

京都大学	博士（医学）	氏 名	藤 田 義 人
論文題目	Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis and lowers fasting blood glucose levels through reactive nitrogen species in mice (マウスにおいて metformin は活性窒素種を介して肝糖新生を抑制し空腹時血糖を低下させる)		
(論文内容の要旨)			
metformin は 2 型糖尿病の治療薬として広く用いられている。metformin の主要標的臓器は肝臓であり、作用機序として AMP kinase (AMPK)の活性化を介して肝糖新生を抑制し空腹時血糖を低下させることが知られているが、AMPK を活性化させる機序については不明な点が多い。本研究では、肝臓において metformin による AMPK 活性化における活性窒素種 (RNS: reactive nitrogen species)の役割を明らかにし、肝糖新生抑制および空腹時血糖低下作用への関与を調べることを目的とした。 metformin にはミトコンドリア complex I 阻害作用があることが知られており、その結果 AMP/ATP 比が上昇し AMPK が活性化される可能性がある。そこでまず野生型マウスの肝細胞を用いて complex I 阻害薬である rotenone と metformin の肝糖新生抑制作用、AMPK の活性化作用を比較し、肝における metformin による AMPK 活性化機序について検討した。metformin、rotenone とともに肝糖新生を抑制し、Western blotting 法を用いた実験において AMPK α のリン酸化(Thr 172)を促進し活性を増加させた。rotenone ではミトコンドリア呼吸鎖阻害を反映して肝細胞の AMP/ATP 比が上昇したが metformin では変化を認めなかった。一方、Fluorescence 法および免疫染色法を用いて RNS の一つである peroxynitrite (ONOO⁻)の肝細胞内での産生を調べたところ、metformin では増加したが rotenone では増加しなかった。さらに外因性に ONOO⁻を肝細胞に直接曝露したときにも、AMP/ATP 比を変化させずに AMPK が活性化され肝糖新生は抑制された。これらの結果から肝細胞の AMPK 活性化機序として metformin では RNS が、rotenone では AMP/ATP 比が関与し、両者の作用機序の違いが示された。 ONOO⁻は細胞内で nitric oxide (NO)と O₂⁻が反応して産生され、NO 産生には nitric oxide synthase (NOS)が関与する。metformin による ONOO⁻産生機序を明らかにするために eNOS 欠損マウスを用いて実験を行った。eNOS 欠損マウス肝細胞では metformin による肝糖新生抑制作用ならびに AMPK リン酸化は減弱し、ONOO⁻の産生増加は認められなかった。これらの結果から metformin による肝細胞における RNS 産生および AMPK 活性化には eNOS の存在が必要であることが示された。 さらに、eNOS が metformin による <i>in vivo</i> での血糖降下作用に関与するかどうかを検証する目的で野生型マウスおよび eNOS 欠損マウス由来の STZ 糖尿病マウスを作成し、metformin の腹腔内投与を行い血糖値の変化を調べた。野生型マウスでは metformin の 3 日間連続投与後の空腹時血糖が低下したが、eNOS 欠損マウスでは変化しなかった。投与後に採取した肝組織の AMPK は野生型マウスでは活性化していたが eNOS 欠損マウスでは活性化を認めなかった。これらの結果から metformin による肝組織の AMPK 活性化および血糖低下作用には eNOS の存在が必要であることが証明された。 以上の結果から、metformin による AMPK 活性化および肝糖新生抑制作用には RNS が関与することが示され、血糖低下作用には eNOS 由来の RNS が関与する可能性が示唆された。			

（論文審査の結果の要旨） 申請者は、2 型糖尿病治療薬であるメトホルミンの肝臓における新たな作用機序として、活性窒素種 (RNS: reactive nitrogen species)の関与について検討した。 野生型マウス肝細胞においてメトホルミンはミトコンドリア呼吸鎖阻害薬であるロテノンとは異なり、AMP/ATP 比を変化させず、RNS 産生を増加させることによって AMP kinase (AMPK)を活性化し肝糖新生を抑制した。 次にメトホルミンによる RNS 産生機序を明らかにするために endothelial nitric oxide synthase (eNOS)欠損マウスを用いて実験を行った。eNOS 欠損マウス肝細胞ではメトホルミンによる肝糖新生抑制作用ならびに AMPK 活性化作用は野生型マウス肝細胞と比較して減弱し、RNS の産生増加が認められなかった。さらにストレプトゾトシンにより糖尿病を誘発した eNOS 欠損マウスではメトホルミン投与による血糖低下が認められなかった。 これらのことからメトホルミンによる AMPK 活性化作用には RNS が関与し、血糖低下作用には eNOS が必要であることが明らかとなった。 以上の研究は肝臓における糖代謝調節機序の解明に貢献し、糖尿病の病態の解明ならびに新たな治療法の開発に寄与するところ大きい。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 6 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
