれている.

単純網膜症から前増殖網膜症においては, 網膜血管閉塞が病態の主症状と考えられており, この血管閉塞により網膜虚血が誘発されて網膜血管新生が惹起される. さらに, 糖尿病網膜症形成の病態生理学的なメカニズムとして, 高血糖による内皮細胞傷害に加えて, 白血球浸潤などを伴う炎症性変化が網膜血管閉塞や網膜血管新生の発症および進展に関与していることが明らかにされている (Limb et al., 1999, Stitt et al., 2013). これらの知見から, 網膜血管閉塞は単純網膜症から前増殖網膜症の発症および進展に重要な病態生理学的変化であると考えられる. 実際に, 網膜循環の異常が, 糖尿病網膜症に代表される網膜疾患の発症に関与していることが示唆されている (Schmetterer et al., 1999, Flammer et al., 2002, De La Cruz et al., 2004). また, ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットでは慢性的な高血糖状態により, 正常ラットと比較して網膜血流が減少することが示されている (Pouliot et al., 2011). さらに, 非網膜症糖尿病患者または単純網膜症を有する糖尿病患者では, 正常患者と比較して網膜動脈血流量の低下が報告されている (Nagaoka et al., 2010). これらのエビデンスからも, 糖尿病病態時には網膜血流の低下により網膜虚血が生じる可能性が考えられる. そのため, 網膜血管の狭窄または閉塞を是正して網膜循環を正常化することは, 糖尿病網膜症の発症および進展を抑制する一つの重要な治療戦略であると考えられる. しかしながら, 網膜血管の収縮および拡張メ

カニズムについては未だ不明な点が多く、有効な治療戦略が確立していないのが現状である。

網膜血管は、自律神経支配が少ない血管であるため (Delaey et al., 2000), 内皮細胞 (Benedito et al., 1991, Haefliger et al., 1992) および網膜組織 (Delaey et al., 1998, Boussery et al., 2002) から局所的に分泌される因子や生体内ホルモンが網膜血流の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。その中で、オータコイドである **bradykinin** は強い血管拡張作用を有しており、生理学的および病態生理学的条件において心血管機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている (Rhaleb et al., 2011)。この **bradykinin** は、多くの血管床において、主に一酸化窒素 (NO), プロスタノイド (PGs) および内皮由来過分極因子 (EDHF) の産生を介して強い血管拡張作用を示すことが知られているが、それらの寄与度は血管床によって様々である (Lipton et al., 1981, Lamontagne et al., 1992, Nagao et al., 1992, Nakashima et al., 1993, Honing et al., 2000)。網膜組織でもカリクレイン-キニン系が存在していることから、**bradykinin** が網膜血流に重要な調節因子として機能している可能性が高い (Ma et al., 1996)。実際に、ブタ網膜血管を用いた *in vitro* 実験において、**bradykinin** が NO 依存的な血管拡張作用を示すことが報告されており (Jeppesen et al., 2002), ラット網膜微小血管においては、PGs が **bradykinin** の血管拡張作用に重要な役割を果たしていることが示されている (Abdoun et al., 2003)。しかしながら、**bradykinin** による網膜血管拡張作用およびその詳細な作用メカニズムについては未だ *in vivo* において十分に解明されていない。これまで、北里大学・分子薬理学教室では、*in vivo* でラットの眼底を高品質なフルカラー画像として撮影する方法を確立し、網膜血管径の変化を指標として網膜血管拡張反応の評価を行ってきた (Ogawa et al., 2007, Mori et al., 2007, Nakazawa et al., 2007, Nakazawa et al., 2008)。しかし、背景領域と網膜血管とのコントラストの差が原因となり、実験条件によっては正確な血管径測定が困難な場合があることが課題であった。そこで本研究では、さらに高精度に網膜

血管径の変化を捉えることを目的として, *in vivo* でラットの網膜血管を蛍光像として撮影する方法を確立した. 本研究では, この新たに確立した実験方法を用いて, **bradykinin** の網膜血管拡張作用について検討を行い, さらにその詳細なメカニズムについて検討を行った.

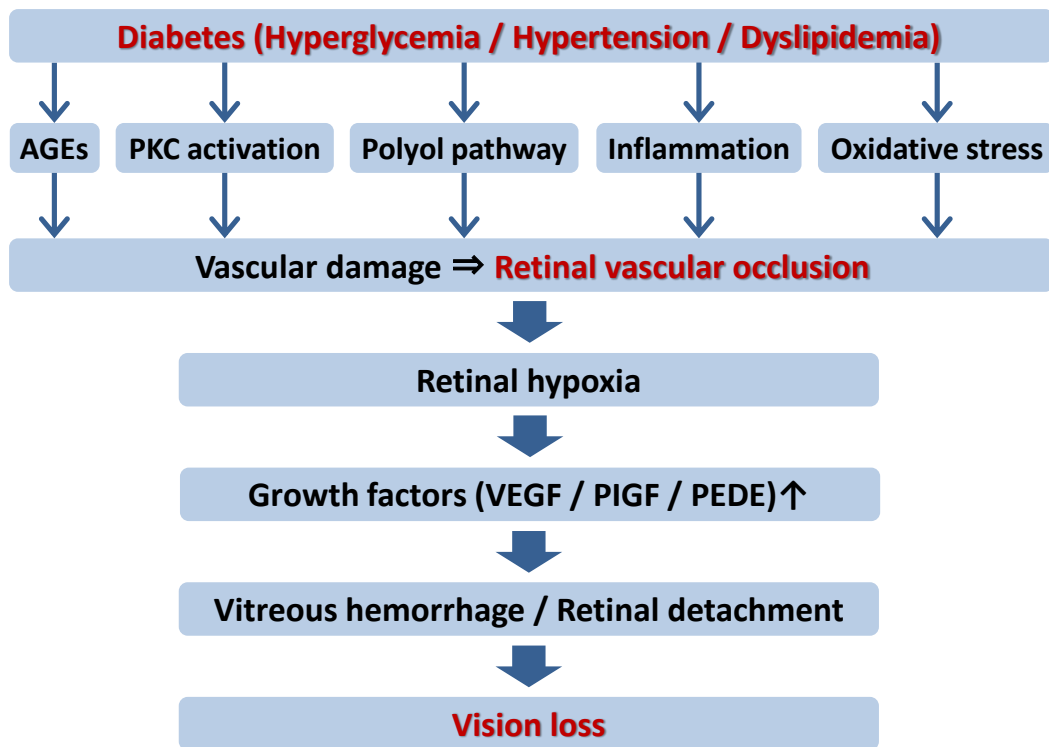


Figure 1.

Proposed mechanisms involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy.

1-2. 方法

1-2-1. 薬物調製

(-)-Norepinephrine bitartrate (ノルアドレナリン) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) および(-) epinephrine (+) bitartrate (アドレナリン) (Sigma-Aldrich) は 0.01% L-アスコルビン酸溶液に溶解した。Bradykinin (Peptide institute, Osaka) および N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma-Aldrich) は生理食塩液に溶解した。Indomethacin (Sigma-Aldrich) は 0.24% Na_2CO_3 溶液に溶解した。Nimesulide (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) はポリエチレングリコール 400 (60%), エタノール (5%) および生理食塩液 (35%) の混合溶液に溶解した。SC-560 (Cayman Chemical) はポリエチレングリコール 400 溶液に溶解した。

1-2-2. 実験動物

本実験は、北里大学動物実験委員会で承認された動物実験ガイドラインおよび視覚と眼科学研究協会の眼科・視覚研究における動物実験指針に従って行った。

雄性 Brown Norway ラット (Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama) は、室温 $22\pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ および 12 時間の明暗周期にコントロールした施設で飼育し、固形飼料および飲料水は自由摂取させた。

1-2-3. 実験方法

Brown Norway ラットをペントバルビタールナトリウム (Nacalaitesque, Kyoto) で麻酔し、角膜反射消失後に保温台に背位固定した。気管にカニューレを挿入して気道確保をした後、薬物を投与するために頸静脈および大腿静脈にカニューレを挿入した。さらに、血圧および心拍数を測定するために左大腿動脈にカニューレを挿入した。血圧は、圧トランスデューサー (Nihon Kohden, Tokyo) およびプリアンプ (Nihon Kohden) を

介して、熱ペンレコーダー (Nihon Kohden) に記録した。心拍数は、心拍タコメーター (Nihon Kohden) を用いて測定した。血圧および心拍数は、SCIENCE LINK II (Keisoku Giken, Utsunomiya) を用いてデジタル化し、パーソナルコンピューター (Apple Japan, Tokyo) に記録および保存した。

実験中の眼球運動を抑制して網膜血管径の継続的な測定を行う目的で、Brown Norway ラットに、テトロドトキシン (Nacalaitesque) を 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で静脈内に投与し、小動物用人工呼吸器 (Sinano, Tokyo) を用いて人工呼吸下 (1 回拍出量: 10 mL/kg, 拍出頻度: 80 strokes/min) に実験を行った (Mori et al., 2007, Nakazawa et al., 2007)。テトロドトキシン処置により血圧および心拍数が低下するため、正常範囲に維持する目的で、ノルアドレナリンおよびアドレナリン混合溶液 (ノルアドレナリン:アドレナリン= 1:9) (ノルアドレナリン: 1–2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, アドレナリン: 9–22.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) をインフュージョンポンプ (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA) を用いて持続投与した (平均血圧: 106 \pm 1 mmHg, 心拍数: 433 \pm 10 bpm, n=19)。また、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME を用いた実験においては、アドレナリン溶液 (0.3–0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) をノルアドレナリンおよびアドレナリン混合溶液の代わりに持続投与した。

Bradykinin の血管拡張作用におけるシクロオキシゲナーゼ (COX) の役割を明らかにする目的で、bradykinin の網膜血管径および血圧に対する作用に及ぼす indomethacin (5 mg/kg), SC-560 (5 mg/kg) および nimesulide (1 mg/kg) の効果を検討した。溶媒対照または各 COX 阻害薬を bradykinin の持続投与開始 20 分前に静脈内に投与し、その後、bradykinin を 1, 3, 10 および 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の用量でインフュージョンポンプを用いて大腿静脈から持続投与した。COX 阻害薬の投与量は、既存の報告に基づき選択した (Takizawa et al., 1998, Boje et al., 2003, Ehrlich et al., 2004)。

次に、bradykinin の COX 経路依存的な網膜血管拡張作用における NO の関与を明らかにする目的で、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME 処置下で、bradykinin の網膜血管径

および血圧に対する作用に及ぼす indomethacin の効果を検討した。溶媒対照または indomethacin (5 mg/kg) を静脈内投与した後、L-NAME (30 mg/kg) を静脈内に投与し、その 20 分後から bradykinin を 1, 3, 10 および 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の用量でインフュージョンポンプを用いて大腿静脈から持続投与した。

1-2-4. 蛍光眼底撮影方法

眼球の保護および対物レンズ [小動物用ボアスコープレンズ (Model 01 : Magnification $\times 20$, Scalar, Tokyo)] の浸水のために、ヒドロキシエチルセルロース (スコピゾル 15) (Senju Pharmaceutical, Osaka) を角膜表面に点眼した。視神経乳頭を中心として、小動物用ボアスコープレンズを介して観察される網膜眼底視野の焦点を調節した。網膜細動脈および網膜細静脈は、血管径および血管形態を基に区別した。フルオレセインイソチオシアネート標識デキストラン (FITC-dextran, 分子量 : 2,000 kDa) (Sigma-Aldrich) を 60 mg/kg の用量で右頸静脈から投与した。フルオレセインイソチオシアネート (FITC) に適したバンドパスフィルター (MX0490, Asahi Spectra, Tokyo) を装着したキセノンランプ (MAX-301, Asahi Spectra) で発生させた励起光を眼球に照射することにより、網膜循環する FITC-dextran の蛍光シグナルを発生させた。蛍光網膜血管画像は、バンドパスフィルター (MX0520, Asahi Spectra) を装着した小動物用ボアスコープレンズを介して、デジタルカメラ (FinePix S3 Pro, Fuji Photo Film, Tokyo) で撮影した。

上記観察方法で撮影した Brown Norway ラットの眼底像を Figure 2A に、同様の方法で撮影した Wistar ラットの眼底像を Figure 2B に示す。Wistar ラットなどのアルビノ動物においては、脈絡膜血管を循環する FITC-dextran の蛍光により、網膜血管と網膜血管外領域とのコントラストが著しく低下した。一方、Brown Norway ラットの場合は、網膜色素上皮細胞層および脈絡膜領域が黒色であるため、脈絡膜血管への励起光ならびに

脈絡膜血管を循環する FITC-dextran からの蛍光が遮断され、その結果、非常に高い網膜血管と網膜血管外領域とのコントラストが得られた。そのため、本研究では有色動物である Brown Norway ラットを実験動物として使用した。

フルオレセインナトリウムを用いた血管造影法は、臨床の場において網膜血管を観察する最も一般的な方法である。そのため、著者は始めにフルオレセインナトリウムを用いて蛍光眼底像の撮影を試みた。しかし、投与後に認められた網膜血管内の蛍光は投与数分後に消失した。次に、FITC-dextran が微小循環研究のトレーサーとして使用されることを参考にして、分子量の異なる 3 種の FITC-dextran (分子量 : 4.4, 150, 2,000 kDa) (Sigma-Aldrich) を用いて検討を行った。その結果、平均分子量 2,000 kDa の FITC-dextran を投与することで、少なくとも投与後 90 分間、質の高い蛍光網膜血管像を撮影することができた。さらに、分子量が比較的大きい 2,000 kDa の FITC-dextran は、網膜微小血管内に分布し、高用量の bradykinin を静脈内持続投与しても、血液網膜関門を通過せず、血管外への漏出は認められなかった。以上の理由から、本研究では平均分子量 2,000 kDa の FITC-dextran を血管造影試薬として用いることとした。

1-2-5. 網膜血管径測定方法

画像解析ソフト (Photoshop 7, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) を用いて、デジタルカメラで撮影ならびに取得した蛍光眼底画像の処理を行った。解析を容易にする目的で、3 チャンネル【R : 赤, G : 緑, B : 青】のうち、蛍光像が記録されている G チャンネルを抽出して自動レベル調整を行い、背景領域と網膜血管領域との領域間のコントラストを高めた (Figure 2C)。網膜血管領域のコントラストを増強させた後、眼底画像から網膜血管を含む小領域 (240×240 μm) を抽出した (Figure 2D)。各々の抽出画像に対して、適切な閾値で 2 階調化を施行して背景領域と血管領域とを区分した。選

択領域における血管径は、血管部面積を血管水平長（120 μm ）で除することにより算出した（NIH image 1.6.2., National Institute of Health, Bethesda, MD, USA）（Figure 2E）.

1-2-6. 解析方法

網膜血管径，平均血圧および心拍数は，bradykinin 静脈内持続投与前を基準値とした比率（%）で表示した．2群間の比較については，Student の t 検定を行った．多群間の比較については，二元配置分散分析で解析した後，Bonferroni 補正を行った．統計解析は，PRISM4（GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA）を用いて行った．統計解析の結果，p 値が 0.05 未満であった場合，統計学的に有意差があると判断した．実験結果は，平均値 \pm 標準誤差で示した．

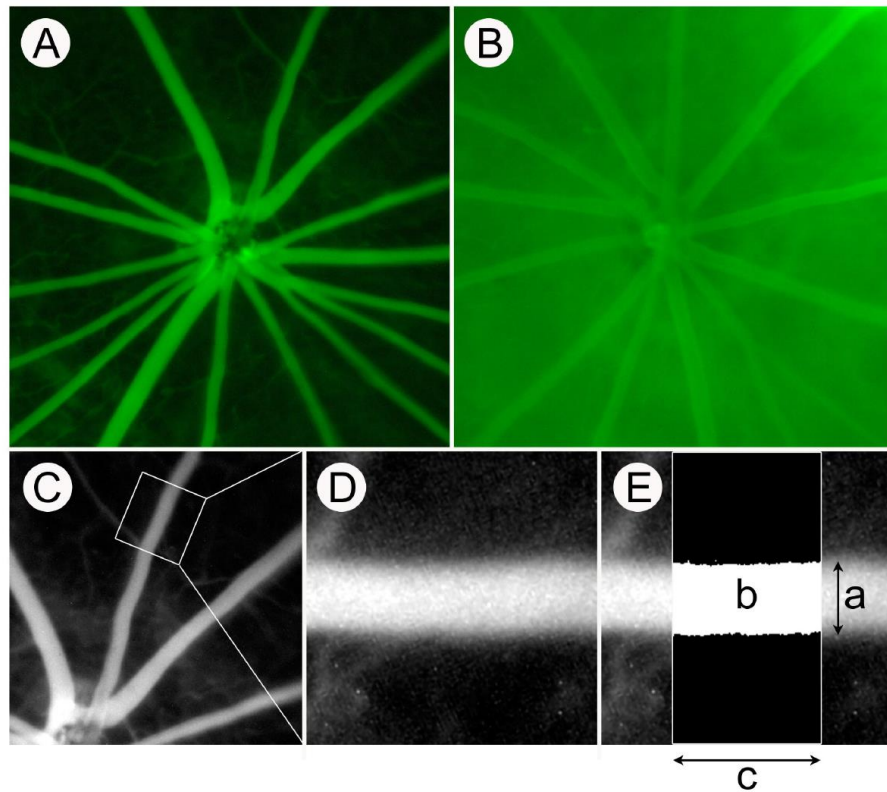


Figure 2.

Fluorescent retinal vascular images of Brown Norway rat (A) and Wistar rat (B) and the processed images of Brown Norway rat (C–E). After intensifying the contrast of the retinal blood vessels by altering the brightness of the green channel image (C), the region ($240 \times 240 \mu\text{m}$) containing one vessel was selected in the fundus image (D). Blood vessel in the region ($240 \times 120 \mu\text{m}$) was distinguished from background by determining a certain threshold value for each image (E). Diameter of vessel (a) was calculated by dividing the area of the vessel (b) by the length of vessel ($120 \mu\text{m}$) (c) in the selected region.

1-3. 結果

1-3-1. Bradykinin の作用に対する COX 阻害薬の効果

Bradykinin の作用に対する COX 阻害薬の効果を図 3 に示す。

Bradykinin を静脈内に持続投与する前の網膜血管径は、各群間で有意な差は認められなかった（網膜細動脈径：非処置群； $53.8 \pm 1.8 \mu\text{m}$, $n=5$, Indomethacin 処置群； $53.0 \pm 2.2 \mu\text{m}$, $n=5$, Nimesulide 処置群； $55.2 \pm 3.3 \mu\text{m}$, $n=5$, SC-560 処置群； $51.5 \pm 4.6 \mu\text{m}$, $n=4$ / 網膜細静脈径：非処置群； $74.2 \pm 3.3 \mu\text{m}$, $n=5$, Indomethacin 処置群； $84.2 \pm 3.2 \mu\text{m}$, $n=5$, Nimesulide 処置群； $78.2 \pm 4.2 \mu\text{m}$, $n=5$, SC-560 処置群； $61.6 \pm 7.1 \mu\text{m}$, $n=4$ ）。

Bradykinin ($1-30 \mu\text{g/kg/min}$) を静脈内に持続投与した結果、用量依存的な網膜血管拡張反応および降圧反応が認められた (Figure 3A, 3B および 3C)。非選択的 COX 阻害薬である indomethacin および選択的 COX-2 阻害薬である nimesulide の前処置により、bradykinin による網膜血管拡張作用は顕著に抑制されたが、bradykinin による降圧作用は抑制されなかった。一方、選択的 COX-1 阻害薬である SC-560 の前処置では、bradykinin による網膜血管拡張作用および降圧作用に対して有意な抑制は認められなかった。テトロドトキシンにより神経反射を遮断した本研究条件においては、bradykinin の静脈内持続投与により降圧反応は認められたものの、心拍数に対する影響は認められなかった (Figure 3D)。

1-3-2. Bradykinin の作用に対する COX 阻害薬および NO 合成酵素阻害薬の効果

NO 合成酵素阻害薬である L-NAME 処置下における bradykinin の作用に対する COX 阻害薬の効果について Figure 4 に示す。

Bradykinin を静脈内に持続投与する前の各測定パラメーターは、各群間で有意な差は認められなかった（平均血圧：L-NAME + 非処置群； $107 \pm 2 \text{ mmHg}$, $n=5$, L-NAME + Indomethacin 処置群； $102 \pm 2 \text{ mmHg}$, $n=5$ / 心拍数：L-NAME + 非処置群； $346 \pm 22 \text{ bpm}$,

n=5, L-NAME + Indomethacin 処置群 ; 371±24 bpm, n=5 / 網膜細動脈径 : L-NAME + 非処置群 ; 48.5±2.7 μm, n=5, L-NAME + Indomethacin 処置群 ; 50.2±4.2 μm, n=5 / 網膜細静脈径 : L-NAME + 非処置群 ; 64.3±3.9 μm, n=5, L-NAME + Indomethacin 処置群 ; 62.6±2.8 μm, n=5).

L-NAME 存在下における, bradykinin (1–30 μg/kg/min) の静脈内持続投与による網膜血管拡張作用は, L-NAME 非存在下における網膜血管拡張作用と比較して顕著に弱かった (Bradykinin 30 μg/kg/min 投与時: 網膜細動脈径拡張率; 15.6±2.5% vs. 9.2±1.8%, P<0.05) (Figure 3A, 3B および 4A, 4B). 一方で, bradykinin による降圧作用については, L-NAME 存在下と非存在下との間に有意な差は認められなかった (Figure 3C および 4C).

Bradykinin による網膜血管拡張作用に対する indomethacin の抑制効果は, L-NAME 処置によって消失した (Figure 4A および 4B). 心拍数に対しては, bradykinin の静脈内持続投与による影響は認められなかった (Figure 4D).

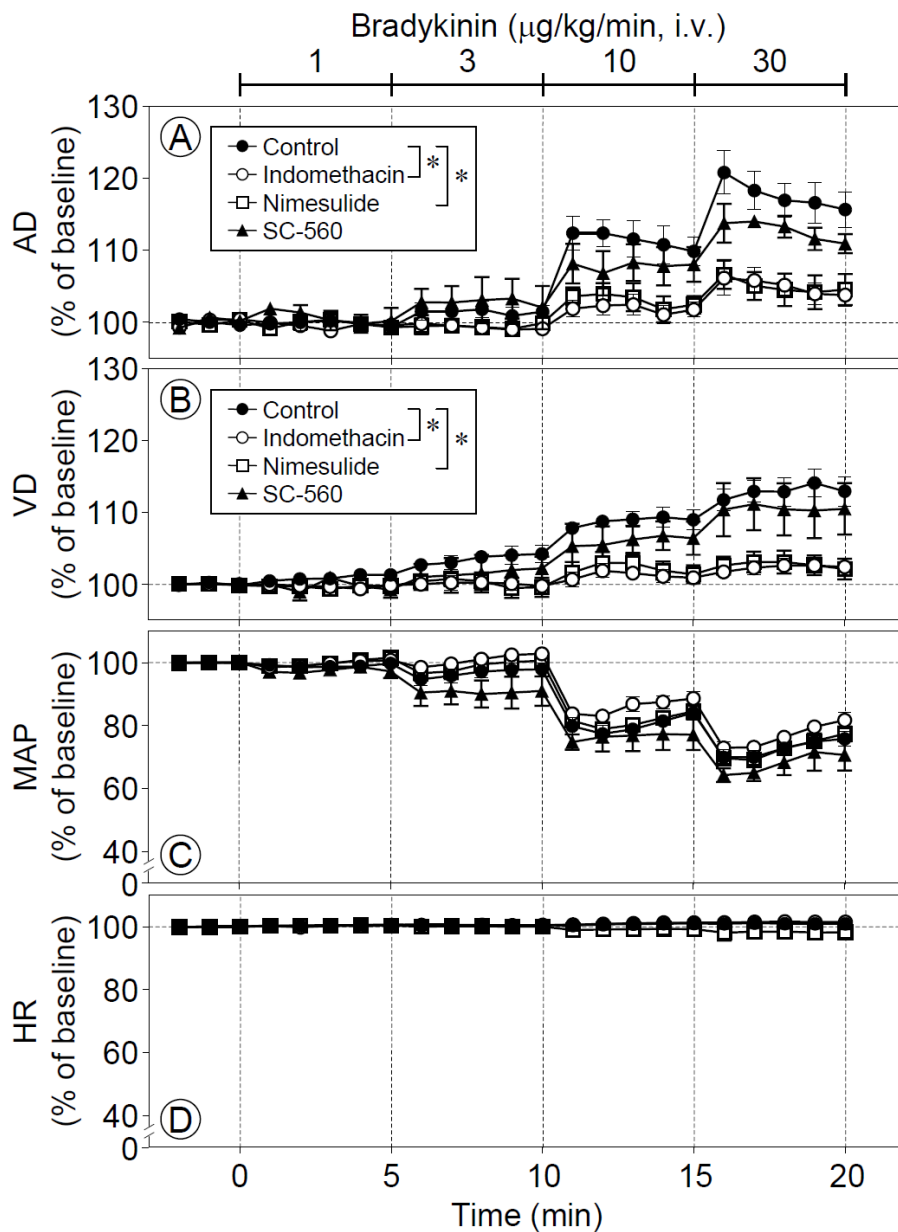


Figure 3.

Changes in retinal arteriolar diameter (AD)(A), retinal venular diameter (VD)(B), mean arterial pressure (MAP)(C) and heart rate (HR)(D) induced by intravenous infusion of bradykinin (1–30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) in Brown Norway rats treated with vehicle (Control), indomethacin (5 mg/kg, i.v.), nimesulide (1 mg/kg, i.v.) or SC-560 (5 mg/kg, i.v.). Data are expressed as percentage of the control level (baseline value measured just before starting infusion of bradykinin). Each point with a vertical bar represents mean \pm SEM of 4–5 animals. *: $P < 0.05$.

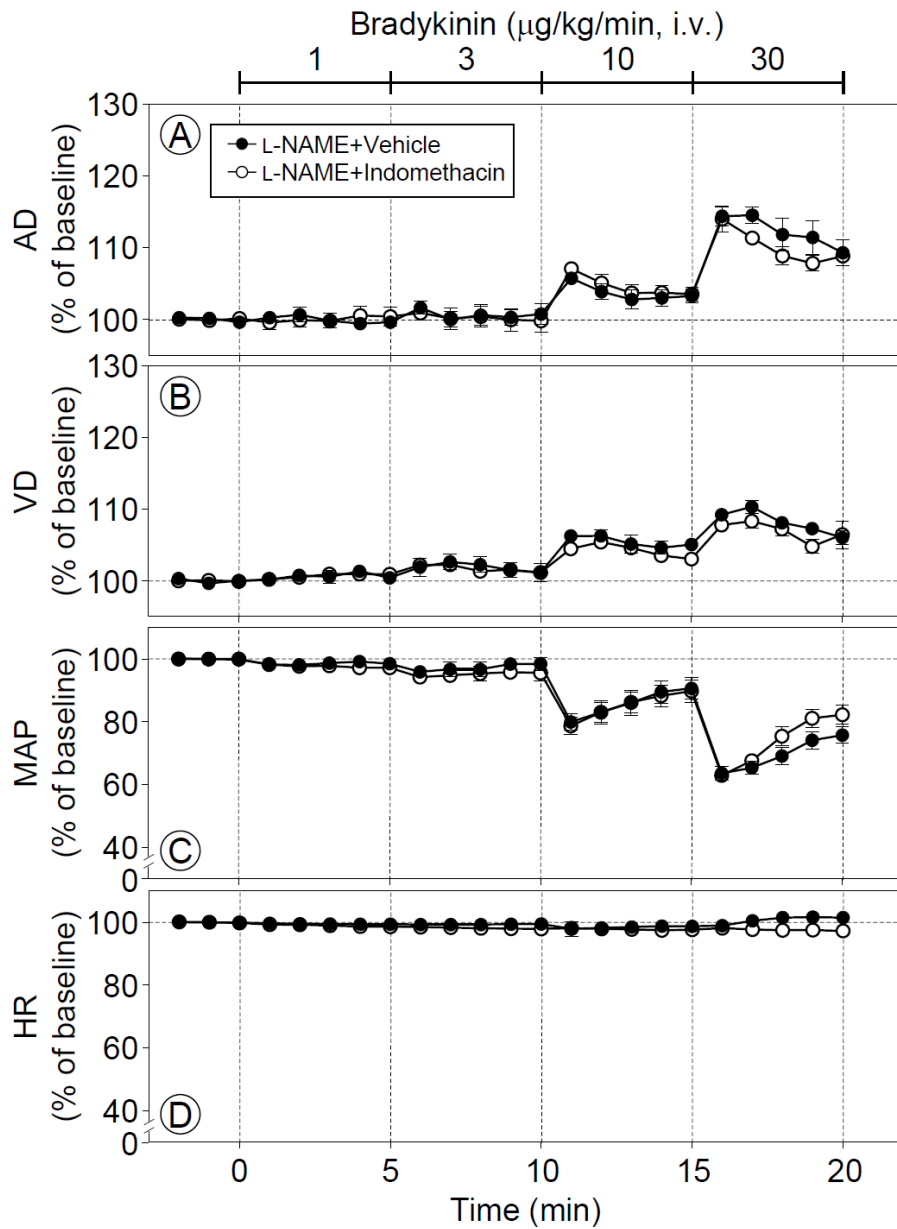


Figure 4.

Changes in retinal arteriolar diameter (AD)(A), retinal venular diameter (VD)(B), mean arterial pressure (MAP)(C) and heart rate (HR)(D) induced by intravenous infusion of bradykinin (1–30 µg/kg/min) in Brown Norway rats treated with indomethacin (5 mg/kg, i.v.) or the vehicle after treatment with L-NAME (30 mg/kg, i.v.). Data are expressed as percentage of the control level (baseline value measured just before starting infusion of bradykinin). Each point with a vertical bar represents mean±SEM of 5 animals.

1-4. 考察

オータコイドである bradykinin は、心血管機能の調節に重要な役割を果たしており、網膜組織においても網膜血流に対する重要な調節因子である可能性が考えられる (Ma et al., 1996, Rhaleb et al., 2011). Bradykinin は、多くの血管床において NO, PGs および EDHF を介して強力な血管拡張作用を示すことが知られているが、それらの寄与度は血管床によって様々であり、網膜組織における詳細な作用メカニズムは十分に解明されていない (Lipton et al., 1981, Lamontagne et al., 1992, Nagao et al., 1992, Nakashima et al., 1993, Honing et al., 2000). そこで本研究では、*in vivo* において bradykinin の網膜血管拡張作用について検討し、さらにその詳細なメカニズムについて解析を行った。

これまでに、小動物における眼底撮影法および血管造影法に関して、種々の方法が報告されている (Hawes et al., 1999, Paques et al., 2006, Paques et al., 2007, Murata et al., 2008). これらの方法により、非浸襲的かつ迅速に高画質で網膜血管の形態学的な情報を入手することが可能になってきているが、著者は本研究において、高画質のラット蛍光眼底像を長時間撮影することができる方法を確立し、この方法で網膜血管径を測定することにより、網膜血管の収縮および拡張反応に対して、より高い精度で薬効評価を行うことを可能とした。本研究では、平均分子量 2,000 kDa の FITC-dextran を血管造影試薬として用いることとした。その理由として、この高分子量 FITC-dextran を投与することで、少なくとも投与後 90 分間は高画質の蛍光網膜血管像を撮影することができ、さらにこの高分子量 FITC-dextran は網膜微小血管内にも分布し、高用量で bradykinin を静脈内に持続投与しても、血管外への漏出は認められなかったことが挙げられる。

本評価法を用いて、Brown Norway ラットにおける bradykinin の作用を検討した結果、用量依存的な降圧反応および網膜細動静脈の拡張反応が認められた。この反応は、血管内皮細胞膜表面に存在する 7 回膜貫通型受容体である B2 受容体に bradykinin が作用した結果であると考えられる (Hess et al., 1992, Regoli et al., 1998). Bradykinin は、NO,

PGs および EDHF といった血管拡張性物質の産生を促進させることにより、種々の血管床において血管拡張反応を惹起する。本研究においても、これらメカニズムによって降圧反応および網膜細動静脈の拡張反応が認められたと考えられる。一方で、前述の通り bradykinin による血管拡張作用における NO, PGs および EDHF の寄与度は血管床によって一様ではない可能性が考えられた。そこで次に、bradykinin の降圧作用および網膜血管拡張作用における、NO および PGs の関与について検討を行った。種々の血管床において、NO は血管平滑筋細胞に存在する可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化して、血管平滑筋細胞内の cGMP 量を増加させることにより強力な血管拡張作用を示す (Moncada et al., 1991)。一方、PGs はアラキドン酸を出発物質として COX および種々の合成酵素によって生成される脂質メディエーターであり、その中でも血管拡張性 PGs は、平滑筋細胞膜に発現する特異的受容体に作用して、細胞内 cAMP 量を増加させることにより血管拡張作用を示す。さらに、NO がグアニル酸シクラーゼ非依存的にアラキドン酸カスケードを活性化させることにより、血管拡張性 PGs の産生を介した細胞内 cAMP 量を増大させることで血管拡張作用を示すことも報告されている (Ogawa et al., 2007, Ogawa et al., 2009)。

Brown Norway ラットを非選択的 COX 阻害薬である indomethacin で前処置したところ、bradykinin による降圧作用には影響を及ぼさなかったものの、網膜血管拡張作用の減弱が認められた。この結果から、bradykinin による降圧作用に対しては血管拡張性 PGs の関与は小さいが、網膜血管拡張作用に対しては COX 経路を介した血管拡張性 PGs の産生が大きく関与していることが示唆された。さらに、網膜血管拡張作用に対する COX アイソフォームの関与について検討を行ったところ、bradykinin による網膜血管拡張作用は選択的 COX-2 阻害薬である nimesulide によって顕著に抑制されたが、選択的 COX-1 阻害薬である SC-560 では抑制されないという結果が得られた。また、bradykinin による降圧作用に対しては、nimesulide および SC-560 の両薬物ともに影響を及ぼさなかった。

これら結果から、網膜血管における bradykinin の血管拡張作用には、主に COX-2 経路を介した血管拡張性 PGs の産生が大きく関与していることが示唆された。一方、bradykinin による降圧作用に対して、各 COX 阻害薬は影響を及ぼさなかったことから、末梢血管における bradykinin の作用は COX 非依存的経路によるものと考えられた。

さらに、COX 経路依存的な bradykinin の網膜血管拡張作用における NO の関与を明らかにする目的で、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME 処置下において、bradykinin による網膜血管拡張作用および降圧作用に対する indomethacin の効果について検討を行った。その結果、L-NAME 処置下で認められた bradykinin による網膜血管拡張作用は、L-NAME 非処置下で認められた網膜血管拡張作用と比較して軽度であったことから、NO が網膜血管拡張反応に関与していることが考えられた。さらに、L-NAME 処置下においては、bradykinin による網膜血管拡張作用に対する indomethacin の抑制効果が消失することが明らかとなり、bradykinin は NO 依存的経路において、COX-2 を介した PGs の産生増加により網膜血管を拡張させる可能性が考えられた。

本研究において、bradykinin により放出された NO が COX-2 依存的経路を介して網膜血管拡張反応を発揮した可能性が考えられた。NO は、一般的に cGMP 経路を介して血管平滑筋を弛緩させることが知られている (Moncada et al., 1991)。しかしながら、NO は血管平滑筋において Ca^{2+} 依存的に K^{+} チャネルを活性化すること (Bolotina et al., 1994, Mistry et al., 1998) や、COX と相互作用して PGs の産生を促進する可能性が報告されている (Salvemini et al., 1993, Salvemini et al., 1996, Salvemini, 1997, Mollace et al., 2005)。さらに、網膜循環においては NO 供与体の血管拡張反応が COX 阻害やアデニル酸シクラーゼ阻害により顕著に抑制されることが報告されている (Hardy et al., 1998, Ogawa et al., 2007, Ogawa et al., 2009)。また、*in vitro* 実験においては、bradykinin により誘発される網膜血管拡張反応が NO 合成酵素阻害薬では抑制されなかったが、COX-2 阻害薬により抑制されたことが報告されている (Abdouh et al., 2003)。

Bradykinin を頸動脈内や硝子体内に局所的に投与する実験も選択肢として考えられたが、今回の研究では網膜血管に対する血管拡張反応を末梢血管の反応と比較することを目的としていたため、bradykinin を静脈内投与することにより検討を行った。一定の毛細血管還流量を確保するために、網膜細動脈圧の変化が、圧自動調節能を介して血管径を代償的に変化させることが知られている (Riva et al., 1981, Robinson et al., 1986)。さらに、PGs および NO が網膜循環の自動調節能に寄与している可能性もあることから、bradykinin の静脈内投与により認められた降圧作用が、PGs や NO などの血管拡張性物質を代償的に増加させた結果、網膜血管径を拡張させた可能性も考えられた (Chemtob et al., 1991, Okuno et al., 2002)。しかしながら、イソプロテレノールによる網膜血管拡張作用が L-NAME 処置の影響を受けないことが報告されていることから (Nakazawa et al., 2008)、今回の研究で認められた bradykinin の網膜血管拡張作用に、圧自動調節機構が関与している可能性は低いと考えられる。

以上の結果から、bradykinin の網膜血管における拡張メカニズムには、血圧調節に重要な意義を有する末梢血管における場合とは異なり、NO ならびに COX-2 を介する経路による PGs の産生が重要である可能性が示された。従って、bradykinin によって活性化される NO-PGs-cAMP 情報伝達経路は、網膜循環調節において重要な役割を果たしており、糖尿病網膜症の新規治療戦略の標的となることが期待された (Figure 5)。

Bradykinin および bradykinin の代謝産物である des-Arg9-bradykinin は、血管拡張作用以外にも血管透過性の亢進に関与することが示唆されている (Abdouh et al., 2008, Phipps et al., 2009)。そのため、bradykinin を用いて網膜循環を改善する戦略は、血管透過性を亢進して眼内浮腫および出血のリスクを高める可能性がある。一方、キニン関連薬として、キニン遊離により血管拡張作用を示すカリジノゲナーゼが網脈絡膜循環障害改善薬として承認・販売されている。このカリジノゲナーゼは、STZ 誘発糖尿病ラットにおいて、眼内の VEGF 量を減少させるとともに網膜血管透過性を低下させることが報告され

ている (Kato et al., 2009). また, カリジノゲナーゼは高酸素負荷網膜血管新生マウスで認められた網膜異常血管を抑制し, そのメカニズムとして VEGF₁₆₅ を選択的に切断する作用を介している可能性が示唆されている (Nakamura et al., 2011). さらに, カリジノゲナーゼは, 網脈絡膜循環障害の患者を対象とした臨床試験において, 網膜出血, 白斑および網膜浮腫に対して著明な改善効果を示している (医薬品インタビューフォーム: カルナクリン錠). このことから, カリジノゲナーゼを用いた網膜循環改善は, 臨床上で有用である可能性が考えられる. しかしながら, カリジノゲナーゼは, アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬との併用では血中キニン濃度を過剰に増大させるため, 過度の降圧が引き起こされる可能性も考えられる.

本研究において COX-2 阻害薬は, bradykinin の降圧作用を抑制することなく網膜血管拡張作用を抑制したことから, 血圧調節に重要な末梢血管とは異なり, 網膜血管においては COX-2 経路を介した PGs の産生が網膜血管拡張作用を仲介する物質として機能する可能性が考えられた. 一方, 網膜血管における PGs 産生には COX-1 が寄与している可能性も示唆されている (Ogawa et al., 2009). Bradykinin は, 網膜組織において COX-2 の発現を亢進するため, 本研究で認められた COX-2 経路を介した PGs 産生が生理的条件下で生じるか否かについては今後の検討課題である (Lim et al., 2008). NO 供与体による網膜血管拡張反応について検討した研究において, 可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害薬では影響を受けなかったのに対して, アデニル酸シクラーゼ阻害薬で血管拡張反応が抑制されたことから, 網膜血管において NO は, 細胞内 cGMP の増大ではなく, PGs 産生を介して cAMP を増大させることにより血管拡張作用を示すことが考えられる (Ogawa et al., 2007, Ogawa et al., 2009). また, NO が PGI₂ の産生・遊離を増大させることにより血管拡張作用を示すことや PGI₂ および PGE₂ が網膜細動静脈を強く拡張することが報告されている (Hardy et al., 1998, Mori et al., 2007). さらに本研究において, bradykinin により NO, PGs および EDHF の血管拡張物質の産生を同時に亢進させた生

理学的に起こり得る条件においても、PGs 産生を介した cAMP の増大が、特異的に網膜血管を拡張させる可能性が考えられた。以上より、過度の降圧反応を引き起こすことなく特異的に網膜血管を拡張させることを目的として、IP 受容体や EP₂ 受容体といった炎症惹起を伴わない PGs の受容体を活性化させることにより、網膜血管に特徴的な NO-PGs-cAMP 情報伝達経路を特異的に活性化させて、糖尿病病態時に低下する網膜循環を改善させることが、糖尿病網膜症の新規治療戦略として有用である可能性が考えられた。

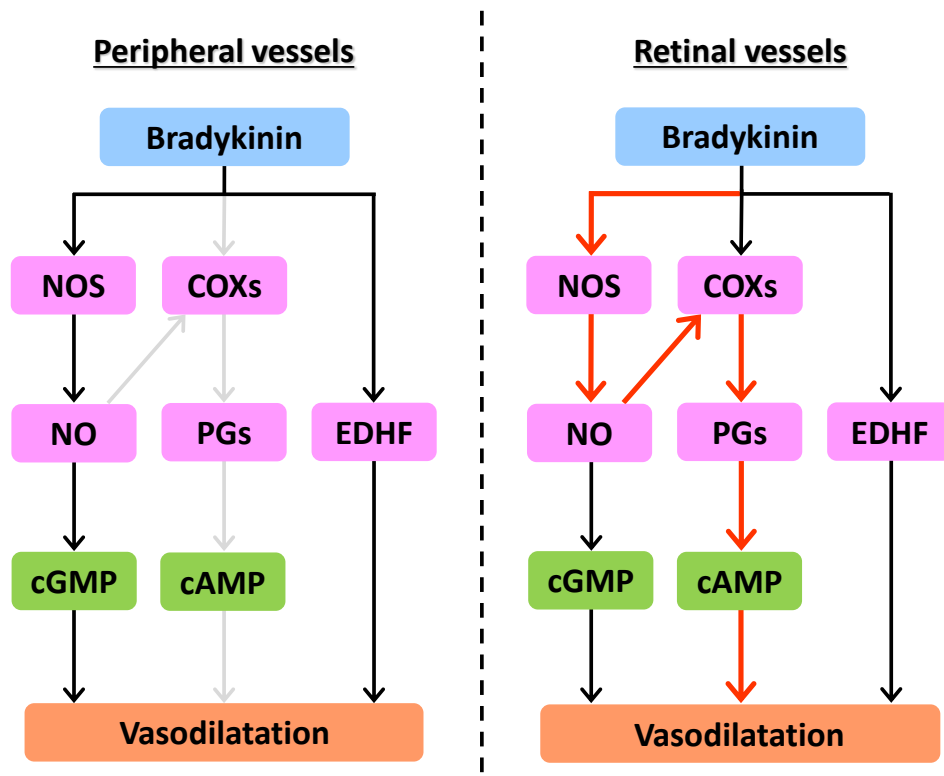


Figure 5.

Proposed differences in vasodilatory mechanism of bradykinin on peripheral vessels and retinal vessels.

第 II 部

糖尿病性腎症に対する新規治療戦略の探索

糖尿病性腎症モデルラットを用いた

SGLT2 阻害薬の糖尿病性腎症に対する効果

2-1. 緒言

慢性腎障害は、全世界において医療費の増加の重大な原因の一つとなっており、今後その患者数ならびに医療費が増加の一途を辿ることが懸念されることから、医療健康上の大きな問題として挙げられている。その中でも糖尿病性腎症は、尿タンパク排泄の進展、糸球体硬化、腎間質線維化などの病態進行過程を辿り、最終的には腎機能が廃絶するために末期腎不全および人工透析導入の主たる原疾患となっている（Ritz et al., 1999, Remuzzi et al., 2006）。実際に、本邦において糖尿病性腎症は透析導入原因疾患の第1位であり、新規透析導入患者の約44%が糖尿病性腎症を罹患していることが示されている（一般社団法人 日本透析医学会 統計調査委員会）。

この糖尿病性腎症の発症・進展を抑制するためには、原因疾患である糖尿病および高血圧症を是正することが重要であると考えられている。慢性腎臓病に対する診療ガイドラインでは、降圧薬であるレニン-アンジオテンシン系阻害薬が糖尿病性腎症に対する第一選択薬として考慮されている（一般社団法人 日本腎臓学会 エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2013）。ACE 阻害薬やアンジオテンシン II AT1 受容体拮抗薬などのレニン-アンジオテンシン系阻害薬では、臨床試験において糖尿病性腎症の正常および微量アルブミン尿症例または顕性アルブミン尿症例に対して、腎機能障害の発症および進展を抑制する効果が示されている（Lewis et al., 1993, The EUCLID Study Group, 1997, Brenner et al., 2001, Makino et al., 2007）。しかしながら、これらレニン-アンジオテンシン系阻害薬などの降圧薬や既存の糖尿病治療薬では糖尿病性腎症の発症および進行を遅延させることはできるものの、完全に抑制することはできないことが課題となっている（Ohkubo et al., 1995, Ueda et al., 2003, Casas et al., 2005, Mann et al., 2008）。そのため、さらに効果的な腎保護効果を示す治療戦略の探索が必要であると考えられる。

ナトリウム依存性グルコース共輸送担体（Sodium-glucose cotransporter : SGLT）は、細胞内外のナトリウムイオンの濃度差に依存して糖を細胞内へ能動輸送するトランス

ポーターである。腎臓の近位尿細管 S1 セグメントには低親和性でグルコース輸送能が大きい SGLT2 が、腎臓の近位尿細管 S3 セグメントには高親和性でグルコース輸送能が小さい SGLT1 が発現しており、これらトランスポーターが協働して糸球体で濾過されたグルコースを体内へ再吸収している。特に SGLT2 は、腎臓の尿細管におけるグルコース再吸収の約 90% を担っており、さらに糖尿病病態時には SGLT2 の発現が亢進することから、近位尿細管における SGLT2 を介したグルコースの再吸収が亢進して、高血糖状態が維持・進行することが病態生理学的に示唆されている (Kanai et al., 1994, Vestri et al., 2001, Rahmoune et al., 2005, Tabatabai et al., 2009) 。そのため、近位尿細管における SGLT2 を阻害することで、グルコースの再吸収を抑制して尿中に排泄することができれば、血中へのグルコースの再吸収が減少して血糖値が低下する可能性が提唱されて、SGLT2 阻害薬の研究開発が進められてきた。実際に、各種糖尿病モデル動物および糖尿病患者に対して、SGLT2 阻害薬は尿糖排泄促進作用を介した良好な血糖低下作用を示し、2016 年現在、日本を含む多くの国々で承認されている (Han et al., 2008, Bailey et al., 2010, Kakinuma et al., 2010, Yamamoto et al., 2011, Suzuki et al., 2012, Tahara et al., 2012, Wilding et al., 2013, Yale et al., 2013) 。しかしながら、SGLT2 は生理学的には生体内のカロリーを維持するメカニズムとして働いている可能性も考えられることから、SGLT2 阻害薬が標的臓器である腎臓に対して悪影響を及ぼさないか否かについては検証の必要がある。一方、SGLT2 阻害薬は長期的に良好な血糖コントロールを維持できることから、糖尿病性腎症に対して改善効果を示す可能性も考えられる。

また、糖尿病病態時には、近位尿細管においてグルコースとともにナトリウムの再吸収も増加することが考えられる。この近位尿細管におけるナトリウムの再吸収亢進は、結果として遠位尿細管に局在する緻密斑への塩化ナトリウム (NaCl) の流入を低下させるため、輸入細動脈の緊張性を保つ機構である尿細管糸球体フィードバック機構を不活性化させる可能性が考えられる。そのため、生理学的に必要な場合においても、輸入細

動脈の収縮が十分に起こらないため、糸球体内への血流量の調節が不十分となり、最終的に糸球体内圧の増加を伴った糸球体過剰濾過を引き起こす可能性が考えられる (Noonan et al., 2001, Vallon et al., 2012) . この糸球体内圧の増加は、糖尿病性腎症の主症状であるメサンギウム基質の増加・蓄積、糸球体構造の破壊、糸球体硬化などを引き起こすことが考えられている (Figure 6) . 一方、SGLT2 阻害薬は近位尿細管において、グルコースとともにナトリウムの再吸収を抑制するため、この糖尿病病態時に起こる病態生理学的な変化に対して、近位尿細管におけるナトリウムの再吸収増加を抑制することで、尿細管糸球体フィードバック機構の破綻を是正して糸球体内圧および糸球体過剰濾過を軽減させることから、腎保護効果を発揮する可能性が考えられる (Vallon et al., 2013, Cherney et al., 2014, Schernthaner et al., 2014) .

このような背景から、非臨床研究において各種 SGLT2 阻害薬の腎障害への有効性が検討されている。2 型糖尿病モデル動物である db/db マウスにおいて、SGLT2 阻害薬であるトホグリフロジンおよびダパグリフロジンは、メサンギウム基質拡大およびアルブミン尿排泄を抑制することが報告されている (Nagata et al., 2013, Terami et al., 2014) . また、SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジンは、2 型糖尿病モデル動物である ob/ob マウスにおいて糖尿病性腎症の初期症状である糸球体過剰濾過やメサンギウム基質拡大を抑制する効果が報告されているが、高血圧を併発した状態においては腎肥大やメサンギウム基質拡大に対して抑制効果は認められていない (Gembardt et al., 2014) . また、SGLT2 を遺伝子欠損したマウスに STZ を処置して糖尿病を誘発した検討において、SGLT2 を欠損することにより高血糖および糸球体過剰濾過を抑制したにも関わらず、メサンギウム基質拡大や腎間質線維化を抑制する効果は認められなかったとの報告もある (Vallon et al., 2013) . さらに、1 型糖尿病モデル動物である Akita マウスに対して、SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジンは、糸球体過剰濾過、腎肥大およびアルブミン尿排泄を抑制する効果を示した (Vallon et al., 2014) . 以上のように、非臨床研究に

において SGLT2 阻害薬の糖尿病性腎症に対する有効性が検証されているが、これら研究で用いられているモデル動物は尿タンパク排泄の進展、メサンギウム基質の増加・蓄積、糸球体硬化、腎間質線維化、糸球体濾過量低下などの糖尿病性腎症患者に類似した進行性の病態変化を呈さないことから、SGLT2 阻害薬が進行性の病態進展を伴う糖尿病性腎症患者に対して有用であるか否かについては不明である (Breyer et al., 2005, Brosius et al., 2009, Kong et al., 2013) . そのため、糖尿病性腎症患者に類似した進行性の病態進展を呈するモデル動物を用いて、SGLT2 阻害薬の薬効を評価することが必要であると考えられた.

以上のような背景から、本研究では微量アルブミン尿および糸球体過剰濾過を主症状とする早期腎症期、尿タンパク排泄の進展を主症状とする顕性腎症期、糸球体濾過量の低下を主症状とする腎不全期の各病期における糖尿病性腎症患者に類似した症状を呈するモデル動物に対して SGLT2 阻害薬の効果を検討することにより、SGLT2 阻害薬の糖尿病性腎症に対する有効性を総合的に検討することを目的とした。本研究に用いた 2 種類の糖尿病性腎症モデル動物の主な特徴は以下の通りである (Figure 7) .

早期腎症期から顕性腎症期の糖尿病性腎症症状を呈するモデル動物として、食塩感受性 Dahl (Dahl S) ラットに STZ を投与することにより、1 型糖尿病を発症させたモデル (Dahl-STZ ラット) を用いて検討を行った。Dahl-STZ ラットは、糸球体過剰濾過、糸球体基底膜肥厚、メサンギウム基質拡大、尿タンパク排泄などの早期腎症期症状を呈し、病態がさらに進行すると、顕性腎症期で認められる尿タンパク排泄の進展、結節性変化を伴うメサンギウム基質拡大、局所性から全体性への進行を伴う糸球体硬化、腎間質線維化などを呈することが報告されている (Slaughter et al., 2013) . Dahl-STZ ラットが糖尿病性腎症の進行性症状を示す原因は未だ明らかではないが、Dahl S ラットでは輸入細動脈の筋原性反応や尿細管糸球体フィードバック機構が破綻していることが関与している可能性が考えられる (Ge et al., 2014) .

さらに、顕性腎症期から腎不全期の糖尿病性腎症症状を呈するモデル動物として、Goto-Kakizaki ラットと Fawn Hooded Hypertensive ラットを交配して作製した 2 型糖尿病性腎症モデル (T2DN ラット) を用いて検討を行った。T2DN ラットは、尿タンパク排泄の進展などの顕性腎症期症状を呈し、病態がさらに進行すると、結節性病変を含む重度の糸球体硬化、腎間質線維化などの腎組織の荒廃を伴い、最終的には糸球体濾過量が低下するといった腎不全期症状に類似した症状を呈することが報告されている (Nobrega et al., 2004, Nobrega et al., 2009, Williams et al., 2011) 。

本研究では、これらモデル動物に SGLT2 阻害薬である luseogliflozin[TS-071: (1S)-1, 5-anhydro-1-[5-(4-ethoxybenzyl)-2-methoxy-4-methylphenyl]-1-thio-D-glucitol] (Kakinuma et al., 2010) (Figure 8) を単独投与または ACE 阻害薬である lisinopril と併用投与することにより、SGLT2 阻害薬の糖尿病性腎症に対する効果について検討を行った。

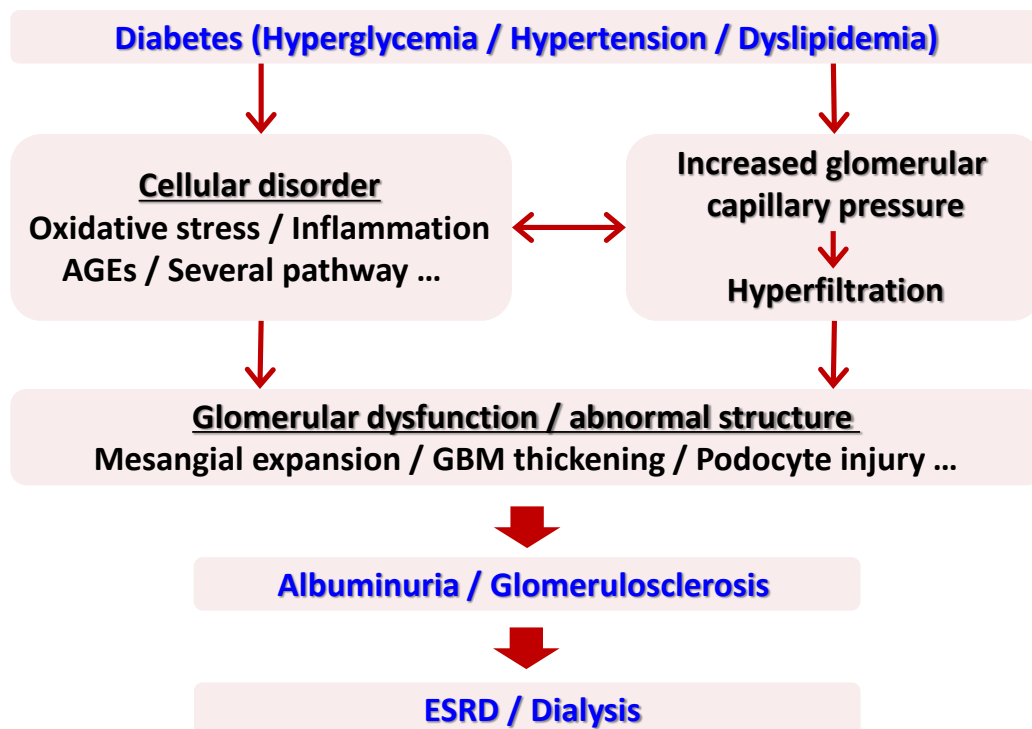


Figure 6.

Proposed mechanisms involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

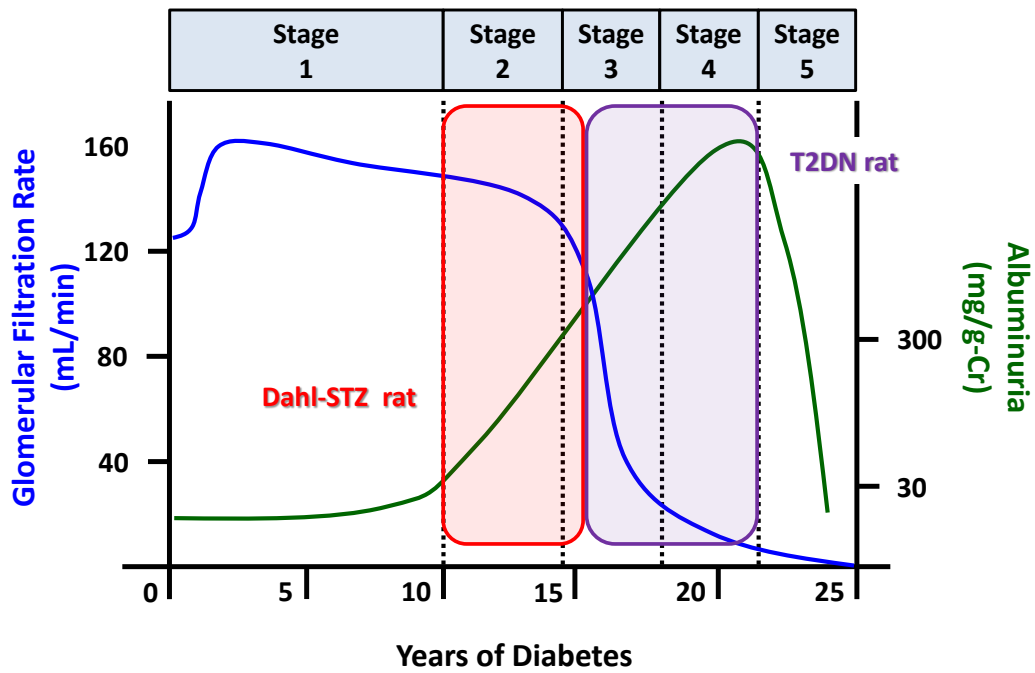


Figure 7.

Characteristic of diabetic nephropathy model animals used in this research.

- Stage 1: Pre-nephropathy
- Stage 2: Incipient nephropathy
- Stage 3: Overt nephropathy
- Stage 4: Kidney failure
- Stage 5: Dialysis therapy

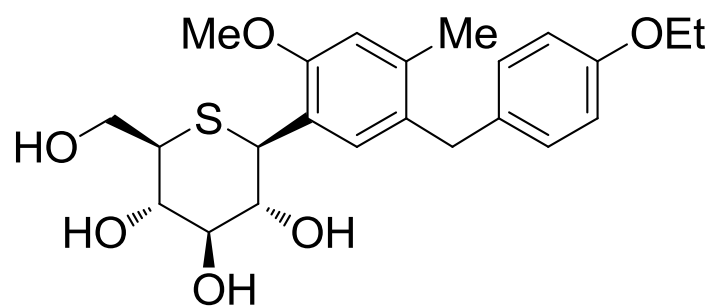


Figure 8.

Structure of luseogliflozin.

2-2. Dahl-STZ ラットにおける SGLT2 阻害薬および ACE 阻害薬の

糖尿病性腎症に対する効果の検討

2-2-1. 研究方法

2-2-1-1. 使用動物

ミシシッピ大学医療センターで系統維持した 8 週齢の雄性 Dahl S ラットを実験に供した。本研究で用いたラットは、全米実験動物ケア評価認証協会 (AALAC) の承認を受けたミシシッピ大学医療センター内の動物実験施設において、1% NaCl 含有通常餌 (Harlan Teklad 8640, Harlan Laboratories, Madison, WI, USA) を用いて、自由摂餌・自由摂水下で飼育を行った。本実験プロトコールは、ミシシッピ大学医療センターの動物実験委員会により承認されている。

2-2-1-2. Dahl-STZ ラットの腎障害進展に対する作用

一晩絶食下に置いた 8 週齢の Dahl S ラットに、50 mg/kg の STZ (Sigma-Aldrich) を尾静脈内に単回投与することにより糖尿病を誘発させて Dahl-STZ ラットを作製した。過度な代謝障害を抑制して血糖値を 300~600 mg/dL に維持する目的で、STZ 投与時に約 40 日間ヒトインスリンを~2 U/日の速度で排出することができる長時間作用型 insulin 徐放剤 (Linpant, Linshin Canada, ON, Canada) を背部皮下に留置した。STZ 投与 3 日後に、簡易型血糖測定装置 (Bayer HealthCare, Mishawaka, IN, USA) を用いて血糖値を測定して高血糖を確認した。

糖尿病発症を確認した後、Dahl-STZ ラットを無作為に、以下のように 5 群に分けた。1 群には通常餌および飲料水を自由摂取させた (病態対照群)。2 群には SGLT2 阻害薬である luseogliflozin を 1 日平均投与量が約 10 mg/kg となるように 0.01% の濃度で混合した粉餌を与えた (Luseogliflozin 投与群)。3 群には ACE 阻害薬である lisinopril (Cayman

Chemical) を 1 日平均投与量が約 20 mg/kg となるように調製した飲料水を与えた (Lisinopril 投与群) . 4 群には luseogliflozin を 1 日平均投与量が約 10 mg/kg となるように調製した粉餌および lisinopril を 1 日平均投与量が約 20 mg/kg となるように調製した飲料水を与えた (併用療法群) . 5 群には血糖値を正常範囲に維持する目的で, さらに insulin 徐放剤を背部皮下に追加で留置した (Insulin 投与群) . Insulin 投与群については, 実験期間中において随時血糖値が 200 mg/dL を超えた際に insulin 徐放剤を追加で背部皮下に留置した. また, 糖尿病によって進行する腎血行動態異常および腎組織傷害を評価する目的で, ベースライン対照群として 9~10 週齢の未処置 Dahl S ラットを用いた.

血液サンプルは, 血糖値, 糖化ヘモグロビン (HbA1c) 値, 血中インスリン値および血中 luseogliflozin 濃度を測定する目的で尾静脈から採取した. また, 24 時間の蓄尿サンプルは, 尿中グルコース排泄および尿タンパク排泄を評価する目的で, 代謝ケージを使用して採集した.

尿中タンパク濃度は, Bradford 法 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で測定した. 尿中グルコース濃度は, グルコースオキシダーゼ / ペルオキシダーゼ法 (Cayman Chemical) で測定した. HbA1c 値は, 簡易型 HbA1c 測定装置 (Bayer HealthCare, Sunnyvale, CA, USA) を用いて測定した. 血圧は, tail-cuff 式血圧測定装置 (Hatteras Instruments, Cary, NC, USA) を用いて測定した. 血中および尿中クレアチニン濃度は, Jaffe 反応 (Wako Chemicals USA, Richmond, VA, USA) で測定した. 血中インスリン値は, ELISA 法 (Mercodia, Uppsala, Sweden) で測定した. 血中 luseogliflozin 濃度は, LC/MS/MS で測定した. グルコース排泄率は, 以下の式 (1) により算出した.

$$(Uglu / Pglu) / (Ucr / Pcr) \dots (1)$$

Uglu : 尿中グルコース濃度

Pglu : 血中グルコース濃度

Ucr : 尿中クレアチニン濃度

Pcr : 血中クレアチニン濃度

2-2-1-3. Dahl-STZ ラットの腎血行動態に対する作用

反復投与試験終了時に、以下に示す通りに腎血行動態に対する検討を行った。ケタミン (Phoenix Pharmaceutical, St. Joseph, MO, USA) を 20 mg/匹の用量で筋肉内に、イナクチン (Sigma-Aldrich) を 50 mg/kg の用量で腹腔内に注射して麻酔したラットを保温台に静置して体温を約 37°C に維持した。気管に PE-240 を挿入して気道を確保した後、平均血圧を測定する目的で右大腿動脈にカニューレを挿入した。さらに、FITC 標識イヌリン溶液を静脈内投与する目的で、右大腿静脈にカニューレを挿入した。FITC 標識イヌリン溶液は、0.9% NaCl, 2% ウシ血清アルブミンおよび 2 mg/mL FITC 標識イヌリンを混合して調製し、糸球体濾過量を測定する目的で静脈内に 6 mL/hr の速度で定速注入した。さらに、腎動脈に超音波血流プローブを装着して腎血流量を測定した。FITC 標識イヌリン溶液注入開始後 30 分間で、尿および血漿サンプルを採取した。血漿中および尿中イヌリン濃度は、マイクロプレートリーダー (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) を用いて FITC の蛍光強度を指標として測定し、糸球体濾過量を算出した。濾過率は、糸球体濾過量を腎血漿流量で除することにより算出した。

2-2-1-4. Dahl-STZ ラットの腎組織傷害に対する作用

腎血行動態試験終了後、左腎を摘出して湿重量を測定した後、10%緩衝ホルマリン溶液に浸漬した。この腎臓サンプルを用いて、パラフィン切片（3 μm）を作製し、糸球体傷害度、腎線維化および尿細管壊死を評価する目的でマッソントリクローム染色を施行した。糸球体傷害度については、各切片当たり腎皮質領域に局在する糸球体 30 個に対して、以下に示すスコア指標に基づいてマスク化して評価を行った。

スコア 0： 正常糸球体

スコア 1： 糸球体毛細血管領域の 1～25%脱落

スコア 2： 糸球体毛細血管領域の 26～50%脱落

スコア 3： 糸球体毛細血管領域の 51～75%脱落

スコア 4： 糸球体毛細血管領域の>75%脱落

さらに、DS-Fil1 カラーカメラ（Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA）を装着した顕微鏡（Nikon Eclipse 55i, Nikon Instruments Inc.）を用いて、腎皮質領域および腎髄質領域の組織画像を撮影した。腎線維化は、画像解析ソフト（NIS-Elements D 3.0, Nikon Instruments Inc.）を用い、各切片当たり 10 ヲ所の腎皮質領域および腎髄質領域について、青色に染色された線維化面積を解析することにより評価した。また、尿細管壊死は、同一の画像解析ソフトを用いて、各切片当たり 3 ヲ所の腎髄質領域について、赤色の蛍光を発する蛋白円柱面積を解析することにより評価した。

2-2-1-5. 統計解析

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。実験群間の統計学的有意差は、実験開始前に計画した解析方法として、SigmaPlot 11 (Systat Software, San Jose, CA, USA) を用いて、分散分析後に Holm-Sidak 多重比較検定を実施することにより検討を行った。

2-2-2. 結果

2-2-2-1. 薬物投与量

Luseogliflozin 投与群および併用療法群における luseogliflozin の一日平均投与用量は約 10 mg/kg であり, さらに血中 luseogliflozin 濃度は約 30 ng/mL であった. また, lisinopril 投与群および併用療法群における lisinopril の一日平均投与用量は約 20 mg/kg であった.

2-2-2-2. Dahl-STZ ラットの摂餌量および体重に対する作用

摂餌量および体重に対する評価結果を Figure 9A および 9B に示す.

Dahl S ラットに STZ を投与することにより糖尿病を誘発させた結果, insulin 投与群以外の全群において摂餌量の増加が認められた. 病態対照群および lisinopril 投与群では, 実験期間を通じて大きな体重の変化は認められなかった. 一方, luseogliflozin 投与群の体重においては, 病態対照群と比較して有意な増加が認められた. さらに, insulin 投与群の体重についても, 病態対照群と比較して, 顕著な摂餌量の減少が認められたのにも関わらず有意な増加が認められた.

2-2-2-3. Dahl-STZ ラットの摂水量, 尿量および尿中グルコース排泄率に対する作用

摂水量および尿量に対する評価結果を Figure 9C および 9D に示す.

Dahl S ラットに STZ を投与することにより糖尿病を誘発させた結果, 病態対照群において摂水量および尿量の増加が認められた. Insulin 投与群において, 血糖値を正常血糖値付近にコントロールした結果, 摂水量および尿量の増加が顕著に抑制された. Luseogliflozin 投与群においては, 投与開始 2 週間後において, 病態対照群と同程度の摂水量および尿量の増加が認められたが, その後, 病態対照群と比較して顕著な摂水量および尿量の減少が認められた.

尿中グルコース排泄率に対する評価結果を Figure 10 に示す。

Luseogliflozin 投与群および併用療法群において、病態対照群と比較して尿中グルコース排泄率の顕著な増加が認められた。一方、insulin 投与群では、病態対照群と比較して尿中グルコース排泄率の顕著な低下が認められた。また、lisinopril 投与群においては、病態対照群と比較して尿中グルコース排泄率に対して有意な作用は認められなかった。

2-2-2-4. Dahl-STZ ラットの血糖値および HbA1c 値に対する作用

随時血糖値および HbA1c 値に対する評価結果を Figure 11A および 11B に示す。

試験開始時において、Dahl-STZ ラットの血糖値は約 400 mg/dL を示し、高血糖状態を呈していた。Luseogliflozin 投与群および insulin 投与群においては、各薬物の投与により血糖値および HbA1c 値が正常血糖値付近まで低下する作用が認められた。同様に併用療法群においても、血糖値および HbA1c 値が正常血糖値付近まで低下する作用が認められた。一方、lisinopril 投与群では、病態対照群と比較して血糖値および HbA1c 値に有意な作用を示さなかった。

2-2-2-5. Dahl-STZ ラットの血中インスリン値に対する作用

血中インスリン値に対する評価結果を Figure 11C に示す。

病態対照群の血中インスリン値は、ベースライン対照群と比較して有意に低値を示した。Insulin 投与群の血中インスリン値は、病態対照群の血中インスリン値と比較して有意に高値を示し、その程度は約 5 倍であった。一方、luseogliflozin および lisinopril 投与群では、病態対照群と比較して血中インスリン値に対する有意な作用は認められなかった。

2-2-2-6. Dahl-STZ ラットの血圧および尿タンパク排泄量に対する作用

Tail-cuff 法で測定した平均血圧に対する評価結果を Figure 12A に示す。

8 週間の試験期間を通じて、病態対照群の平均血圧は 111 mmHg から 145 mmHg に上昇した。Luseogliflozin 投与群においては、病態対照群と比較して平均血圧に対する有意な作用は認められなかった。一方、lisinopril 投与群では、投与 8 週目において、病態対照群と比較して顕著な降圧作用が認められた。さらに、併用療法群においては、luseogliflozin または lisinopril 単独投与群と比較して、より強い降圧作用が認められた。

尿タンパク排泄量に対する評価結果を Figure 12B に示す。

8 週間の試験期間を通じて、Dahl-STZ ラットにおいて尿タンパク排泄の進展が認められた。Insulin 投与群においては、血糖値を正常血糖値付近にコントロールした結果、尿タンパク排泄の増加が顕著に抑制された。一方、luseogliflozin 投与により血糖値を正常血糖値付近にコントロールすることができたものの、尿タンパク排泄に対する有意な抑制は認められなかった。また、lisinopril 投与群においては、試験期間を通じて、病態対照群と比較して顕著な尿タンパク排泄の抑制が認められた。さらに併用療法群では、投与 8 週目において、luseogliflozin または lisinopril 単独投与群と比較して、より強力な尿タンパク排泄抑制効果が認められた。

2-2-2-7. Dahl-STZ ラットの腎重量に対する作用

腎重量に対する評価結果を Figure 13A に示す。

病態対照群の腎重量は、ベースライン対照群と比較して 57% の増加を示した。Luseogliflozin 投与群および insulin 投与群において、病態対照群と比較して顕著な腎重量の低下が認められた。また、lisinopril 投与群においても、病態対照群と比較して顕著な腎重量の低下が認められた。併用療法群においては、luseogliflozin または lisinopril 単独投与群と同程度の腎重量の低下が認められた。

2-2-2-8. Dahl-STZ ラットの腎血行動態に対する作用

腎血行動態に対する評価結果を Figure 13B, 13C および 13D に示す。

Dahl S ラットに対して STZ により糖尿病を誘発させた結果、糸球体過剰濾過症状が認められた。すなわち、ベースライン対照群と比較して、Dahl-STZ ラットの糸球体濾過量は腎血流量の大きな変化を伴わずに約 2 倍に上昇し、さらに濾過率も約 2 倍に上昇した。これに対して、luseogliflozin 投与群および insulin 投与群では、病態対照群で認められた糸球体濾過量および濾過率の増加を顕著に抑制する効果が認められた。Lisinopril 投与群においても同様に、病態対照群で認められた糸球体濾過量および濾過率の増加を顕著に抑制する効果が認められた。さらに併用療法群においても、luseogliflozin または lisinopril 単独投与群と同様に、糸球体濾過量および濾過率の増加を抑制する効果が認められた。

2-2-2-9. Dahl-STZ ラットの腎組織傷害に対する作用

腎組織傷害に対する評価結果を Figure 14, 15 および 16 に示す。

病態対照群の腎組織を解析した結果、糸球体基底膜の肥厚、糸球体メサンギウム基質の増加、局所性糸球体硬化、腎間質線維化、腎髄質領域における尿細管壊死などが認められた。病態対照群の糸球体傷害を評価した結果、糸球体傷害度は 2.58 ± 0.06 を示し、25%以上の糸球体毛細血管が脱落・線維化していたことが明らかとなった。さらに、糸球体傷害度のスコア毎の糸球体数を解析した結果、病態対照群においては半数以上の糸球体が重度の糸球体傷害を示すスコア 3 および 4 であった。

Luseogliflozin 投与群において、糸球体傷害度、腎髄質外層領域の線維化および尿細管壊死の指標である蛋白円柱形成に対する顕著な改善効果が認められた。一方、insulin 投与群では、糸球体傷害度および腎髄質外層領域の線維化に対して顕著な改善効果が認められたが、蛋白円柱形成に対する改善効果は認められなかった。また、lisinopril 投与群

では、糸球体傷害度、腎皮質および腎髄質外層領域の線維化および蛋白円柱形成に対する改善効果が認められた。併用療法群においても、糸球体傷害度、腎皮質および腎髄質外層領域の線維化および蛋白円柱形成に対する改善効果が認められ、さらに腎髄質外層領域の線維化および蛋白円柱形成に関しては、luseogliflozin または lisinopril 単独投与群と比較して、より有効な併用効果が認められた。

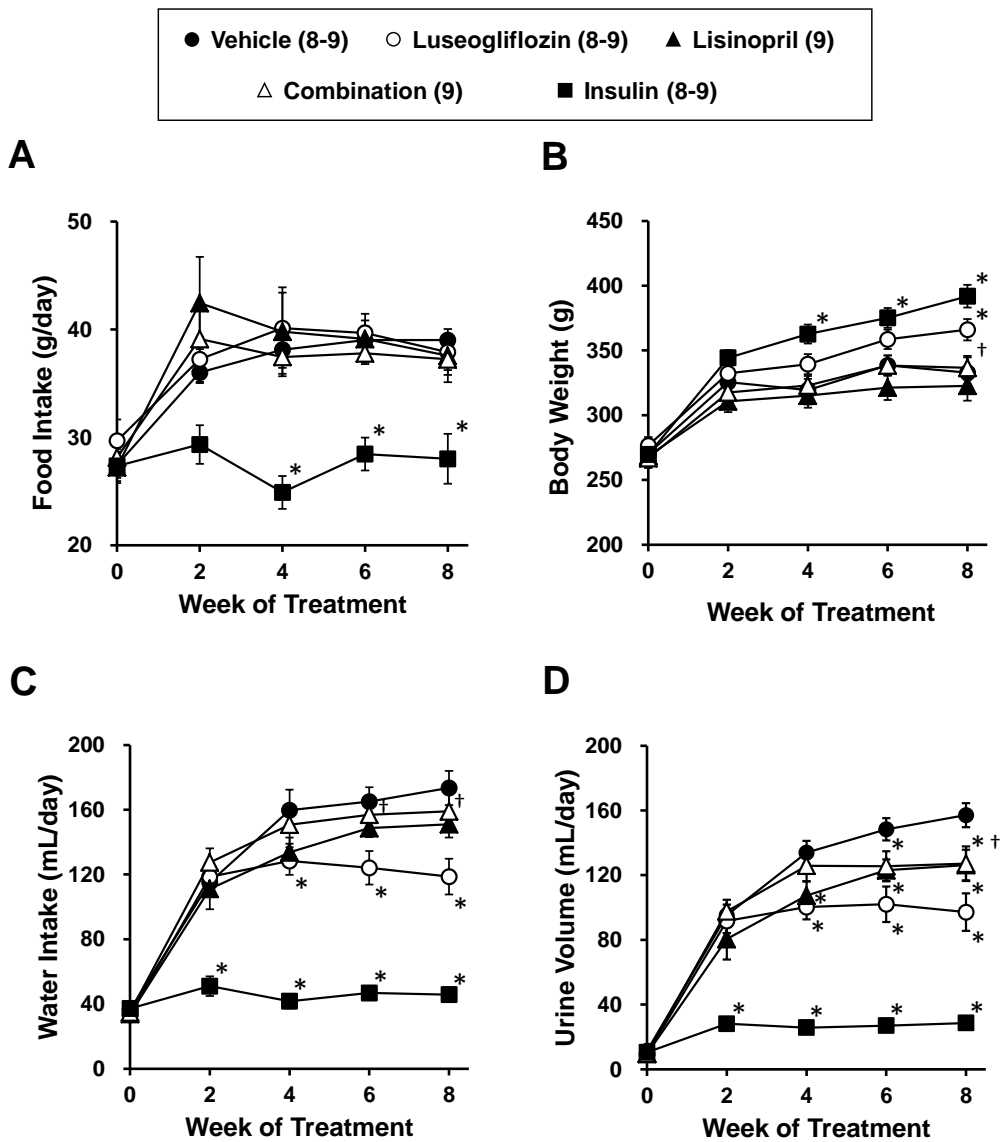


Figure 9.

Effects of luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on daily food intake (A), body weight (B), daily water intake (C) and daily urine volume (D) in Dahl-STZ rats. Numbers in parenthesis indicate the number of rats in which a complete data set was collected per group.

*Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats.

†Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats.

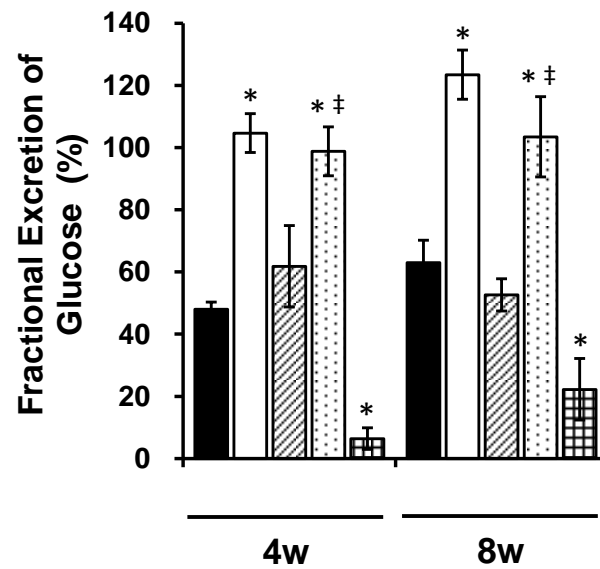
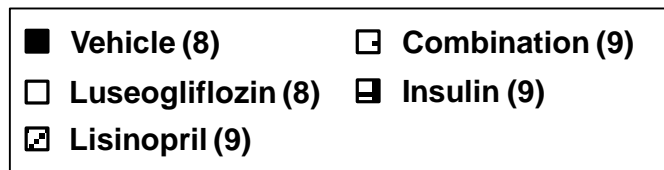


Figure 10.

Effects of luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on the fractional excretion of glucose in Dahl-STZ rats. Numbers in parenthesis indicate the number of rats in which a complete data set was collected per group. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. ‡Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

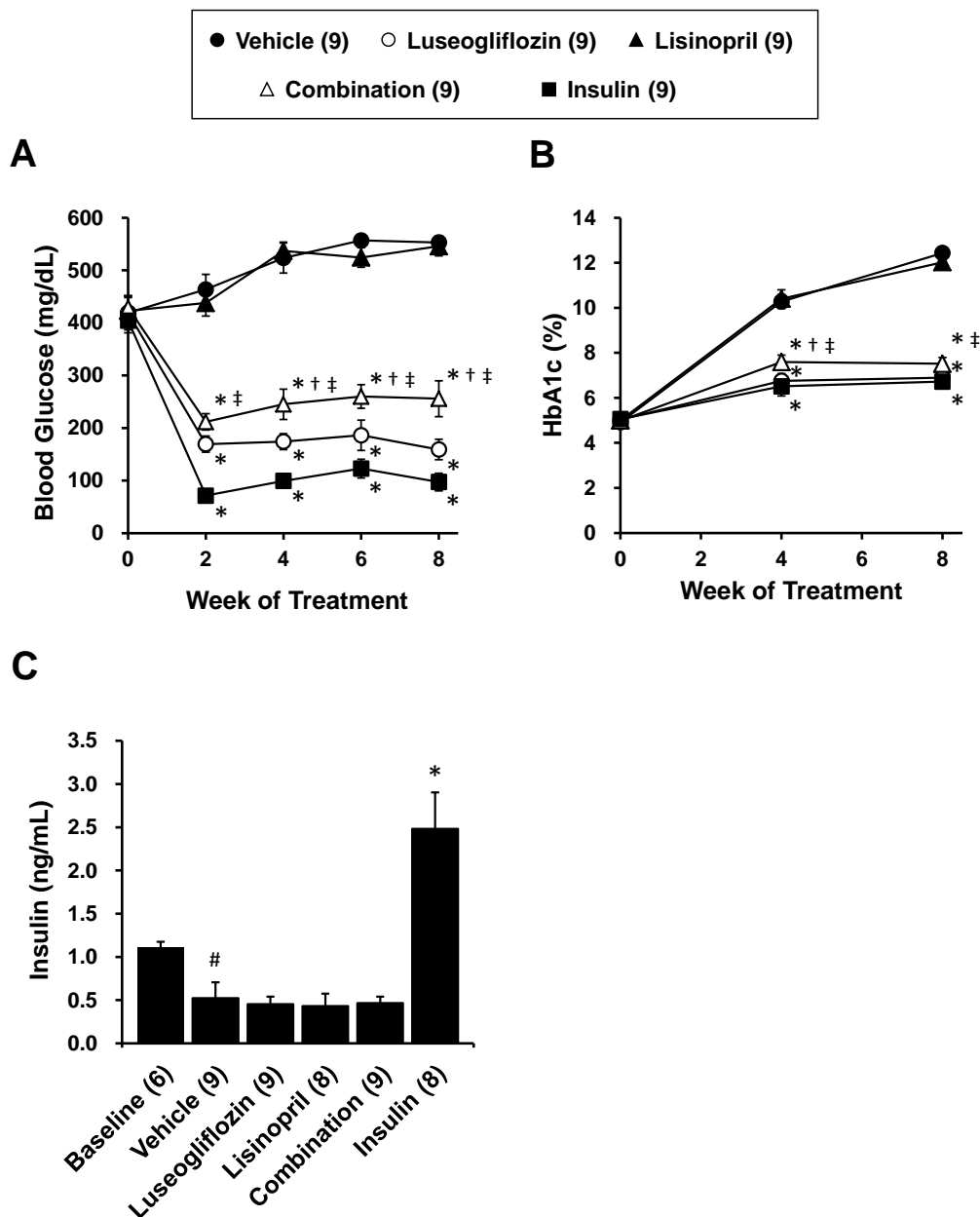


Figure 11.

Effects of luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on nonfasting blood glucose levels (A), HbA1c levels (B) and plasma insulin levels (C) in Dahl-STZ rats. Numbers in parenthesis indicate the number of rats in which a complete data set was collected per group. #Indicates a significant difference from the corresponding values in the baseline control group of Dahl salt-sensitive rats. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats. ‡Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

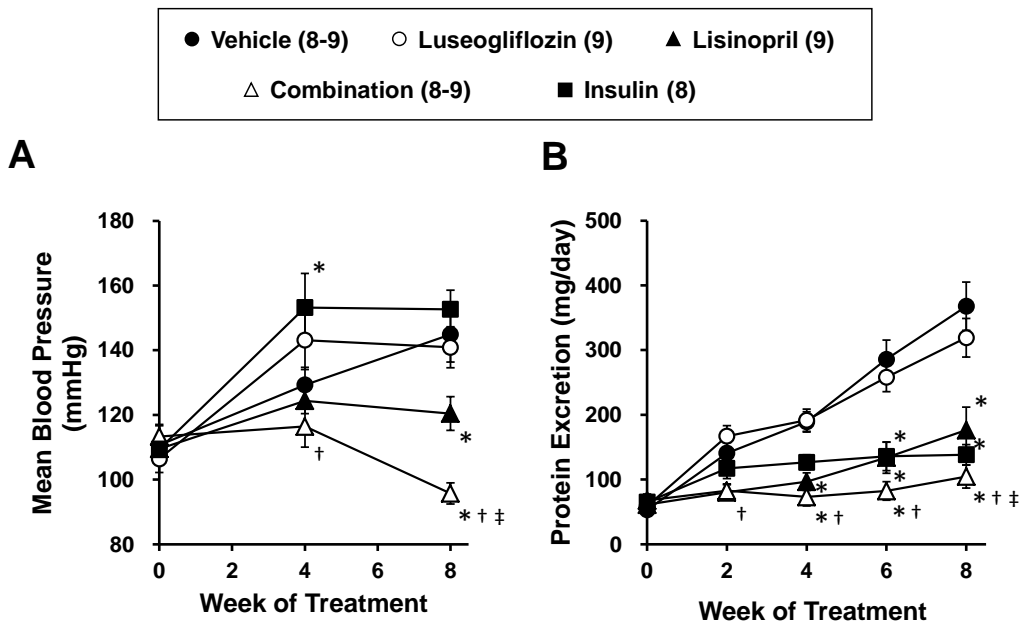


Figure 12.

Effects of luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on mean blood pressure (A) and urinary protein excretion (B) in Dahl-STZ rats. Numbers in parenthesis indicate the number of rats in which a complete data set was collected per group. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats. ‡Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

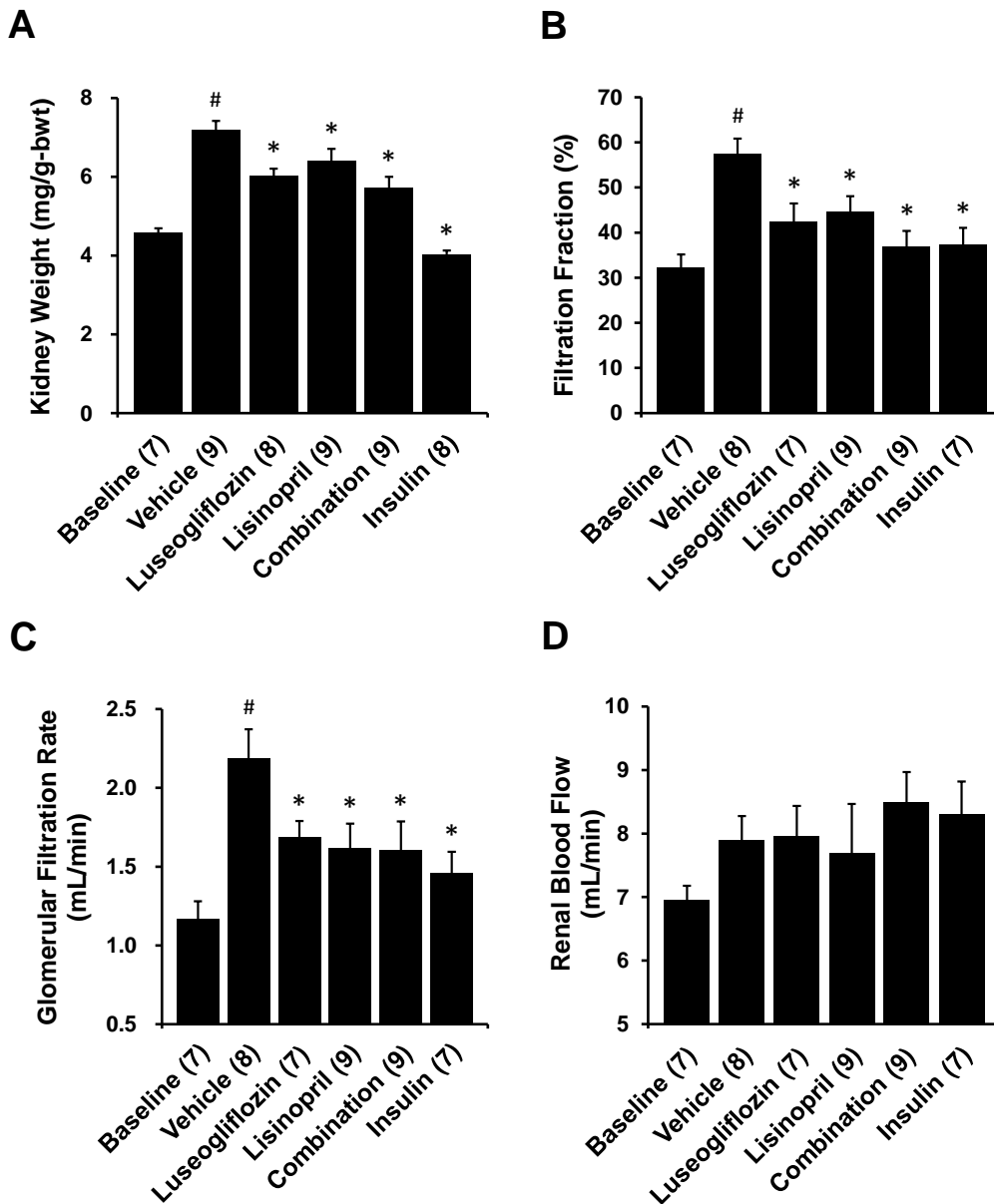


Figure 13.

Effects of 2 months of chronic treatment with luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on kidney weight (A), filtration fraction (B), glomerular filtration rate (C) and renal blood flow (D) in Dahl-STZ rats. Numbers in parenthesis indicate the number of rats in which a complete data set was collected per group. #Indicates a significant difference from the corresponding values in the baseline control group of Dahl salt-sensitive rats. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats.

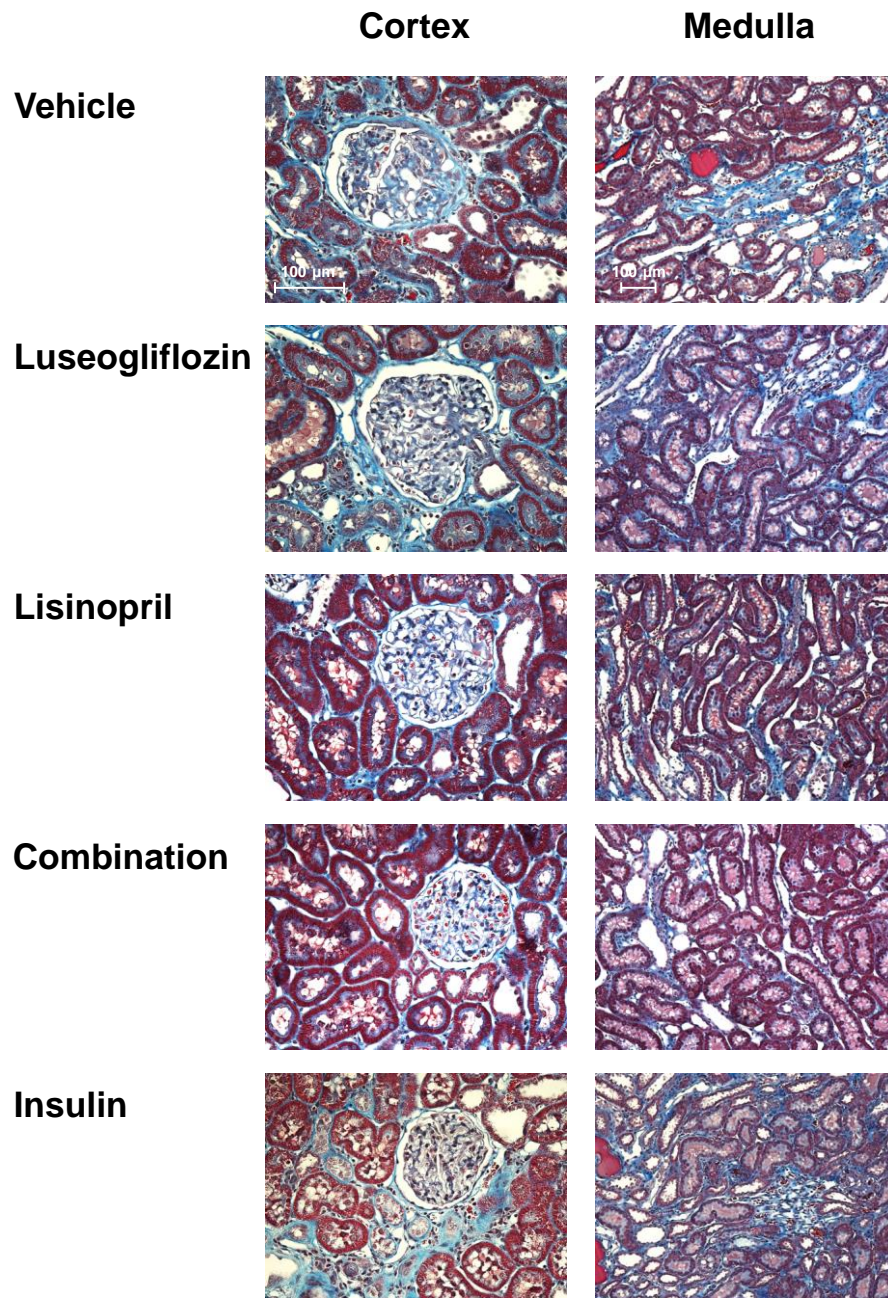


Figure 14.

Representative appearance of the renal cortex (200×) and medulla (100×) stained with Masson's trichrome in Dahl-STZ rats treated with vehicle, luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin.

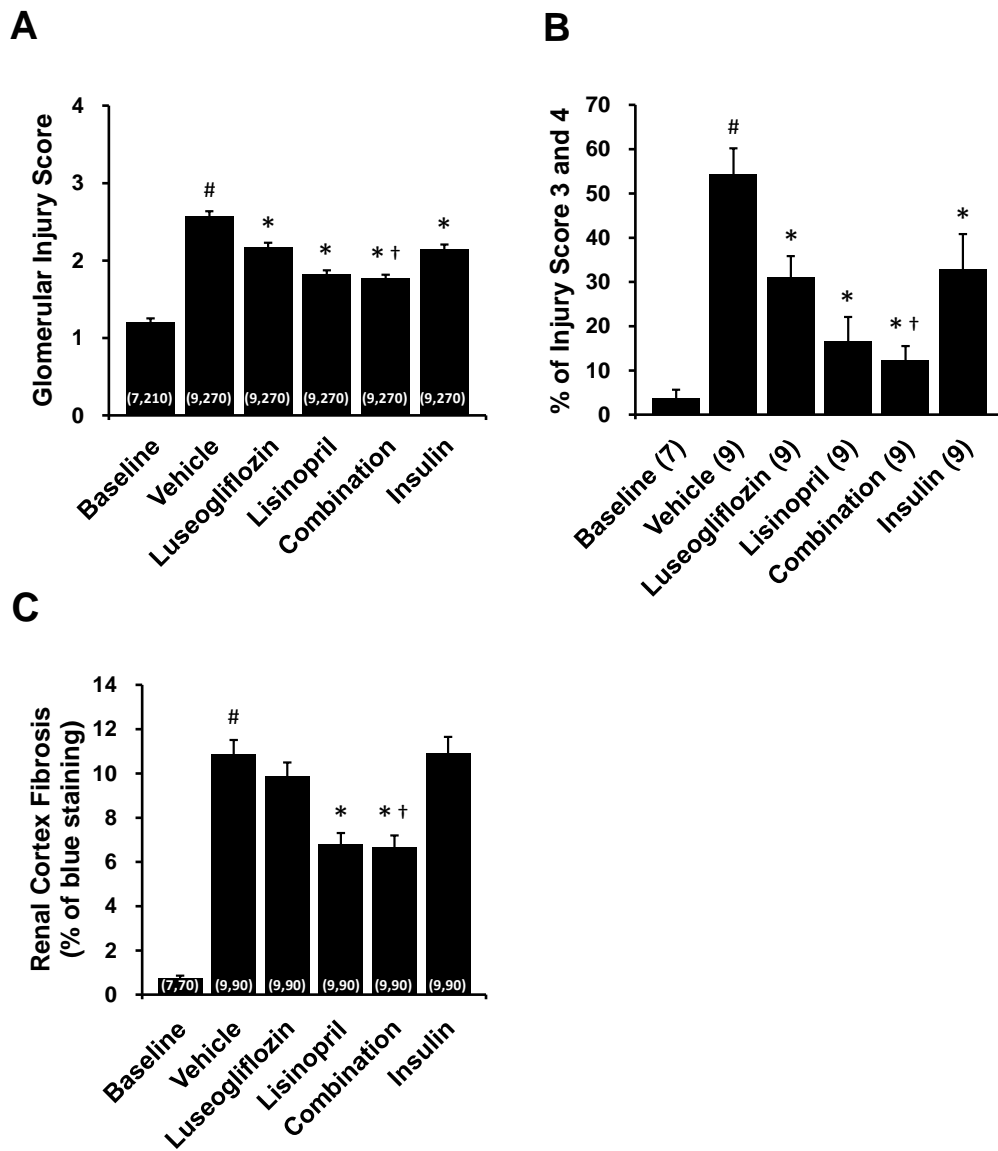


Figure 15.

Effects of 2 months of chronic treatment with luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on glomerular injury score (A), percentage of severe glomerulosclerosis (B) and renal cortical fibrosis (C) in Dahl-STZ rats. Numbers in parenthesis indicate the number of rats, glomeruli and areas in which a complete data set was collected per group. #Indicates a significant difference from the corresponding values in the baseline control group of Dahl salt-sensitive rats. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats.

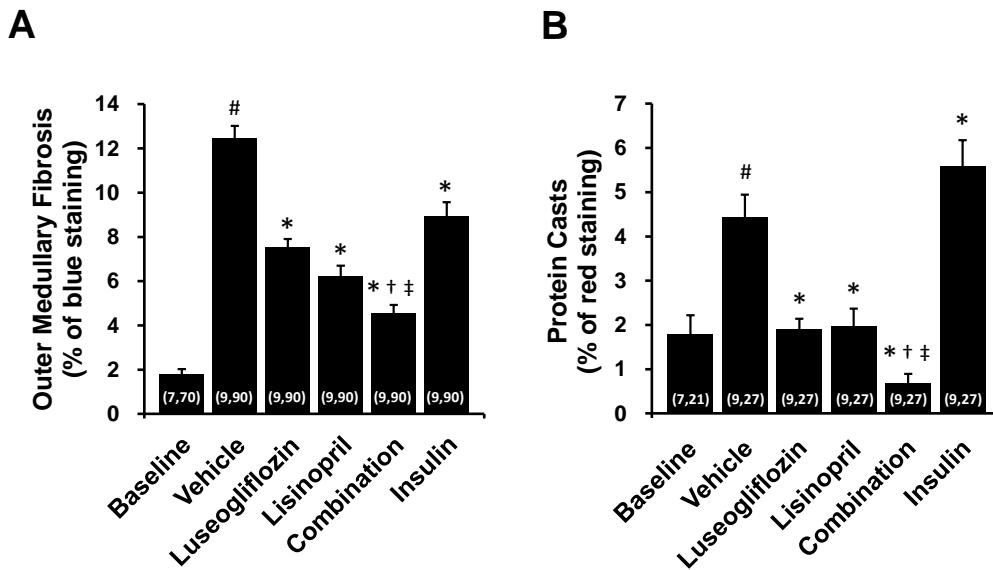


Figure 16.

Effects of 2 months of chronic treatment with luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on the degree of renal medullary fibrosis (A) and the formation of protein casts (B) in Dahl-STZ rats. Numbers in parenthesis indicate the number of rats and areas in which a complete data set was collected per group. #Indicates a significant difference from the corresponding values in the baseline control group of Dahl salt-sensitive rats. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats. ‡Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

2-2-3. 考察

Dahl-STZ ラットは、尿タンパク排泄の進展、糸球体過剰濾過、糸球体硬化、尿細管間質線維化、尿細管壊死などを示し、早期腎症期から顕性腎症期の糖尿病性腎症患者に類似した病態を呈する 1 型糖尿病性腎症モデル動物である。本研究では、Dahl-STZ ラットに対して、SGLT2 阻害薬である luseogliflozin の単独投与ならびに ACE 阻害薬である lisinopril との併用投与が腎障害に与える効果について検討した。

Dahl-STZ ラットに対して、luseogliflozin を 0.01% の濃度で混合した粉餌を自由摂取させた際の血中 luseogliflozin 濃度は約 30 ng/mL であった。Luseogliflozin の蛋白結合率は約 95% であるため、非結合型血中薬物濃度は約 3.5 nmol/L であったことが考えられ、本研究における luseogliflozin の投与量は SGLT2 に対する IC₅₀ 値 (2.3 nmol/L) を超える用量であったことが考えられた。

Dahl-STZ ラットに対する luseogliflozin および insulin による血糖低下作用

Luseogliflozin 投与群および併用療法群において、顕著な血糖値および HbA1c 値の低下作用が認められた。さらに、尿中グルコース排泄率に対する検討において、luseogliflozin 投与により糸球体濾過されたグルコースの大部分が尿中に排泄されていたことから、luseogliflozin による血糖低下作用には SGLT2 を阻害したことによる尿糖排泄促進作用が関わっており、本検討で用いた luseogliflozin の投与量は SGLT2 を介した糖再吸収を十分に阻害することができる用量であったことが考えられた。さらに、Dahl-STZ ラットに対する luseogliflozin の血糖低下作用は、insulin による血糖低下作用と同程度であった。一方、luseogliflozin と insulin で血糖低下作用に関連した 2 つの薬効の違いが認められた。1 つ目として、luseogliflozin は尿糖排泄促進作用を示すために尿量および飲水量が高値を示した一方で、insulin は尿量および飲水量が糖尿病発症前と比較してほとんど増加しなかった点が挙げられる。また 2 つ目として、insulin 投与群では

病態対照群と比較して血中インスリン値が約 5 倍高値を示した一方で、luseogliflozin 投与群では血中インスリン値の増加を伴わなかった。

Dahl-STZ ラットにおける luseogliflozin の糸球体過剰濾過に対する効果

反復投与試験終了時において Dahl-STZ ラットは、ベースライン対照群と比較して 57%の腎重量増加（腎肥大）、糸球体濾過量の 2 倍化および濾過率の増加（糸球体過剰濾過）を呈した。この Dahl-STZ ラットで認められた腎肥大および糸球体過剰濾過は、luseogliflozin の反復投与により抑制された。糖尿病病態時に認められる糸球体過剰濾過には、近位尿細管におけるナトリウム再吸収の亢進により、遠位尿細管の緻密斑への NaCl の流入が低下するため、尿細管糸球体フィードバック機構が不活性化されて輸入細動脈の収縮が十分に起こらないことが関与している可能性が考えられる（Noonan et al., 2001, Vallon et al., 2012）。この病態生理学的変化に対して、luseogliflozin は SGLT2 を阻害することにより近位尿細管におけるナトリウムの再吸収を抑制して、遠位尿細管の緻密斑への NaCl の流入を増加させて、尿細管糸球体フィードバック機構を活性化させたことにより糸球体過剰濾過を抑制した可能性が考えられる（Thomson et al. 2012）。その一方で、持続的な腎尿細管流量および遠位尿細管への NaCl 流入の増加は、尿細管糸球体フィードバック機構の反応性を減弱させる可能性も考えられる（Schnermann and Briggs 1990, Thomson et al., 1996, Thomson et al., 1999）。さらに Dahl S ラットの筋原反応および糸球体尿細管フィードバック機構は、著しく障害を受けている可能性もある（Ge et al., 2014）。そのため、本研究で認められた luseogliflozin による糸球体過剰濾過の抑制は、尿細管糸球体フィードバック機構の活性化によるものだけではなく、高血糖を是正したことにより腎肥大および糸球体サイズが減少したことによる二次的な効果の可能性も考えられる。SGLT2 阻害薬が、糖尿病モデル動物さらには糖尿病患者の尿細管糸球体フィードバック機構の破綻を長期的に是正するかについては、今後さらに詳細な検討が期待される。

Dahl-STZ ラットにおける luseogliflozin の腎障害進展に対する効果

Luseogliflozin の反復投与は、Dahl-STZ ラットで観察された糸球体傷害、腎髄質外層領域の線維化および尿細管壊死の指標である蛋白円柱形成に対して改善効果を示した。一方、luseogliflozin により良好に血糖値をコントロールしたにも関わらず、尿タンパク排泄に対する抑制効果は認められなかった。Luseogliflozin による腎組織傷害に対する改善効果における詳細なメカニズムは明らかではないが、糸球体過剰濾過を抑制する効果が認められたことから、一つの可能性として糸球体内圧の上昇が抑制されたことによる可能性が考えられる。この糸球体過剰濾過および糸球体内圧の上昇は、糸球体メサンギウム基質拡大、ポドサイト喪失、糸球体毛細血管の透過性亢進を誘発・進展することが考えられる。その他の可能性として、luseogliflozin は高血糖を是正したことにより、腎臓組織内での炎症の惹起やサイトカイン類、増殖因子の放出を減少させた可能性も考えられる。一方、luseogliflozin の反復投与により、糸球体傷害が改善したのにも関わらず尿タンパク排泄が抑制されなかったことは予期しない結果であった。その原因の一つとして、luseogliflozin が近位尿細管でのナトリウムおよびグルコースの再吸収を抑制したことで尿流速が増加し、その結果として糸球体で濾過されたタンパク（アルブミン）とエンドサイトーシス受容体であるメガリンおよびキュビリンとの接触機会が減少したことにより、近位尿細管でのタンパク（アルブミン）の再吸収が減少して尿中に排泄された可能性が考えられる。また、luseogliflozin は、近位尿細管細胞へのグルコースの過剰流入を抑制したことにより腎組織傷害を軽減した可能性も考えられる。高血糖状態では、糸球体から濾過されるグルコース量が増加するため、原尿中のグルコース濃度が上昇するとともに SGLT2 の発現が亢進し、近位尿細管細胞へのグルコースの再吸収が亢進することが考えられる（Kanai et al., 1994, Vestri et al., 2001, Rahmoune et al., 2005, Tabatabai et al., 2009, DeFronzo et al., 2013）。さらに、近位尿細管細胞では、グルコース濃度の上昇に伴って酸化ストレスやコラーゲンおよびファイブロネクチンの産生が

上昇することが報告されており (Ziyadeh et al., 1990, Phillips et al., 1997, Jones et al., 1999), luseogliflozin は SGLT2 を阻害して近位尿細管細胞への糖取り込みを長期的に抑制したことで、尿細管障害や腎間質線維化を改善した可能性も考えられる。

Dahl-STZ ラットにおける insulin の糸球体過剰濾過および腎障害進展に対する効果

Insulin 投与により、Dahl-STZ ラットの腎肥大、糸球体過剰濾過、糸球体傷害および腎髄質外層領域の線維化は抑制され、さらに尿タンパク排泄が顕著に抑制される効果が認められた。この insulin による腎障害改善効果には、糸球体過剰濾過を促進させる高血糖状態を是正したことが関与した可能性が考えられた。しかしながら、insulin によって高血糖を是正したのにも関わらず、腎皮質領域の線維化および尿細管壊死の指標である蛋白円柱形成に対する改善効果は認められなかった。Dahl-STZ ラットにおいて、insulin がこれら腎組織傷害を抑制しなかった理由としては、血中インスリン値の上昇を介した線維化促進および細胞増殖促進により、腎臓において組織傷害が惹起された可能性が考えられる。また insulin 投与群では、病態対照群と比較して血圧の有意な上昇が認められた。この昇圧作用には insulin によるナトリウム貯留が関与しており、さらに Dahl S ラットは腎血流量の自動調節能が破綻しているため、insulin 投与で生じた過度な昇圧によって腎組織傷害がさらに進展した可能性も推察される (Banday et al., 2005, Ge et al., 2014)。

Dahl-STZ ラットにおける lisinopril の糸球体過剰濾過および腎障害進展に対する効果

レニン-アンジオテンシン系阻害薬である lisinopril の反復投与により、Dahl-STZ ラットにおいて明確な降圧作用が認められた。さらに、lisinopril により尿タンパク排泄、腎肥大および糸球体過剰濾過が顕著に抑制される作用が認められ、組織学的解析においても糸球体傷害、腎線維化および尿細管壊死の顕著な改善効果が認められた。なお、lisinopril による尿タンパク排泄抑制作用については、レニン-アンジオテンシン系を阻害したことにより輸出細動脈が拡張して糸球体内圧が低下し、その結果、糸球体にお

るタンパク濾過量が低下した可能性が考えられる。実際に, lisinopril 投与群においては, 病態対照群と比較して尿タンパク排泄の低下とともに, 濾過率および糸球体濾過量の顕著な減少が認められた。一方, lisinopril は, 酸化ストレスやアンジオテンシン II によって刺激される腎障害に関連する種々の増殖因子およびサイトカイン類を減少させた可能性も考えられる。

Dahl-STZ ラットにおける luseogliflozin および lisinopril の併用効果

Luseogliflozin および lisinopril の併用療法群においては, luseogliflozin 単独投与群と同様に, 血糖値および HbA1c 値を正常血糖値付近まで良好にコントロールする作用が認められた。さらに両薬物の併用療法により, 各薬物の単独投与群と比較して, より強力な降圧作用が認められた。この強力な降圧作用には, luseogliflozin による体液量減少に lisinopril によるレニン-アンジオテンシン系阻害作用が協調した可能性が考えられる。SGLT2 が長期的に阻害される状況においては, 体液量減少により血中レニン濃度が代償的に上昇する可能性がある (Vallon et al., 2011, Lambers Heerspink et al., 2013, Cherney et al., 2014) 。そのため, SGLT2 阻害薬投与条件下では, 体液量を保持するために代償的にレニン-アンジオテンシン系が活性化されており, これを lisinopril がリセットしたため, 強力な降圧作用が認められた可能性が考えられる。また, 併用療法群では腎組織傷害に対する著明な改善効果が認められたことから, これが降圧効果を助長している可能性も考えられる。さらに併用療法群では, 各薬物を単独投与した場合と比較して, 尿タンパク排泄の抑制, 腎髄質外層領域の線維化および尿細管壊死の改善に対して, より有効な併用効果が認められた。これら腎障害に対する併用効果は, Dahl-STZ ラットにおいて luseogliflozin および lisinopril の両薬物が, 血糖値や血圧のコントロールに加えて, 糸球体過剰濾過を是正したことによる可能性が考えられる。

2-3. T2DN ラットにおける SGLT2 阻害薬および ACE 阻害薬の

糖尿病性腎症に対する効果の検討

2-3-1. 研究方法

2-3-1-1. 使用動物

ミシシッピ大学医療センターで系統維持した 14 ヶ月齢の雄性 T2DN ラットを実験に供した。T2DN ラットは、2 型糖尿病を発症するが腎障害が発症・進展しにくいモデル動物である Goto-Kakizaki ラットと、腎障害を発症しやすい Fawn Hooded Hypertensive ラットを交配して作製した 2 型糖尿病性腎症モデル動物である (Nobrega et al., 2009) 。本研究で用いたラットは、AALAC の承認を受けたミシシッピ大学医療センター内の動物実験施設において、1% NaCl 含有通常餌 (Harlan Teklad 8640, Harlan Laboratories) を用いて、自由摂餌・自由摂水下で飼育を行った。本実験プロトコールは、ミシシッピ大学医療センターの動物実験委員会により承認されている。

2-3-1-2. T2DN ラットの腎障害進展に対する作用

T2DN ラットを無作為に、以下のように 5 群に分けた。1 群には通常餌および飲料水を自由摂取させた (病態対照群)。2 群には SGLT2 阻害薬である luseogliflozin を 1 日平均投与量が約 10 mg/kg となるように 0.02% の濃度で混合した粉餌を与えた (Luseogliflozin 投与群)。3 群には ACE 阻害薬である lisinopril (Cayman Chemical) を 1 日平均投与量が約 10 mg/kg となるように調製した飲料水を与えた (Lisinopril 投与群)。4 群には luseogliflozin を 1 日平均投与量が約 10 mg/kg となるように調製した粉餌および lisinopril を 1 日平均投与量が約 10 mg/kg となるように調製した飲料水を与えた (併用療法群)。5 群には血糖値を正常範囲に維持する目的で、insulin 徐放剤 (Linplant, Linshin Canada) を背部皮下に留置した (Insulin 投与群)。予備検討において、使用し

た insulin 徐放剤は, T2DN ラットの血糖値を正常血糖値付近に維持することができることが示唆されている. さらに insulin 投与群については, 実験期間中において随時血糖値が 200 mg/dL を超えた際に insulin 徐放剤を追加で背部皮下に留置した. また, 試験開始時の T2DN ラットの腎血行動態異常および腎組織傷害を評価する目的で, ベースライン対照群として 14 ヶ月齢の未処置 T2DN ラットを用いた.

血液サンプルは, 血糖値, HbA1c 値, 血中インスリン値および血中 luseogliflozin 濃度を測定する目的で尾静脈から採取した. また, 24 時間の蓄尿サンプルは, 尿糖排泄, 尿タンパク排泄および尿中ネフリン排泄を評価する目的で, 代謝ケージを使用して採集した.

尿中タンパク濃度は, Bradford 法 (Bio-Rad Laboratories) で測定した. 尿中グルコース濃度は, グルコースオキシダーゼ / ペルオキシダーゼ法 (Cayman Chemical) で測定した. 尿中ネフリン濃度は, ELISA 法 (Exocell, Philadelphia, PA, USA) で測定した. 血糖値および HbA1c 値は, 簡易型血糖測定装置 (Bayer HealthCare) および簡易型 HbA1c 測定装置 (Bayer HealthCare) を用いて測定した. 血圧は, tail-cuff 式血圧測定装置 (Hatteras Instruments) を用いて測定した. 血中インスリン値は, ELISA 法 (Merckodia) で測定した. 血中 luseogliflozin 濃度は, LC/MS/MS で測定した.

2-3-1-3. T2DN ラットの腎血行動態に対する作用

反復投与試験終了時に, 各群無作為に動物を抽出して腎血行動態に対する検討を行った. ケタミン (Phoenix Pharmaceutical) を 20 mg/匹の用量で筋肉内に, イナクチン (Sigma-Aldrich) を 50 mg/kg の用量で腹腔内に注射して麻酔したラットを保温台に静置して体温を 37°C に維持した. 気管に PE-240 を挿入して気道を確保した後, 平均血圧を測定する目的で右大腿動脈にカニューレを挿入した. さらに, FITC 標識イヌリン溶液を静脈内投与する目的で右大腿静脈にカニューレを挿入した. FITC 標識イヌリン溶

液は、0.9%NaCl, 2%ウシ血清アルブミンおよび2 mg/mL FITC 標識イヌリンを混合して調製し、糸球体濾過量を測定する目的で静脈内に6 mL/hr の速度で定速注入した。さらに、腎動脈に超音波血流プローブを装着して腎血流量を測定した。FITC 標識イヌリン溶液注入開始後30分間で、尿および血漿サンプルを採取した。血漿中および尿中イヌリン濃度は、マイクロプレートリーダー (BioTek Instruments) を用いてFITCの蛍光強度を指標として測定し、糸球体濾過量を算出した。腎血管抵抗は、平均血圧を腎血流量で除することにより算出した。

2-3-1-4. T2DN ラットの腎組織傷害に対する作用

腎血行動態試験終了後、左腎を摘出して湿重量を測定した後、10%緩衝ホルマリン溶液に浸漬した。この腎臓サンプルを用いて、パラフィン切片(3 μm)を作製し、糸球体傷害度、腎線維化および尿細管壊死を評価する目的でマッソントリクローム染色を施行した。糸球体傷害度については、各切片当たり腎皮質領域に局在する糸球体30個に対して、以下に示すスコア指標に基づいてマスク化して評価を行った。

スコア0： 正常糸球体

スコア1： 糸球体毛細血管領域の1~25%脱落

スコア2： 糸球体毛細血管領域の26~50%脱落

スコア3： 糸球体毛細血管領域の51~75%脱落

スコア4： 糸球体毛細血管領域の>75%脱落

さらに、DS-Fil1 カラーカメラ (Nikon Instruments Inc.) を装着した顕微鏡 (Nikon Eclipse 55i, Nikon Instruments Inc.) を用いて、腎皮質領域および腎髄質領域の組織画像を撮影した。腎線維化は、画像解析ソフト (NIS-Elements D 3.0, Nikon Instruments Inc.) を用

い、各切片当たり 10 ヲ所の腎皮質領域および腎髄質領域について、青色に染色された線維化面積を解析することにより評価した。また尿細管壊死は、同一の画像解析ソフトを用いて、各切片当たり 3 ヲ所の腎髄質領域について、赤色に染色された蛋白円柱面積を解析することにより評価した。また、同様の画像解析ソフトを用いて、糸球体の内径についても解析を行った。

2-3-1-5. 統計解析

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。実験群間の統計学的有意差は、実験開始前に計画した解析方法として、SigmaPlot 11 (Systat Software) を用いて、分散分析後に Holm-Sidak 多重比較検定を実施することにより検討を行った。

2-3-2. 結果

2-3-2-1. 薬物投与量

Luseogliflozin および lisinopril の投与量と血中 luseogliflozin 濃度を Table 1 に示した。Luseogliflozin 投与群および併用療法群における luseogliflozin の一日平均投与用量は約 10 mg/kg であり、さらに血中 luseogliflozin 濃度は約 50 ng/mL であった。また、lisinopril 投与群および併用療法群における lisinopril の一日平均投与用量は約 10 mg/kg であった。

2-3-2-2. T2DN ラットの体重および摂餌量に対する作用

体重および摂餌量に対する評価結果を Figure 17A および 17B に示す。

病態対照群および lisinopril 投与群では、実験期間を通じて大きな体重の変化は認められなかった。一方、luseogliflozin 投与群の体重は、病態対照群と比較して、摂餌量が増加したのにも関わらず有意に減少した。一方、insulin 投与群では、病態対照群と比較して、摂餌量には影響は認められなかったものの顕著な体重の増加が認められた。

2-3-2-3. T2DN ラットの尿糖排泄量および摂水量に対する作用

尿糖排泄量および摂水量に対する評価結果を Figure 17C および 17D に示す。

Luseogliflozin 投与群では、病態対照群と比較して顕著な尿糖排泄量の増加が認められた。一方、insulin 投与群においては、病態対照群と比較して有意な尿糖排泄量の低下が認められた。Lisinopril 投与群において、一過性の尿糖排泄量の低下が認められたが、試験開始時の一時的な摂餌量および体重の低下が原因である可能性が考えられた。併用療法群においては、luseogliflozin 投与群と同等の尿糖排泄量の増加が認められた。

摂水量については、luseogliflozin 投与群および併用療法群において、病態対照群と比較して顕著な増加が認められた。一方、lisinopril 投与群および insulin 投与群においては、病態対照群と比較して顕著な摂水量の減少が認められた。

2-3-2-4. T2DN ラットの血糖値および HbA1c 値に対する作用

随時血糖値および HbA1c 値に対する評価結果を Figure 18A および 18B に示す。

試験開始時において、T2DN ラットの随時血糖値は約 350 mg/dL、HbA1c 値は約 10% であった。Luseogliflozin 投与群および insulin 投与群において、各薬物の投与により血糖値および HbA1c 値が正常血糖値付近まで低下する作用が認められた。同様に併用療法群においても、血糖値および HbA1c 値が正常血糖値付近まで低下する作用が認められた。一方、lisinopril 投与群においては、投与開始 2 週間後において一過性の血糖値および HbA1c 値の低下が認められた。この低下には、一時的な摂餌量および体重の減少が関連している可能性が考えられた。

2-3-2-5. T2DN ラットの血中インスリン値に対する作用

血中インスリン値に対する評価結果を Figure 18C に示す。

Insulin 投与群の血中インスリン値は、病態対照群の血中インスリン値の約 10 倍であった。Lisinopril 投与群においては、病態対照群と比較して血中インスリン値に対する有意な作用は認められなかった。一方、luseogliflozin 投与群では、病態対照群と比較して血中インスリン値の有意な低下が認められた。

2-3-2-6. T2DN ラットの血圧に対する作用

Tail-cuff 法で測定した収縮期、平均および拡張期血圧に対する評価結果を Figure 19A, 19B および 19C に示す。

Luseogliflozin 投与群および insulin 投与群においては、病態対照群と比較して血圧に対する有意な作用は認められなかった。一方、lisinopril 投与群では、病態対照群と比較して顕著な降圧作用が認められた。さらに、併用療法群においては、各薬剤単独投与群と比較して、より強い降圧作用が認められた。

2-3-2-7. T2DN ラットの尿タンパク排泄に対する作用

尿タンパク排泄に対する評価結果を Figure 19D に示す。

3 ヶ月間の試験期間を通じて、T2DN ラットにおいて尿タンパク排泄の進展が認められた。Insulin 投与群においては、血糖値を正常血糖値付近にコントロールすることができたものの尿タンパク排泄に対する有意な作用は認められなかった。Luseogliflozin 投与群では、投与開始2 ヶ月間において、病態対照群と比較して尿タンパク排泄の顕著な増加が認められたが、投与3 ヶ月目においては病態対照群と同程度の排泄量であった。一方、lisinopril 投与群および併用療法群においては、病態対照群と比較して顕著な尿タンパク排泄抑制効果が認められた。

2-3-2-8. T2DN ラットの腎血行動態に対する作用

腎血行動態に対する評価結果を Figure 20 に示す。

試験終了時において、ベースライン対照群と比較して、病態対照群で有意な腎血管抵抗の増大および糸球体濾過量の低下が認められた。平均血圧に対して、lisinopril 投与群では顕著な低下が認められたが、luseogliflozin 投与群および insulin 投与群では有意な作用は認められなかった。さらに lisinopril 投与群では、病態対照群と比較して顕著な腎血流量増加作用ならびに糸球体濾過量低下に対する抑制効果が認められた。同様に、luseogliflozin 投与群においても、病態対照群と比較して糸球体濾過量低下に対する抑制効果が認められた。さらに、luseogliflozin 投与群、lisinopril 投与群および insulin 投与群では、病態対照群と比較して腎血管抵抗の顕著な低下が認められた。また、併用療法群においても、病態対照群と比較して、顕著な腎血流量増加作用および血圧低下作用が認められ、さらに腎血管抵抗増大ならびに糸球体濾過量低下に対する抑制効果が認められた。

2-3-2-9. T2DN ラットの腎組織傷害に対する作用

腎組織傷害に対する評価結果を Figure 21, 22 および 23 に示す.

病態対照群の腎組織を解析した結果, 重度かつ腎組織全体に及ぶ糸球体硬化, 腎線維化, 腎髄質領域における尿細管壊死などが認められた. Luseogliflozin 投与により血糖値を正常血糖値付近にコントロールした結果, 糸球体傷害度, 腎線維化および尿細管壊死の指標である蛋白円柱形成に対して顕著な改善効果が認められた. 一方, insulin 投与により血糖値を正常血糖値付近にコントロールしたにも関わらず, 糸球体傷害度, 腎線維化および蛋白円柱形成に対して有意な改善効果は認められなかった. また, lisinopril 投与群においては, 糸球体傷害度および蛋白円柱形成に対して顕著な改善効果が認められたが, 腎線維化に対する改善効果は認められなかった. 併用療法群においては, 糸球体傷害度, 腎線維化および蛋白円柱形成に対して, luseogliflozin または lisinopril 単独投与群と比較して, より有効な併用効果が認められた. さらに, 併用療法群においては, 病態対照群と比較して糸球体内径が有意に減少していた. 腎糸球体の構成成分であるネフリンの尿中排泄量を検討した結果, luseogliflozin 投与群, lisinopril 投与群および併用療法群において, 病態対照群と比較して顕著に尿中ネフリン排泄量を低下させる効果が認められた. 一方, insulin 投与群においては, 病態対照群と比較して尿中ネフリン排泄量に対する有意な効果は認められなかった.

Table 1

Daily intake of luseogliflozin or lisinopril and plasma concentration of luseogliflozin in T2DN rats.

Luseogliflozin Intake (mg/kg)				
Group	1-month	2-month	3-month	Average
Luseogliflozin	15.5 ± 1.6	14.2 ± 1.0	14.6 ± 0.5	14.8 ± 0.9
Combination	13.9 ± 1.0	13.0 ± 0.4	13.6 ± 1.0	13.5 ± 0.4

Lisinopril Intake (mg/kg)				
Group	1-month	2-month	3-month	Average
Lisinopril	12.4 ± 1.1	9.8 ± 0.8	9.5 ± 1.3	10.5 ± 0.9
Combination	14.1 ± 0.3	9.2 ± 0.3	8.6 ± 0.7	10.7 ± 0.3

Plasma Luseogliflozin Concentration (ng/mL)				
Group	1-month	2-month	3-month	Average
Luseogliflozin	65.9 ± 4.9	50.0 ± 10.1	56.1 ± 13.5	57.3 ± 7.8
Combination	61.2 ± 7.3	49.5 ± 6.1	31.0 ± 3.7	47.2 ± 4.5

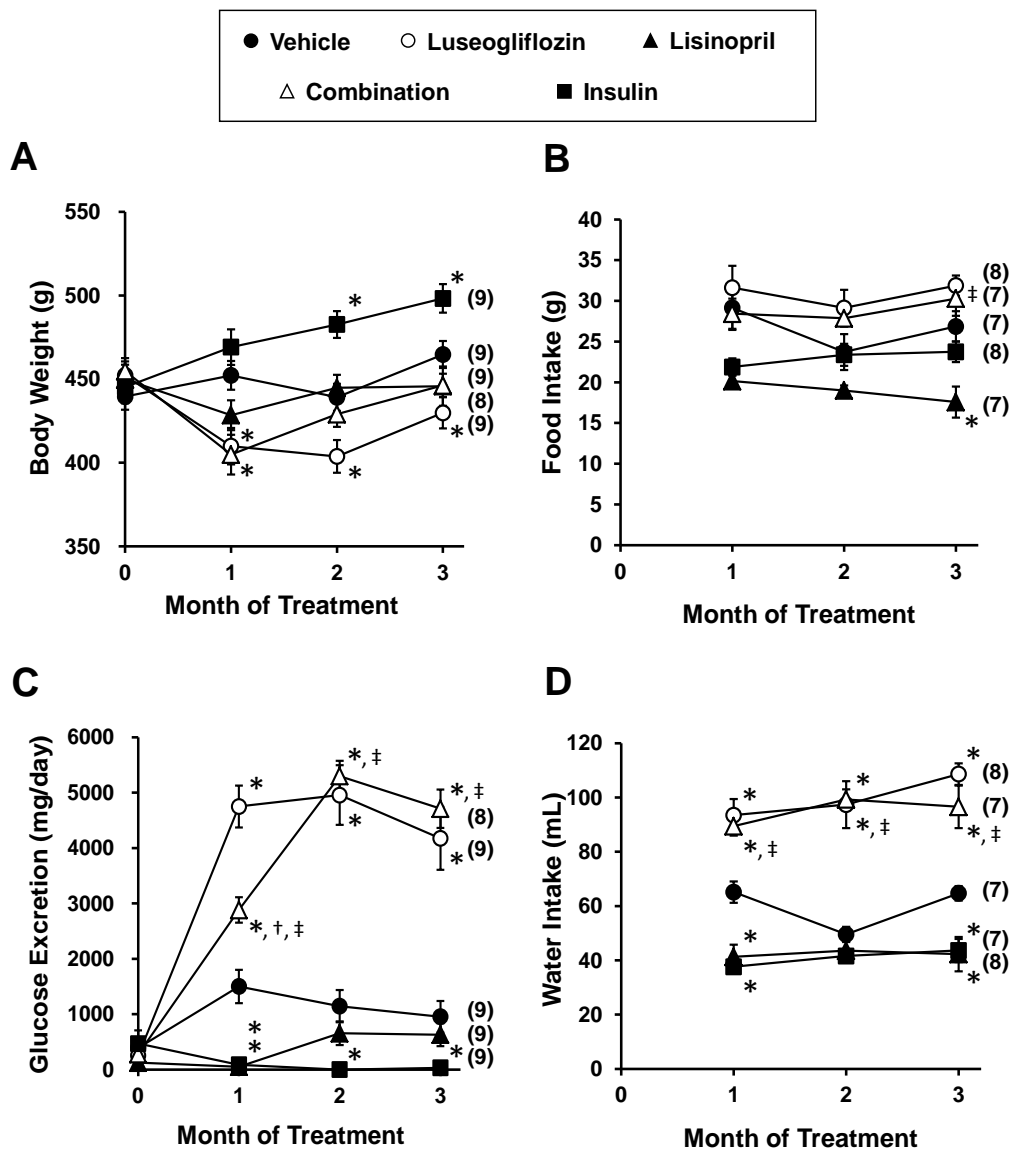


Figure 17.

Effects of luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on body weight (A), daily food intake (B), urinary glucose excretion (C) and daily water intake (D) in T2DN rats. Numbers in parentheses indicate the number of rats studied per group. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats. ‡ Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

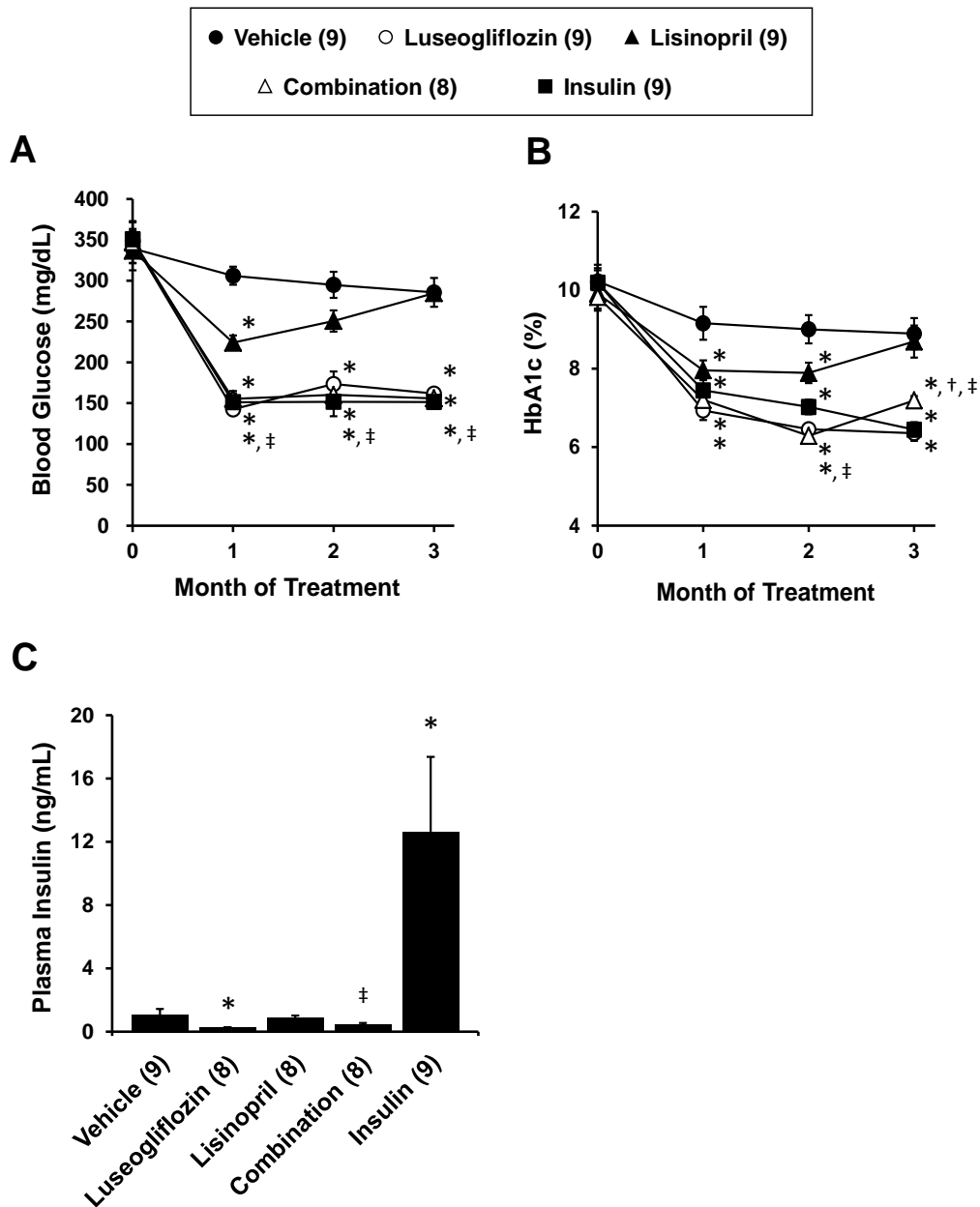


Figure 18.

Effects of luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on nonfasting blood glucose levels (A), HbA1c levels (B) and plasma insulin levels (C) in T2DN rats. Numbers in parentheses indicate the number of rats studied per group. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats. ‡Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

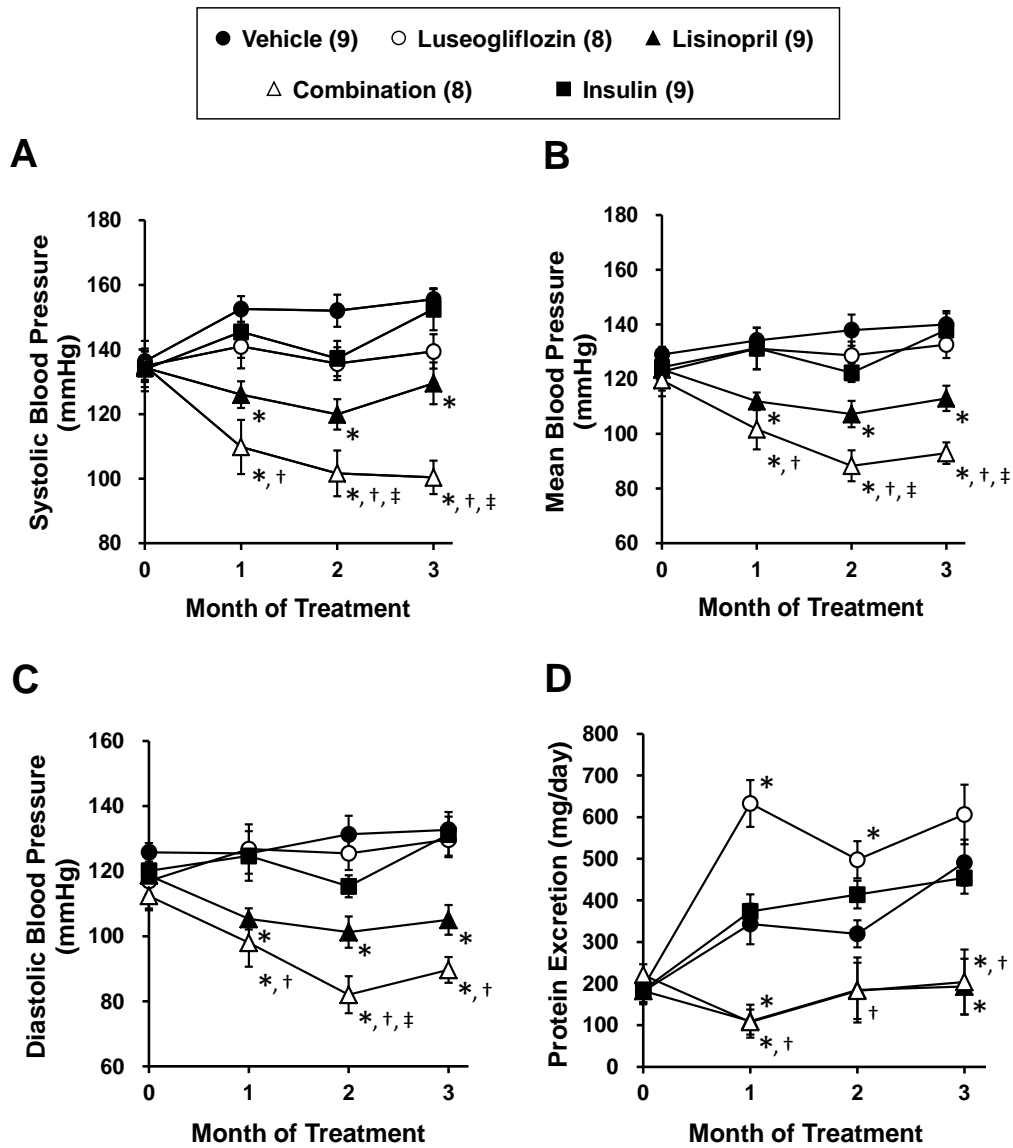


Figure 19.

Effects of luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on systolic blood pressure (A), mean blood pressure (B), diastolic blood pressure (C) and urinary protein excretion (D) in T2DN rats. Numbers in parentheses indicate the number of rats studied per group. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats. ‡ Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

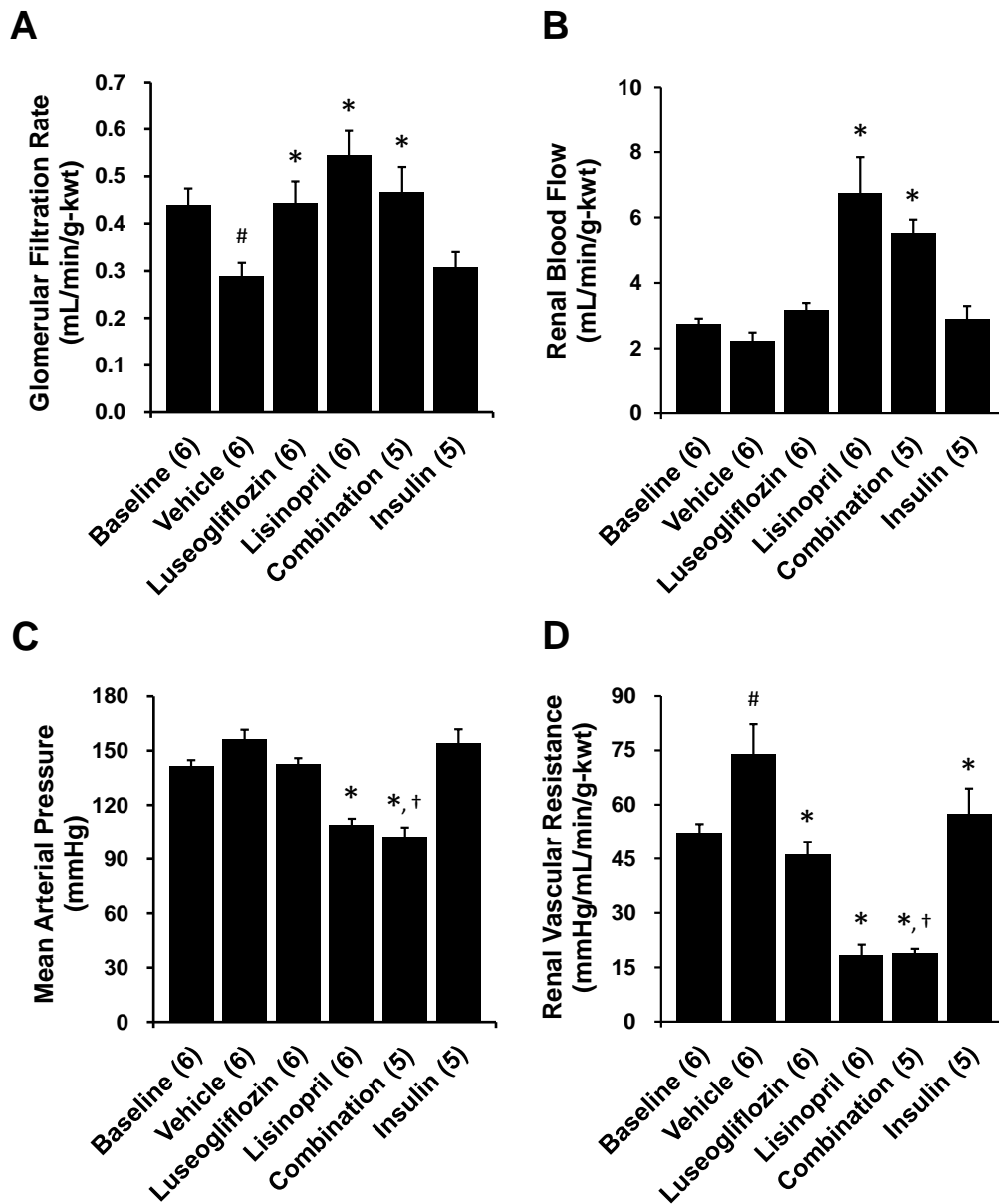


Figure 20.

Effects of 3-month chronic treatment with luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on glomerular filtration rate (A), renal blood flow (B), mean arterial pressure (C) and renal vascular resistance (D) in 17-month-old T2DN rats. Numbers in parentheses indicate the number of rats studied per group. kwt, Kidney weight. #Indicates a significant difference from the corresponding values in 14-month-old T2DN rats. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats.

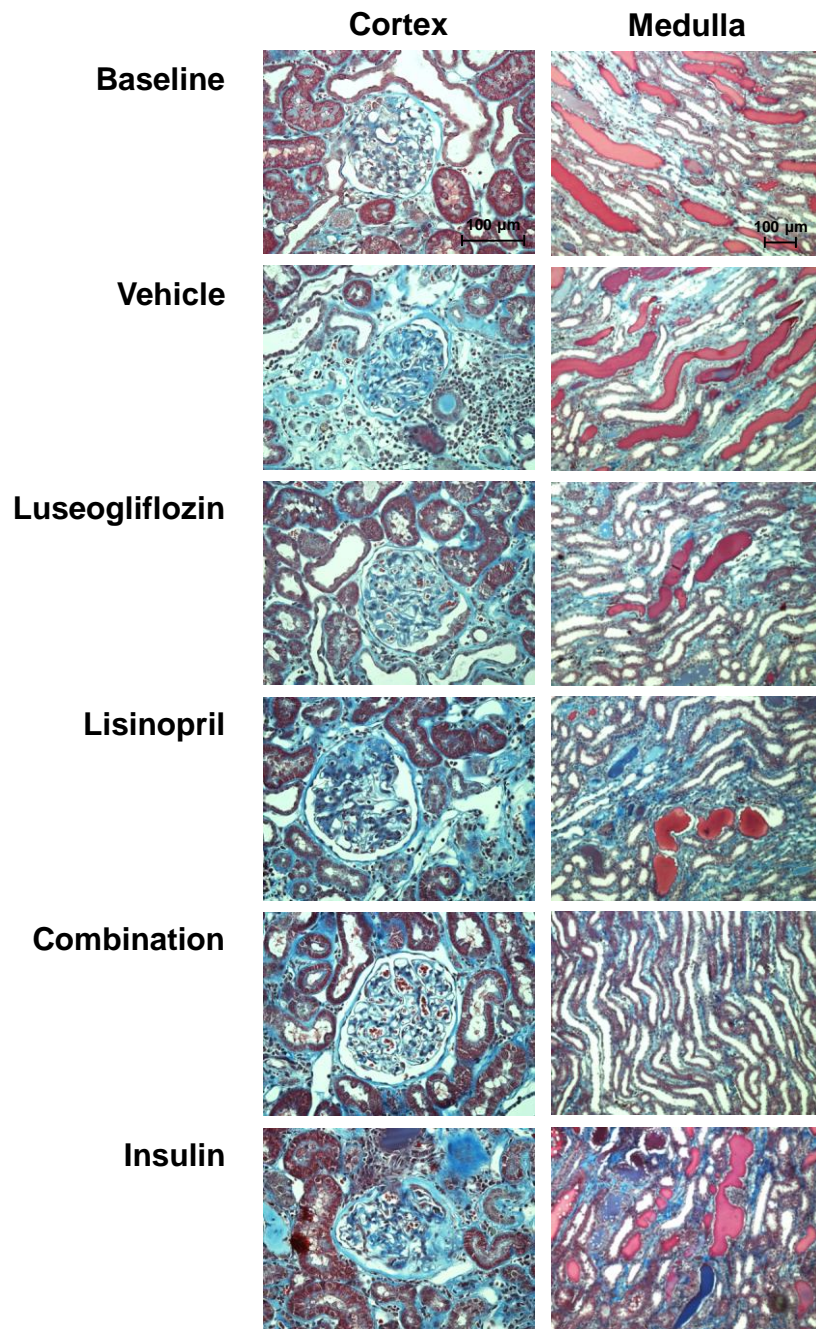


Figure 21.

Representative microphotographs of the renal cortex (200×) and medulla (100×) stained with Masson's trichrome in 17-month-old T2DN rats treated with vehicle, luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin.

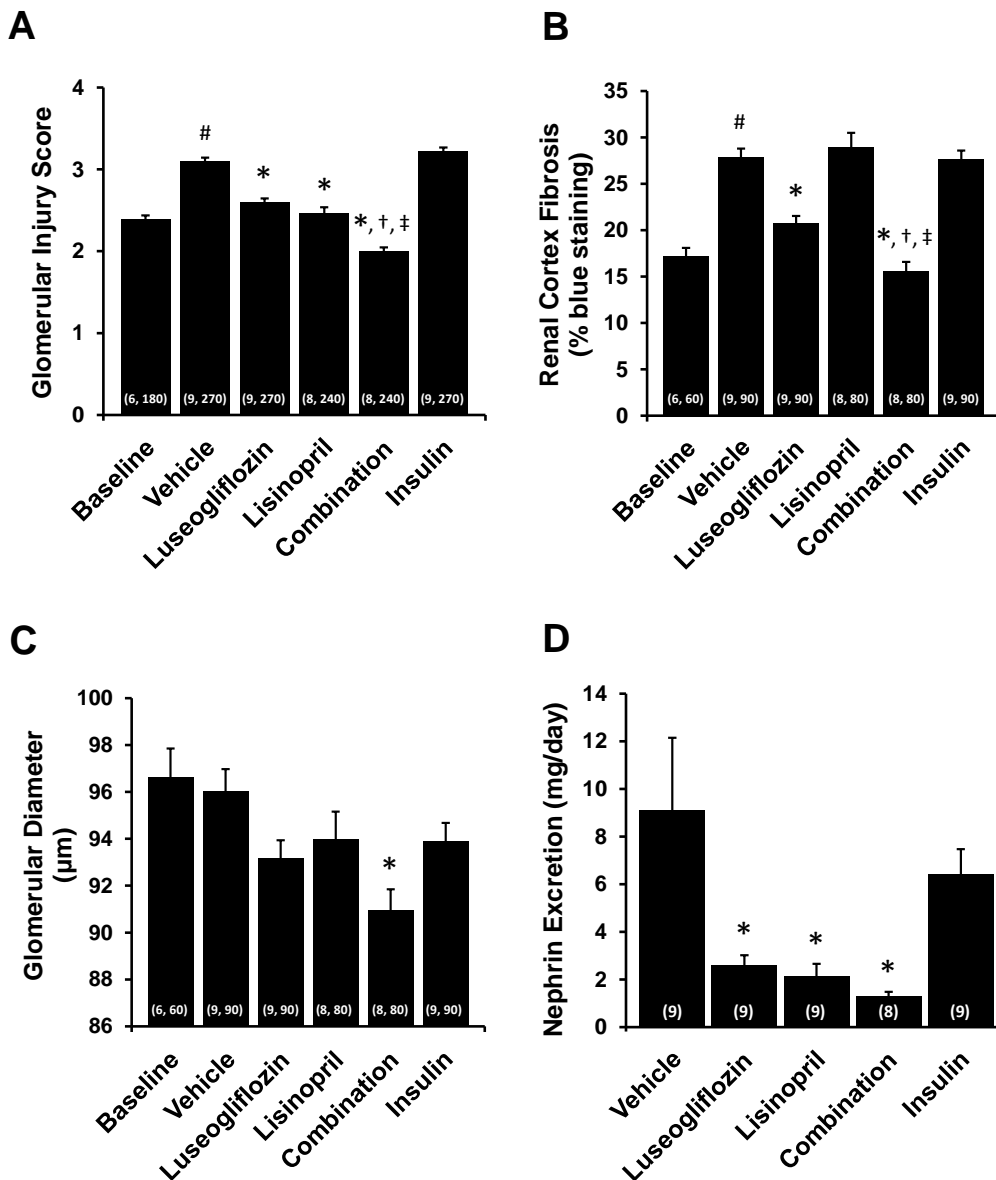


Figure 22.

Effects of 3-month chronic treatment with luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on glomerular injury score (A), renal cortex fibrosis (B), glomerular diameter (C) and urinary nephrin excretion (D) in 17-month-old T2DN rats. Numbers in parentheses indicate the number of glomeruli or areas scored and the number of rats studied per group. [#]Indicates a significant difference from the corresponding values in 14-month-old T2DN rats. ^{*}Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. [†] Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats. [‡]Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

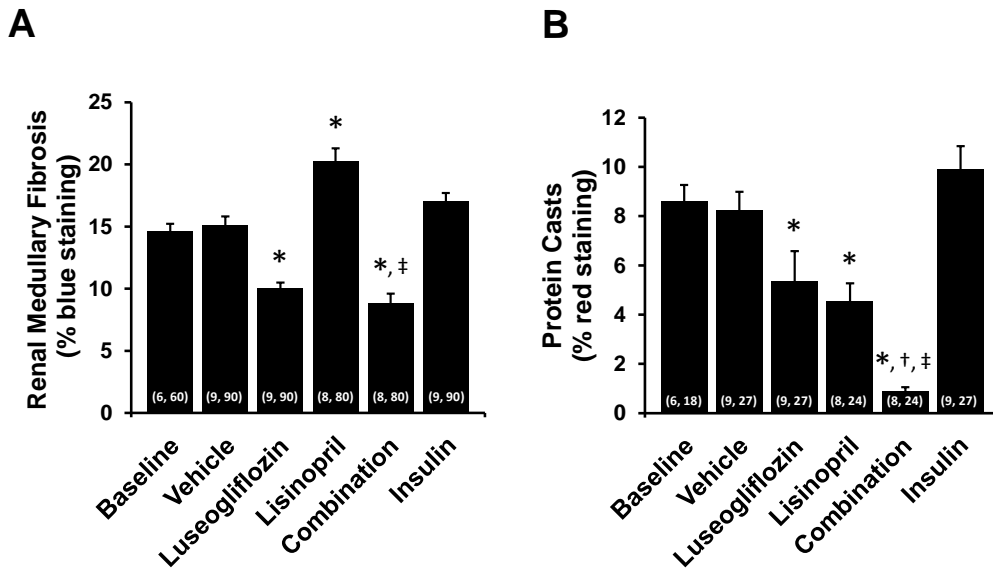


Figure 23.

Effects of 3-month chronic treatment with luseogliflozin, lisinopril, combination therapy and insulin on renal outer medullary fibrosis (blue staining of collagen and fibronectin) (A) and red-stained tubular protein casts an index of tubular necrosis (B) in 17-month-old T2DN rats. Numbers in parentheses indicate the number of areas scored and the number of rats studied per group. *Indicates a significant difference from the corresponding value in vehicle-treated rats. †Indicates a significant difference from the corresponding value in luseogliflozin-treated rats. ‡Indicates a significant difference from the corresponding value in lisinopril-treated rats.

2-3-3. 考察

T2DN ラットは、尿タンパク排泄の進展、糸球体硬化、腎間質線維化、尿細管壊死、糸球体濾過量低下などを示し、顕性腎症期から腎不全期の糖尿病性腎症患者に類似した病態を呈する2型糖尿病性腎症モデル動物である。本研究では、T2DN ラットに対して、SGLT2 阻害薬である luseogliflozin の単独投与ならびに ACE 阻害薬である lisinopril との併用投与が腎障害に与える効果について検討した。

T2DN ラットに対して、luseogliflozin を 0.02% の濃度で混合した粉餌を自由摂取させた際の血中 luseogliflozin 濃度は約 50 ng/mL であった。Luseogliflozin の蛋白結合率は約 95% であるため、遊離型血中薬物濃度は約 5 nmol/L であったことが考えられ、本研究における luseogliflozin の投与量は SGLT2 に対する IC₅₀ 値 (2.3 nmol/L) を超える用量であったことが考えられた。

T2DN ラットにおける luseogliflozin の体重に対する効果

Luseogliflozin の反復投与により摂餌量が増加したにも関わらず、T2DN ラットの体重は 10% 程度低下した。これには、SGLT2 阻害薬が血中の過剰なグルコースを尿から体外へ排泄させたため、生体内のカロリーが体外へ排出され、その結果として体重が減少した可能性が考えられた。

T2DN ラットに対する luseogliflozin および insulin の血糖低下作用

Luseogliflozin 投与群および併用療法群では、尿糖排泄促進作用を伴った血糖値および HbA1c 値の顕著な低下作用が認められた。この luseogliflozin による血糖低下作用は、insulin 投与群で認められた血糖低下作用と同程度であった。Insulin 投与群においては、insulin の皮下投与により血中インスリン値が約 10 倍増加した。一方、luseogliflozin 投与群では、血中インスリン値の有意な低下が認められた。これは、luseogliflozin が尿糖排泄を介して高血糖を是正したため、膵 β 細胞からのインスリン分泌が低下したためであると考えられる。

Luseogliflozin の反復投与により、試験期間を通じて持続的な尿糖排泄促進作用が認められた。高血糖を呈する T2DN ラットにおいては、SGLT2 を阻害することにより尿糖排泄量が増加することは予想していたが、反復投与により高血糖が正常血糖値付近に是正された状態においては、SGLT2 を阻害しても尿糖排泄量は増加しないことを予想していた。本研究において、luseogliflozin の反復投与により、試験期間を通じて持続的に尿糖排泄量が増加した明確な理由は不明であるが、ラットが餌を摂取する度に糸球体で濾過されるグルコース量が上昇し、そのグルコースが SGLT2 阻害作用により尿として体外へ排泄されたため、試験期間を通じて常に尿糖排泄量の増加が認められたと推察された。

T2DN ラットにおける luseogliflozin および insulin の腎障害進展に対する効果

本研究で用いた T2DN ラットは、これまでの報告と同様に (Nobrega et al., 2004, Williams et al., 2011) , 尿タンパク排泄の進展, 重度の糸球体硬化, 腎間質線維化, 腎尿細管壊死, 糸球体濾過量の低下などの顕性腎症期から腎不全期で認められる腎障害症状を呈した。この T2DN ラットに luseogliflozin を反復投与した結果, 病態対照群と比較して糸球体傷害, 腎線維化および尿細管壊死を改善する効果が認められ, さらに糸球体濾過量の低下を顕著に抑制する効果が認められた。一方, luseogliflozin の反復投与により, 一過性の尿タンパク排泄の増加が認められた。SGLT2 阻害薬は, 糸球体尿細管フィードバック機構を活性化させて糸球体濾過量を低下させる可能性があることから (Thomson et al., 2012) , 糸球体におけるタンパクの濾過量が増加したことにより尿タンパク排泄が増加した可能性は低いと考えられる。Luseogliflozin の反復投与により, 一過性の尿タンパク排泄の増加が認められた理由の一つとして, SGLT2 を介したナトリウムおよびグルコースの再吸収が阻害されたことにより尿量が増加したため, 近位尿細管において糸球体濾過されたタンパク (アルブミン) とエンドサイトーシス受容体であるメガリンおよびキューベリンとの接触機会が減少し, タンパク (アルブミン) の再吸収

が減少した可能性が考えられる。本研究では、luseogliflozin の反復投与により、糸球体傷害および腎線維化を顕著に抑制する効果が認められたことから、糸球体傷害に依存しない尿タンパク排泄促進の原因として上記の可能性が推察される。さらに、メガリンおよびキュベリンを介したアルブミンの再吸収は、腎間質の炎症に関与していることが示されている (Liu et al., 2015) 。また、高脂肪食誘発メタボリック症候群モデル動物において認められる腎障害が、メガリンのノックアウトにより改善することも示唆されている (Kuwahara et al., 2015) 。糸球体濾過された原尿中のアルブミンには脂肪酸が結合していることから、尿細管に取り込まれたアルブミンと結合した脂肪酸による脂肪毒性が、尿細管間質傷害を惹起させる可能性も考えられる (Thomas et al., 2002, Yamahara et al., 2013, Ruggiero et al., 2014) 。そのため、SGLT2 阻害薬が T2DN ラットの腎障害を改善したメカニズムの一つとして、近位尿細管でのアルブミン再吸収が抑制されたことによる可能性も考えられる。

Luseogliflozin の反復投与によって認められた腎保護効果は、insulin 投与によって認められた腎保護効果と比較してより効果的であった。Insulin は T2DN ラットに対して良好な血糖コントロールを示したが、尿タンパク排泄を減少させる効果は認められず、さらに糸球体濾過量の低下を抑制する効果も認められなかった。さらに重要な点として、組織学的解析において insulin は、糸球体傷害、腎線維化ならびに尿細管壊死の指標である蛋白円柱形成に対して改善効果を示さなかった。Insulin が腎障害改善効果を示さなかった原因は不明であるが、本研究では 14 ヶ月齢以上の T2DN ラットを用いたため、既に重度の腎障害を有していた T2DN ラットの高血糖を是正したとしても、腎障害の進展を抑制することができなかった可能性が考えられる。また、T2DN ラットは 2 型糖尿病モデル動物であるため、insulin によって血中インスリン値が約 10 倍に上昇したことが影響した可能性も考えられる。実際に、insulin 濃度の上昇が TGF- β 1 発現や培養メサンギウム細胞の基質産生を増加させること (Anderson et al., 1996) 、さらには insulin が糸

球体および腎間質の線維化を悪化させる可能性が報告されている (Sarafidis and Ruilope, 2006, Jackson et al., 2012, Piwkowska et al., 2013, Piwkowska et al., 2015) . 一方, luseogliflozin により血糖値をコントロールした結果, 顕著な腎保護効果が認められた. 前述の通り, luseogliflozin と insulin の腎障害に対する保護効果の差異の原因は不明であるが, その一つの可能性として, luseogliflozin は血中インスリン値を低下させたことから, 腎臓において insulin による増殖促進作用を軽減したことが考えられる. さらに, luseogliflozin による SGLT2 阻害作用は, 近位尿細管におけるナトリウムの再吸収を低下させるため, 遠位尿細管の緻密斑への NaCl の流入を増加させて, 尿細管糸球体フィードバック機構が活性化された可能性が考えられる. その結果として, 単位ネフロン当たりの糸球体濾過が減少して糸球体内圧が軽減され, 腎障害の進展が抑制された可能性が考えられる. この糸球体内圧の上昇は, 単位ネフロンに対して構造的および機能的な障害を与える原因の一つであると考えられている. また, luseogliflozin は近位尿細管細胞へのグルコースの過剰流入を抑制したことにより, 腎障害を軽減した可能性も考えられる. 高血糖状態では糸球体から濾過されるグルコース量が増加するため, 原尿中のグルコース濃度が上昇するとともに SGLT2 の発現が亢進し, 近位尿細管細胞へのグルコースの再吸収が亢進することが考えられる (Kanai et al., 1994, Vestri et al., 2001, Rahmoune et al., 2005, Tabatabai et al., 2009, DeFronzo et al., 2013) . また, 近位尿細管細胞におけるグルコース濃度の上昇に伴って, 酸化ストレスやコラーゲンおよびファイブロネクチンの産生が上昇することが報告されている (Ziyadeh et al., 1990, Phillips et al., 1997, Jones et al., 1999) . このことから, luseogliflozin で SGLT2 を阻害したことにより, 近位尿細管細胞への糖取り込みを長期的に抑制したことで, 尿細管障害や腎間質線維化を改善した可能性も考えられる.

T2DN ラットにおける lisinopril による腎障害進展に対する効果

レニン-アンジオテンシン系阻害薬である lisinopril の反復投与により、T2DN ラットに対して顕著な降圧作用が認められた。糖尿病病態では、体液量減少がレニン-アンジオテンシン系を亢進させる可能性があることから、lisinopril により亢進したレニン-アンジオテンシン系が抑制されて、顕著な降圧作用が認められたと考えられる。さらに、lisinopril の反復投与により、顕著な尿タンパク排泄抑制作用、腎血流量増加作用および糸球体濾過量低下に対する抑制効果が認められた。組織学的解析においても、lisinopril を反復投与した結果、糸球体傷害および尿細管壊死を改善する効果が認められたが、腎間質線維化に対しては改善効果が認められなかった。レニン-アンジオテンシン系を阻害することで腎障害が改善されたメカニズムについては不明であるが、lisinopril により濾過率が低下傾向を示したことから、lisinopril は降圧作用および輸出細動脈拡張作用を發揮したことで、糸球体内圧を低下させることによりタンパク濾過量を低下させて、さらに腎障害の進展も抑制した可能性が考えられる。また、レニン-アンジオテンシン系を阻害することにより、酸化ストレスやアンジオテンシン II により活性化される種々の成長因子およびサイトカイン類の発現を抑制することも関与していた可能性が考えられる。

T2DN ラットの糸球体構造異常に対する luseogliflozin および lisinopril の保護効果

Luseogliflozin および lisinopril 投与群において、尿中ネフリン排泄量の顕著な減少が認められた。糸球体毛細血管は、内皮細胞、基底膜および糸球体上皮細胞で構成されており、この3層構造によって、タンパクおよびアルブミンの原尿中への濾過は最小限に留まっている。特に、糸球体上皮細胞に存在するスリット膜がバリア機能に重要な役割を果たしており、ネフリンはその主要構成蛋白であることが知られている (Mundel et al., 2002)。この糸球体のバリア機能に重要な役割を果たしているネフリンは、腎障害の進展を伴う糖尿病モデル動物において、糸球体における発現量が減少するとともに、尿中

への排泄量が増加することが報告されている (Bonnet et al., 2001, Saleh et al., 2011) .

以上の理由から, luseogliflozin および lisinopril の反復投与により, T2DN ラットの糸球体濾過バリア機能が保護された可能性が考えられる.

T2DN ラットにおける luseogliflozin および lisinopril の併用効果

Luseogliflozin および lisinopril の併用療法群では, luseogliflozin 単独投与群と同様に, 血糖値および HbA1c 値の持続的な低下が認められた. さらに血圧に対しては, 各々の薬剤単独投与群と比較して, より強力な降圧作用が認められた. この強力な降圧作用は, luseogliflozin の利尿作用に伴うレニン-アンジオテンシン系の亢進が lisinopril によりリセットされたことを反映している可能性が考えられる. また, 併用療法群では, 腎組織傷害に対する著明な改善効果が認められたことから, これが降圧効果を助長している可能性も考えられる. さらに併用療法群では, 各薬物を単独投与した場合と比較して, 糸球体傷害, 腎線維化および尿細管壊死に対して併用効果が認められた. これら腎組織傷害に対する併用効果は, T2DN ラットにおいて luseogliflozin および lisinopril の両薬物が, 血糖値や血圧のコントロールに加えて, 単位ネフロン当たりの糸球体過剰濾過を効果的に是正したことによる可能性が考えられる.

2-4. 総合考察

糖尿病性腎症は、尿タンパク排泄の進展、糸球体硬化、腎間質線維化などの病態進行過程を辿り、最終的には腎機能が廃絶して末期腎不全および人工透析導入の主たる原疾患となるため、医療健康上の大きな問題となっている (Remuzzi et al., 2006) . この糖尿病性腎症の発症および進展を抑制するためには、原因疾患である糖尿病および高血圧症を是正することが重要であると考えられているが、既存の糖尿病治療薬や降圧薬では、糖尿病性腎症の進行を遅延させることはできるものの完全に抑制することはできない (Ohkubo et al., 1995, Ueda et al., 2003, Casas et al., 2005, Mann et al., 2008) . そのため、さらに効果的な腎保護効果を示す治療戦略の探索が必要であると考えられている。

2型糖尿病治療薬として、腎臓の近位尿細管においてグルコースの再吸収を担っている SGLT2 に対する阻害薬が開発され、2016年現在、日本を含む多くの国々で承認されている。SGLT2 阻害薬は、近位尿細管においてグルコースとともにナトリウムの再吸収も抑制するため、高血糖時に生じる尿細管糸球体フィードバック機構の異常を是正して、血糖低下作用とは独立した機序で糖尿病性腎症改善作用を示す可能性が考えられるが、SGLT2 阻害薬がヒトの病態でみられる糖尿病性腎症の進行性の病態進展に対して有用であるかについては未だ不明である (Breyer et al., 2005, Brosius et al., 2009, Kong et al., 2013) . そこで本研究では、糖尿病性腎症患者に類似した進行性の病態進展を示す2種類のモデル動物に対して SGLT2 阻害薬の効果を検討することにより、SGLT2 阻害薬の糖尿病性腎症に対する有効性を総合的に検討することを目的とした。

本研究では、早期腎症期から顕性腎症期の糖尿病性腎症症状を呈するモデル動物として Dahl-STZ ラットを用いて、顕性腎症期から腎不全期の糖尿病性腎症症状を呈するモデル動物として T2DN ラットを用いて SGLT2 阻害薬の効果について検討を行った。

Dahl-STZ ラットにおける SGLT2 阻害薬および ACE 阻害薬の糖尿病性腎症に対する効果の検討

Dahl-STZ ラットに対して、luseogliflozin を 2 ヶ月間投与したところ、尿タンパク排泄の進展は抑制されなかったものの、糸球体過剰濾過が顕著に減少するとともに、糸球体傷害、腎髄質線維化および尿細管壊死に対する抑制効果が認められた。さらに、luseogliflozin と lisinopril の併用療法により、各薬物を単独投与した場合と比較して、血圧、尿タンパク排泄、腎髄質線維化および尿細管壊死に対して、より有効な併用効果が認められた。

T2DN ラットにおける SGLT2 阻害薬および ACE 阻害薬の糖尿病性腎症に対する効果の検討

T2DN ラットに対して、luseogliflozin を 3 ヶ月間投与したところ、糸球体傷害、腎線維化および尿細管壊死が顕著に抑制され、加えて糸球体濾過量低下に対する抑制効果が認められた。さらに、luseogliflozin と lisinopril の併用療法により、各薬物を単独投与した場合と比較して、血圧、糸球体傷害、腎線維化および尿細管壊死に対して、より有効な併用効果が認められた。

SGLT2 阻害薬の糖尿病性腎症に対する治療効果の可能性

Luseogliflozin は、早期腎症期から顕性腎症期の糖尿病性腎症症状を呈する Dahl-STZ ラットに対して、糸球体過剰濾過の減少に加えて腎組織傷害を改善する効果を示した。この結果から、luseogliflozin は糖尿病性腎症の病態進展要因の一つである糸球体過剰濾過を抑制することにより、腎組織傷害の進展を抑制した可能性が考えられた。また、luseogliflozin による腎組織傷害の進展に対する抑制効果には、糸球体過剰濾過の抑制以外にも、近位尿細管でのアルブミン再吸収抑制や近位尿細管細胞への糖取り込みの抑制が病態改善に関与している可能性が考えられる。さらに、顕性腎症期から腎不全期の糖尿病性腎症症状を呈する T2DN ラットに対して、luseogliflozin は腎組織傷害を改善して、

さらに糸球体濾過量低下を抑制する効果を示した。この結果から、*luseogliflozin* は糸球体傷害や腎線維化の進展を抑制することにより、腎不全期の症状である糸球体濾過量の著しい低下を抑制することができる可能性が考えられた。これら知見から、*SGLT2* 阻害薬は、早期腎症期から顕性腎症期ならびに顕性腎症期から腎不全期における糖尿病性腎症を改善する可能性があり、糖尿病性腎症の治療を見据えた新たな糖尿病に対する治療戦略となり得ると考えられた。さらに、*luseogliflozin* と *lisinopril* の併用療法は、両モデル動物の血圧および腎組織傷害に対して、各薬物単独投与と比較して、より有効な併用効果を示した。血圧に対する併用効果には、*luseogliflozin* による体液量減少や利尿作用に伴うレニン-アンジオテンシン系の亢進が *lisinopril* によりリセットされたことを反映している可能性が考えられる。また、腎組織傷害に対して著明な改善効果が認められたことから、これが降圧効果を助長している可能性も考えられる。さらに、腎組織傷害に対する併用効果には、*luseogliflozin* および *lisinopril* の両薬物が、血糖値や血圧のコントロールに加えて、単位ネフロン当たりの糸球体過剰濾過を是正したことによる可能性が考えられる。このことから、*SGLT2* 阻害薬と *ACE* 阻害薬の併用療法は、糖尿病性腎症の発症および進展をさらに効果的に抑制させる画期的な治療選択となり得ることが期待された (Figure 24)。

臨床研究において、エンパグリフロジンの8週間投与により、1型糖尿病患者の糸球体過剰濾過を軽減する効果が報告されている (Cherney et al., 2014)。さらに、*SGLT2* 阻害薬は、2型糖尿病患者を対象とした臨床研究において、尿タンパク排泄を抑制する効果が報告されている (Scherthner et al., 2014)。しかしながら、これら臨床研究では、進行性の腎障害に対する薬効については明確になっていない。今後、本研究で得られた成果に基づいて、*SGLT2* 阻害薬の糖尿病性腎症に対する有効性、さらにはレニン-アンジオテンシン系阻害薬との併用療法の有用性が臨床的に実証されることが期待される。

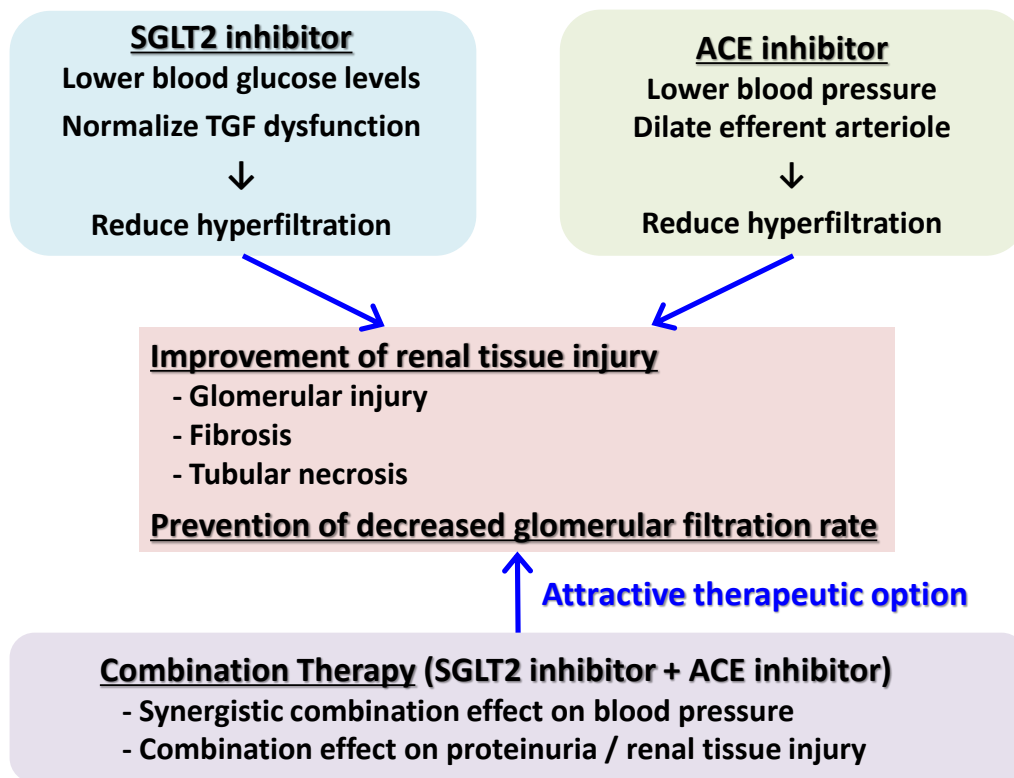


Figure 24.

Proposed therapeutic strategy of SGLT2 inhibitor and ACE inhibitor for diabetic nephropathy.

TGF: Tubuloglomerular feedback

総括

本邦において、「糖尿病が強く疑われる者」と「糖尿病の可能性を否定できない者」を合わせた推定人数は約 2,050 万人に上ることが報告されている（厚生労働省 平成 24 年 国民健康・栄養調査）。さらに、2015 年から 2040 年の推定糖尿病患者数は、日本を含む西太平洋地域において約 40%の増加が見込まれていることから、糖尿病患者は今後も増加の一途を辿ることが懸念されている（IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015）。糖尿病はインスリン分泌不全とインスリン抵抗性によるインスリン作用不足が原因となり、慢性的な高血糖状態を主徴とする代謝性疾患である。この糖尿病治療の最終的な目標は、高血糖による自覚症状を改善することに留まらず、糖尿病性腎症、糖尿病網膜症などの糖尿病細小血管合併症および動脈硬化性疾患の発症や進展を抑制することにより、健常人と同様の生活の質や生命予後を保つことである。このような背景から、様々な標的分子やシグナル経路を狙った新規治療薬の創薬および開発が進められているが、糖尿病合併症を根本的に治療し得る治療戦略は未だ確立しておらず、アンメットメディカルニーズの高い疾患領域であると考えられる。その原因の一つとして、糖尿病合併症の病態生理学的な発症機序が十分解明されていないことが考えられる。そこで著者は、糖尿病によって惹起される網膜および腎臓の病態生理学的な変化に着目し、糖尿病網膜症および糖尿病性腎症に対する新規治療戦略の探索を行った。

糖尿病網膜症に対する新規治療戦略の探索

糖尿病網膜症は、我が国における主要な視覚障害原因の一つであり、十分に満足できる薬物治療が未だ確立していないことから、アンメットメディカルニーズの高い疾患である。この糖尿病網膜症は、網膜の細小血管障害を基盤として、血管透過性の亢進や眼内の血管新生が起こる疾患である。その中で網膜血管閉塞は、網膜組織における虚血を起こし、眼内局所における増殖因子などの発現亢進により病的な血管新生を促進させるため、糖尿病網膜症の発症および進展に重要な病態生理学的変化であると考えられる。

そのため、網膜血管の狭窄または閉塞を是正して網膜循環を正常化することは、糖尿病網膜症の発症および進展を抑制する一つの重要な治療戦略であると考えられる。しかしながら、網膜血管の収縮および拡張メカニズムについては未だ不明な点が多く、有効な治療戦略が確立していないのが現状である。

本研究では、網膜血管拡張メカニズムを解明することを目的として、NO、PGs および EDHF の産生を介して強い血管拡張作用を示すことが知られているオータコイドである bradykinin の網膜血管拡張作用について検討を行い、さらにその詳細なメカニズムについて検討を行った。

Brown Norway ラットにおける bradykinin の作用を検討した結果、用量依存的な降圧反応および網膜細動静脈の拡張反応が認められた。Bradykinin は、NO、PGs および EDHF といった血管拡張性物質の産生を促進させることで血管拡張反応を惹起したことが考えられたが、一方で、血管拡張反応における NO、PGs および EDHF の寄与度は血管床によって様ではない可能性があることから、次に bradykinin の降圧作用および網膜血管拡張作用における NO および PGs の関与について検討を行った。非選択的 COX 阻害薬である indomethacin は、bradykinin による降圧作用には影響を及ぼさなかったものの、網膜血管拡張作用を減弱させたことから、bradykinin の降圧作用に対する血管拡張性 PGs の関与は小さいが、網膜血管拡張作用に対しては COX 経路を介した血管拡張性 PGs の産生が大きく関与していることが示唆された。さらに、網膜血管拡張作用に対する COX アイソフォームの関与について検討を行ったところ、bradykinin による網膜血管拡張作用は選択的 COX-2 阻害薬である nimesulide によって顕著に抑制されたが、選択的 COX-1 阻害薬である SC-560 では抑制されなかった。このことから、網膜血管における bradykinin の血管拡張作用には、主に COX-2 経路を介した血管拡張性 PGs の産生が大きく関与していることが示唆された。一方、bradykinin による降圧作用に対して、各 COX 阻害薬は影響を及ぼさなかったことから、末梢血管における bradykinin の作用は COX

非依存的経路によるものと考えられた。さらに、COX 経路依存的な bradykinin の網膜血管拡張作用における NO の関与を明らかにする目的で、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME 処置下において、bradykinin による網膜血管拡張作用および降圧作用に対する indomethacin の効果について検討を行ったところ、L-NAME 処置下においては、bradykinin による網膜血管拡張作用に対する indomethacin の抑制効果が消失することが明らかとなった。このことから bradykinin は、NO 依存的経路において、COX-2 を介した PGs の産生増加により網膜血管を拡張させる可能性が考えられた。

これら知見から、生理学的に起こり得る NO、PGs および EDHF の血管拡張物質の産生が同時に亢進される条件において、COX 阻害薬は bradykinin の降圧作用を抑制することなく網膜血管拡張作用を抑制した。このことから、血圧調節に重要な末梢血管とは異なり、網膜血管においては PGs が血管拡張作用を仲介する物質として機能しており、PGs 産生を介した cAMP の増大により特異的に網膜血管が拡張する可能性が考えられた。以上より、過度の降圧反応を引き起こすことなく特異的に網膜血管を拡張させることを目的として、IP 受容体や EP₂ 受容体といった炎症惹起を伴わない PGs の受容体を活性化させることにより、網膜循環調節において重要な役割を果たしている NO-PGs-cAMP 情報伝達経路を特異的に活性化させて、糖尿病病態時に低下する網膜循環を改善させることが、糖尿病網膜症の新規治療戦略として有用である可能性が考えられた。

糖尿病性腎症に対する新規治療戦略の探索

慢性腎障害は、全世界において医療費の増加の重大な原因の一つとなっており、今後もその患者数ならびに医療費が増加の一途を辿ることが懸念されることから、医療健康上の大きな問題として挙げられている。その中でも糖尿病性腎症は、尿タンパク排泄の進展、糸球体硬化、腎間質線維化などの病態進行過程を辿り、最終的には腎機能が廃絶するために末期腎不全および人工透析導入の主たる原疾患となっている。この糖尿病性腎症の発症および進展を抑制するためには、原因疾患である糖尿病および高血圧症を是

正することが重要であると考えられている。しかしながら、既存の糖尿病治療薬やレニン-アンジオテンシン系阻害薬などの降圧薬では糖尿病性腎症の発症および進行を遅延させることはできるものの、完全に抑制することはできないことが課題となっている。そのため、さらに効果的な腎保護効果を示す治療戦略の探索が必要であると考えられる。

SGLT2 阻害薬は、腎臓の近位尿細管において SGLT2 を阻害することにより、尿糖排泄促進作用を介して、良好な血糖低下作用を示す新規の経口糖尿病治療薬である。さらに、SGLT2 阻害薬は腎臓の近位尿細管においてナトリウムの再吸収も抑制するため、高血糖時に生じる尿細管糸球体フィードバック機構の異常を是正して、血糖低下作用とは独立した機序で糖尿病性腎症改善効果を示す可能性が考えられる。そこで本研究では、糖尿病性腎症患者に類似した進行性の病態進展を示す 2 種類のモデル動物に対する SGLT2 阻害薬の効果を検討することにより、SGLT2 阻害薬の糖尿病性腎症に対する有効性を総合的に検討することを目的とした。

早期腎症期から顕性腎症期の糖尿病性腎症症状を呈する Dahl-STZ ラットに対して、luseogliflozin は糸球体過剰濾過の減少に加えて腎組織傷害を改善する効果を示した。このことから、luseogliflozin は糖尿病性腎症の病態進展要因の一つである糸球体過剰濾過を抑制することにより、腎組織傷害の進展を抑制した可能性が考えられた。また、luseogliflozin による腎組織傷害の進展に対する抑制効果には、近位尿細管でのアルブミン再吸収抑制や近位尿細管細胞への糖取り込みの抑制も病態改善に関与している可能性が考えられた。さらに、顕性腎症期から腎不全期の糖尿病性腎症症状を呈する T2DN ラットに対して、luseogliflozin は腎組織傷害を改善して、さらに糸球体濾過量低下を抑制する効果を示した。このことから、luseogliflozin は糸球体傷害や腎線維化の進展を抑制することにより、腎不全期の症状である糸球体濾過量の著しい低下を抑制することができる可能性が考えられた。

これら知見から、SGLT2 阻害薬は、早期腎症期から顕性腎症期ならびに顕性腎症期から腎不全期における糖尿病性腎症を改善する可能性があり、糖尿病性腎症の治療を見据えた新たな糖尿病に対する治療戦略となり得ると考えられた。さらに、luseogliflozin と lisinopril の併用療法は、両モデル動物の血圧および腎組織傷害に対して、各薬物単独投与と比較して、より有効な併用効果を示した。血圧に対する併用効果には、luseogliflozin による体液量減少や利尿作用に伴うレニン-アンジオテンシン系の亢進が lisinopril によりリセットされたことを反映している可能性が考えられる。また、腎組織傷害に対する著明な改善効果が降圧効果を助長している可能性も考えられる。さらに、腎組織傷害に対する併用効果には、luseogliflozin および lisinopril の両薬物による血糖値および血圧のコントロールに加えて、単位ネフロン当たりの糸球体過剰濾過を是正したことが関与した可能性が考えられる。このことから、SGLT2 阻害薬と ACE 阻害薬の併用療法は、糖尿病性腎症の発症および進展をさらに効果的に抑制させる画期的な治療選択となり得ることが期待された。

今後は、本研究で得られた知見に基づいて、新たな糖尿病合併症治療薬に対する創薬および開発が推進されることが期待される。

参考文献

第 I 部

Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, and Hasséssian HM. (2003) Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. **Br J Pharmacol** 140(1): 33-40.

Abdouh M, Talbot S, Couture R, and Hasséssian HM. (2008) Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. **Br J Pharmacol** 154(1): 136-43.

Benedito S, Prieto D, Nielsen PJ, and Nyborg NC. (1991) Role of the endothelium in acetylcholine-induced relaxation and spontaneous tone of bovine isolated retinal small arteries. **Exp Eye Res** 52(5): 575-579.

Boje KM, Jaworowicz D Jr, and Raybon JJ. (2003) Neuroinflammatory role of prostaglandins during experimental meningitis: evidence suggestive of an in vivo relationship between nitric oxide and prostaglandins. **J Pharmacol Exp Ther** 304(1): 319-325.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, and Cohen RA. (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature** 368(6474): 850-853.

Boussery K, Delaey C, and Van de Voorde J. (2002) Rat retinal tissue releases a vasorelaxing factor. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 43(10): 3279-3286.

Brown DM, Nguyen QD, Marcus DM, Boyer DS, Patel S, and Feiner L, et al. (2013) Long-term outcomes of ranibizumab therapy for diabetic macular edema: the 36-month results from two phase III trials: RISE and RIDE. **Ophthalmology** 120(10): 2013-2022.

Brown DM, Schmidt-Erfurth U, Do DV, Holz FG, Boyer DS, and Midea E, et al. (2015) Intravitreal Aflibercept for Diabetic Macular Edema: 100-Week Results From the VISTA and VIVID Studies. **Ophthalmology** 122(10): 2044-2052.

Campochiaro PA, Wykoff CC, Shapiro H, Rubio RG, and Ehrlich JS. (2014) Neutralization of vascular endothelial growth factor slows progression of retinal nonperfusion in patients with diabetic macular edema. **Ophthalmology** 121(9): 1783-1789.

Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, and Aranda JV. (1991) Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 32(6): 1799-1807.

De La Cruz JP, González-Correa JA, Guerrero A, and de la Cuesta FS. (2004) Pharmacological approach to diabetic retinopathy. **Diabetes Metab Res Rev** 20(2): 91-113.

Delaey C and Van de Voorde J. (1998) Retinal arterial tone is controlled by a retinal-derived relaxing factor. **Circ Res** 83(7): 714-720.

Delaey C and Van De Voorde J. (2000) Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. **Ophthalmic Res** 32(6): 249-256.

Ehrlich K, Sicking C, Respondek M, and Peskar BM. (2004) Interaction of cyclooxygenase isoenzymes, nitric oxide, and afferent neurons in gastric mucosal defense in rats. **J Pharmacol Exp Ther** 308(1): 277-283.

Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, and Serra LM, et al. (2002) The impact of ocular blood flow in glaucoma. **Prog Retin Eye Res** 21(4): 359-393.

Haefliger IO, Flammer J, and Lüscher TF. (1992) Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 33(7): 2340-2343.

Hardy P, Abran D, Hou X, Lahaie I, Peri KG, and Asselin P, et al. (1998) A major role for prostacyclin in nitric oxide-induced ocular vasorelaxation in the piglet. **Circ Res** 83(7): 721-729.

Hawes NL, Smith RS, Chang B, Davisson M, Heckenlively JR, and John SW. (1999) Mouse fundus photography and angiography: a catalogue of normal and mutant phenotypes. **Mol Vis** 5: 22.

Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, and Ransom RW. (1992) Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. **Biochem Biophys Res Commun** 184(1): 260-268.

Honing ML, Smits P, Morrison PJ, and Rabelink TJ. (2000) Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. **Hypertension** 35(6): 1314-1318.

Jeppesen P, Aalkjaer C, and Bek T. (2002) Bradykinin relaxation in small porcine retinal arterioles. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 43(6): 1891-1896.

Kato N, Hou Y, Lu Z, Lu C, Nagano H, and Suzuma K, et al. (2009) Kallidinogenase normalizes retinal vasopermeability in streptozotocin-induced diabetic rats: potential roles of vascular endothelial growth factor and nitric oxide. **Eur J Pharmacol** 606(1-3): 187-190.

Korobelnik JF, Do DV, Schmidt-Erfurth U, Boyer DS, Holz FG, and Heier JS, et al. (2014) Intravitreal aflibercept for diabetic macular edema. **Ophthalmology** 121(11): 2247-2254.

Lamontagne D, König A, Bassenge E, and Busse R. (1992) Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. **J Cardiovasc Pharmacol** 20(4): 652-657.

Lim SK, Park MJ, Jung HK, Park AY, Kim DI, and Kim JC, et al. (2008) Bradykinin stimulates glutamate uptake via both B1R and B2R activation in a human retinal pigment epithelial cells. **Life Sci** 83(23-24): 761-770.

Limb GA, Hickman-Casey J, Hollifield RD, and Chignell AH. (1999) Vascular adhesion molecules in vitreous from eyes with proliferative diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 40(10): 2453-2457.

Lippton HL, Chapnick BM, Hyman AL, Glass FL, and Kadowitz PJ. (1981) The influence of indomethacin on vasodilator responses to bradykinin and nitroglycerin in the cat. **Peptides** 2(2): 165-169.

Ma JX, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, and Chao J. (1996) Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. **Exp Eye Res** 63(1): 19-26.

Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43(2): 109-142.

Mistry DK and Garland CJ. (1998) Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br J Pharmacol** 124(6): 1131-1140.

Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, and Salvemini D. (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacol Rev** 57(2): 217-252.

Mori A, Saito M, Sakamoto K, Narita M, Nakahara T, and Ishii K. (2007) Stimulation of prostanoid IP and EP(2) receptors dilates retinal arterioles and increases retinal and choroidal blood flow in rats. **Eur J Pharmacol** 570(1-3): 135-141.

Murata H, Aihara M, Chen YN, Ota T, Numaga J, and Araie M. (2008) Imaging mouse retinal ganglion cells and their loss in vivo by a fundus camera in the normal and ischemia-reperfusion model. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 49(12): 5546-5552.

Nagao T and Vanhoutte PM. (1992) Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery. **Br J Pharmacol** 107(4): 1102-1107.

Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, Yokota H, Sogawa K, and Yoshida A. (2010) Impaired retinal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus: retinal laser Doppler velocimetry study. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 51(12): 6729-6734.

Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, and Vanhoutte PM. (1993) Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. **J Clin Invest** 92(6): 2867-2871.

Nakamura S, Morimoto N, Tsuruma K, Izuta H, Yasuda Y, and Kato N, et al. (2011) Tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization via the cleavage of vascular endothelial growth factor-165. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 31(5): 1041-1048.

Nakazawa T, Kaneko Y, Mori A, Saito M, Sakamoto K, Nakahara T, and Ishii K. (2007) Attenuation of nitric oxide- and prostaglandin-independent vasodilation of retinal arterioles induced by acetylcholine in streptozotocin-treated rats. **Vascul Pharmacol** 46(3): 153-159.

Nakazawa T, Mori A, Saito M, Sakamoto K, Nakahara T, and Ishii K. (2008) Vasodilator effects of adenosine on retinal arterioles in streptozotocin-induced diabetic rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 376(6): 423-430.

Ogawa N, Mori A, Hasebe M, Hoshino M, Saito M, and Sakamoto K, et al. (2009) Nitric oxide dilates rat retinal blood vessels by cyclooxygenase-dependent mechanisms. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 297(4): R968-977.

Ogawa N, Saito M, Mori A, Sakamoto K, Kametaka S, and Nakahara T, et al. (2007) Vasodilator effect of nicorandil on retinal blood vessels in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 375(5): 323-328.

Okuno T, Oku H, Sugiyama T, Yang Y, and Ikeda T. (2002) Evidence that nitric oxide is involved in autoregulation in optic nerve head of rabbits. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 43(3): 784-789.

Paques M, Guyomard JL, Simonutti M, Roux MJ, Picaud S, and Legargasson JF, et al. (2007) Panretinal, high-resolution color photography of the mouse fundus. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 48(6): 2769-2774.

Paques M, Simonutti M, Roux MJ, Picaud S, Levavasseur E, and Bellman C, et al. (2006) High resolution fundus imaging by confocal scanning laser ophthalmoscopy in the mouse. **Vision Res** 46(8-9): 1336-1345.

Phipps JA, Clermont AC, Sinha S, Chilcote TJ, Bursell SE, and Feener EP. (2009) Plasma kallikrein mediates angiotensin II type 1 receptor-stimulated retinal vascular permeability.

Hypertension 53(2): 175-181.

Pouliot M, Héту S, Lahjouji K, Couture R, and Vaucher E. (2011) Modulation of retinal blood flow by kinin B₁ receptor in Streptozotocin-diabetic rats. **Exp Eye Res** 92(6): 482-489.

Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, and Gobeil FJ. (1998) Bradykinin receptors and their antagonists. **Eur J Pharmacol** 348(1): 1-10.

Rhaleb NE, Yang XP, and Carretero OA. (2011) The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. **Compr Physiol** 1(2): 971-993.

Riva CE, Sinclair SH, and Grunwald JE. (1981) Autoregulation of retinal circulation in response to decrease of perfusion pressure. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 21(1 Pt 1): 34-38.

Robinson F, Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL, and Sinclair SH. (1986) Retinal blood flow autoregulation in response to an acute increase in blood pressure. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 27(5): 722-726.

Salvemini D. (1997) Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cell Mol Life Sci** 53(7): 576-582.

Salvemini D, Currie MG, and Mollace V. (1996) Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation. A key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. **J Clin Invest** 97(11): 2562-2568.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, and Needleman P. (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc Natl Acad Sci U.S.A** 90(15): 7240-7244.

Schmetterer L and Wolzt M. (1999) Ocular blood flow and associated functional deviations in diabetic retinopathy. **Diabetologia** 42(4): 387-405.

Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Holz FG, Schlingemann RO, Lanzetta P, and Massin P, et al. (2014) Three-year outcomes of individualized ranibizumab treatment in patients with diabetic macular edema: the RESTORE extension study. **Ophthalmology** 121(5): 1045-1053.

Stitt AW, Lois N, Medina RJ, Adamson P, and Curtis TM. (2013) Advances in our understanding of diabetic retinopathy. **Clin Sci (Lond)** 125(1): 1-17.

Takizawa H, DelliPizzi AM, and Nasjletti A. (1998) Prostaglandin I₂ contributes to the vasodepressor effect of baicalein in hypertensive rats. **Hypertension** 31(3): 866-871.

Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW and Bek T, et al. (2012) Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. **Diabetes Care** 35(3): 556-564.

第 II 部

Anderson PW, Zhang XY, Tian J, Correale JD, Xi XP, and Yang D, et al. (1996) Insulin and angiotensin II are additive in stimulating TGF-beta 1 and matrix mRNAs in mesangial cells. **Kidney Int** 50(3): 745-753.

Bailey CJ, Gross JL, Pieters A, Bastien A, and List JF. (2010) Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with metformin: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet** 375(9733): 2223-2233.

Banday AA, Siddiqui AH, Menezes MM, and Hussain T. (2005) Insulin treatment enhances AT1 receptor function in OK cells. **Am J Physiol Renal Physiol** 288(6): F1213-1219.

Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, and Cao Z. (2001) Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. **Diabetologia** 44(7): 874-877.

Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, and Parving HH, et al. (2001) Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. **N Engl J Med** 345(12): 861-869.

Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC 3rd, Coffman TM, Harris RC, and Heilig CW, et al. (2005) Mouse models of diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol** 16(1): 27-45.

Brosius FC 3rd, Alpers CE, Bottinger EP, Breyer MD, Coffman TM, and Gurley SB, et al.

(2009) Mouse models of diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol** 20(12): 2503-2512.

Casas JP, Chua W, Loukogeorgakis S, Vallance P, Smeeth L, and Hingorani AD, et al.

(2005) Effect of inhibitors of the renin-angiotensin system and other antihypertensive drugs on renal outcomes: systematic review and meta-analysis. **Lancet** 366(9502): 2026-2033.

Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Maione M, Lai V, and Lee A, et al. (2014) Renal

hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. **Circulation** 129(5): 587-597.

DeFronzo RA, Hompesch M, Kasichayanula S, Liu X, Hong Y, and Pfister M, et al. (2013)

Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Care** 36(10): 3169-3176.

Ge Y, Murphy SR, Fan F, Williams JM, Falck JR, and Liu R, et al. (2014) Role of

20-HETE in the impaired myogenic and TGF responses of the Af-Art of Dahl salt-sensitive rats. **Am J Physiol Renal Physiol** 307(5): F509-515.

Gembardt F, Bartaun C, Jarzebska N, Mayoux E, Todorov VT, and Hohenstein B, et al.

(2014) The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates early features of diabetic nephropathy in BTBR ob/ob type 2 diabetic mice with and without hypertension. **Am J Physiol Renal Physiol** 307(3): F317-325.

Han S, Hagan DL, Taylor JR, Xin L, Meng W, and Biller SA, et al. (2008) Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats. **Diabetes** 57(6): 1723-1729.

Jackson CM, Alexander BT, Roach L, Haggerty D, Marbury DC, and Hutchens ZM, et al. (2012) Exposure to maternal overnutrition and a high-fat diet during early postnatal development increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. **Am J Physiol Renal Physiol** 302(6): F774-783.

Jones SC, Saunders HJ, and Pollock CA. (1999) High glucose increases growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. **Diabet Med** 16(11): 932-938.

Kakinuma H, Oi T, Hashimoto-Tsuchiya Y, Arai M, Kawakita Y, and Fukasawa Y, et al. (2010) (1S)-1,5-anhydro-1-[5-(4-ethoxybenzyl)-2-methoxy-4-methylphenyl]-1-thio-D-glucitol (TS-071) is a potent, selective sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for type 2 diabetes treatment. **J Med Chem** 53(8): 3247-3261.

Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, and Hediger MA. (1994) The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. **J Clin Invest** 93(1): 397-404.

Kong LL, Wu H, Cui WP, Zhou WH, Luo P, and Sun J, et al. (2013) Advances in murine models of diabetic nephropathy. **J Diabetes Res** 2013: 797548.

Kuwahara S, Hosojima M, Kaneko R, Aoki H, Nakano D, and Sasagawa T, et al. (2015)
Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. **J Am Soc Nephrol** pii: ASN.2015020190. [Epub ahead of print]

Lambers Heerspink HJ, de Zeeuw D, Wie L, Leslie B, and List J. (2013) Dapagliflozin a glucose-regulating drug with diuretic properties in subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab** 15(9): 853-862.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, and Rohde RD. (1993) The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. **N Engl J Med** 329(20): 1456-1462.

Liu D, Wen Y, Tang TT, Lv LL, Tang RN, and Liu H, et al. (2015)
Megalin/Cubulin-Lysosome-mediated Albumin Reabsorption Is Involved in the Tubular Cell Activation of NLRP3 Inflammasome and Tubulointerstitial Inflammation. **J Biol Chem** 290(29): 18018-18028.

Makino H, Haneda M, Babazono T, Moriya T, Ito S, and Iwamoto Y, et al. (2007)
Prevention of transition from incipient to overt nephropathy with telmisartan in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care** 30(6): 1577-1578.

Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, and Pogue J, et al. (2008)
Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. **Lancet** 372(9638): 547-553.

Mundel P, and Shankland SJ. (2002) Podocyte biology and response to injury. **J Am Soc Nephrol** 13(12): 3005-3015.

Nagata T, Fukuzawa T, Takeda M, Fukazawa M, Mori T, and Nihei T, et al. (2013) Tofogliflozin, a novel sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, improves renal and pancreatic function in db/db mice. **Br J Pharmacol** 170(3): 519-531.

Nobrega MA, Fleming S, Roman RJ, Shiozawa M, Schlick N, and Lazar J, et al. (2004) Initial characterization of a rat model of diabetic nephropathy. **Diabetes** 53(3): 735-742.

Nobrega MA, Solberg Woods LC, Fleming S, and Jacob HJ. (2009) Distinct genetic regulation of progression of diabetes and renal disease in the Goto-Kakizaki rat. **Physiol Genomics** 39(1): 38-46.

Noonan WT, Shapiro VM, and Banks RO. (2001) Renal glucose reabsorption during hypertonic glucose infusion in female streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci** 68(26): 2967-2977.

Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, and Motoyoshi S, et al. (1995) Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. **Diabetes Res Clin Pract** 28(2): 103-117.

Phillips AO, Steadman R, Morrisey K, Martin J, Eynstone L, and Williams JD. (1997)

Exposure of human renal proximal tubular cells to glucose leads to accumulation of type IV collagen and fibronectin by decreased degradation. **Kidney Int** 52(4): 973-984.

Piwkowska A, Rogacka D, Audzeyenka I, Angielski S, and Jankowski M. (2015) Combined

effect of insulin and high glucose concentration on albumin permeability in cultured rat podocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 461(2): 383-389.

Piwkowska A, Rogacka D, Kasztan M, Angielski S, and Jankowski M. (2013) Insulin

increases glomerular filtration barrier permeability through dimerization of protein kinase G type I α subunits. **Biochim Biophys Acta** 1832(6): 791-804.

Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, and Brown J. (2005) Glucose

transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. **Diabetes** 54(12): 3427-3434.

Remuzzi G, Macia M, and Ruggenti P. (2006) Prevention and treatment of diabetic renal

disease in type 2 diabetes: the BENEDICT study. **J Am Soc Nephrol** 17(4 Suppl 2): S90-97.

Ritz E, Rychlík I, Locatelli F, and Halimi S. (1999) End-stage renal failure in type 2 diabetes:

A medical catastrophe of worldwide dimensions. **Am J Kidney Dis** 34(5): 795-808.

Ruggiero C, Elks CM, Kruger C, Cleland E, Addison K, and Noland RC, et al. (2014) Albumin-bound fatty acids but not albumin itself alter redox balance in tubular epithelial cells and induce a peroxide-mediated redox-sensitive apoptosis. **Am J Physiol Renal Physiol** 306(8): F896-906.

Saleh MA, Boesen EI, Pollock JS, Savin VJ, and Pollock DM. (2011) Endothelin receptor A-specific stimulation of glomerular inflammation and injury in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. **Diabetologia** 54(4): 979-988.

Sarafidis PA, and Ruilope LM. (2006) Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: mechanisms and implications. **Am J Nephrol** 26(3): 232-244.

Schnermann J, and Briggs JP. (1990) Restoration of tubuloglomerular feedback in volume-expanded rats by angiotensin II. **Am J Physiol** 259(4 Pt 2): F565-572.

Scherthaner G, Mogensen CE, and Scherthaner GH. (2014) The effects of GLP-1 analogues, DPP-4 inhibitors and SGLT2 inhibitors on the renal system. **Diab Vasc Dis Res** 11(5): 306-323.

Slaughter TN, Paige A, Spires D, Kojima N, Kyle PB, and Garrett MR, et al. (2013) Characterization of the development of renal injury in Type-1 diabetic Dahl salt-sensitive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 305(7): R727-734.

Suzuki M, Honda K, Fukazawa M, Ozawa K, Hagita H, and Kawai T, et al. (2012) Tofogliflozin, a potent and highly specific sodium/glucose cotransporter 2 inhibitor, improves glycemic control in diabetic rats and mice. **J Pharmacol Exp Ther** 341(3): 692-701.

Tabatabai NM, Sharma M, Blumenthal SS, and Petering DH. (2009) Enhanced expressions of sodium-glucose cotransporters in the kidneys of diabetic Zucker rats. **Diabetes Res Clin Pract** 83(1): e27-30.

Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, and Hayashizaki Y, et al. (2012) Antidiabetic effects of SGLT2-selective inhibitor ipragliflozin in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic mice. **J Pharmacol Sci** 120(1): 36-44.

Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, and Nakatsuka A, et al. (2014) Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. **PLoS One** 9(6): e100777.

The EUCLID Study Group. (1997) Randomised placebo-controlled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin-dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria. **Lancet** 349(9068): 1787-1792.

Thomas ME, Harris KP, Walls J, Furness PN, and Brunskill NJ. (2002) Fatty acids exacerbate tubulointerstitial injury in protein-overload proteinuria. **Am J Physiol Renal Physiol** 283(4): F640-647.

Thomson SC, Bachmann S, Bostanjoglo M, Ecelbarger CA, Peterson OW, and Schwartz D, et al. (1999) Temporal adjustment of the juxtaglomerular apparatus during sustained inhibition of proximal reabsorption. **J Clin Invest** 104(8): 1149-1158.

Thomson SC, Blantz RC, and Vallon V. (1996) Increased tubular flow induces resetting of tubuloglomerular feedback in euvolemic rats. **Am J Physiol** 270(3 Pt 2): F461-468.

Thomson SC, Rieg T, Miracle C, Mansoury H, Whaley J, and Vallon V, et al. (2012) Acute and chronic effects of SGLT2 blockade on glomerular and tubular function in the early diabetic rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 302(1): R75-83.

Ueda H, Ishimura E, Shoji T, Emoto M, Morioka T, and Matsumoto N, et al. (2003) Factors affecting progression of renal failure in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care** 26(5): 1530-1534.

Vallon V, Gerasimova M, Rose MA, Masuda T, Satriano J, and Mayoux E, et al. (2014) SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice. **Am J Physiol Renal Physiol** 306(2): F194-204.

Vallon V, Platt KA, Cunard R, Schroth J, Whaley J, Thomson SC, et al. (2011) SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. **J Am Soc Nephrol** 22(1): 104-112.

Vallon V, Rose M, Gerasimova M, Satriano J, Platt KA, and Koepsell H, et al. (2013)
Knockout of Na-glucose transporter SGLT2 attenuates hyperglycemia and glomerular hyperfiltration but not kidney growth or injury in diabetes mellitus. **Am J Physiol Renal Physiol** 304(2): F156-167.

Vallon V, and Thomson SC. (2012) Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. **Annu Rev Physiol** 74: 351-375.

Vestri S, Okamoto MM, de Freitas HS, Aparecida Dos Santos R, Nunes MT, and Morimatsu M, et al. (2001) Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. **J Membr Biol** 182(2): 105-112.

Wilding JP, Ferrannini E, Fonseca VA, Wilpshaar W, Dhanjal P, and Houzer A. (2013)
Efficacy and safety of ipragliflozin in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin: a dose-finding study. **Diabetes Obes Metab** 15(5): 403-409.

Williams JM, Zhang J, North P, Lacy S, Yakes M, and Dahly-Vernon A, et al. (2011)
Evaluation of metalloprotease inhibitors on hypertension and diabetic nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol** 300(4): F983-998.

Yale JF, Bakris G, Cariou B, Yue D, David-Neto E, and Xi L, et al. (2013) Efficacy and safety of canagliflozin in subjects with type 2 diabetes and chronic kidney disease. **Diabetes Obes Metab** 15(5): 463-473.

Yamahara K, Kume S, Koya D, Tanaka Y, Morita Y, and Chin-Kanasaki M, et al. (2013)
Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions. **J Am Soc Nephrol** 24(11): 1769-1781.

Yamamoto K, Uchida S, Kitano K, Fukuhara N, Okumura-Kitajima L, and Gunji E, et al. (2011) TS-071 is a novel, potent and selective renal sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor with anti-hyperglycaemic activity. **Br J Pharmacol** 164(1): 181-191.

Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, and Haverty TP. (1990)
High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. **Am J Physiol** 259(4 Pt 2): F704-714.

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導ご鞭撻を賜り、さらに本論文のご校閲を頂きました、北里大学薬学部 薬理学教室 教授 田辺光男先生、生化学教室 教授 服部成介先生、薬物治療学Ⅱ教室 准教授 黒山政一先生に謹んで厚く御礼申し上げます。

糖尿病網膜症に関する研究は、北里大学薬学部 分子薬理学教室で行われたものであり、この機会を与えて頂くとともに、本研究を進めるにあたり多くのご指導ご鞭撻を賜りました、指導教官である北里大学薬学部 分子薬理学教室 教授 石井邦雄先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するのにあたりご指導ご鞭撻を賜りました、共同研究者である北里大学薬学部 分子薬理学教室 准教授 中原努先生、講師 坂本謙司先生、助教 森麻美先生および岩手医科大学薬学部 分子細胞薬理学講座 助教 斉藤麻希先生に厚く御礼申し上げます。

糖尿病性腎症に関する研究は、大正製薬株式会社とミシシッピ大学医療センターとの共同研究として行われたものであり、この機会を与えて頂きました、大正製薬株式会社 上原昭二名誉会長、上原明取締役会長、上原茂代表取締役社長、上原健代表取締役副社長に厚く御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり多くのご指導ご鞭撻を賜りました、指導教官であるミシシッピ大学医療センター 薬理学・毒性学教室 主任教授 **Richard J. Roman** 先生に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究を遂行するのにあたりご指導ご鞭撻を賜りました、共同研究者である大正製薬株式会社 医薬事業企画部 部長 宮田則之博士、薬理第 2 研究室 グループマネージャー 高橋禎介博士、主任研究員補 加藤壮太氏、ミシシッピ大学医療センター 薬理学・毒性学教室 准教授 **Jan M. Williams** 先生、デューク大学 内科学教室 博士研究員 **Tiffani N. White (Slaughter)** 博士に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究において、血中 **luseogliflozin** 濃度の測定をして頂いたミシシッピ大学医療センター 薬理学・毒性学教室 名誉教授 **Rodney Baker** 先生および分析スペシャリスト **Chris Purser** 氏、動物飼育および実験補助としてご協力頂いたミシ

シッピ大学医療センター 薬理学・毒性学教室 Robin Dycee 氏および Wenjie Wu 氏，データチェックにご協力頂いた大正製薬株式会社 薬理第 2 研究室 主任研究員補 三谷明子氏に厚く御礼申し上げます。

本研究遂行の後押しをして下さり，さらに学位取得に際し深いご理解と多大なご指導を賜りました，大正富山医薬品株式会社 藤田憲一代表取締役社長，大正製薬株式会社 医薬研究本部 本部長 奥山茂博士，セルフメディケーション研究開発本部 本部長 高橋健三博士，薬理研究所 所長 植木智一博士，薬理第 2 研究室 室長 山本浩二博士に厚く御礼申し上げます。

最後に，本研究活動において，北里大学薬学部 分子薬理学教室，大正製薬株式会社 開発薬理研究室ならびに薬理第 2 研究室，ミシシッピ大学医療センター 薬理学・毒性学教室をはじめとして，多くの諸先輩および同僚の皆様には，様々なご協力，ご支援ならびにご指導を頂きました。お世話になりながらも，お名前を言上することが出来なかった多くの方々に，心から厚く御礼申し上げます。

2016 年 2 月