



Title	基礎的・臨床的見地からのSGLT2阻害薬の有用性
Author(s)	高橋, 清彦
Description	配架番号 : 2418
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13253号
Issue Date	2018-06-29
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13253
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75236
Type	doctoral thesis
File Information	Kiyohiko_Takahashi.pdf



学 位 論 文

基礎的・臨床的見地からの SGLT2
阻害薬の有用性
(The efficacy of sodium-glucose
cotransporter 2 inhibitor for basic and
clinical aspect)

2018 年 6 月

北 海 道 大 学

高橋 清彦

学 位 論 文

基礎的・臨床的見地からの SGLT2
阻害薬の有用性
(The efficacy of sodium-glucose
cotransporter 2 inhibitor for basic and
clinical aspect)

2018 年 6 月

北 海 道 大 学

高橋 清彦

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
1. 緒言	2 頁
2. 略語表	4 頁
3. 第一章	
異なる週齢の db/db マウスに SGLT2 阻害薬 luseogliflozin を 投与した際の膵 β 細胞量に与える影響	6-51 頁
3.1 緒言	7 頁
3.2 実験方法	9-16 頁
3.2.1 実験に用いた動物	9 頁
3.2.2 実験に用いた試薬と入手先	9 頁
3.2.3 luseogliflozin の投与	9 頁
3.2.4 体重・摂餌量の測定	10 頁
3.2.5 随時血糖の測定の測定	10 頁
3.2.6 経口ブドウ糖負荷試験	10 頁
3.2.7 インスリン抵抗性の評価	10 頁

3.2.8	血中インスリン・血糖比の評価	11 頁
3.2.9	膵島単離	11 頁
3.2.10	膵島インスリン含量の測定	12 頁
3.2.11	膵の組織学的評価	12 頁
3.2.12	免疫組織染色（酵素抗体法）	12 頁
3.2.13	免疫組織染色（蛍光抗体法）	13 頁
3.2.14	遺伝子発現解析	16 頁
3.2.15	統計学的解析	16 頁
3.3	実験結果	17-48 頁
3.3.1	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 体重・摂餌量・随時血糖値	17 頁
3.3.2	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 耐糖能評価	19 頁
3.3.3	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による インスリン負荷試験の検討	22 頁
3.3.4	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞機能の検討	23 頁

3.3.5	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵の組織学的検討	25 頁
3.3.6	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞量保持作用の検討	28 頁
3.3.7	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞機能に関する遺伝子発現	31 頁
3.3.8	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞の細胞周期に関する遺伝子発現	33 頁
3.3.9	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞の酸化ストレスに関する遺伝子発現	34 頁
3.3.10	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞における FoxO1 の発現	35 頁
3.3.11	6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞における c-Jun の発現	37 頁
3.3.12	異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による 体重、随時血糖の推移	39 頁

3.3.13	異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による 耐糖能評価	41 頁
3.3.14	異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞機能の検討	43 頁
3.3.15	異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞量の検討	44 頁
3.3.16	異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞量保持作用の検討	45 頁
3.3.17	異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞における Mafa の発現に対する検討	48 頁
3.4	考察	49 頁
4.	第二章	
ipragliflozin を開始する際に SU 薬は中止すべきか少量残すべきか？		52-73 頁
4.1	緒言	53 頁
4.2	実験方法	54-56 頁
4.2.1	対象	54 頁

4.2.2	研究プロトコール	54 頁
4.2.3	その他の評価項目	55 頁
4.2.4	目標症例数の設定	55 頁
4.2.5	統計学的解析	56 頁
4.3	実験結果	57-74 頁
4.3.1	背景因子	57 頁
4.3.2	試験結果	62 頁
4.3.3	有害事象	69 頁
4.4	考察	71 頁
5.	総括および結論	74 頁
6.	謝辞	76 頁
7.	引用文献	77 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として発表した。

1. Kiyohiko Takahashi, Akinobu Nakamura, Hideaki Miyoshi, Hiroshi Nomoto, Naoyuki Kitao, Kazuno Omori, Kohei Yamamoto, Kyu Yong Cho, Yasuo Terauchi, Tatsuya Atsumi, Effect of the sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic beta cell mass in db/db mice of different ages. *Scientific Reports* **8**, 6864 (2018).

本研究は下記の論文として投稿中である。

2. Kiyohiko Takahashi, Kyu Yong Cho, Akinobu Nakamura, Aika Miya, Arina Miyoshi, Chiho Yamamoto, Hiroshi Nomoto, Hirokatsu Niwa, Kiyohito Takahashi, Naoki Manda, Yoshio Kurihara, Shin Aoki, Yoichi M. Ito, Tatsuya Atsumi, Hideaki Miyoshi, Should sulfonylurea be discontinued or maintained the lowest dose when starting ipragliflozin? A multicentre observational study in Japanese patients with type 2 diabetes.

本研究の一部は下記の学会で発表した。

1. Takahashi K, Nakamura A, Kitao N, Cho KY, Miyoshi H, Terauchi Y, Atsumi T, The protective effect of Luseogliflozin on pancreatic beta cell mass, The 52th Annual Meeting of the European association for the study of diabetes, Munich, Germany, 12-16 September 2016

1. 緒 言

日本糖尿病学会の「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会」の報告によれば、糖尿病は、インスリン作用の不足による慢性高血糖を主徴とし、種々の特徴的な代謝異常を伴う疾患群である。その発症には遺伝因子と環境因子がともに関与し、長期間にわたる代謝異常の持続は特有の合併症を来たしやすく、動脈硬化性疾患や発癌をも促進する。代謝異常の程度によって、無症状からケトアシドーシスや昏睡に至る幅広い病態を示す。糖尿病の成因に基づいて本邦では1型、2型、その他の特定の機序・疾患によるもの、妊娠糖尿病と大別されている。糖尿病の大部分を占める2型糖尿病における病態の特徴として、インスリンの分泌低下とインスリン抵抗性があげられる¹。そのうち、インスリン分泌低下の原因として、膵β細胞機能の低下に加え、膵β細胞量の低下が重要であることが注目されている。実際、肥満の有無にかかわらず、剖検例にて糖尿病者は非糖尿病者に比し膵β細胞量が低下しており、さらに糖尿病を発症していない境界型肥満症例でも膵β細胞量が低下していることが明らかになっている^{2,3}。欧米での大規模疫学研究である United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) 16 は、2型糖尿病発症時点においてすでに膵β細胞機能は約50%まで低下しており糖尿病発症の約12年前から徐々に進行していることを示唆している⁴。さらに、肥満2型糖尿病モデル動物である db/db マウスでも経時的に膵β細胞量が低下し膵β細胞機能の低下を認めることが報告されている^{5,6}。このように、糖尿病患者において早期からの治療介入が膵β細胞量や膵β細胞機能を保持するうえで重要であると考えられる。また、膵β細胞量を増加させることは糖尿病における理想的な治療戦略となりうる。

近年、本邦において実臨床で使用可能となった SGLT2 (sodium-glucose cotransporter 2) 阻害薬は、インスリン分泌に依存することなく近位尿細管より尿糖の再吸収を抑制させて尿糖排出を亢進し、持続的に血糖を低下させる薬剤である。また、内臓脂肪減少による体重の減少、脂肪肝の改善、脂質異常や血圧などのメタボリックパラメーターの改善効果、さらに、心血管イベントの二次予防や腎臓の保護的作用といった、これまでの経口血糖降下薬にない効果を有する⁷⁻¹⁴。また、近年、SGLT2 受容体は膵β細胞に発現して

いないことが明らかになっており¹⁵、SGLT2 阻害薬は、膵β細胞に直接作用はなくブドウ糖毒性解除によるインスリン分泌やインスリン抵抗性の改善をもたらすと考えられる。我々は、第1章では2型糖尿病モデルマウスにおけるSGLT2阻害薬の膵β細胞量へ与える影響およびその分子メカニズムについて検討した。第2章では、Sulfonylurea (SU)薬を内服中の患者にSGLT2 阻害薬を開始する際、SU薬を中止した群、SU薬を減量した群にわけその効果や安全性を検討した。

2. 略 語 表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

Aldh1a3	aldehyde dehydrogenase 1a3
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
AUC	area under the curve
BMI	body mass index
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
Ccnd1	cyclin D1
Ccnd2	cyclin D2
Ccnd3	cyclin D3
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
DAB	diaminobenzidine
eGFR	estimated glomerular filtration rate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FoxO1	Forkhead box protein O1
PFA	paraformaldehyde
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gck	glucokinase
Glut2	glucose transporter2
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
HOMA- β	Homeostasis model assessment of beta cell function
HOMA-IR	Homeostasis model assessment of insulin resistance
KRBH	Krebs-Ringer's solution bicarbonate / Hepes
LDL	low-density lipoprotein cholesterol
Luseo	luseogliflozin
Mafa	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
Neurog3	neurogenin3

NKX6.1	NK6 Homeobox 1
OGTT	oral glucose tolerance test
OR	odds ratio
PBS	phosphate-buffered saline
Pdx-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
ROC	Receiver operating characteristic
SGLT2	sodium–glucose cotransporter 2
SU	sulfonylurea
T-CHO	total cholesterol
TG	triglyceride
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study

－第 1 章－

異なる週齢の db/db マウスに SGLT2
阻害薬 luseogliflozin を投与した際の
膵 β 細胞量に与える影響

3.1. 緒 言

前述の如く、SGLT2 阻害薬は、膵β細胞への直接作用なく、インスリン非依存的に、高血糖のみを改善させるという特性がある。

臨床研究では、2 型糖尿病患者に対する SGLT2 阻害薬投与により、膵β細胞機能の指標である *beta cell glucose sensitivity* や *disposition index* が改善することが報告されている^{16,17}。

一方、*in vivo* においては、SGLT2 を欠損させた db/db マウスは膵β細胞量の減少を抑制しグルコース応答性インスリン分泌が増加したとの報告がある¹⁸。また、10 週齢の db/db マウスに 4 週間の SGLT2 阻害薬を投与した結果、ブドウ糖毒性改善によりアポトーシスを低下させ、膵β細胞機能の改善や膵β細胞量が増加したとの報告もある¹⁹。6 週齢の db/db マウスに 1 週間の SGLT2 阻害薬の短期投与でも、同様に膵β細胞機能の改善や膵β細胞増殖能が亢進したことが報告されている²⁰。このように、臨床研究や *in vivo* の結果より SGLT2 阻害薬は、膵β細胞量保護作用が認められる一方で、その分子メカニズムはまだ明らかになっていない。

db/db マウスは、慢性的な高血糖に起因して、経時的に膵β細胞量が低下し膵β細胞機能の低下を認めることが明らかになっている^{5,6}。糖尿病発症後長期に経過がたち、すでに膵β細胞量の低下を来している db/db マウスに、他の血糖降下薬（*liraglutide*、*pioglitazone* または、その併用）を投与しても、膵β細胞機能や膵β細胞量の保護効果は乏しくなることが明らかになっている^{21,22}。これらの報告より、膵β細胞機能や膵β細胞量を保護するうえで、糖尿病発症早期からの治療介入が重要であることが示唆されている。一方で、*streptozotocin* 投与により膵β細胞数を減少させた 1 型糖尿病モデルマウスに SGLT2 阻害薬を投与した報告では、耐糖能の改善と酸化ストレス低下による膵β細胞保護効果が認められている²³。この知見より、他の血糖降下薬と異なり、糖尿病の進行度に関わらず SGLT2 阻害薬は、膵β細胞保護効果を有する可能性が示唆される。

そこで、本研究では、初めに 6 週齢の糖尿病発症早期と想定される db/db マウスに SGLT2 阻害薬である *luseogliflozin* を 4 週間投与し、膵β細胞量に与える影響およびその分子機構を明らかにすることを目的として実験を行った。さらに、糖尿病発症後経過がたち膵β細胞量の低下を来していると

推定される 10 週齢、14 週齢、24 週齢の db/db マウスを用いて同様に実験を行った。

今回著者は、早期週齢 db/db マウスに、luseogliflozin を投与することで非投与群と比べて耐糖能の改善、膵 β 細胞機能の改善に加え、膵 β 細胞量を増加させたことを明らかにした。さらに、単離膵島を用いた遺伝子発現解析の比較検討では luseogliflozin の投与により酸化ストレスに関連した遺伝子の発現が低下し膵 β 細胞機能や膵 β 細胞増殖に関連した遺伝子の発現が上昇したことを示した。さらに異なる週齢の db/db マウスに対しても同様に、週齢に関係なく luseogliflozin の投与によって耐糖能の改善、膵 β 細胞機能の改善、膵 β 細胞量の増加を認めた。一方で、早期週齢の luseogliflozin の投与は、発症後経過がたってからの投与に比べ、より膵 β 細胞機能の改善、膵 β 細胞量の増加を認めた。

本研究より、SGLT2 阻害薬は糖尿病の進行度に関係なく治療効果を示す可能性が示唆された。更に、糖尿病発症後、早期からの治療介入が、膵 β 細胞量を保持するうえで重要であると考えられた。本検討結果が、今後の 2 型糖尿病治療介入の進歩に貢献できることを望む。

3.2 実 験 方 法

3.2.1 実験に用いた動物

肥満糖尿病モデル動物である雄性の BKS. Cg-Dock7^m +/+ Lepr^{db/J} (db/db) マウス (Oriental Yeast Co, Tokyo, Japan) を用いた。マウスの飼育環境は、室温 25℃の空調のもと 7 時～19 時までを明期とした明暗サイクルで自由運動および水道水・餌の自由摂取のもとで飼育した。実験動物の取り扱いについては、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に従って行った。

3.2.2 実験に用いた試薬と入手先

SGLT2 阻害薬の一つである luseogliflozin を大正製薬株式会社から供給を受けた²⁴。luseogliflozin は、普通食 CE-2 (CLEA, Tokyo, Japan) に 0.01%混餌し使用まで 4℃で保存した。本研究の投与量は既報に基づき決定した¹⁹。

3.2.3 luseogliflozin の投与

実験には雄性の db/db マウスを用いた。5 週齢、9 週齢、13 週齢、23 週齢まで通常食で摂餌し、6 週齢、10 週齢、14 週齢、24 週齢時より無作為に普通食飼育群 (control 群) と 0.01%luseogliflozin 含有特別食群 (luseo 群) に分け 4 週間自由摂食下で飼育した。

3.2.4 体重・摂餌量の測定

3.2.3 の条件で飼育した db/db マウスを control 群と luseo 群の 2 群に分け、毎週同一の時間において体重を測定し群間の比較を行った。また、週に 1 回ケージ交換する際に各ケージの摂餌量を測定し、群間の比較を行った。

3.2.5 随時血糖の測定の測定

3.2.3 の条件で飼育した両マウスを、負荷開始時点から隔週の自由摂食下での血糖値を測定した。採血は尾静脈から行い、血糖測定には Glutestmint portable glucose meter (Sanwa Chemical, Nagoya, Japan) を用いて添付文書の通りに測定した。

3.2.6 経口ブドウ糖負荷試験

3.2.3 と同様の条件で両マウスを飼育した。経口ブドウ糖負荷試験 (Oral blood glucose test (OGTT)) として 10 週齢で 4 時間と 16 時間の絶食下、14 週齢、18 週齢、28 週齢では、4 時間の絶食下において 1.0 g/kg のブドウ糖水溶液をゾンデを用いて経口投与し、投与前 (0 分)・5 分・30 分・60 分・90 分・120 分後に尾静脈から採血を行い血糖値を測定した。各測定値を、縦軸を測定した血糖値 (mg/dl)、横軸を測定した時間 (hr) としてグラフにプロットして直線でつなぎ、0mg/dl を縦軸の底として台形の面積の算出法を用いて 0 分～120 分までの各曲線下面積の総和を AUC (mg/dl x hr) として算出し、各群の比較を行った。

3.2.7 インスリン抵抗性の評価

3.2.3 と同様の条件で両マウスを飼育した。10 週齢で自由摂食下において速効型インスリン (Humarin®R; Eli Lilly, IN, USA) を 2.0 U/kg で腹腔内投与を行い、投与前 (0 分)・30 分・60 分・90 分・120 分における血糖値

を測定した。各測定時間における血糖値を投与前（0分）の血糖値で除して得た値を血糖降下率（%）としてインスリン抵抗性の評価を行った。縦軸を、血糖降下率（%）、横軸を測定した時間（hr）としてグラフにプロットして直線でつなぎ、0mg/dlを縦軸の底として台形の面積の算出法を用いて0分～120分までの各曲線下面積の総和を area under the curve (AUC) (mg/dl x hr) として算出し、各群の比較を行った。

3.2.8 血中インスリン・血糖比の評価

3.2.3と同様の条件で両マウスを飼育した。10週齢で、4時間と16時間絶食下、14週齢、18週齢、28週齢では、4時間絶食下における血清を採取し enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法（Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan）を用いてインスリン値の測定を行った。またそのさい、尾静脈から採血を行い血糖値を測定し、インスリン値を血糖値で除し、各群の比較を行った。

3.2.9 膵島単離

3.2.3と同様の条件で飼育したマウスを屠殺し、開腹したのち総胆管を露出させた。十二指腸を鉗子でクランプしたのち、注射針を総胆管にカニューレーションし、超純水で33.3 mg/mlに希釈したcollagenase (Sigma-Aldrich) を注入した。膨張した膵臓を切離し上記のcollagenaseの入ったシリンジに移し、37℃で24分間温振した。その後、複数回に分けて反応停止液（Hanks' balanced salt solution: Sigma-Aldrich）にfetal bovine serum ((FBS: Gibco BRL, Paisley, UK)を添加して使用) を加え攪拌・上清の吸引を繰り返し、最終的に沈殿した膵組織を10 cm dishに播種し、実体顕微鏡下にて膵島を回収して各実験に使用した。

3.2.10 膵島インスリン含量の測定

上記の方法で採取した膵島を1.5mlのエッペンドルフチューブに10個ずつ分注し、2.8 mMのGlucoseを含有するKrebs-Ringer's solution bicarbonate/Hepes (KRBH) buffer (129 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5.0 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 2.0 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, pH7.4) で5%CO₂、37度の条件下で30分間pre-incubationを行い、その後Glucose 5.6 mMを含むKRBH bufferに交換し、更に60分間培養した。その後、上清を静かに採取しインスリンの測定まで-20℃で保存した。また、チューブに残存した膵島は残存した上清を慎重に吸引した後、500 µlのAcid ethanol (0.4 M HCl in 74 % ethanol) を加えて振盪・溶解し、ELISA法 (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan) を用いて膵島のインスリン含量を測定した。

3.2.11 膵の組織学的評価

3.2.3 と同様の条件で両マウスを飼育した。10 週齢、14 週齢、18 週齢、28 週齢で各マウスを、頸椎脱臼による安楽死により屠殺し、膵臓を切離した。切離した膵臓は 4% PFA (paraformaldehyde) / PBS pH 7.4 にて速やかに固定し、パラフィン包埋した。膵臓に対し長軸方向に切片を作製し、下記に示す染色を実施した。

3.2.12 免疫組織染色 (酵素抗体法)

パラフィン切片を脱パラフィンし、水洗後、0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、ヤギ血清 (Invitrogen) をもちいて 30 分ブロッキングを行った後、PBS で希釈した一次抗体 (下記) を 4℃ overnight でインキュベートした。その後、PBS で洗浄し、二次抗体 (ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (Nichirei, Tokyo, Japan))、HRP 標識ストレプトアビジン (Nichirei) を各々1時間で反応させ、洗浄後に検鏡しながら DAB (diaminobenzidine) で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った。インスリン染色には、一次抗体として抗インスリン抗体 (anti-

insulin, Santa Cruz Biotechnology) を x500 にて用いた。

光学顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 (Keyence Japan, Osaka, Japan) にて BZ-II 観察アプリケーション ver.1.40 (Keyence) を用いて標本の写真を撮影・取り込みし、BZ-II analyzer ver.1.41 (Keyence) を用いて写真の解析を行った。BZ-II analyzer 上にて手動的にヘマトキシリンで染色された膵組織を囲んで膵切片全体の面積 (A) を計測し、次に同一切片のインスリン陽性細胞を BZ-II analyzer 上で色調・濃度の選択を用いて抽出し、その面積 (B) を測定した。膵 β 細胞面積比ならびに膵 β 細胞量の算出は Bouwens らの方法に従い²⁵、前者は (B) を (A) で除して 100 を乗じ、%単位として算出した。また後者は切離した膵の総重量 (mg) にこの膵 β 細胞面積比 (%) を乗じ、膵 β 細胞量 (mg) とした。

式：膵 β 細胞量 (mg) = 膵 β 細胞面積比 (%) $\times$ 膵重量 (mg)

膵 β 細胞の増殖の評価として、5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 抗体を用い BrdU 染色を行った。同時に上述のインスリン抗体を用い二重染色を行った。各膵島における BrdU 陽性細胞数 / 膵 β 細胞数を%比として算出し、その平均値を BrdU 陽性率 (%) とした。BrdU 染色には BrdU 染色キット (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を添付文書の通りに使用した。

3.2.13 免疫組織染色（蛍光抗体法）

パラフィン切片を脱パラフィンし、水洗後、抗原賦活化液としてクエン酸ナトリウムまたは EDTA を用いた。ヤギ血清 (Invitrogen) または、モルモット血清をもちいて 30 分ブロッキングを行った後、PBS で希釈した一次抗体 (Table 1) を 4°C overnight でインキュベートした。その後、PBS で洗浄し、二次抗体 (Table 1) を 40 分間反応させた。洗浄後にインスリン抗体 (Table 1) を用いて室温で 60 分反応させ後、PBS で洗浄し二次抗体 (Table 1) を 40 分間反応させた。PBS で洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratory, Burlingame, USA) で対比染色を行った。膵 β 細胞のアポトーシスの評価として terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) system (Deadend; Promega, Madison, WI) を用いた。

Table1. マウス腓島の蛍光抗体染色のために用いた抗体

Primary antibodies			
Antigen	Species	Manufacturer	Working dilution
Aldh1a3	Goat	Santa Cruz Biotechnology	1:200
c-Jun	Rabbit	Cell Signaling TECHNOLOGY	1:200
FoxO1	Rabbit	Cell Signaling TECHNOLOGY	1:50
Glucagon	Mouse	SIGMA-ALDRICH	1:500
Insulin	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1:250
Insulin	guinea pig	Dako	1:2
Ki67	Rabbit	Cell Signaling TECHNOLOGY	1:200
Mafa	Rabbit	BETHYL	1:50

Table1. (つづき)

Secondary antibodies			
Antigen	Species	Fluorescent dye	Manufacturer
guinea pig IgG	Goat	Alexa Fluor 488	Life Technologies
rabbit IgG	Goat	Alexa Fluor 488	Life Technologies
rabbit IgG	Donkey	Alexa Fluor 488	abcam
rabbit IgG	Goat	Alexa Fluor 594	Life Technologies
mouse IgG	Goat	Alexa Fluor 594	Life Technologies
goat IgG	Donkey	Alexa Fluor 594	Abcam

3.2.14 遺伝子発現解析

3.2.9の方法で採取した各マウスの脾臓から、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を添付文書の通りに用いてtotal RNAを抽出した。抽出したRNAは濃度を調節後にrandom primer、10mM dNTP (以上Promega, WI, USA) , Superscript® III, RNaseOUT, 5x Fast Standard Buffer (以上Life Technologies) を用いてcDNAを作製し、SYBR Green (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いたリアルタイム定量Realtime-PCR法で各種遺伝子発現量を定量した。内因性コントロールとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) を用いた。

3.2.15 統計学的解析

図表のデータは全て平均値±標準偏差で表記した。二群間の平均の検定には、対応のない Student の t 検定を用いた。多群間の平均の検定には、one-way analysis of variance (ANOVA)を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Fisher's PLSD test 法を用いて各群間を比較した。 p 値が 0.05 未満をもって有意差とした。データ値は平均±標準偏差で表記した。統計解析にはエクセル統計 2012 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan)を用いた。

3. 実験結果

3.3.1 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による

体重・摂餌量・随時血糖値の推移

luseo 群は control 群と比し、体重や摂餌量に明らかな差を認めなかった。(Figure 1, 2)。随時血糖値は、luseo 群で観察期間中、control 群と比し有意に低下を認めた(Figure 3)。

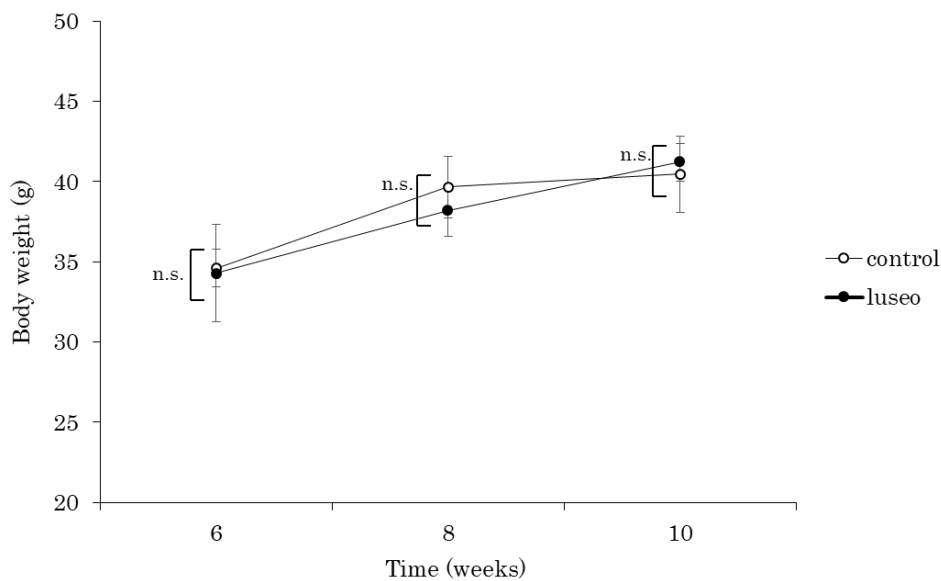


Figure 1 luseogliflozin 投与による体重の推移

6 週齢まで通常食で摂餌し、luseogliflozin 含有特別食を開始した 6 週齢より luseogliflozin を 4 週間投与した。毎週同一条件下で、各マウスの体重測定を行った（平均 ± S.D.）（各群 n=12）。統計には対応のない *t* 検定を用いた。

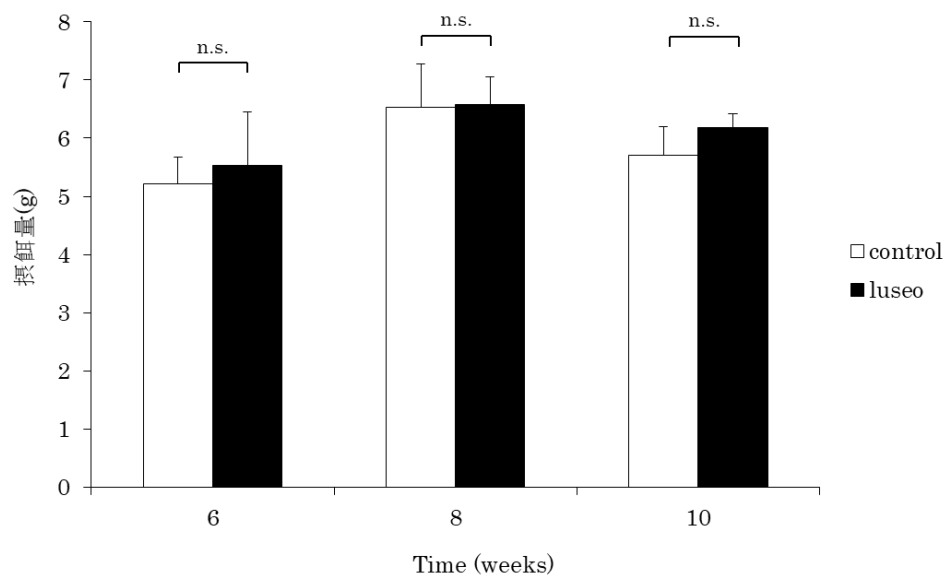


Figure 2 luseogliflozin 投与における摂餌量の推移

luseogliflozin 含有特別食群を開始した 6 週齢時より、週 2 回のケージ交換の際に投与する摂餌量と残余している餌の量を測定し、1 週間ごとの各マウスの摂餌量を測定した（平均 ± SD）（各群 n=5）。統計には対応のない *t* 検定を用いた。

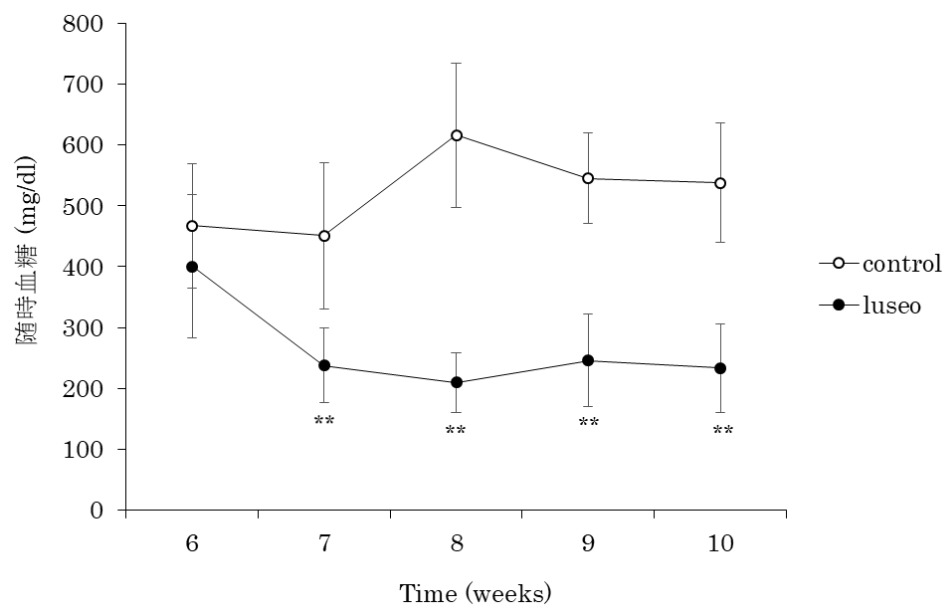


Figure 3 luseogliflozin 投与における随時血糖の推移

隔週で同一の条件下で尾静脈より血液を採取し、簡易血糖測定器を用いて随時血糖の測定を行った（平均 ± SD）（各群 n=12）。** $p < 0.01$ vs. control group

3.3.2 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による

耐糖能評価

luseo 群で control 群に比べ明らかに血糖値を改善させていたため次に糖負荷時の耐糖能を、4 時間絶食下と luseogliflozin の薬効が切れるとされる 16 時間絶食下で OGTT を用いて血糖値の測定を行うことで評価した。4 時間絶食下並びに 16 時間絶食下では、luseo 群で有意に耐糖能の改善が認められた (Figure 4,5)。また、OGTT の AUC における評価でも同様に luseo 群において有意な改善を認めた (Figure 6,7)。

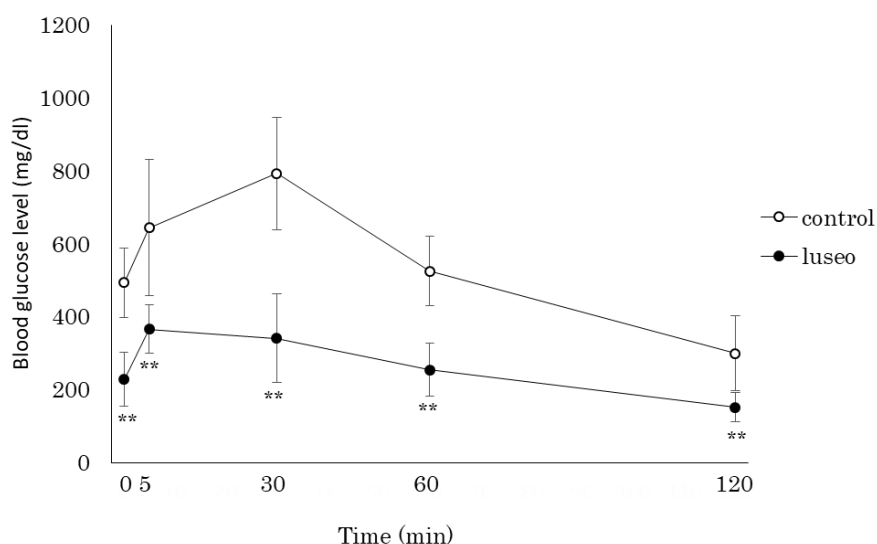


Figure 4 経口ブドウ糖負荷試験

10 週齢の control 群、luseo 群に 4 時間の絶食後に、ゾンデを用いて経口的に 1.0 g/kg のブドウ糖水溶液を投与し各時間に尾静脈より血液を採取して血糖値を測定した (平均 $\pm$ SD) (各群 n=8)。** $p < 0.01$ vs. control group

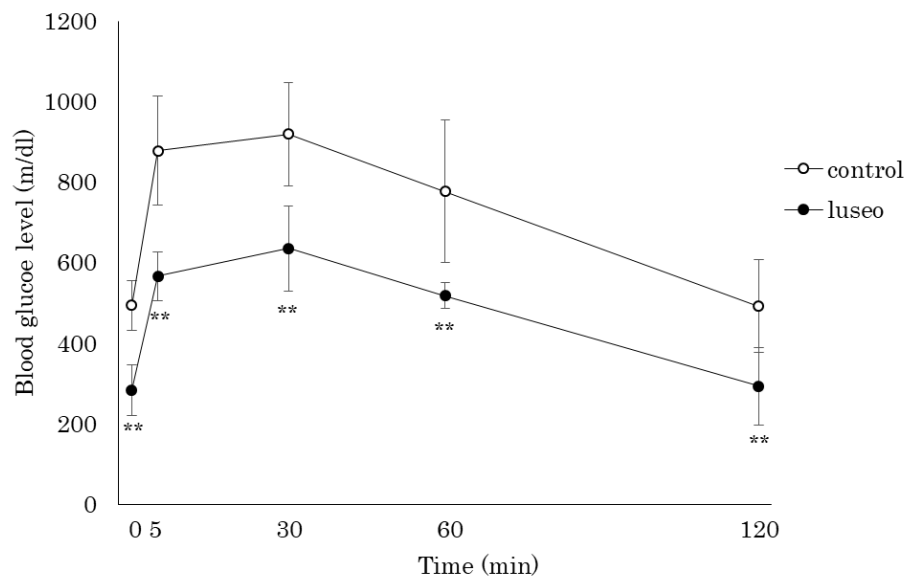


Figure 5 経ロブドウ糖負荷試験

10 週齢の control 群、luseo 群に 16 時間の絶食後に、ゾンデを用いて経口的に 1.0 g/kg のブドウ糖水溶液を投与し各時間に尾静脈より血液を採取して血糖値を測定した（平均 ± SD）（各群 n=8）。** $p < 0.01$ vs. control group

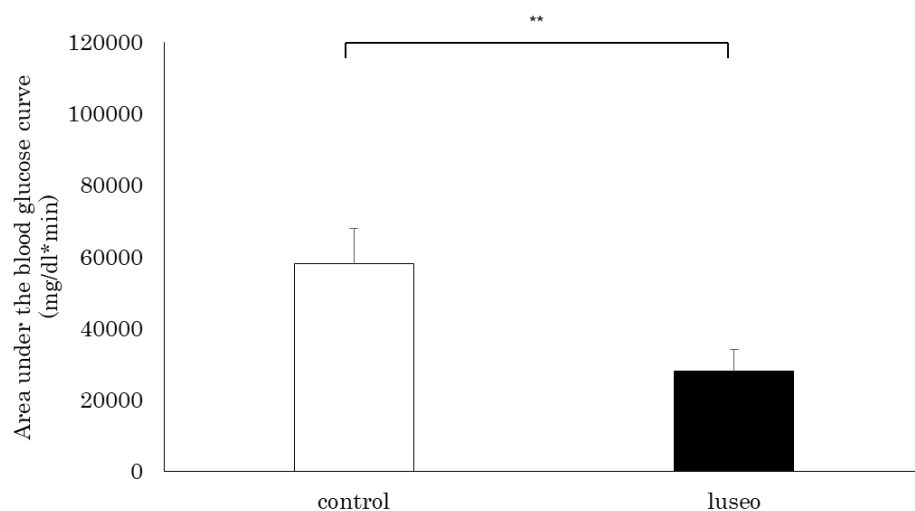


Figure 6 経ロブドウ糖負荷試験における OGTT の曲線下面積

Figure 4 の方法で施行した OGTT の各時間の血糖値を、0mg/dl を縦軸の底とした台形として各時間間の曲線下面積を求め、0～120 分までの総和を OGTT の AUC として評価した（平均 ± SD）（各群 n=8）。統計には対応のない t 検定を用いた。** $p < 0.01$ vs. control group

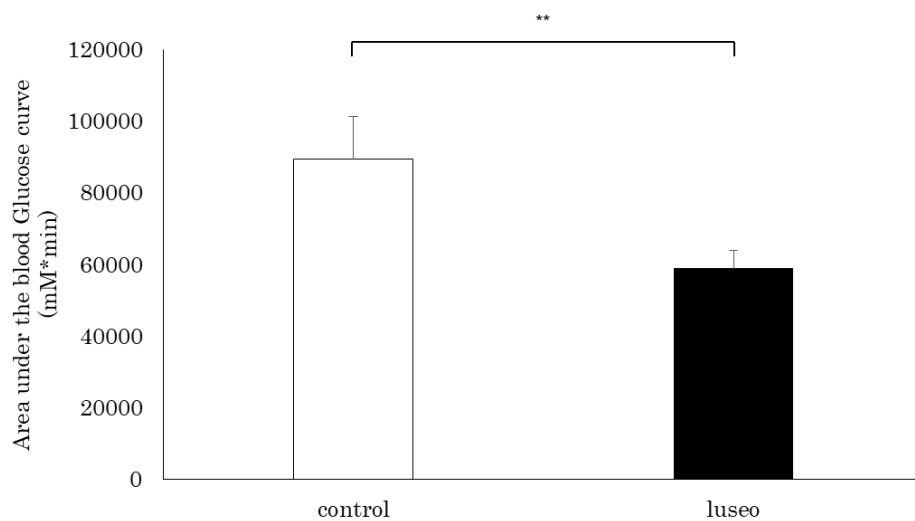


Figure 7 経口ブドウ糖負荷試験における OGTT の曲線下面積

Figure5 の方法で施行した OGTT の各時間の血糖値を、0mg/dl を縦軸の底とした台形として各時間間の曲線下面積を求め、0～120 分までの総和を OGTT の AUC として評価した（平均 ± SD）（各群 n=8）。統計には対応のない *t* 検定を用いた。** $p < 0.01$ vs. control group

3.3.3 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による

インスリン負荷試験の検討

luseo 群で耐糖能が改善している結果より、耐糖能の改善に寄与した因子の解明のために、まずインスリン負荷試験によりインスリン抵抗性を評価した。luseo 群は、control 群に比し 30、60、120 分での血糖値が有意に低下しておりインスリン抵抗性の改善を認めた (Figure 8)。また、インスリン負荷試験後の AUC における評価でも同様に luseo 群においてインスリン抵抗性の有意な改善を認めた (Figure 8)。

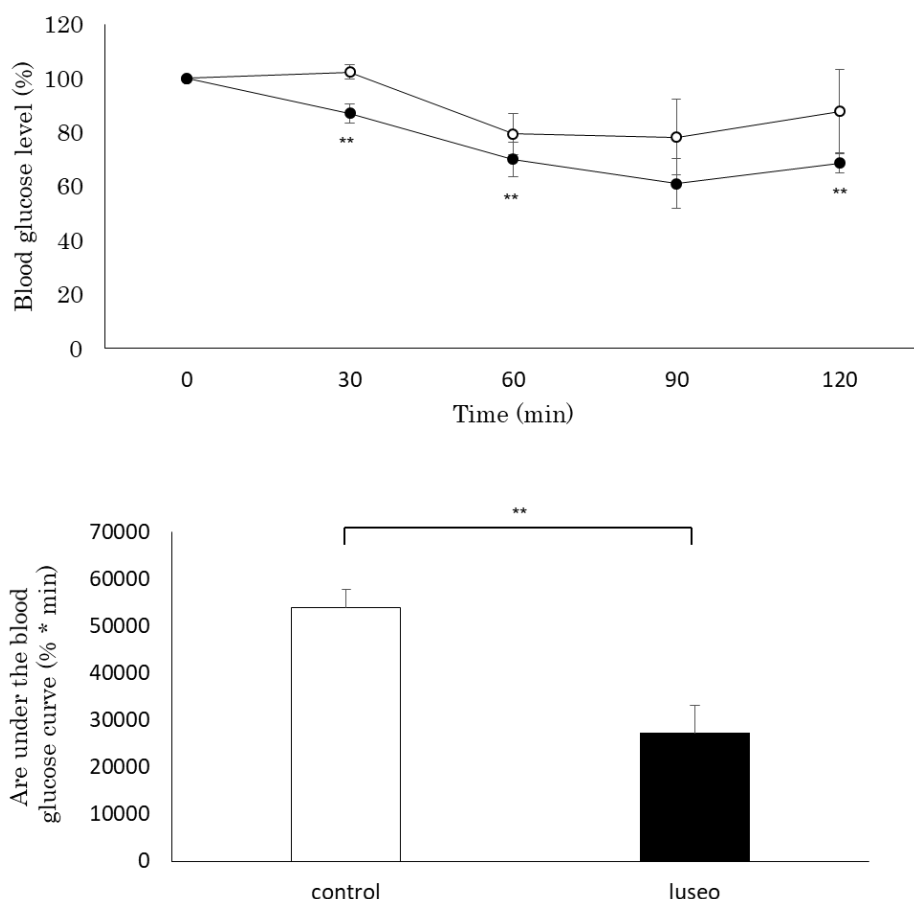


Figure 8 インスリン負荷試験

上段：インスリン負荷試験 下段：AUC

10 週齢の luseo 群、control 群に、自由摂食下で速効型インスリン 2 U/kg の腹腔内投与を行い、30 分毎に尾静脈より血液を摂取し血糖値を測定し、前値との比を測定した (平均 $\pm$ SD) (各群 n=4)。また、各時間間の曲線

下面積を求め、0～120 分までの総和をインスリン負荷試験の AUC として評価した（平均 ± SD）（各群 n=4）。統計には二元配置分散分析を用い、post-hoc 検定には Fisher's PLSD test 法を用いた。また、AUC の比較では、対応のない *t* 検定を用いた。** $p < 0.01$ vs. control group

3.3.4 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による

膵 β 細胞機能の検討

次に膵 β 細胞の機能を評価するため、16 時間絶食下での血中インスリン・血糖比を測定し、さらに各群より単離した膵島を用いてインスリン含量を測定し比較した。血中インスリン・血糖比（Figure 9）、膵島におけるインスリン含量（Figure 10）はいずれも luseo 群で増加を認めていた。この結果から、luseo 群ではインスリン膵 β 細胞機能の改善が認められた。

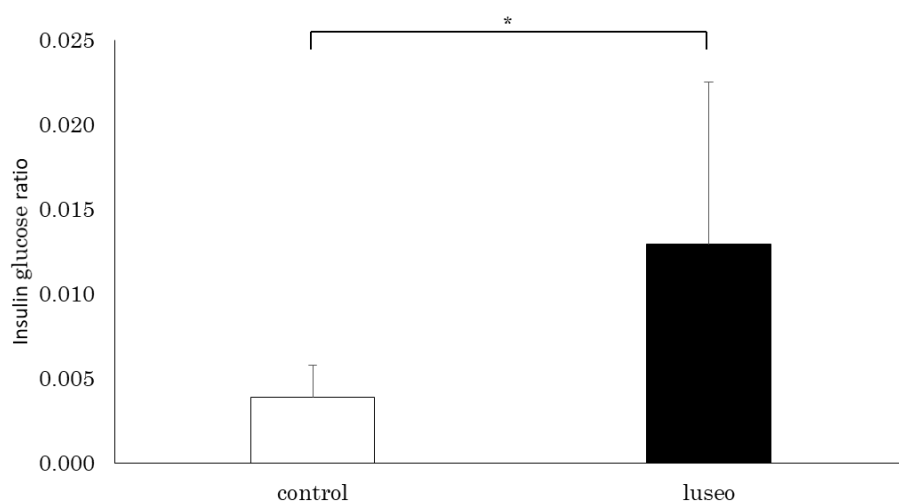


Figure 9 血中インスリン血糖比

16 時間絶食下で血液を採取し血清を分離して、ELISA 法にて血清インスリン濃度を測定し、その時の血糖値で除した（平均 ± SD）（各群 n=8）。統計には対応のない *t* 検定を用いた。* $p < 0.05$ vs. control group

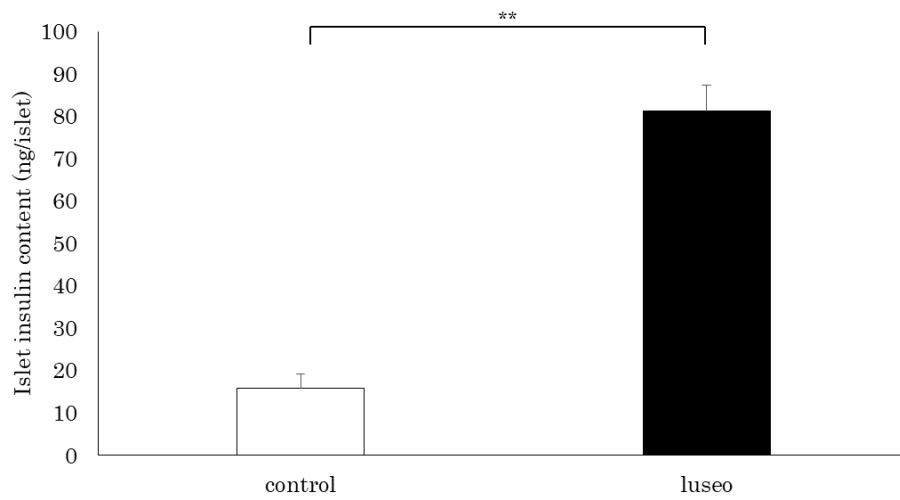


Figure 10 膵島インスリン含量

10 週齢のマウスからコラゲナーゼを用いた膵島単離法で膵島を摂取し、acid ethanol を用いて溶解しインスリン含量を ELISA 法にて測定した (平均 $\pm$ SD) (各群 n=6)。統計には対応のない t 検定を用いた。** $p < 0.01$ vs. control group

3.3.5 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による

膵の組織学的検討

次に、luseogliflozin における膵 β 細胞機能の改善が、膵 β 細胞量によるものかを検討するため膵 β 細胞量の計測をした。さらに、蛍光免疫染色法で膵島における β 細胞と α 細胞の二重染色をし、その分布を評価した。luseo 群においては膵 β 細胞量の有意な増加を認めた (Figure 11)。二重染色では luseo 群では膵島の中心部が β 細胞、周辺部に α 細胞といった通常の野生型マウスの同様の極性を示し、control 群では α 細胞が中心部まで入り込み β 細胞の減少を認めた (Figure 12)。膵島内の $\alpha + \beta$ 細胞数における β 細胞数の割合で評価しても luseo 群で有意に増加を認めていた (Figure 12)。

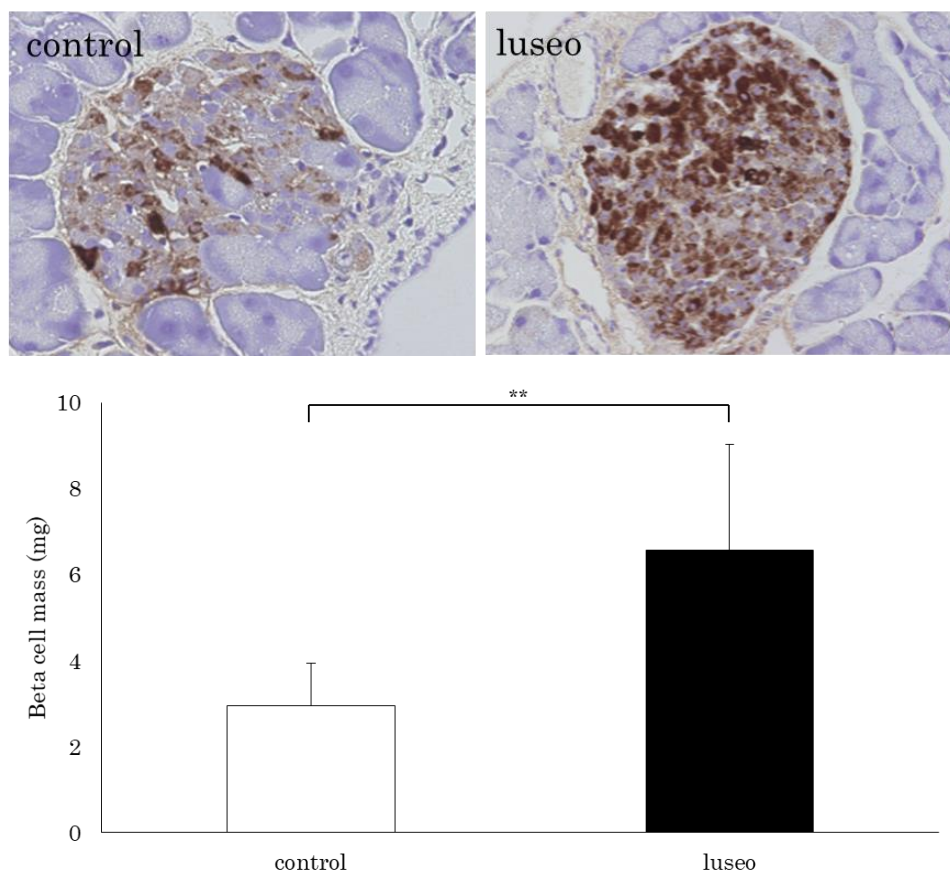


Figure 11 luseogliflozin 下における膵 β 細胞量

上段：インスリン免疫染色 下段：膵 β 細胞量

10週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体にて酵素抗体法で染色し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。手動的に膵を囲い、コンピューターソフトウェアを用いて同一切片における膵全体・膵 β 細胞面積を計測した（平均 $\pm$ SD）（各群 $n=8$ ）。統計解析には対応のない t 検定を用いた。**
 $p < 0.01$ vs. control group

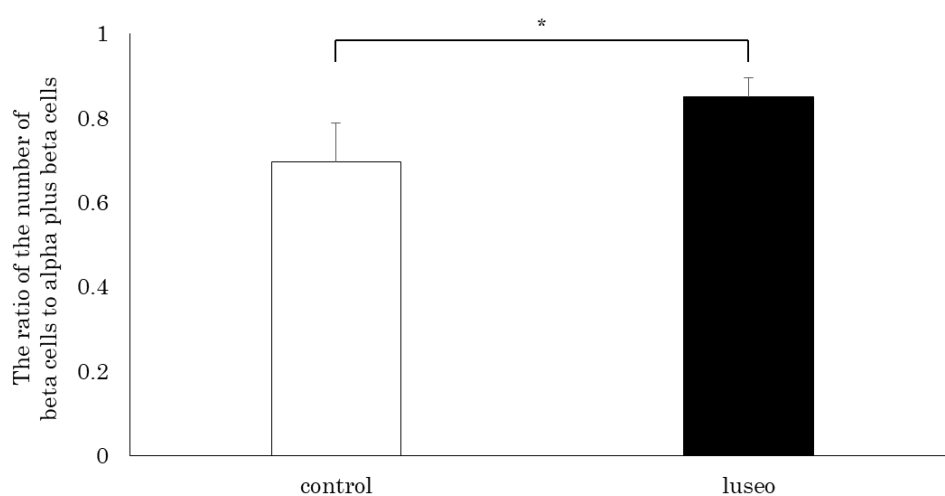
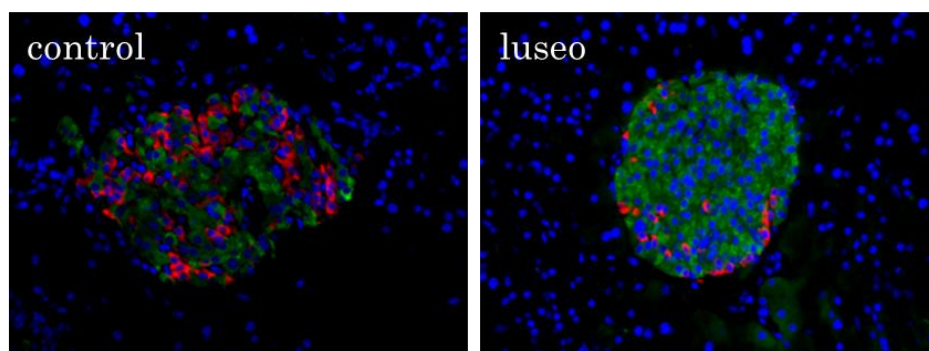


Figure 12 膵島におけるインスリン・グルカゴン二重染色

上段：インスリン・グルカゴン蛍光免疫染色

下段：膵島内の $\alpha + \beta$ 細胞数における β 細胞数の割合

10週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体にて蛍光免疫染色法で二重染色し、DAPIで対比染色を行った。核をカウントし、膵島における β 細胞数を α 細胞と β 細胞の総和で除した（平均 $\pm$ SD）（各群 $n=5$ ）。統計解析には対応のない t 検定を用いた。* $p < 0.05$ vs. control group

3.3.6 6週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による膵β細胞量保持作用の検討

次に luseogliflozin の膵β細胞量保持作用のメカニズムを明らかにするため免疫組織学的解析を行った。細胞増殖マーカーである BrdU 染色の結果 luseo 群においては、BrdU 陽性細胞率が有意な増加を認めていた (Figure 13)。また、アポトーシスマーカーでもある TUNEL 染色では有意な差は認めなかったが luseo 群は control 群に比べ 50.2%、膵β細胞における TUNEL 陽性細胞数が低下していた (Figure 14)。また、単離膵島より total RNA を抽出し、脱分化関連マーカーである neurogenin3 (Neurog3) や aldehyde dehydrogenase 1a3 (Aldh1a3) の遺伝子発現の変化を real-time PCR で比較したが両群間で差を認めなかった (Figure 15)。また、Aldh1a3 免疫染色でも、膵β細胞内の Aldh1a3 陽性細胞数に差を認めなかった (Figure 16)。

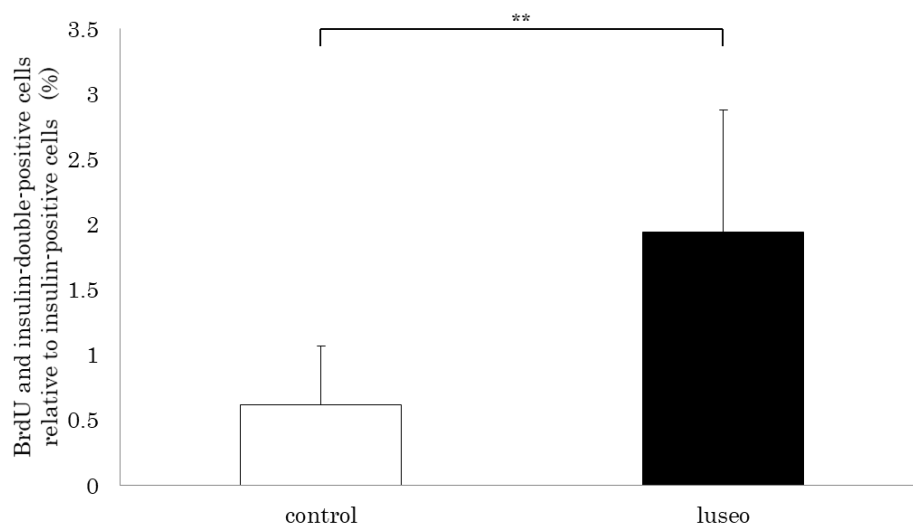


Figure 13 luseogliflozin 下における膵β細胞増殖率

10週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 BrdU 抗体にて酵素抗体法で染色した (平均 ± SD) (各群 n=6)。核をカウントし、膵島における BrdU 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて BrdU 陽性細胞率 (%) として評価した。統計解析には対応のない *t* 検定を用いた。** $p < 0.01$ vs. control group

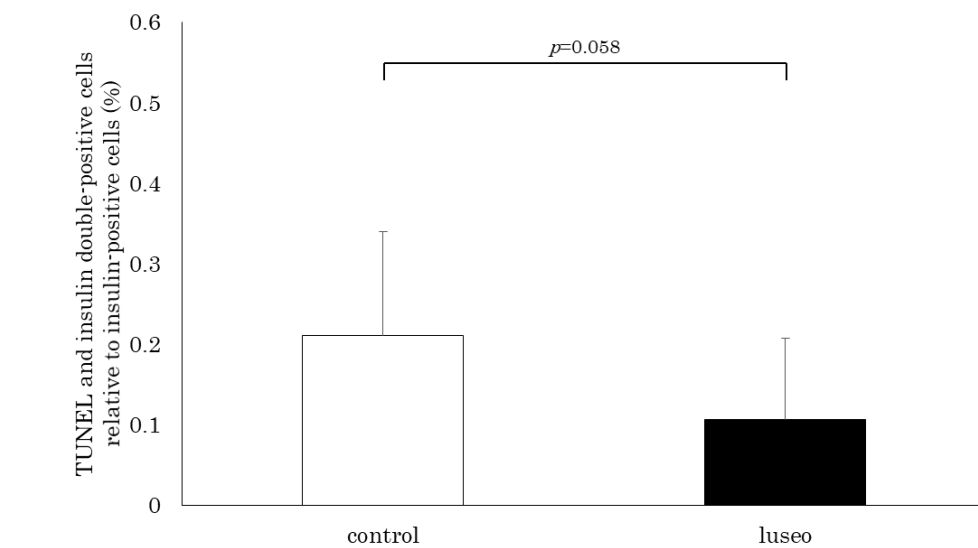


Figure 14 luseogliflozin 下におけるアポトーシスの変化

10 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 TUNEL 抗体にて蛍光免疫染色法で染色した（平均 $\pm$ SD）（各群 $n=10$ ）。核をカウントし、膵島における TUNEL 陽性 β 細胞数を、膵島内の全 β 細胞数で除し 100 を乗じて TUNEL 陽性細胞率（%）として評価した。統計解析には対応のない t 検定を用いた。

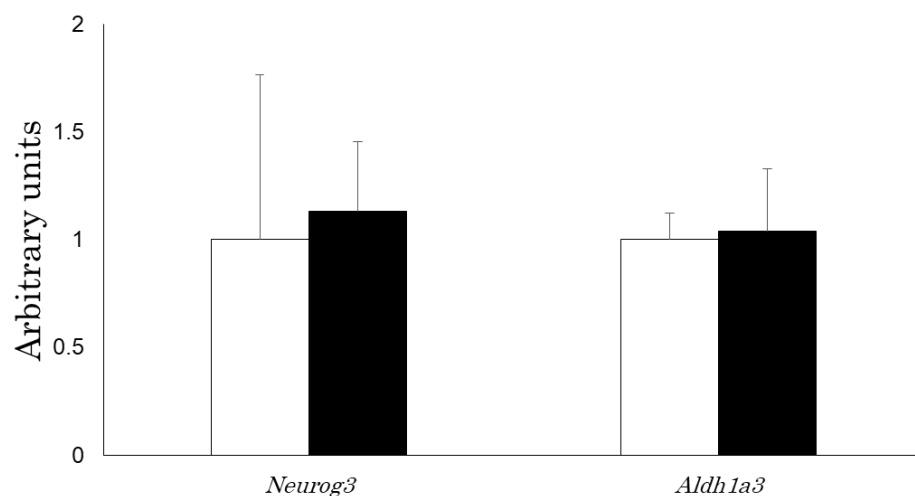


Figure 15 luseogliflozin 下における脱分化の変化

10 週齢の各マウスの単離膵島より total RNA を抽出し、cDNA を作成し real time PCR 法で遺伝子発現を定量した。内因性コントロールとして GAPDH を用いて目的とする遺伝子発現量は $\Delta \Delta CT$ 法で各遺伝子と GAPDH との平均の差を計算し算出した (平均 $\pm$ SD) (n=3-4)。統計解析には対応のない t 検定を用いた。

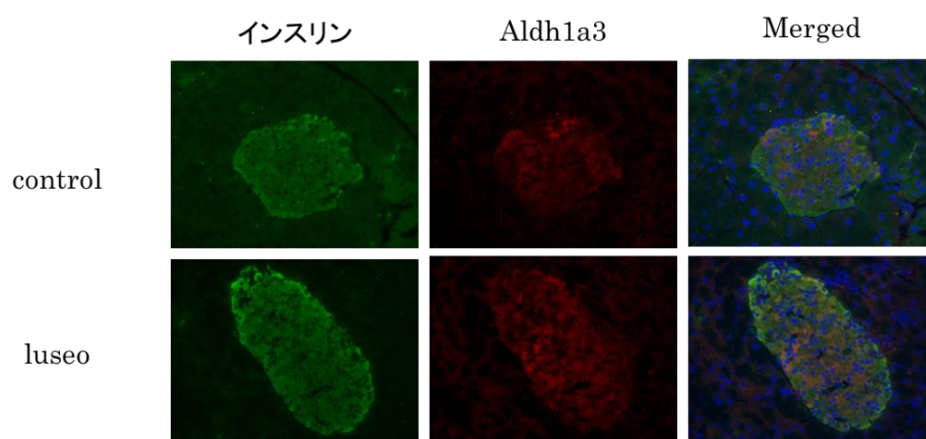


Figure 16 膵島におけるインスリン・Aldh1a3 の二重染色

10 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 Aldh1a3 抗体にて蛍光免疫染色法で二重染色し、DAPI で対比染色を行った。

3.3.7 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵 β 細胞機能に関する遺伝子発現

6 週齢 db/db マウスに 4 週間の luseogliflozin を投与することでインスリン分泌亢進を認めたが、膵島における詳細な機序を解明するため、単離膵島における遺伝子発現の解析を行うこととした。前述の方法で得た単離膵島における遺伝子発現を real-time PCR 法で定量し比較したところ、luseo 群において膵 β 細胞機能関連遺伝子である *Mafa*, *Pdx1*, *NKX6.1*, *INS1*, *INS2*, *Gck* の発現が有意に上昇していた (Figure 17)。蛍光免疫染色でも同様に luseo 群で膵 β 細胞の *Mafa* 陽性細胞が有意な増加を認めた (Figure 18)。

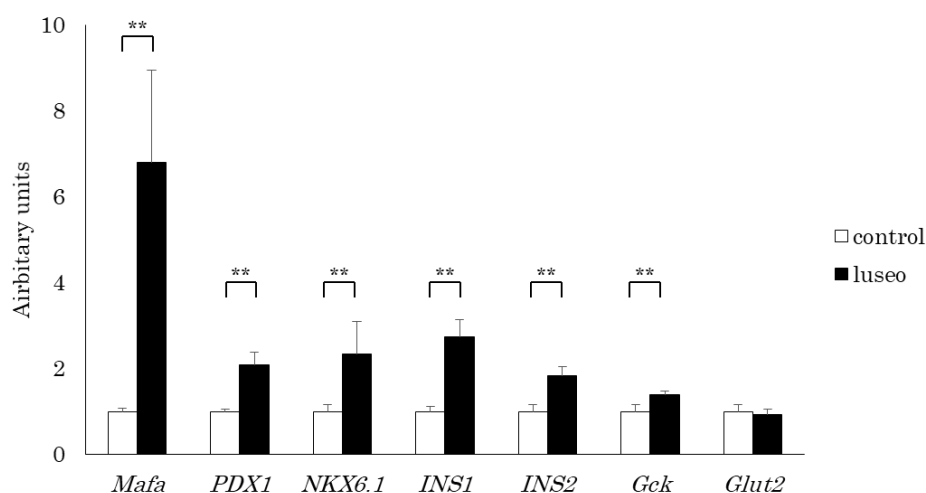


Figure 17 単離膵島における膵 β 細胞機能関連遺伝子の比較

10 週齢の各マウスのコラゲナーゼを用いた膵島単離法で膵島を単離し、各マウスから 30 islets を採取し RNeasy Mini Kit にて total RNA を抽出し、cDNA を作製し real-time PCR 法で遺伝子発現量を定量した (平均 $\pm$ SD) (各群 n=4)。内因性コントロールとして GAPDH を用いて目的とする遺伝子発現量は $\Delta \Delta CT$ 法で各遺伝子と GAPDH との平均の差を計算し算出した。統計解析には対応のない *t* 検定を用いた。** $p < 0.01$ vs. control group

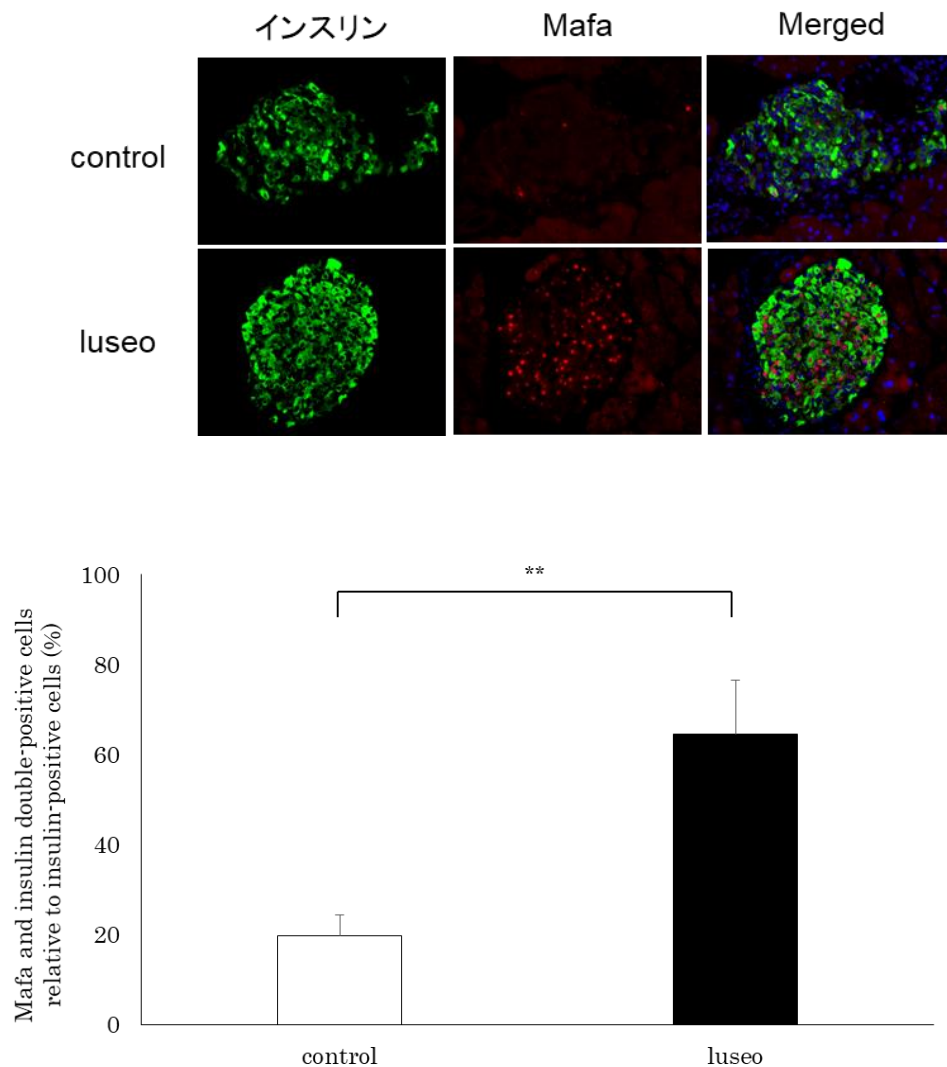


Figure 18 膵島におけるインスリン・Mafa の二重染色

上段：インスリン・Mafa 蛍光免疫染色

下段：膵β細胞数における Mafa 陽性細胞数の割合

10 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 Mafa 抗体にて蛍光免疫染色法で二重染色し、DAPI で対比染色を行った。核をカウントし、膵β細胞における Mafa 陽性細胞数を膵β細胞数で除した（平均 ± SD）

（各群 n=4）。統計解析には対応のない *t* 検定を用いた。** $p < 0.01$ vs. control group

3.3.8 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による

膵 β 細胞の細胞周期に関する遺伝子発現

6 週齢 db/db マウスに 4 週間の luseogliflozin を投与することで膵 β 細胞増殖を亢進させたが、次に細胞周期関連遺伝子を解明するため、単離膵島における遺伝子発現の解析を行うこととした。前述の方法で得た単離膵島における遺伝子発現を real-time PCR 法で定量し比較したところ、luseo 群において細胞増殖を示す *Ki67*、細胞周期関連遺伝子である *Ccnd2* の発現が有意に上昇していた (Figure 19)。

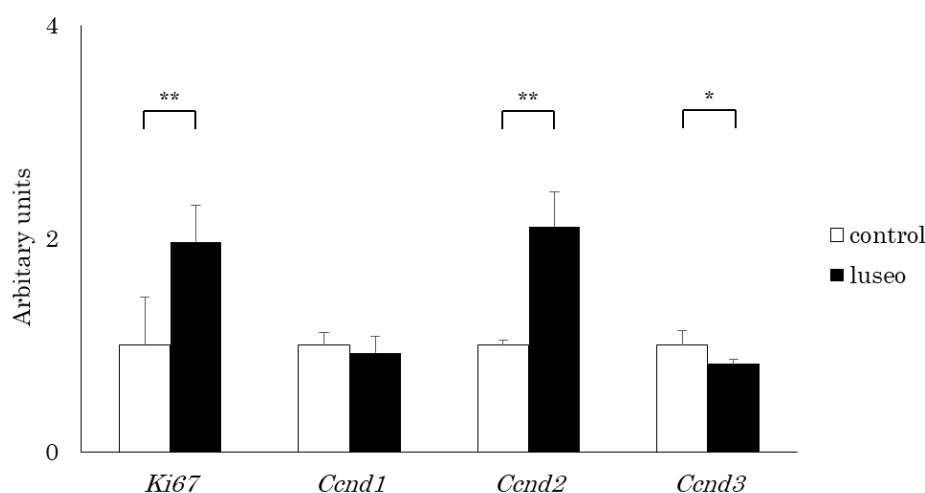


Figure 19 単離膵島における膵 β 細胞周期関連遺伝子

10 週齢の各マウスのコラゲナーゼを用いた膵島単離法で膵島を単離し、各マウスから 30 islets を採取し RNeasy Mini Kit にて total RNA を抽出し、cDNA を作製し real-time PCR 法で遺伝子発現量を定量した (平均 $\pm$ SD) (各群 $n=4$)。内因性コントロールとして GAPDH を用いて目的とする遺伝子発現量は $\Delta\Delta CT$ 法で各遺伝子と GAPDH との平均の差を計算し算出した。統計解析には対応のない t 検定を用いた。** $p < 0.01$ vs. control group, * $p < 0.05$ vs. control group

3.3.9 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による

膵 β 細胞の酸化ストレスに関する遺伝子発現

db/db マウスは高血糖に暴露されミトコンドリア内電子伝達系の活性化により酸化ストレスが上昇し、結果として膵 β 細胞機能が低下することが明らかになっている。そこで、NADPH オキシダーゼ関連遺伝子である *p22phox*, *gp91phox*, *p47phox* の遺伝子発現を比較した。luseo 群で *p22phox* の遺伝子発現が有意に低下していた (Figure 20)。また *gp91phox*, *p47phox* の遺伝子発現に有意な差は認めなかったが luseo 群で低下傾向を認めていた (Figure 20)。

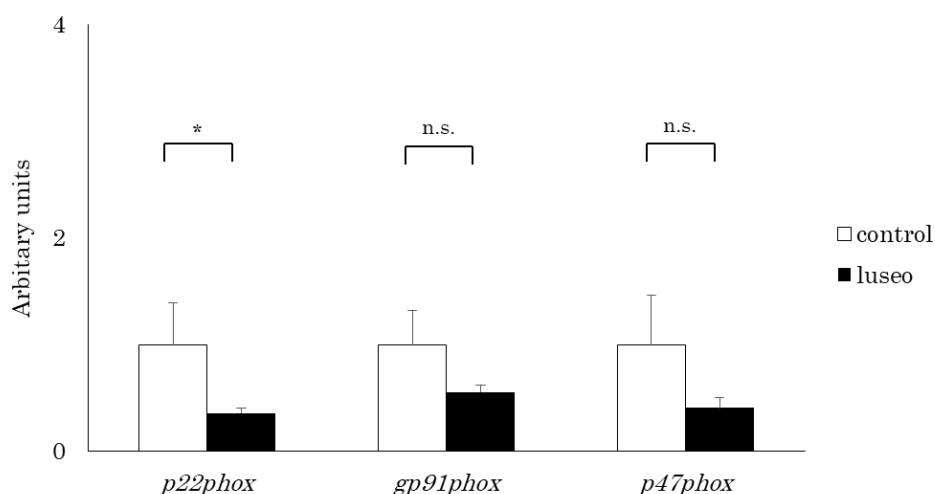


Figure 20 単離膵島における膵 β 細胞周期関連遺伝子

10 週齢の各マウスのコラゲナーゼを用いた膵島単離法で膵島を単離し、各マウスから 30 islets を採取し RNeasy Mini Kit にて total RNA を抽出し、cDNA を作製し real-time PCR 法で遺伝子発現量を定量した (平均 $\pm$ SD) (各群 $n=4$)。内因性コントロールとして GAPDH を用いて目的とする遺伝子発現量は $\Delta\Delta CT$ 法で各遺伝子と GAPDH との平均の差を計算し算出した。統計解析には対応のない t 検定を用いた。* $p < 0.05$ vs. control group

3.3.10 6 週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による

膵 β 細胞における FoxO1 の発現

Forkhead box protein O1 (FoxO1)は、forkhead ドメインを有する転写遺伝子の O サブファミリーである。インスリン抵抗性下の膵 β 細胞代償性過形成の機序の一つに、インスリンや IGF1 シグナルの活性化により膵 β 細胞内の FoxO1 がリン酸化されることで核から細胞質へ移行し膵 β 細胞増殖に関与すると報告されている。逆に、高血糖や酸化ストレスに暴露されると FoxO1 は、細胞質から核へ移行し膵 β 細胞増殖能の低下することも報告されている。luseo 群で、3.3.4 や 3.3.9 の結果から、血中インスリン・血糖比を上昇させ単離膵島の酸化ストレスを減少させることが明らかになったため膵 β 細胞量増加や膵 β 細胞増殖能亢進のメカニズムとして両群間での膵 β 細胞内の FoxO1 の局在について検討した。膵 β 細胞内の Foxo1 核陽性細胞率を比較したが両群間に有意な差を認めなかった

(Figure 21)。この結果より、luseo 群の膵 β 細胞量増加や膵 β 細胞増殖能亢進のメカニズムとして FoxO1 を介した機序は否定的であった。

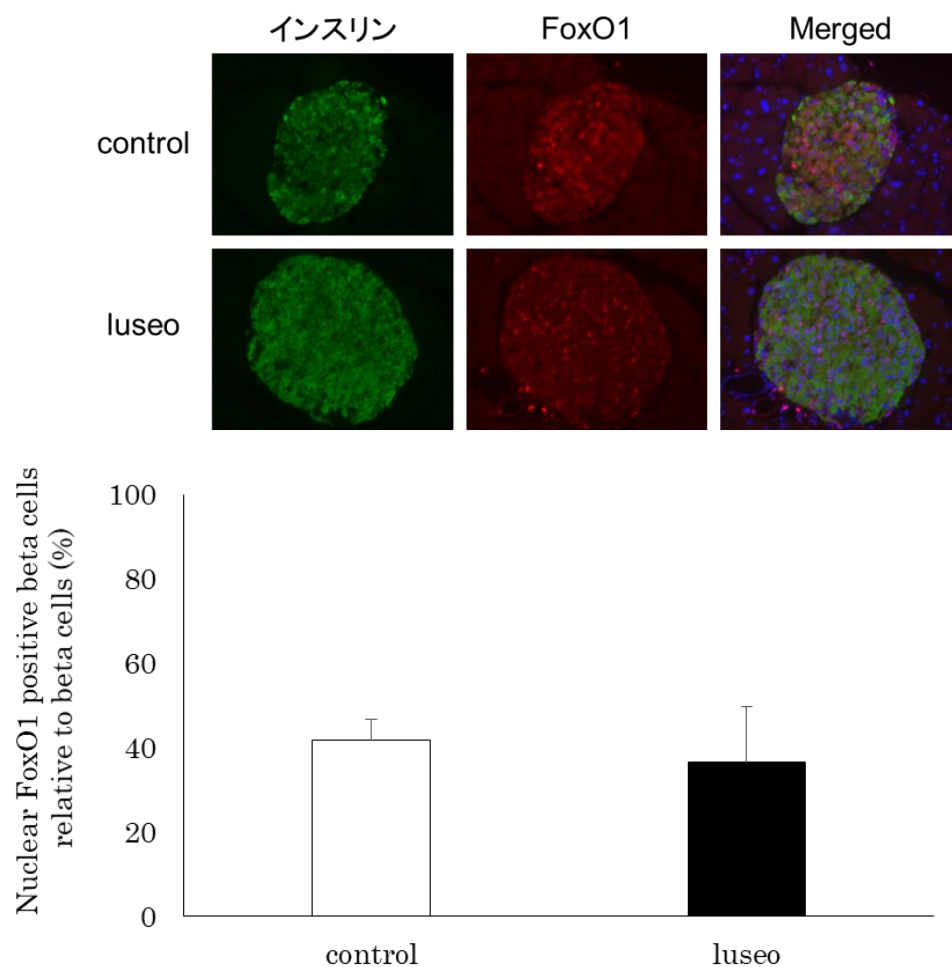


Figure 21 膵島におけるインスリン・FoxO1 の二重染色

上段：インスリン・FoxO1 蛍光免疫染色

下段：膵β細胞数における FoxO1 陽性細胞数の割合

10 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 FoxO1 抗体にて蛍光免疫染色法で染色した（平均 ± SD）（各群 n=4）。核をカウントし、膵島における FoxO1 陽性膵β細胞を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて FoxO1 陽性細胞率（%）として評価した。統計解析には対応のない *t* 検定を用いた。

3.3.11 6週齢 db/db マウスに luseogliflozin 投与による 膵β細胞における c-Jun の発現

3.3.7 の結果では control 群に比べて luseo 群では膵β細胞の Mafa の発現が上昇し、3.3.9 の結果より luseo 群では単離膵島の酸化ストレス関連遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。血糖や酸化ストレスの上昇によって発現する c-Jun の上昇が Mafa の発現を抑制させることが報告されており²⁶、膵β細胞内の c-Jun の発現を両群間で比較検討した。luseo 群で膵β細胞内の c-Jun 陽性細胞の発現が有意に低下していることが明らかとなった。この結果から、luseo 群で膵β細胞内の Mafa の発現が上昇する機序として、血糖や酸化ストレスの低下により、膵β細胞内の c-Jun の発現低下によるものが考えられた。

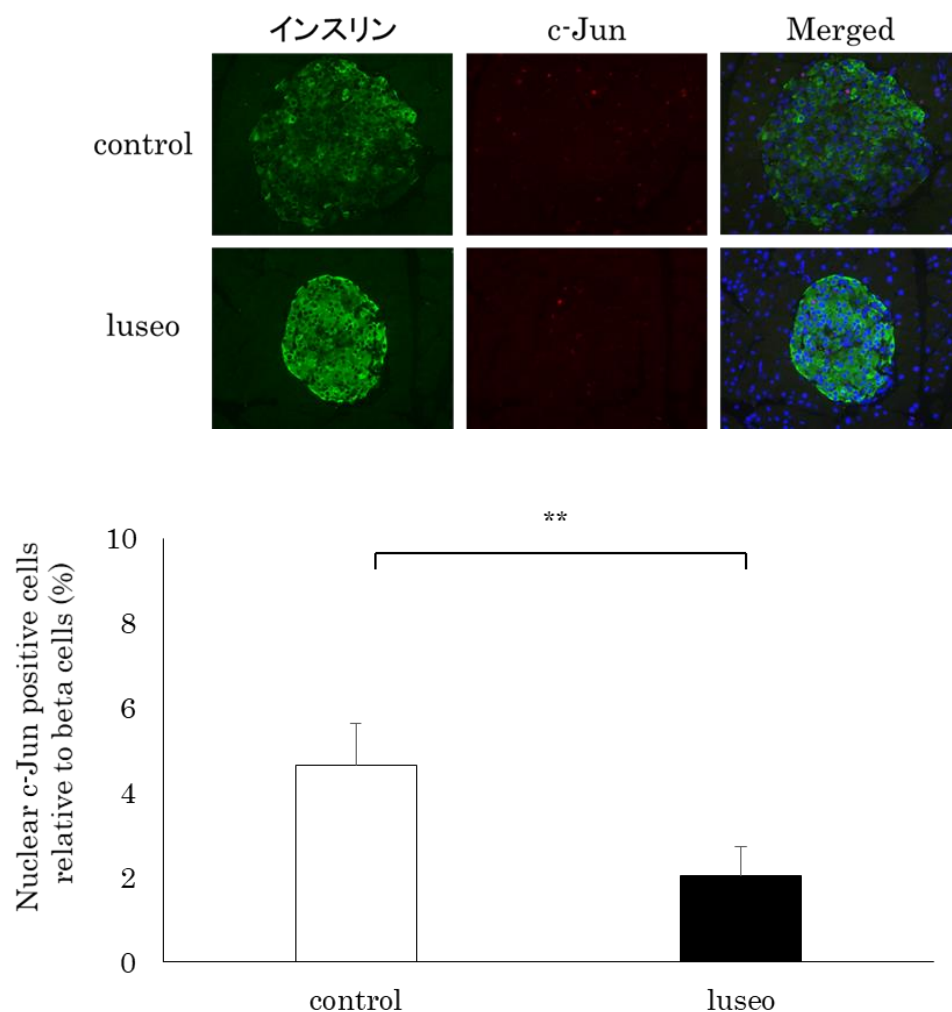


Figure 22 膵島におけるインスリン・c-Jun の二重染色

上段：インスリン・c-Jun 蛍光免疫染色

下段：膵β細胞数における c-Jun 陽性細胞数の割合

10 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 c-Jun 抗体にて蛍光免疫染色法で染色した（平均 ± SD）（各群 n=4）。核をカウントし、膵島における c-Jun 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて c-Jun 陽性細胞率（%）として評価した。統計解析には対応のない *t* 検定を用いた。**p* < 0.05 vs. control group

3.3.12 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin

投与による体重、随時血糖の推移

実験結果 3.3.1～3.3.11 の結果より早期週齢（6 週齢）の db/db マウスに 4 週間の luseogliflozin を投与することで膵 β 細胞量の増加や膵 β 細胞機能を改善することが明らかとなった。db/db マウスは、週齢と共に膵 β 細胞量や膵 β 細胞機能の低下が起きるモデルマウスであることを利用して、異なる週齢から同様に 4 週間 luseogliflozin を投与し、control 群と luseo 群で比較検討することとした。週齢に関係なく両群間で体重には有意な差を認めなかったが（Figure 23）、随時血糖値は、luseo 群で、週齢関係なく同程度まで血糖降下を認めた（Figure 24）。

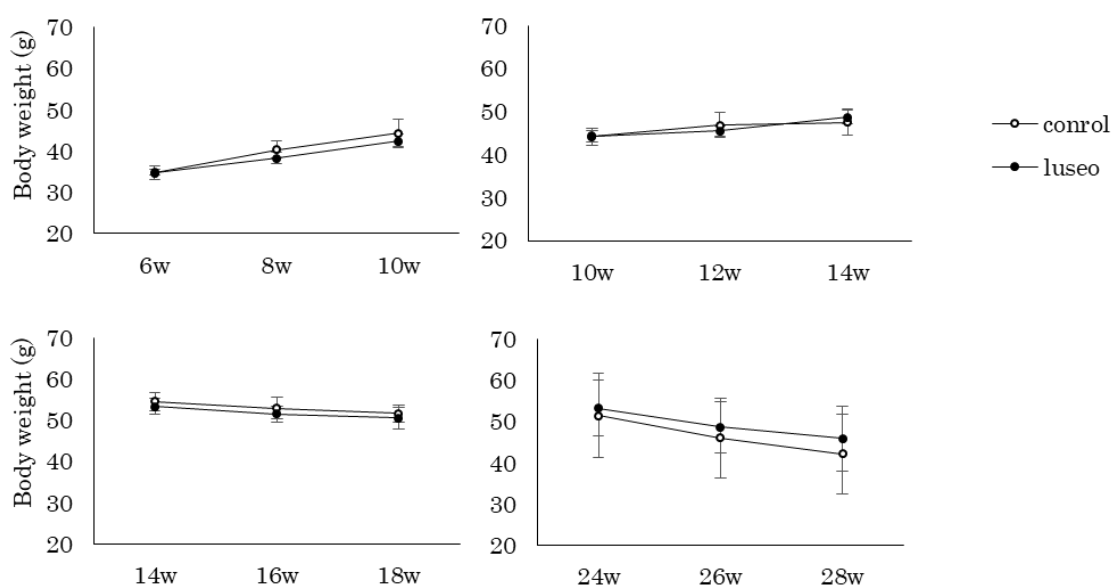


Figure 23 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による体重の推移

6、10、14、24 週齢より luseogliflozin を 4 週間投与した。同一条件下で、各マウスの体重測定を行った（平均 $\pm$ SD）（n=6-8）。

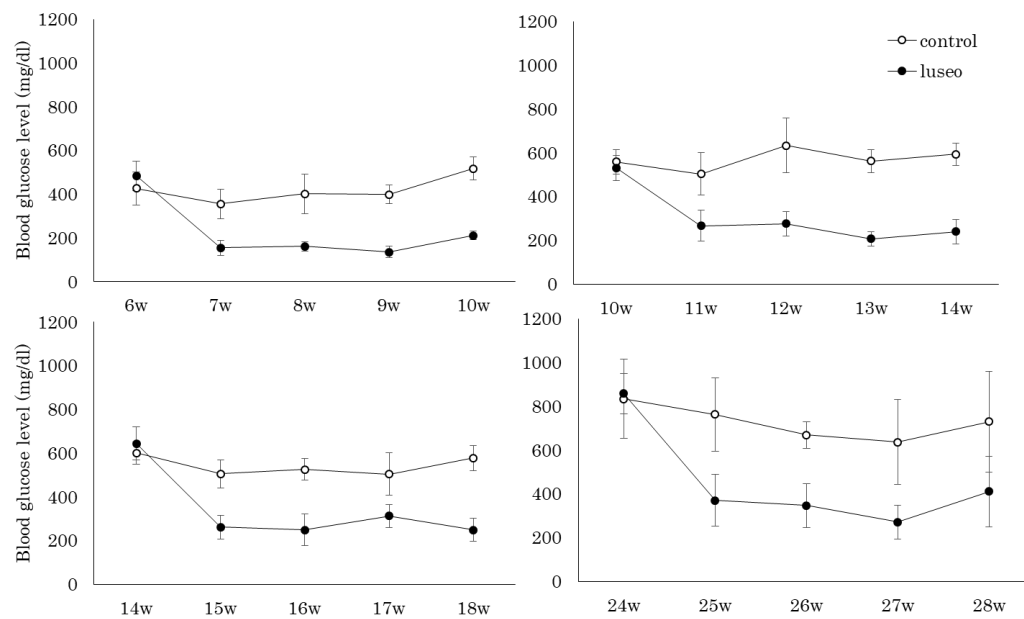


Figure 24 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による
随時血糖の推移

隔週で同一の条件下で尾静脈より血液を採取し、簡易血糖測定器を用いて
随時血糖の測定を行った（平均 ± SD）（n=6-8）。

3.3.13 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin

投与による耐糖能評価

次に、異なる週齢に luseogliflozin を投与した際の、耐糖能を OGTT で評価した。4 時間絶食下で週齢に関係なく、luseo 群で control 群に比べて有意に耐糖能の改善を認めた (Figure 25)。また、OGTT の AUC における評価でも同様に luseo 群において有意な耐糖能の改善を認めた (Figure 26)。

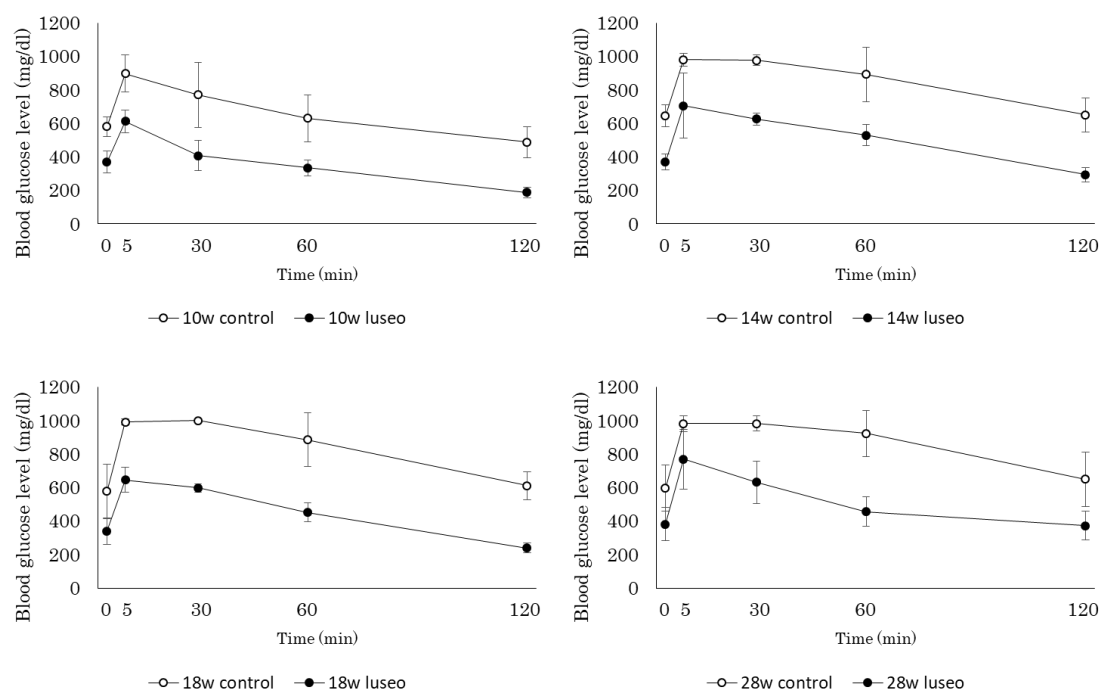


Figure 25 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による経口ブドウ糖負荷試験

10、14、18、28 週齢の control 群、luseo 群に 4 時間の絶食後に、ゾンデを用いて経口的に 1.0 g/kg のブドウ糖水溶液を投与し各時間に尾静脈より血液を採取して血糖値を測定した。(平均 $\pm$ SD) (n=6-8)。

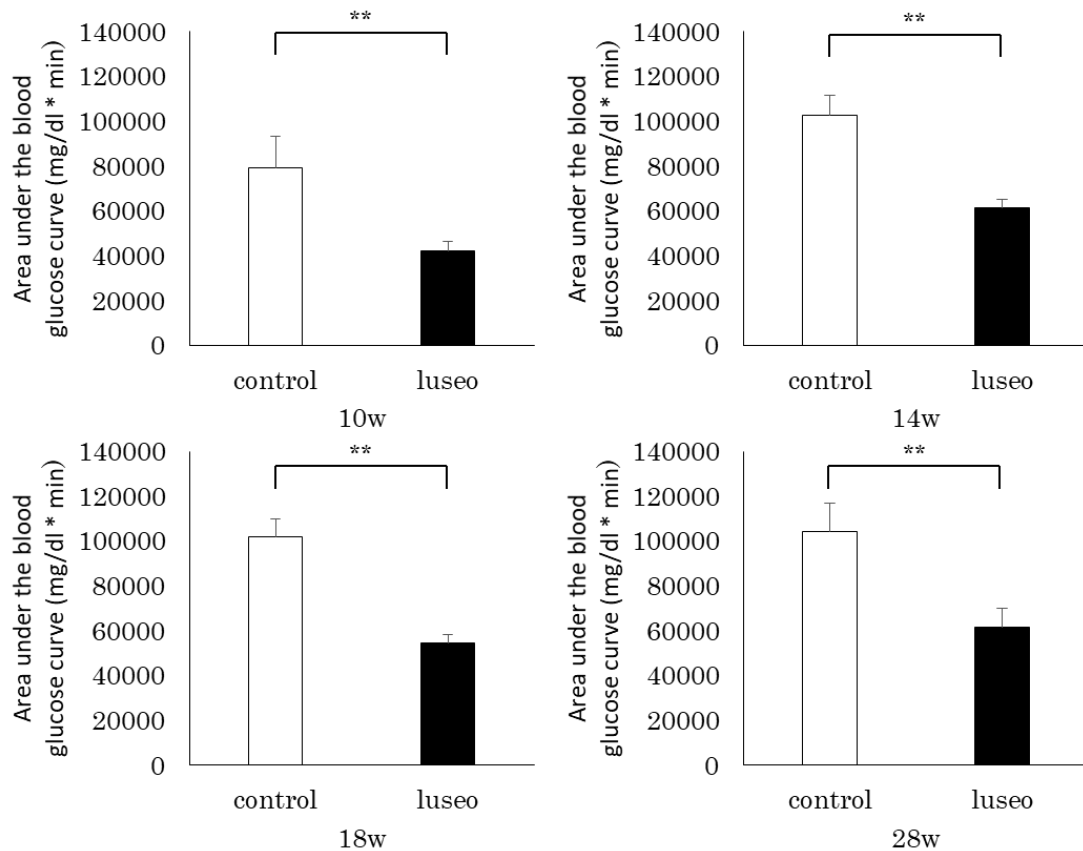


Figure 26 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による

経口ブドウ糖負荷試験における OGTT の曲線下面積

Figure25 の方法で施行した OGTT の各時間の血糖値を、0mg/dl を縦軸の底とした台形として各時間間の曲線下面積を求め、0~120 分までの総和を OGTT の AUC として評価した (平均 $\pm$ SD) (n=6-8)。統計には対応のない t 検定を用いた。* $p < 0.05$ vs. control group

3.3.14 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin

投与による膵β細胞機能の検討

次に異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin を投与した際の膵β細胞機能を詳細に評価するため、4時間絶食下での血中インスリン・血糖比を測定した。4時間絶食下のインスリン・血糖比で膵β細胞機能を評価したところ週齢に関係なく control 群と比べて luseo 群で有意にインスリン・血糖比の上昇を認めた (Figure 27)。さらに、6週齢からの4週間の luseogliflozin 介入群は24週齢からの4週間の luseogliflozin 介入群に比べて有意にインスリン・血糖比の上昇を認めた (Figure 27)。この結果より、db/db マウスに luseogliflozin を投与することにより週齢に関係なく耐糖能を改善するものの早期週齢からの介入の方がより膵β細胞機能を改善させる可能性が示唆された。

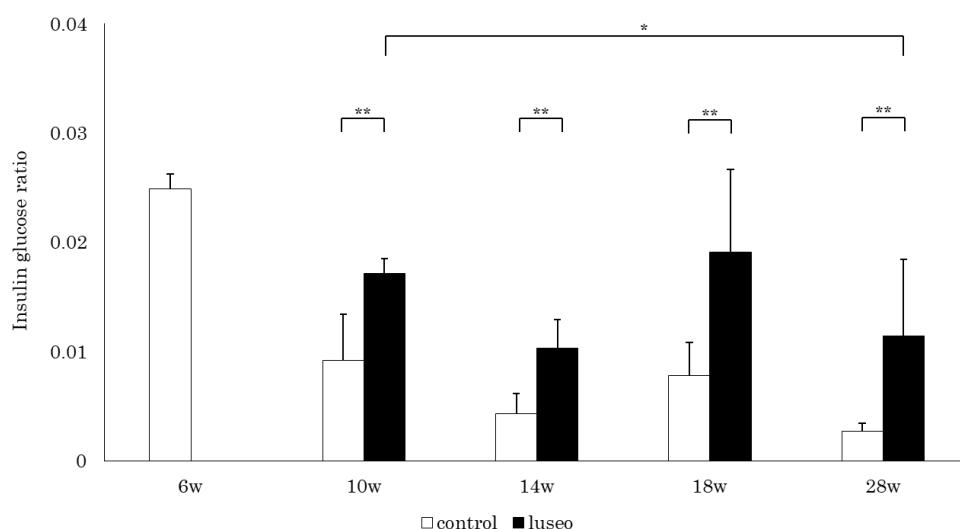


Figure 27 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による
血中インスリン・血糖比

4時間絶食下で血液を採取し血清を分離して、ELISA 法にて血清インスリン濃度を測定し、その時の血糖値で除した (平均 ± SD) (n=6-8)。統計には、one-way analysis of variance (ANOVA)を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Fisher's PLSD test 法を用いて各群間を比較した。** $p < 0.01$ vs. control group, * $p < 0.05$ vs. control group

3.3.15 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin

投与による膵β細胞量の検討

次に、異なる週齢からの luseogliflozin の介入で、膵β細胞量の影響を検討した。control 群は週齢と共に膵β細胞量が低下していく一方、luseo 群は週齢に関係なく control 群に比し膵β細胞量の増加を認めた (Figure 28)。さらに、6 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群は 24 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群に比べて有意な膵β細胞量の増加を認めた (Figure 28)。この結果より、db/db マウスに luseogliflozin を投与することは週齢に関係なく膵β細胞量を増加させる一方で、早期週齢からの介入の方がより膵β細胞量を増加させる可能性が示唆された。

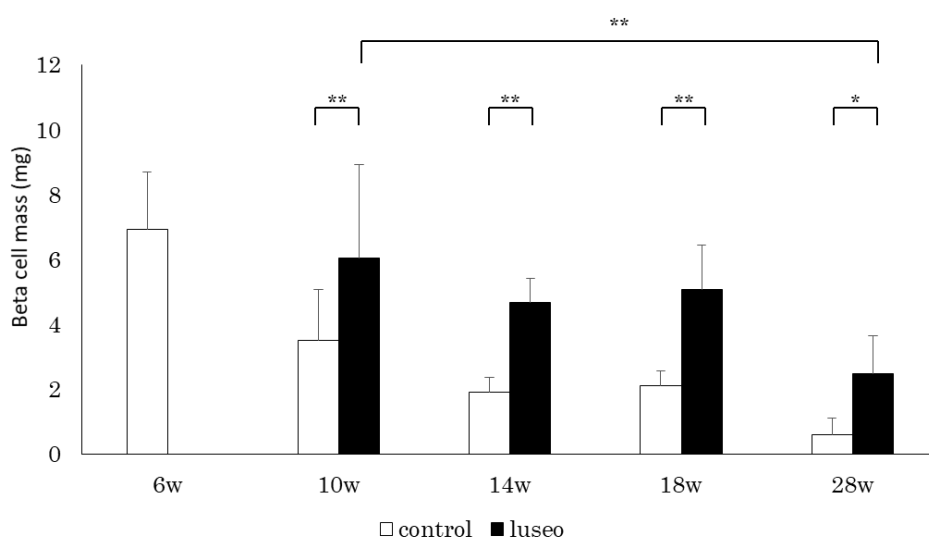


Figure 28 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による膵β細胞量

6、10、14、18、28 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体にて酵素抗体法で染色し、ヘマトキシリンで対比染色を行った。手動的に膵を囲い、コンピューターソフトウェアを用いて同一切片における膵全体・膵β細胞面積を計測した (平均 ± SD) (n=4-8)。統計には、one-way analysis of variance (ANOVA)を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Fisher's PLSD test 法を用いて各群間を比較した。** $p < 0.01$ vs. control group, * $p < 0.05$ vs. control group

3.3.16 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin

投与による膵β細胞量保持作用の検討

次に異なる週齢での luseogliflozin の膵β細胞保持作用のメカニズムを明らかにするため免疫組織学的解析を行った。細胞増殖マーカーである BrdU 染色の結果、3.3.6 の結果同様に、6 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群においては、BrdU 陽性細胞率が control 群に比べて有意な増加を認めていたが、発症後経過がたってからの 4 週間の luseogliflozin 介入群においては、BrdU 陽性細胞率が control 群に比べ差を認めなかった (Figure 29)。別の細胞増殖マーカーである Ki67 染色でも検討したが、同様に 6 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群においては、Ki67 陽性細胞率が control 群に比べて有意な増加を認めていたが、24 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群においては、Ki67 陽性細胞率が control 群に比べ差を認めなかった (Figure 30)。また、アポトーシスマーカーでもある TUNEL 染色では 6 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群において有意に TUNEL 陽性細胞数を減少させたが 24 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群においては、TUNEL 陽性細胞数は control 群に比べ差を認めなかった (Figure 31)。

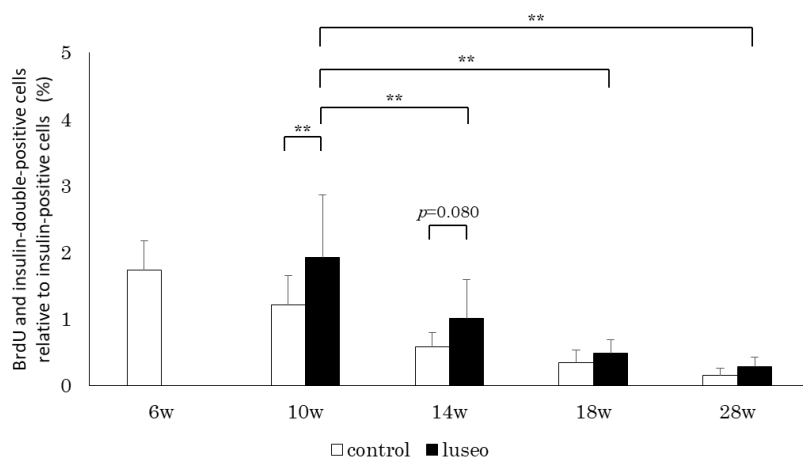


Figure 29 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による膵β細胞増殖率

6、10、14、18、28 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 BrdU 抗体にて酵素抗体法で染色した。核をカウントし、膵島における BrdU 陽性β細胞数を、膵島内の全β細胞数で除し 100 を乗じて BrdU 陽性細胞率 (%) として評価した (平均 ± SD) (n=4-8)。統計には、one-

way analysis of variance (ANOVA)を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Fisher's PLSD test 法を用いて各群間を比較した。 ** $p < 0.01$ vs. control group

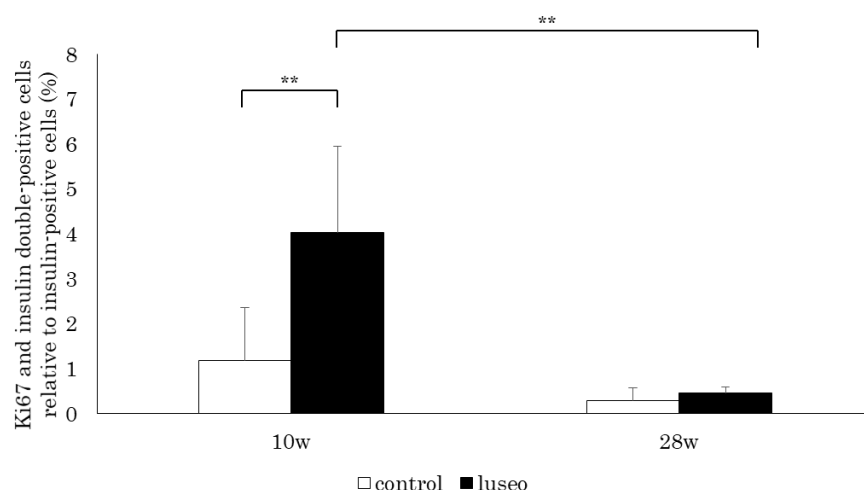


Figure 30 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による
膵 β 細胞増殖率

10、28 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 Ki67 抗体にて酵素抗体法で染色した。核をカウントし、膵島における Ki67 陽性 β 細胞数を、膵島内の全 β 細胞数で除し 100 を乗じて Ki67 陽性細胞率 (%) として評価した。(平均 $\pm$ SD) (n=5) 統計には、one-way analysis of variance (ANOVA)を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Fisher's PLSD test 法を用いて各群間を比較した。 ** $p < 0.01$ vs. control group

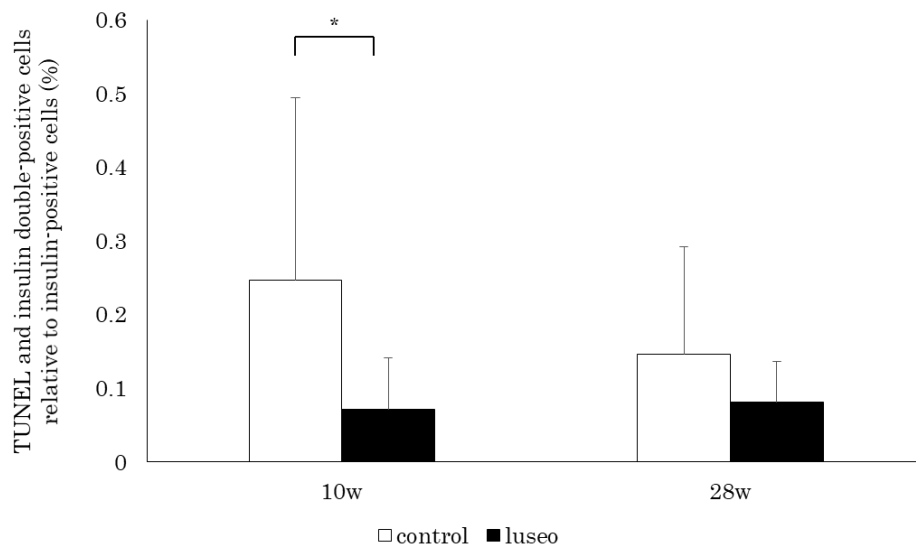


Figure 31 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による
アポトーシスの変化

10、28 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 TUNEL 抗体にて蛍光免疫染色法で染色した。核をカウントし、膵島における TUNEL 陽性 β 細胞数を、膵島内の全 β 細胞数で除し 100 を乗じて TUNEL 陽性細胞率 (%) として評価した。(平均 $\pm$ SD) (n=6-8) 統計には、one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Fisher's PLSD test 法を用いて各群間を比較した。* $p < 0.05$ vs. control group

3.3.17 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による膵β細胞における Mafa の発現に対する検討

次に、異なる週齢からの luseogliflozin の介入で、膵β細胞における Mafa の発現への影響を検討した。control 群は週齢と共に膵β細胞内の Mafa の発現が低下していく一方、luseo 群は週齢に関係なく control 群に比し膵β細胞内の Mafa の発現の増加を認めた (Figure 32)。さらに、6 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群は 24 週齢からの 4 週間の luseogliflozin 介入群に比べて有意に膵β細胞内の Mafa の発現の増加を認めた (Figure 32)。4.12 ~4.17 の結果から、db/db マウスに luseogliflozin を投与することは週齢に関係なく耐糖能や膵β細胞機能を改善させると共に膵β細胞量を増加させることが明らかになった。しかしながら、早期週齢からの介入の方がよりその効果を強めたことが示唆された。

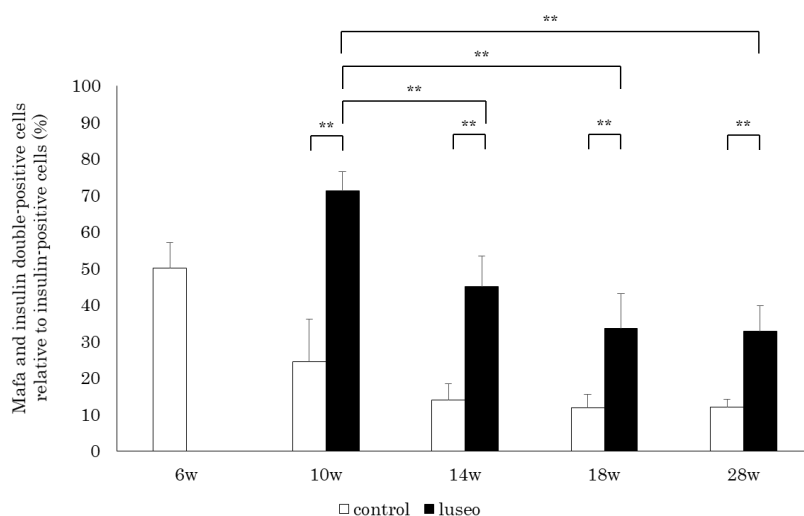


Figure 32 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin 投与による膵β細胞数における Mafa 陽性細胞率

6、10、14、18、28 週齢の各マウスの膵切片を抗インスリン抗体、抗 Mafa 抗体にて蛍光免疫染色法で二重染色し、DAPI で対比染色を行った。核をカウントし、膵β細胞における Mafa 陽性細胞数を膵β細胞数で除し 100 を乗じた (平均 ± SD) (n=4-8)。統計には、one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、有意差を認めた場合は post hoc 試験として Fisher's PLSD test 法を用いて各群間を比較した。** $p < 0.01$ vs. control group

3.4 考 察

db/db マウスは、レプチンの受容体欠損により過食となり肥満、高血糖を呈し若い週齢より糖尿病となり、ヒトの肥満型糖尿病に類似した表現型を有するモデル動物である。今回我々は、6 週齢の db/db マウスを用いて SGLT2 阻害薬の一つである luseogliflozin が膵 β 細胞機能や膵 β 細胞量に与える影響の検討を行った。4 週間の投与により luseo 群では、control 群に比べて耐糖能や膵 β 細胞機能を改善させ膵 β 細胞量を増加させた。

db/db マウスやストレプトゾトシン誘導性 1 型糖尿病モデルマウスに SGLT2 阻害薬を投与し膵 β 細胞保護作用を明らかにした報告^{19,23,27}は既報にあり、今回の我々の研究結果と一致した。本検討では、luseo 群は、control 群に比べて有意に血中インスリン・血糖比や膵 β 細胞内の *Mafa* の発現が上昇した結果であった。既報では慢性的な高血糖状態が続くと、膵 β 細胞内の酸化ストレスが増加し、膵 β 細胞内の *Mafa* や *Pdx1* の遺伝子発現や蛋白レベルが低下し、膵 β 細胞機能低下を来す機序が報告されている²⁸。本検討の結果より、luseogliflozin の尿糖排泄作用によって、耐糖能が改善し、膵 β 細胞内の酸化ストレスを減少させ、その結果、膵 β 細胞内の *Mafa* や *Pdx1* の発現が増加し膵 β 細胞機能を改善させたと考えられた。

db/db マウスに SGLT2 阻害薬を投与することで膵 β 細胞量を増加させたが、その分子学的メカニズムに関しては、いまだ明らかになってはいない。4 週齢の db/db マウスは、インスリン抵抗性に対し膵 β 細胞機能及び膵 β 細胞量が増加することで血中のインスリン分泌を増加させて血糖上昇に応答しようとする。その際に、インスリンや IGF1 シグナルの活性化により膵 β 細胞内の FoxO1 がリン酸化されることで核から細胞質へ移行し膵 β 細胞増殖に関与することが、明らかになっている²⁹⁻³¹。その後、6 週齢以降の db/db マウスは、慢性的な高血糖や酸化ストレスの上昇によって FoxO1 は膵 β 細胞内の核内に移行し、膵 β 細胞増殖が低下するとされる³¹。この報告を基に、本研究においても control 群と luseo 群で膵 β 細胞内の FoxO1 の局在を検討したが、両群間で膵 β 細胞内の FoxO1 の核陽性細胞率に差を認めず、luseogliflozin 投与における FoxO1 を介した膵 β 細胞量増殖の機序の関与は否定的と考えられた。既報では、膵 β 細胞内の *Mafa* を欠失したマウスは膵 β 細胞量の低下を認め³²、db/db マウスに膵 β

細胞内の *Mafa* を過剰発現させると膵 β 細胞量を増加させることが明らかになっていることから³³、*Mafa* が、膵 β 細胞機能改善効果に加え、膵 β 細胞量増加のメカニズムにも関与した可能性が示唆された。

膵 β 細胞量の調節メカニズムとして、細胞増殖やアポトーシス以外に、近年、脱分化の関与が報告されている³⁴⁻³⁶。膵 β 細胞に特異的に *FoxO1* を欠失したマウスに加齢や多産などのストレスを与えると膵 β 細胞量が低下し高血糖となる。*Talchai* ら³⁵は、その際、膵 β 細胞はインスリンやその転写因子の発現を失い、膵内分泌前駆マーカーを発現し *progenitor-like cell* に変換し膵 β 細胞量低下に寄与していたことを報告している。この報告を基に、本検討では、膵 β 細胞内での脱分化関連マーカーである *NGN3* や *ALDH1a3* の遺伝子発現または蛋白発現を検討したが、*luseo* 群と *control* 群で差を認めなかった。*Ishida*³⁷ らは、*db/db* マウスを用いて、*SGLT* 阻害剤である *phloridzin* が膵 β 細胞の脱分化抑制効果を発揮しなかったことを報告しており、本検討でも同様な結果であった。

本検討では、インスリン分泌、膵 β 細胞量が低下している 24 週齢の *db/db* マウスにおいても *luseogliflozin* の投与により、*control* 群に比べて部分的に膵 β 細胞機能の改善や膵 β 細胞量の増加を認めた。*Kimura*²¹ らは、7 週齢の *db/db* マウスに 2 週間の *GLP-1* 受容体作動薬の *liraglutide*、チアゾリジン薬の *pioglitazone* またはこの両者を併用投与すると膵 β 細胞機能の改善や膵 β 細胞量の増加を認めたが、16 週齢の *db/db* マウスではその効果が認められなかったことを報告している。また、*liraglutide* 単剤の検討でも同様な結果であったことを *Shao*²² らも報告している。また、これらの報告では早期週齢からの治療介入群では経過がたってからの治療介入群に比べて *Mafa* の発現が改善していたことを報告している^{21,22}。本検討の結果と、既報が異なる理由として治療期間や投与した薬の差異が関連している可能性が考えられた。既報では、経過がたってからの *db/db* マウスでは治療介入によっても血糖降下作用が減弱しており、ブドウ糖毒性が改善出来ず、その結果、膵 β 細胞内の *Mafa* の発現が不十分となり膵 β 細胞機能の低下や膵 β 細胞量が増加しなかった可能性が考えられた^{21,22}。反対に本検討では、経過がたってからの *db/db* マウスにおける *luseogliflozin* の投与は、早期週齢 *db/db* マウスからの投与と同程度の血糖降下や耐糖能の改善を示し、膵 β 細胞内の *Mafa* の発現が増加し、膵 β 細胞機能の改善や膵 β 細胞量が増加した可能性が考えられた。しかしながら、早期週齢からの *luseogliflozin* の介入は、経過がたってからの介入と比べ、より膵 β 細胞機能の改善や膵 β 細胞量増加効果が大きい結

果であったことから、これまでの既報と同様に、膵β細胞保護をするうえで糖尿病発症早期からの治療が重要であることが考えられた。

本研究の限界点として、luseogliflozin の投与期間は 4 週間であったことであり、6 週齢から 28 週齢にかけて luseogliflozin を長期に投与した場合、膵β細胞にあたえる影響に対しては検討をしていない。他に、SGLT2 阻害薬と他の糖尿病治療薬を用いて、膵β細胞に与える影響の違いについて検討をしていない。今後、db/db マウスを用いて、SGLT2 阻害薬またはインスリンを投与し同レベルまで血糖値を低下させた場合の膵β細胞量保持に与える分子機構の違いについて検討する予定である。

今回我々は、db/db マウスに luseogliflozin を投与することで膵β細胞機能や膵β細胞量を保持することを明らかにした。その保持効果は、db/db マウスの週齢にかかわらず認めた。また、早期週齢からの投与で、よりその保護効果が大きいことを明らかにした。

－第 2 章－

SGLT2 阻害薬を開始する際に
SU 薬は中止すべきか少量残すべきか？

4.1 緒 言

糖尿病患者の治療目標は、血糖値を適切にコントロールして合併症の発症を予防することある。第1部で使用した薬剤である **SGLT2 阻害薬**は、ヒト臨床試験では血糖改善効果以外に、低血糖のリスクを低下させ、内臓脂肪の減少を介しメタボリックシンドロームの改善効果があることが明らかになっている^{12,38}。さらに、近年、心血管イベントの既往を有する2型糖尿病患者を対象にした大規模臨床試験において、**SGLT2 阻害薬**が複合心血管イベントの発生を有意に抑制し、腎保護効果を有することも明らかになった^{11,13}。米国糖尿病学会は、**SGLT2 阻害薬**は、2型糖尿病患者のための確立された治療で、心臓血管イベントおよび死亡率を低減させる効果がある薬剤として「糖尿病における標準治療」として推奨している³⁹。

一方、膵β細胞に作用しインスリン分泌を促し強いグルコース低下効果を発揮する **SU 薬**は、2型糖尿病患者の治療に古くから広く用いられている⁴。しかしながら、体重増加や低血糖頻度を増加させる副作用があり⁴⁰、さらに、2型糖尿病患者の進行性の膵β細胞機能の低下は、**SU 薬**の有効性が低下することも明らかになっている⁴。従って、**SU 薬**で血糖コントロールを達成できていない患者においては、他の経口血糖降下薬に変更していくか、他の経口血糖降下薬を併用していく必要がある。既報では、**SGLT2 阻害薬**と **SU 薬**の併用療法は、低血糖頻度が増加したが有意に **HbA1c** が改善したことが報告されている⁴¹。さらに、**SGLT2 阻害薬**と **SU 薬**を比較した欧米における大規模臨床研究では、**SGLT2 阻害薬**が **SU 薬**よりも有意に体重減少と低血糖頻度を低下させ、**HbA1c**を同等以上に改善させることが示された^{38,42}。しかし、欧米人に比べインスリン分泌能が低下しているアジア人にとっては、**SU 薬**は欧米人以上に有効である可能性が高く、血糖降下作用において **SGLT2 阻害薬**が **SU 薬**より勝るかどうかは不明である。また、本邦では **SGLT2 阻害薬**を開始する際、低血糖予防のために使用中の **SU 薬**を適宜減量するように推奨はされているが、その用量には根拠となる臨床研究が全くなく、どの程度減量すべきかは、担当医の判断に委ねられているのが現状である。そこで我々は、**SGLT2 阻害薬**である **ipragliflozin 50mg**を開始する際、**SU 薬**を中止すべきか否か、その有効性と安全性を検討した。

4.2 実験方法

4.2.1 対象

北海道内 14 の糖尿病専門医療機関に通院中の 2 型糖尿病患者を対象とした。登録基準は以下の通りであった。登録基準は以下の通りであった：SU（glimepiride ≥ 1 mg/日, gliclazide ≥ 40 mg/日, glibenclamide ≥ 1.25 mg/日）を、4 週間以上内服している 20～75 歳の 2 型糖尿病で血糖コントロールが不十分（HbA1c 6.5～8.5%）であること。body mass index (BMI) が 22 kg/m^2 、eGFR が $45 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ を超えていること。一方で、不安定な糖尿病性網膜症を有する患者、心疾患を合併している患者、内因性インスリン分泌が低下している患者（C-peptide $< 0.5 \text{ ng/ml}$ ）、妊娠中の女性、慢性的な血清トランスアミナーゼ高値や腎機能障害を有する患者、重症ケトosis、糖尿病性昏睡又は前昏睡、重症感染症、手術前後、重篤な外傷のある患者、食事療法を明らかに遵守できず、主治医が不適と判断した患者、担当医師が不適当と判断した患者は除外した。

4.2.2 研究プロトコール

前向き観察研究。SU 薬（glimepiride ≥ 1 mg/日, gliclazide ≥ 40 mg/日, glibenclamide ≥ 1.25 mg/日）を 12 週以上内服中の 2 型糖尿病患者に対して、ipragliflozin 50 mg の追加投与を決定した際に、日本糖尿病学会 SGLT2 阻害薬の適正使用に関する委員会の推奨する「SGLT2 阻害薬の適正使用に関する Recommendation」に基づき、主治医判断により、SU 薬を減量する群（Low-dose group）もしくは中止する群（Discontinuation group）に分けて、通院加療を 24 週間継続した。SU 薬の減量については、最低用量（glimepiride 1 mg/日または gliclazide 20 mg/日）に減量することに統一した。低血糖でインスリンを含む糖尿病治療薬の減量の必要性がない限り、試験期間中は治療中の全ての薬剤の変更を原則行わないこととし、ipragliflozin 50 mg の投与が中止になった時点で試験脱落として対応した。

傾向スコアを用いて患者背景をマッチングさせた 2 群において、有効性と安全性について比較することとした。具体的には、BMI、体重、腹囲、血圧、空腹時血糖、HbA1c、脂質、肝機能、腎機能、低血糖頻度などについて、試験前後の変化を比較評価した。また、FDA (The Food and Drug Administration) の非劣性基準に基づいて⁴³、HbA1c 0.4%未満の上昇は変動許容範囲(成功)とした時に、成功のための最適な治療選択に寄与する背景因子を探索することを次の目的とした。被験者登録期間は 2015 年 2 月から 2016 年 12 月までとした。

4.2.3 その他の評価項目

インスリン抵抗性の指標である Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)は、 $HOMA-IR = \text{fasting plasma glucose (FPG) (mg / dl)} \times \text{インスリン濃度} (\mu \text{ U/ ml}) / 405$ を用いて評価した。膵β細胞機能の指標である、Homeostasis model assessment of beta cell function (HOMA-β)は、 $HOMA-β = 360 \times \text{インスリン濃度} (\mu \text{ U/ ml}) \div (\text{FPG (mg/dl)} - 63)$ を用いて評価した。low-density lipoprotein cholesterol (LDL)は、Friedewald の式を用いて評価した。Friedewald の式: $LDL \text{ (mg/dl)} = \text{total cholesterol (T-Cho) (mg/dl)} - \text{high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (mg/dl)} - \text{triglyceride (TG) (mg/dl)} / 5$

4.2.4 目標症例数の設定

本研究では ipragliflozin を投与する際に SU 薬を減量、もしくは中止した場合の有用性に関する探索的な観察研究であるため、検証を目的とした例数設計は行わないこととした。ただし、評価項目に低血糖頻度を盛り込んでいることから、必要症例数の目安として以下の検討を行った。

ipragliflozin と S U 薬の併用に関する国内 P III 開発治験において、ipragliflozin と S U 薬 24 週間併用時の低血糖頻度は 1.2% (2/166 例) であった。実臨床の環境を考慮して、本研究では低血糖の頻度を 2%程度と想定した。この想定のもと、信頼係数 95%で低血糖を検出する場合に必要な症例数は 183 例となり、途中脱落や実施可能性を考慮し目標症例数を 200 例に設定した。

4.2.5 統計学的解析

有効性に関する各種評価の解析は、intention-to-treat 解析にて行った。傾向スコアを推定するため、Discontinuation group または Low-dose group に対する判定基準を従属変数とし、年齢、BMI、FPG、HbA1c、aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、HDL-C、sulfonylurea dose を共変量とした多重ロジスティック回帰分析を行った。共変量を調整し因果効果を推定するため、最近傍マッチング法を用い非復元抽出による 1 対 1 マッチングを行った。傾向スコアの距離 (caliper) は、推奨値とされる傾向スコア推定値をロジット変換後、その値の標準偏差の 0.5 乗とした。sulfonylurea dose を算出する際、既報より、1mg の glimepiride 用量は 40 mg の gliclazide、1.25mg の glibenclamide と等価容量であると定義した^{44,45}。結果は平均±SD として示した。両群間の背景因子の差や両群間の試験開始時～24 週後の変化値の比較には、連続変数には unpaired *t* 検定、離散変数には chi-square test 検定を用いて評価した。各群間内での試験開始時～24 週後の変化値の比較には、連続変数には paired *t* 検定、離散変数には McNemar 検定を用いて評価した。背景因子の差は *p* 値 < 0.05 を統計的に有意であるとした。Discontinuation group の試験開始時の HDL-C と BMI の相関は Pearson の相関係数を用いた。SU 薬中止群において、切り替え成功に関連する患者背景因子に対して logistic 回帰分析を用いて探索した。更に、検出された因子について、Receiver operating characteristic (ROC) 曲線を作成し、感度、特異度、カットオフ値を検出した。データ分析には JMP version 13 software (SAS Inc., Cary, NC, USA)を用いて解析を行った。

4.3 実験結果

4.3.1 背景因子

計画通りに合計 200 人の患者（男性 144 人、女性 56 人）が研究に登録され、Discontinuation group または Low-dose group のいずれかに割り当てられた。その後、2 人の患者が試験基準を満たさないことが判明し研究終了までに 9 人の患者が脱落した。脱落の原因は、痒み、発疹、生殖器感染、動悸、頻尿（ $n = 4$ ）の副作用と同意の撤回（ $n = 5$ ）が含まれていた（Figure 33）。結果、189 人の患者が研究を完了した。

Discontinuation group と Low-dose group の 200 人の患者の背景の比較では、Discontinuation group は Low-dose group と比較して年齢が低く、eGFR および HDL-C が高値であった。1 : 1 の傾向スコアマッチングの後、Discontinuation group と Low-dose group の患者のそれぞれ 55% および 62% が、一致したコホート（各群 58 人）に選出された。マッチング後、Discontinuation group と Low-dose group は、すべての項目（ $p > 0.05$ ）において適切なバランスがとれていた。平均年齢、BMI、HbA1c および sulfonylurea dose は、それぞれ 58.8 歳、 $27.7\text{kg} / \text{m}^2$ 、7.57% および 1.4mg / 日であった（Table 2）。

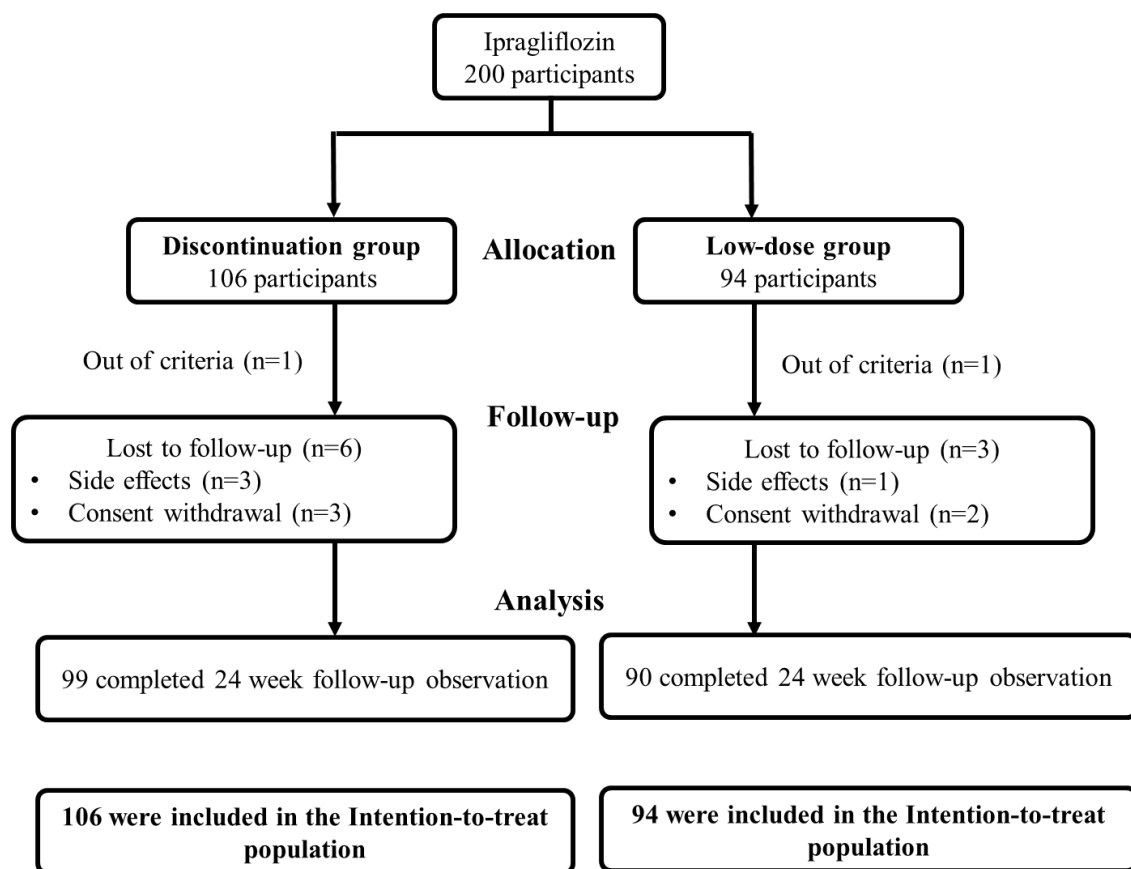


Figure 33 Study protocol flow diagram

Table2 患者背景の比較

	Before			After		
	propensity-matching			propensity-matching		
	Discontinuation group (n=106)	Low-dose Group (n=94)	<i>p</i> value	Discontinuation group (n=58)	Low-dose group (n=58)	<i>p</i> value
Age (year)	56.0 ± 9.7	59.4 ± 8.9	< 0.05	58.7 ± 8.5	59.0 ± 8.7	0.84
Male/female (n)	76/30	68/26	0.92	41/17	40/18	0.84
Duration of diabetes (year)			0.49			0.46
0-4 (%)	11.4	12.2		10.5	16.4	
5-9 (%)	31.4	23.3		38.6	25.5	
10-14 (%)	25.7	34.4		19.3	20.0	
15- (%)	31.4	30.0		31.6	38.2	
Duration of sulfonylurea (year)			0.38			0.98
0-4 (%)	33.0	26.3		30.9	30.4	
5-9 (%)	27.8	36.8		34.6	34.8	
10-14 (%)	22.7	26.3		21.8	19.6	
15- (%)	16.5	10.5		12.7	15.2	
Smoking status			0.76			0.69
Never smoker (%)	43.4	38.7		44.8	40.4	
Former smoker (%)	24.5	24.7		25.9	22.8	
Current smoker (%)	32.1	36.6		29.3	36.8	
Alcohol drinking status			0.38			0.45
Noncurrent drinkers	70.8	64.9		52.9	47.1	
Current drinkers	29.3	35.1		45.7	54.4	
Body weight (kg)	79.6 ± 16.4	76.0 ± 14.6	0.10	75.2 ± 12.0	75.5 ± 14.3	0.91
BMI (kg/m ²)	29.1 ± 5.0	27.9 ± 4.5	0.08	27.7 ± 4.0	27.7 ± 4.3	0.98
Waist circumference (cm)	97.6 ± 11.0	95.1 ± 10.3	0.09	94.5 ± 8.0	94.5 ± 10.4	0.97
SBP (mmHg)	132.6 ± 14.5	134.9 ± 15.9	0.30	132.5 ± 12.9	135.1 ± 17.8	0.38
DBP (mmHg)	80.5 ± 11.6	79.0 ± 10.7	0.37	80.1 ± 9.2	79.9 ± 11.7	0.91
FPG (mg/dL)	148.4 ± 33.2	158.1 ± 41.0	0.06	151.1 ± 35.0	150.0 ± 35.0	0.87
HbA1c (%)	7.51 ± 0.57	7.62 ± 0.52	0.17	7.60 ± 0.60	7.54 ± 0.49	0.53
Insulin (μU/mL)	10.1 ± 10.9	12.5 ± 13.7	0.23	10.3 ± 13.0	8.7 ± 7.8	0.48
HOMA-IR	3.8 ± 4.7	5.8 ± 7.7	0.06	4.1 ± 5.6	3.6 ± 4.6	0.67

Table2 (つづき)

	Before			After		
	propensity-matching			propensity-matching		
	Discontinuation group (n=106)	Low-dose Group (n=94)	<i>p</i> value	Discontinuation group (n=58)	Low-dose group (n=58)	<i>p</i> value
HOMA-beta	48.1 ± 49.6	45.7 ± 47.3	0.77	45.7 ± 53.3	38.7 ± 36.3	0.47
UA (mg/dL)	5.6 ± 1.3	5.4 ± 1.2	0.23	5.6 ± 1.3	5.3 ± 1.2	0.15
AST (U/L)	30.5 ± 14.7	30.9 ± 18.9	0.89	29.6 ± 13.5	26.8 ± 11.7	0.25
ALT (U/L)	38.7 ± 24.9	40.4 ± 30.7	0.67	37.7 ± 22.5	34.5 ± 22.1	0.44
γ-GTP (U/L)	60.7 ± 64.9	46.6 ± 37.0	0.07	55.9 ± 58.6	49.8 ± 43.4	0.52
Ht (%)	43.4 ± 4.2	44.2 ± 4.3	0.18	43.6 ± 4.6	43.8 ± 4.6	0.82
ACR (mg/g creatinine)	91.7 ± 290.9	99.3 ± 247.2	0.85	74.0 ± 170.3	124.1 ± 305.6	0.28
eGFR (mL/min/1.73m ²)	80.8 ± 17.7	75.4 ± 19.1	< 0.05	79.0 ± 16.4	74.4 ± 17.6	0.14
TG (mg/dL)	139.8 ± 85.8	152.3 ± 90.6	0.32	138.5 ± 86.1	136.0 ± 80.8	0.87
T-Cho (mg/dL)	180.3 ± 29.5	179.5 ± 32.7	0.85	174.1 ± 24.8	178.8 ± 29.6	0.38
HDL-C (mg/dL)	52.4 ± 14.9	48.5 ± 11.1	< 0.05	50.4 ± 13.5	51.9 ± 11.2	0.51
LDL (mg/dL)	100.1 ± 28.0	101.1 ± 31.0	0.82	96.2 ± 21.0	100.4 ± 26.0	0.36
non-HDL-C (mg/dL)	128.0 ± 29.8	131.2 ± 31.6	0.47	123.4 ± 24.9	127.0 ± 27.2	0.48
sulfonylurea dose (mg/day)	1.3 ± 0.5	1.5 ± 0.8	0.06	1.3 ± 0.6	1.5 ± 0.9	0.32
Antidiabetic medicine						
Biguanide (n)	88	77		49	46	
DPP-4 inhibitors (n)	84	77		32	47	
Thiazolidinedione (n)	24	14		9	9	
Alpha-glucosidase inhibitor (n)	18	11		11	6	
Glinide (n)	0	0		0	0	
Insulin (n)	15	11		8	7	
GLP-1 receptor agonist (n)	3	3		3	1	

Table2 患者背景の比較

1 : 1 の傾向スコアマッチングの後（各群 58 人）、Discontinuation group と Low-dose group の患者の背景を比較した。（平均 ± SD）統計には、連続変数には unpaired *t* 検定、離散変数には chi-square test 検定を用いて評

価した。

BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; FPG: fasting plasma glucose; HbA1c: haemoglobin A1c; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; HOMA-beta: homeostasis model assessment of beta cell function; UA: uric acid; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; γ -GTP: γ -glutamyl transpeptidase; Ht: haematocrit; ACR: albumin/creatinine ratio; eGFR: estimated glomerular filtration rate; TG: triglyceride; T-Cho: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; DPP-4 inhibitors: dipeptidyl peptidase-4 inhibitors; GLP-1 receptor agonist; glucagon-like peptide-1 receptor agonist

4.3.2 試験結果

Propensity score のマッチング後、試験終了時の切替え成功率は、Low-dose group は 91.4% であり Discontinuation group 群の 75.9% と比較し有意に高かった ($p = 0.024$) (Figure 34)。試験前後の HbA1c の変化値の比較では、Low-dose group は、Discontinuation group と比べて有意な低下を認めた ($0.08 \pm 0.65\%$ vs. $-0.33 \pm 0.51\%$, $p < 0.01$)。体重、BMI、腹囲、尿酸値、および肝機能パラメーターは、両群間で試験終了時有意に低下したが、血圧は Discontinuation 群でのみ有意に減少した (Table 3)。体重、BMI、および AST の低下の程度は、Discontinuation 群で有意に大きかった。 (-4.4 ± 2.1 kg vs. -2.9 ± 1.9 kg, $p < 0.01$; -1.6 ± 0.8 kg / m² vs. -1.1 ± 0.7 kg / m², $p < 0.01$; -7.3 ± 11.7 U / L vs. 3.2 ± 6.6 U / L, $p < 0.05$) (Table 3)。Discontinuation group の試験終了時の切替え成功を目的変数とし多変量解析を行ったところ、試験開始前の HDL-C (Odds ratio (OR) 0.90, 95%CI 0.84-0.97, $p < 0.01$)、sulfonylurea dose (OR 0.09, 95%CI 0.01-0.72, $p < 0.01$)、年齢 (OR 0.83, 95%CI 0.70-0.99, $p < 0.01$) が独立寄与因子として抽出された (Table 4)。さらに、ROC 解析を用いて、カットオフ値を求めたところ、HDL-C については 48mg/dL、sulfonylurea dose については 1.0mg / 日、および年齢については 62 歳であった (Table 5)。また、HDL-C、sulfonylurea dose、および年齢についての ROC 曲線下面積は、それぞれ 0.78、0.64 および 0.70 であった (Figure 35)。Discontinuation group の HDL-C 48 mg/dl をカットオフとした場合、試験終了時の切替え成功に対する特異度は 85.7% であった (Table 5)。

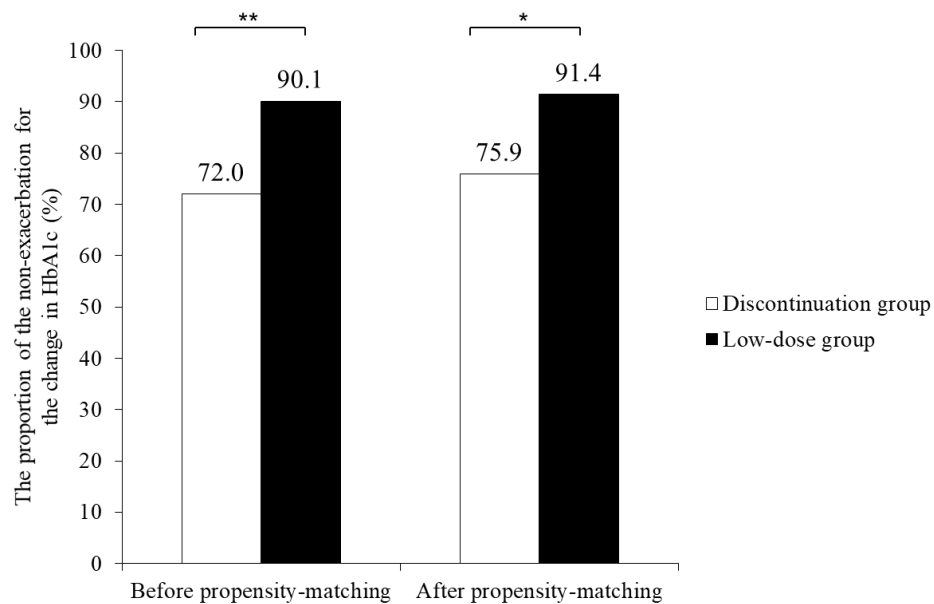


Figure 34 試験終了時の Discontinuation group と Low-dose group の切り替え成功率

1 : 1 の傾向スコアマッチングの後（各群 58 人）、Discontinuation group と Low-dose group の試験終了時の HbA1c 0.4%未満の上昇は変動許容範囲（成功）とした時の成功率を比較した。統計には、chi-square test 検定を用いて評価した。** $p < 0.01$, * $p < 0.5$

Table3 Propensity matching 前後における試験前後での
各種パラメーター比較

Before propensity-matching					
	Discontinuation group (n=106)		Low-dose group (n=94)		<i>p</i> value
	Baseline	Endpoint	Baseline	Endpoint	
Body weight (kg)	79.6 ± 16.4	75.1 ± 16.4**	76.0 ± 14.6	73.4 ± 14.2**	< 0.01
BMI (kg/m ²)	29.1 ± 5.0	27.5 ± 5.1**	27.9 ± 4.5	26.9 ± 4.3**	< 0.01
Waist circumference (cm)	97.6 ± 11.0	93.8 ± 11.1**	95.1 ± 10.3	91.9 ± 10.0**	0.24
SBP (mmHg)	132.6 ± 14.5	126.8 ± 14.3**	134.9 ± 15.9	130.9 ± 14.7*	0.27
DBP (mmHg)	80.5 ± 11.6	75.8 ± 9.6**	79.0 ± 10.7	78.0 ± 10.4	< 0.05
FPG (mg/dL)	148.4 ± 33.2	138.8 ± 31.2**	158.1 ± 41.0	137.5 ± 26.8**	0.05
HbA1c (%)	7.5 ± 0.6	7.5 ± 0.6	7.6 ± 0.5	7.2 ± 0.6**	< 0.01
Insulin (μU/mL)	10.1 ± 10.9	6.5 ± 4.9**	12.5 ± 13.7	7.4 ± 5.9**	< 0.05
HOMA-IR	3.8 ± 4.7	2.3 ± 2.0**	5.8 ± 7.7	2.5 ± 2.3**	< 0.01
HOMA-beta	48.1 ± 49.6	35.2 ± 32.7*	45.7 ± 47.3	40.0 ± 32.2	0.63
UA (mg/dL)	5.6 ± 1.3	5.1 ± 1.2**	5.4 ± 1.2	5.1 ± 1.1*	0.07
AST (U/L)	30.5 ± 14.7	24.0 ± 13.0**	30.9 ± 18.9	25.8 ± 12.3**	0.29
ALT (U/L)	38.7 ± 24.9	27.4 ± 19.3**	40.4 ± 30.7	31.3 ± 21.4**	0.48
γ-GTP (U/L)	60.7 ± 64.9	44.1 ± 44.9**	46.6 ± 37.0	39.3 ± 36.0**	< 0.05
Ht (%)	43.4 ± 4.2	44.9 ± 4.9**	44.2 ± 4.3	46.5 ± 3.9**	0.14
ACR (mg/g creatinine)	91.7 ± 290.9	83.0 ± 330.6	99.3 ± 247.2	69.7 ± 132.3*	0.46
eGFR (mL/min/1.73m ²)	80.8 ± 17.7	83.1 ± 17.9*	75.4 ± 19.1	74.7 ± 19.2	0.10
TG (mg/dL)	139.8 ± 85.8	131.3 ± 69.3	152.3 ± 90.6	142.5 ± 95.2	0.83
T-Cho (mg/dL)	180.3 ± 29.5	184.4 ± 30.2	179.5 ± 32.7	181.4 ± 34.2	0.74
HDL (mg/dL)	52.4 ± 14.9	56.0 ± 15.0**	48.5 ± 11.1	52.9 ± 13.8**	0.26
LDL (mg/dL)	100.1 ± 28.0	101.9 ± 26.3	101.1 ± 31.0	100.2 ± 29.3	0.45
non-HDL (mg/dL)	128.0 ± 29.8	128.1 ± 30.3	131.2 ± 31.6	128.9 ± 33.4	0.37

Table3 (つづき)

After propensity-matching					
	Discontinuation group (n=58)		Low-dose group (n=58)		<i>p</i> value
	Baseline	Endpoint	Baseline	Endpoint	
Body weight (kg)	75.2 ± 12.0	70.8 ± 12.2**	75.5 ± 14.3	72.6 ± 14.0**	< 0.01
BMI (kg/m ²)	27.7 ± 4.0	26.1 ± 4.0**	27.7 ± 4.3	26.6 ± 4.1**	< 0.01
Waist circumference (cm)	94.5 ± 8.0	90.1 ± 7.8**	94.5 ± 10.4	91.7 ± 10.1**	0.63
SBP (mmHg)	132.5 ± 12.9	125.9 ± 15.9**	135.1 ± 17.8	131.8 ± 14.4	0.25
DBP (mmHg)	80.1 ± 9.2	75.2 ± 10.1**	79.9 ± 11.7	77.9 ± 10.6	0.11
FPG (mg/dL)	151.1 ± 35.0	143.3 ± 34.5	150.0 ± 35.0	135.9 ± 22.8**	0.21
HbA1c (%)	7.6 ± 0.6	7.7 ± 0.6	7.5 ± 0.5	7.2 ± 0.5**	< 0.01
Insulin (mU/mL)	10.3 ± 13.0	5.8 ± 3.6*	8.7 ± 7.8	6.5 ± 6.0**	0.83
HOMA-IR	4.1 ± 5.6	2.1 ± 1.9	3.6 ± 4.6	2.3 ± 2.3*	0.31
HOMA-beta	45.7 ± 53.3	28.2 ± 17.2*	38.7 ± 36.3	32.1 ± 24.9	0.56
UA (mg/dL)	5.6 ± 1.3	5.2 ± 1.2**	5.3 ± 1.2	5.0 ± 1.2**	0.16
AST (U/L)	29.6 ± 13.5	22.3 ± 8.9**	26.8 ± 11.7	23.7 ± 10.1**	< 0.05
ALT (U/L)	37.7 ± 22.5	26.0 ± 16.2**	34.5 ± 22.1	26.8 ± 16.5**	0.16
γ-GTP (U/L)	55.9 ± 58.6	38.6 ± 41.2**	49.8 ± 43.4	41.4 ± 41.9**	0.05
Ht (%)	43.6 ± 4.6	45.5 ± 5.4**	43.8 ± 4.6	46.2 ± 4.1**	0.25
ACR (mg/g creatinine)	74.0 ± 170.3	45.0 ± 80.6	124.1 ± 305.6	73.8 ± 148.1*	0.50
eGFR (mL/min/1.73m ²)	79.0 ± 16.4	81.3 ± 17.7*	74.4 ± 17.6	75.0 ± 18.0	0.27
TG (mg/dL)	138.5 ± 86.1	133.3 ± 68.2	136.0 ± 80.8	131.3 ± 89.5	0.95
T-Cho (mg/dL)	174.1 ± 24.8	182.6 ± 29.3	178.8 ± 29.6	182.5 ± 33.3	0.63
HDL (mg/dL)	50.4 ± 13.5	54.3 ± 14.2**	51.9 ± 11.2	56.6 ± 14.4**	0.54
LDL (mg/dL)	96.2 ± 21.0	101.4 ± 23.8	100.4 ± 26.0	100.1 ± 26.6	0.39
non-HDL (mg/dL)	123.4 ± 24.9	127.9 ± 28.6	127.0 ± 27.2	126.5 ± 32.5	0.35

Table3 Propensity matching 前後における試験前後での
各種パラメーター比較

1 : 1 の傾向スコアマッチングの後（各群 58 人）、Discontinuation group と Low-dose group の群内および群間での変化を比較した。（平均 ± SD）統計には、連続変数には unpaired *t* 検定、非連続変数には unpaired *t* 検定、

離散変数には chi-square test 検定を用いて評価した。

p values: mean changes from baseline to the end of the study between the Discontinuation group and the low dose group. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ between baseline and the end of the study. BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; FPG: fasting plasma glucose; HbA1c: haemoglobin A1c; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; HOMA-beta: homeostasis model assessment of beta cell function; UA: uric acid; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; γ -GTP: γ -glutamyl transpeptidase; Ht: haematocrit; ACR: albumin/creatinine ratio; eGFR: estimated glomerular filtration TG: triglyceride; T-Cho: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL: low-density lipoprotein cholesterol.

Table 4 Discontinuation group の試験終了時の切替え成功を目的変数とした多変量解析

	OR	95% CI	<i>p</i> value
HDL-C (mg/dL)	0.90	0.84-0.97	< 0.01
Sulfonylurea dose (mg/day)	0.09	0.01-0.72	< 0.01
Age (year)	0.83	0.70-0.99	< 0.01
BMI (kg/m ²)	1.06	0.80-1.34	0.69
HbA1c (%)	1.16	0.25-5.35	0.85

$R^2=0.3558$

Table 4 Discontinuation group の試験終了時の切替え成功を目的変数とした多変量解析

1 : 1 の傾向スコアマッチングの後（各群 58 人）、Discontinuation group の試験終了時の切替え成功を目的変数とし HDL-C、 sulfonylurea dose、 age、 BMI、 HbA1c を従属変数として Logistic 回帰分析を行った。

BMI: body mass index; HbA1c: haemoglobin A1c; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; OR: odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval.

Table 5 Discontinuation group の試験終了時の切替え成功に関連した
因子のカットオフ値

	Cut-off value	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)
HDL-C (mg/dL)	48.0	0.78	63.6	85.7
Sulfonylurea dose (mg/day)	1.0	0.64	57.2	70.5
Age (year)	62.0	0.70	64.3	70.5

Table 5 Discontinuation group の試験終了時の切替え成功に関連した
因子のカットオフ値

Table 4 の結果より得た Discontinuation group の試験終了時の切替え成功に関連した独立因子のカットオフ値を Figure35 の ROC 曲線より算出した。

HbA1c: haemoglobin A1c; AUC: area under the receiver operating curve; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol.

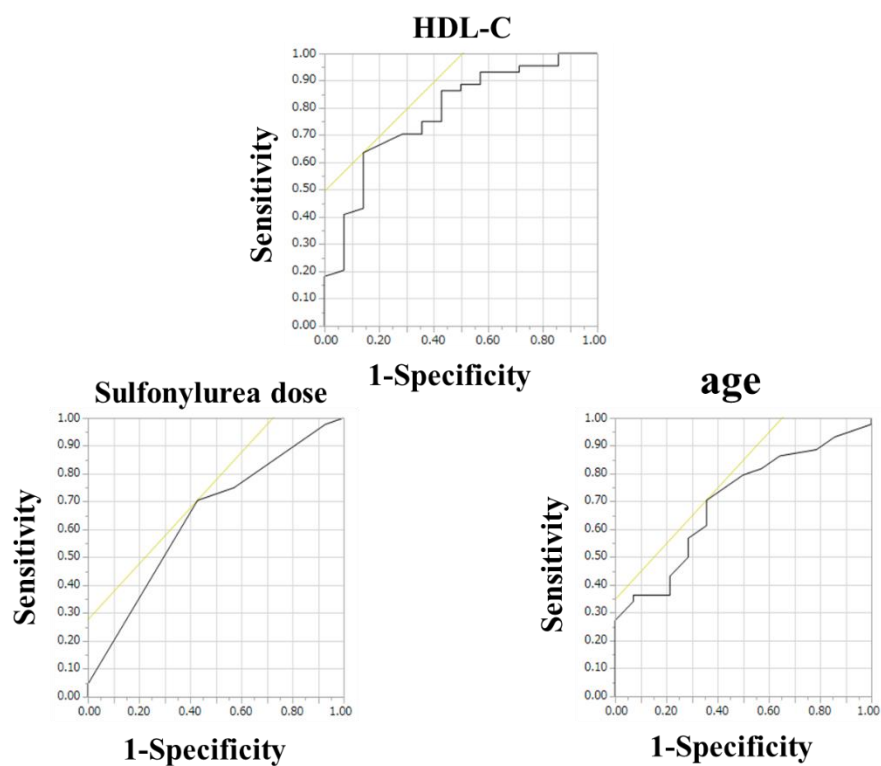


Figure 35 Discontinuation group の切り替え成功に寄与した因子の ROC 曲線

4.3.3 有害事象

Discontinuation group では 22 例、Low-dose group では 20 例の有害事象を認めた。いずれのグループにおいても重篤な有害事象は報告されなかった。両群間で、低血糖が最も多い有害事象であった。Discontinuation group においては 7 例 (6.6%)、Low-dose group では 10 例 (10.6%) で低血糖症状を認めた (Table 6)。両群間で低血糖を経験した患者の多くは、インスリン使用患者であった。(Discontinuation group; 4 例 [40.0%]、Low-dose group; 3 例 [42.9%])。さらに、各群内における試験前後の低血糖頻度の比較では、両群ともに増加は認めなかった (Figure 36)。両群間で、低血糖以外の有害事象は、掻痒、頻尿、糖尿病の悪化、発疹、空腹感、骨折、および生殖器感染であった (Table 6)。

Table 6 試験期間中の副作用

	Discontinuation group (n=106) n (%)	Low-dose group (n=94) n (%)	Total (n=200) n (%)
Hypoglycaemia	7 (6.6)	10 (10.6)	17 (8.5)
Any adverse event	4 (3.8)	2 (2.1)	6 (3.0)
Pruritus	3 (2.8)	1 (1.1)	4 (2.0)
Pollakiuria	2 (1.9)	1 (1.1)	3 (1.5)
Worsening of diabetes	1 (0.9)	1 (1.1)	2 (1.0)
Rash	1 (0.9)	1 (1.1)	2 (1.0)
Hunger sensation		2 (2.1)	2 (1.0)
Fracture	1 (0.9)	1 (1.1)	2 (1.0)
Genital infection	1 (0.9)		1 (0.5)
Dehydration		1 (1.1)	1 (0.5)
Palpitation	1 (0.9)		1 (0.5)
Anacathesia	1 (0.9)		1 (0.5)

Table 6 試験期間中の副作用

Discontinuation group (n=106) と Low-dose group (n=94)における
試験期間の副作用 Values are n (%) of patients

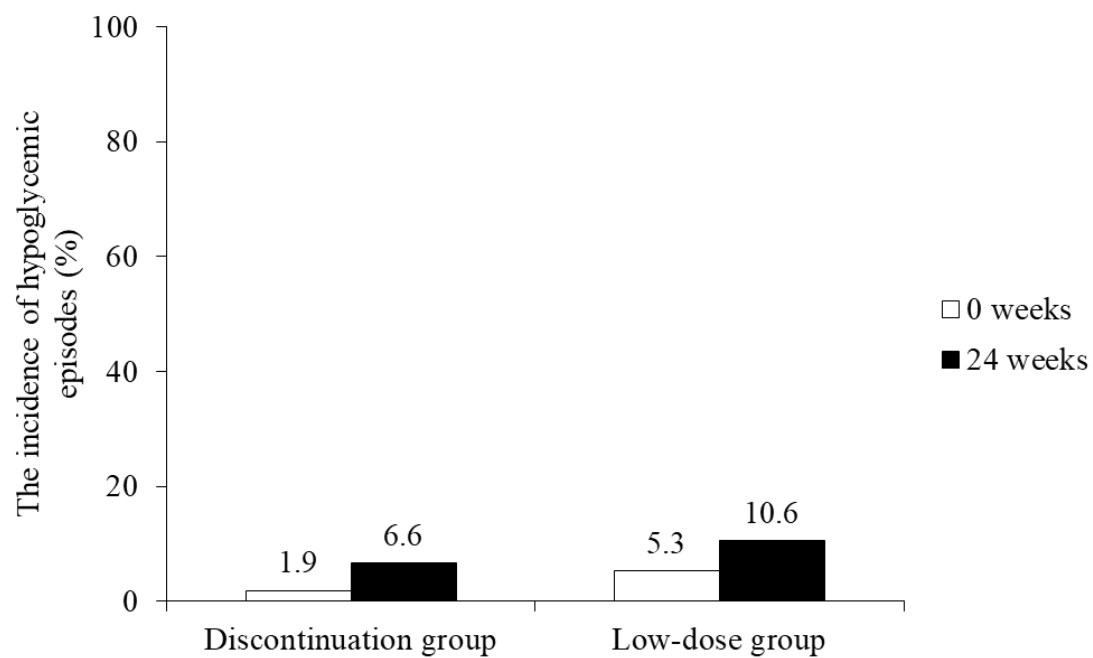


Figure 36 試験前後の低血糖頻度の割合

Discontinuation group (n=106) と Low-dose group (n=94)の各群の試験前後の低血糖頻度の割合。統計には McNemar 検定を行った。

4.4 考 察

24 週間の観察において、重篤ではない軽度の有害事象が約 20%の割合で発生したが (Figure 33)、既報と比較し、有害事象に起因した患者の試験脱落率が低いことがまず一つの特徴である (n = 4、全登録患者の 2%)⁴⁶。このことは、糖尿病専門機関で専門医による治療が行われたことも影響していることが予想される。また、Low-dose group の試験終了時の切り替え成功率が 90%以上であり、Discontinuation group で約 75%であったことから、ipragliflozin を追加投与する際に、SU 薬を最低用量残すことで殆どすべての患者で血糖コントロールを悪化させないことができるが、SU 薬を中止することで、約四分の一の患者は血糖コントロールが悪化してしまうことが明らかになった。高用量の SU 薬と他の経口血糖降下薬の併用に関する以前の報告では、併用療法は血糖コントロールを有意に改善させたものの約 30%低血糖頻度を増加させることが問題点であった^{42,47,48}。一方、本検討では低用量の SU 薬と SGLT2 阻害薬の併用は、低血糖や他の有害事象を増加させることなく血糖コントロールを改善させる点で有益であると考えられた。

SGLT2 阻害薬による内臓脂肪の減少や脂質異常症、高血圧、高尿酸血症、脂肪肝などの代謝異常の改善が臨床的に広く認識されている^{12,14}。一方で、SU 薬は、空腹感や軽度の低血糖症症状に起因する体重増加をしばしば引き起こす^{49,50}。本研究では、体重、BMI および AST は両群とも有意に減少したが、その減少効果の大きさは Low-dose group と比較して Discontinuation group で有意に大きかった。Discontinuation group では Low-dose group と比較し、約 1.7 倍の体重減少を認めたが、理由として ipragliflozin の薬効に加え SU 薬を中止したことによる減量効果がより大きかったことによると考えられた。

logistic 回帰分析において、SU 薬を中止した際の切り替え成功に寄与する背景因子として低 HDL-C、SU 薬低用量、若年が抽出され、中でも低 HDL-C が最も強い寄与因子であった (Table 4)。低 HDL-C はメタボリックシンドロームの診断基準の一つであるように、肥満の 2 型糖尿病患者でも同様に HDL-C レベルが低値であったと報告されている⁵¹。一方で、SGLT2 阻害薬は BMI が高値な症例ほど血糖降下作用が強いことが明らか

になっている⁵²。本検討における Discontinuation group の HDL-C と BMI においても有意な負の相関を認めており ($r = -0.27$ 、 $p < 0.05$)

(Figure 37)、HDL-C が高値の症例では、BMI が低く SGLT2 阻害薬の効果が減弱することで、SU 薬中止後の HbA1c を悪化させやすい可能性が考えられた。以上から HDL-C (48mg / dL 以下)、SU 薬使用量 (1.0mg / 日以下)、および年齢 (62 歳以下) の 2 型糖尿病患者は、SU 薬を中止しても HbA1c を悪化させず、体重減少に加え代謝障害を改善させることが明らかになった。

本研究の限界点として、第一に症例数が少なく調査期間が比較的短い点が挙げられる。本研究結果を証明し知見を拡大するためには、より大きなサンプルサイズでのさらなる研究が必要である。第二に、本研究は、探索的前向き観察研究であるため、主治医の患者選択バイアスが影響している可能性が考えられた。交絡効果を排除するために Propensity score 法を使用し解析したが、無作為化された研究が必要である。第三に、低血糖のエピソードに関して、患者の外来診療時に注意深く問診したものの、一部の患者は低血糖症状に気付かず、低血糖症状のエピソードを両群で見逃された可能性が考えられた。連続的グルコースモニタリングを用いることでこの問題点を解決できると考えられる。最後に、本研究の対象は日本人である。日本人と白人の 2 型糖尿病患者との間には、体格差⁵³や、内因性インスリン分泌能⁵⁴の違いがあるため、我々の結果が外国人に適用できるかは不明である。

結論として、SU 薬内服中の 2 型糖尿病患者に SGLT2 阻害薬を開始する際、SU 薬を中止しても、約四分の三の患者が血糖コントロールを悪化させずに、著しい体重減少と各種代謝パラメーターの改善を期待することができる。一方で、最低用量で SU 薬を残した場合、体重減少効果や代謝パラメーターの改善は限定的であるが、低血糖を増加させることなく確実な血糖コントロールの改善を期待できる。SGLT2 阻害薬を開始する際、SU 薬を中止するか最低用量で残すかは、SGLT2 阻害薬の使用目的に応じて考慮すべきであり、開始前の HDL-C、SU 薬使用量、年齢は SU 薬を中止か減量かを検討するうえで予測因子として有用であると考えられた。

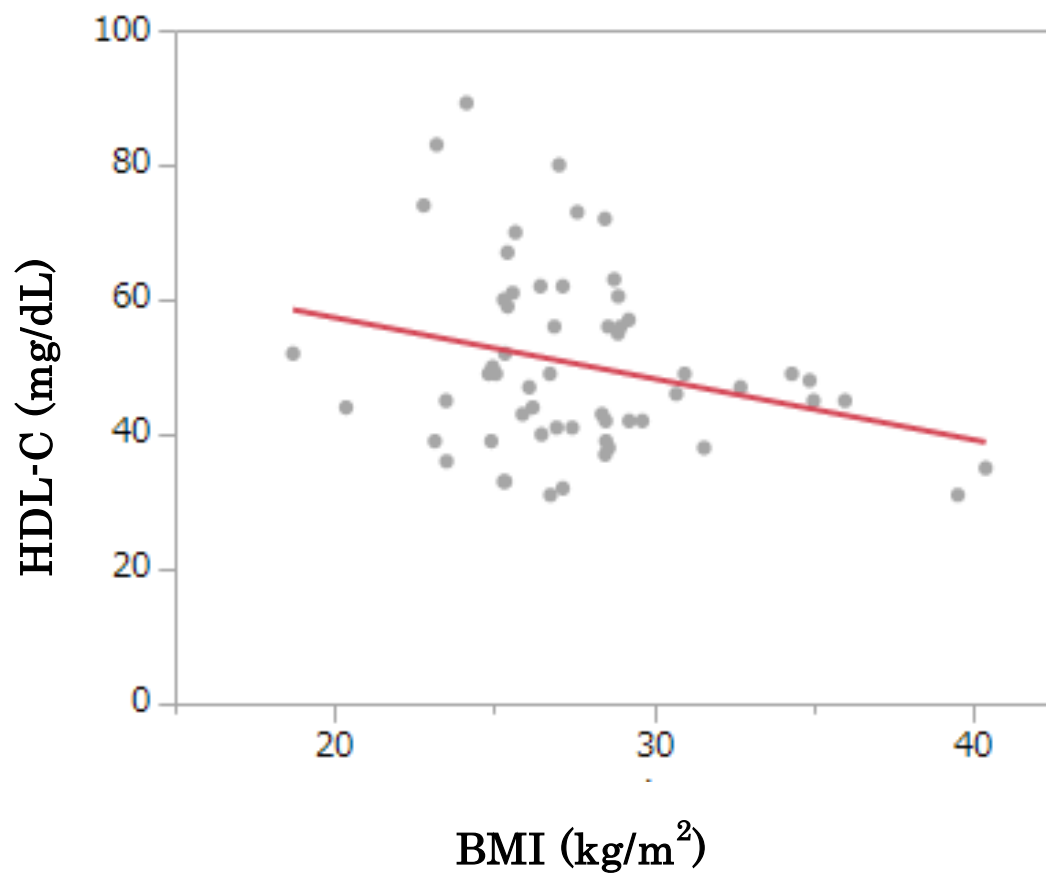


Figure 37 Discontinuation group における HDL-C と BMI の相関
($r = -0.27$, $p < 0.05$)

5. 総括および結論

第一章で SGLT2 阻害薬 luseogliflozin の膵 β 細胞量の保持作用について、異なる週齢の肥満糖尿病モデルマウス db/db マウスを用いて検討した。本研究において明らかとなった知見は以下の通りである。

1. 早期週齢の db/db マウスに luseogliflozin を投与することで耐糖能や膵 β 細胞機能を改善させた。また、膵 β 細胞増殖能を亢進させ膵 β 細胞量を増加させた。
2. そのメカニズムとして、膵島における酸化ストレス関連遺伝子の発現の減少に加え *Mafa*、*Pdx1*、*Nkx6.1* といった遺伝子発現の上昇が確認された。また、免疫染色でも同様に膵 β 細胞内における *Mafa* の発現の上昇を認めた。
3. 異なる週齢の db/db マウスに luseogliflozin を投与し比較した検討では、週齢を問わず control 群に比べて luseo 群で耐糖能や膵 β 細胞機能を改善させて、膵 β 細胞量を増加させた。
4. 早期週齢からの luseogliflozin の投与は、晩期週齢からの投与に比べ有意に膵 β 細胞量を増加させた。

これまで、糖尿病モデルマウスに SGLT2 阻害薬を投与して膵 β 細胞の機能・量についての解析がなされてきているが、糖尿病発症早期または晩期での SGLT2 阻害薬の効果について比較した報告はなかった。他の血糖降下薬（liraglutide、pioglitazone または、その併用）では晩期からの投与では、膵 β 細胞機能や膵 β 細胞量には効果作用が乏しくなることが明らかになっているが、我々は SGLT2 阻害薬には晩期からの投与でも部分的な効果があることを解明した。また、早期からの治療介入の方が晩期からの治療介入に比べより、その効果作用が大きかったことも解明した。

第二章では、SGLT2 阻害薬を開始する際に、SU 薬を中止すべきか否かを検討した。本研究において明らかとなった知見は以下の通りである。

1. SGLT2 阻害薬への切替え成功率は、Low-dose group は Discontinuation group に比べ有意に高値であった (91.4 % vs. 75.9 %, $p < 0.05$)。
2. 体重、BMI および AST は両群とも有意に減少したが、その減少効果の大きさは Low-dose group と比較して Discontinuation group で有意に大きかった。
3. SGLT2 阻害薬を開始する際、HDL-C、SU 薬使用量、年齢は SU 薬を中止か減量かを検討するうえで予測因子として有用であると考えられた。

このように、SGLT2 阻害薬を開始するさい SU 薬を中止するか、最低用量減量するかは、患者の治療目的に応じて考慮すべきであると考えられた。今回、SGLT2 阻害薬に着目し研究を行ったが、我々の知見が、今後の糖尿病の将来の治療戦略の一助につながることを期待する。

謝 辞

原稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院免疫代謝内科学教室 渥美達也教授に謝意を表します。併せて、本研究全般にわたり直接のご指導ご鞭撻を賜りました糖尿病・肥満病態治療分野 三好秀明特任教授、免疫代謝内科学教室 中村昭伸助教に深く感謝いたします。

また本分野 糖尿病・内分泌グループ、NTT 東日本札幌病院 永井聡先生には、終始適切なご指導、ご助言を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

実験助手の藤森なつみさん、渡邊真理華さんのご協力なしに実験を遂行することは不可能でした。感謝を申し上げます。この他にも、この論文作成にあたり、多くの諸先輩方よりご協力、ご助言、ご支援をいただきましたことに、心より感謝を申し上げます。

最後に、本研究を陰になり支えていただきました、内科学講座 免疫・代謝内科学分野の全ての皆様に心より御礼を申し上げます。

7. 引用文献

- 1 Taylor, S. I. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* **97**, 9-12 (1999).
- 2 Butler, A. E. *et al.* Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 102-110 (2003).
- 3 Sakuraba, H. *et al.* Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* **45**, 85-96 (2002).
- 4 U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* **44**, 1249-1258 (1995).
- 5 Dalboge, L. S. *et al.* Characterisation of age-dependent beta cell dynamics in the male db/db mice. *PloS one* **8**, e82813 (2013).
- 6 Puff, R. *et al.* Reduced proliferation and a high apoptotic frequency of pancreatic beta cells contribute to genetically-determined diabetes susceptibility of db/db BKS mice. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **43**, 306-311 (2011).
- 7 Chen, L., Klein, T. & Leung, P. S. Effects of combining linagliptin treatment with BI-38335, a novel SGLT2 inhibitor, on pancreatic islet function and inflammation in db/db mice. *Current molecular medicine* **12**, 995-1004 (2012).
- 8 Thomas, L. *et al.* Long-term treatment with empagliflozin, a novel, potent and selective SGLT-2 inhibitor, improves glycaemic control and features of metabolic syndrome in diabetic rats. *Diabetes, obesity & metabolism* **14**, 94-96 (2012).
- 9 Vallon, V. The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annual review of medicine* **66**, 255-270 (2015).
- 10 Washburn, W. N. Development of the renal glucose reabsorption inhibitors: a new mechanism for the pharmacotherapy of diabetes

- mellitus type 2. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 1785-1794 (2009).
- 11 Zinman, B. *et al.* Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* **373**, 2117-2128 (2015).
 - 12 Yamamoto, C. *et al.* Ipragliflozin effectively reduced visceral fat in Japanese patients with type 2 diabetes under adequate diet therapy. *Endocrine journal* **63**, 589-596 (2016).
 - 13 Neal, B. *et al.* Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *The New England journal of medicine* **377**, 644-657 (2017).
 - 14 Takase, T., Nakamura, A., Miyoshi, H., Yamamoto, C. & Atsumi, T. Amelioration of fatty liver index in patients with type 2 diabetes on ipragliflozin: an association with glucose-lowering effects. *Endocrine journal* **64**, 363-367 (2017).
 - 15 Bonner, C. *et al.* Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nature medicine* **21**, 512-517 (2015).
 - 16 Ferrannini, E. *et al.* Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *The Journal of clinical investigation* **124**, 499-508 (2014).
 - 17 Takahara, M., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Katakami, N. & Shimomura, I. Ameliorated pancreatic beta cell dysfunction in type 2 diabetic patients treated with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor ipragliflozin. *Endocrine journal* **62**, 77-86 (2015).
 - 18 Jurczak, M. J. *et al.* SGLT2 deletion improves glucose homeostasis and preserves pancreatic beta-cell function. *Diabetes* **60**, 890-898 (2011).
 - 19 Okauchi, S. *et al.* Protective effects of SGLT2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic beta-cells in obese type 2 diabetic db/db mice. *Biochemical and biophysical research communications* **470**, 772-782 (2016).
 - 20 Shimo, N. *et al.* Short-term selective alleviation of glucotoxicity and lipotoxicity ameliorates the suppressed expression of key beta-cell factors under diabetic conditions. *Biochemical and biophysical*

- research communications* **467**, 948-954 (2015).
- 21 Kimura, T. *et al.* Protective effects of pioglitazone and/or liraglutide on pancreatic beta-cells in db/db mice: Comparison of their effects between in an early and advanced stage of diabetes. *Molecular and cellular endocrinology* **400**, 78-89 (2015).
 - 22 Shao, Y., Yuan, G., Feng, Y., Zhang, J. & Guo, X. Early liraglutide treatment is better in glucose control, beta-cell function improvement and mass preservation in db/db mice. *Peptides* **52**, 134-142 (2014).
 - 23 Cheng, S. T., Chen, L., Li, S. Y., Mayoux, E. & Leung, P. S. The Effects of Empagliflozin, an SGLT2 Inhibitor, on Pancreatic beta-Cell Mass and Glucose Homeostasis in Type 1 Diabetes. *PloS one* **11**, e0147391 (2016).
 - 24 Yamamoto, K. *et al.* TS-071 is a novel, potent and selective renal sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor with anti-hyperglycaemic activity. *British journal of pharmacology* **164**, 181-191 (2011).
 - 25 Bouwens, L., Wang, R. N., De Blay, E., Pipeleers, D. G. & Kloppel, G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* **43**, 1279-1283 (1994).
 - 26 Matsuoka, T. A. *et al.* Regulation of MafA expression in pancreatic beta-cells in db/db mice with diabetes. *Diabetes* **59**, 1709-1720 (2010).
 - 27 Terami, N. *et al.* Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PloS one* **9**, e100777 (2014).
 - 28 Robertson, R. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of biological chemistry* **279**, 42351-42354 (2004).
 - 29 Okamoto, H. *et al.* Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **116**, 775-782 (2006).
 - 30 Terauchi, Y. *et al.* Glucokinase and IRS-2 are required for

- compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **117**, 246-257 (2007).
- 31 Guo, S. *et al.* Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation* **123**, 3305-3316 (2013).
 - 32 Hang, Y. *et al.* The MafA transcription factor becomes essential to islet beta-cells soon after birth. *Diabetes* **63**, 1994-2005 (2014).
 - 33 Matsuoka, T. A. *et al.* Preserving Mafa expression in diabetic islet beta-cells improves glycemic control in vivo. *The Journal of biological chemistry* **290**, 7647-7657 (2015).
 - 34 Dor, Y. & Glaser, B. beta-cell dedifferentiation and type 2 diabetes. *The New England journal of medicine* **368**, 572-573 (2013).
 - 35 Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L. & Accili, D. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* **150**, 1223-1234 (2012).
 - 36 Wang, Z., York, N. W., Nichols, C. G. & Remedi, M. S. Pancreatic beta cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell metabolism* **19**, 872-882 (2014).
 - 37 Ishida, E., Kim-Muller, J. Y. & Accili, D. Pair Feeding, but Not Insulin, Phloridzin, or Rosiglitazone Treatment, Curtails Markers of beta-Cell Dedifferentiation in db/db Mice. *Diabetes* **66**, 2092-2101 (2017).
 - 38 Nauck, M. A. *et al.* Dapagliflozin versus glipizide as add-on therapy in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycemic control with metformin: a randomized, 52-week, double-blind, active-controlled noninferiority trial. *Diabetes care* **34**, 2015-2022 (2011).
 - 39 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes care* **41**, S73-s85 (2018).
 - 40 Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet (London, England)* **352**, 837-853 (1998).

- 41 Strojek, K. *et al.* Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with glimepiride: a randomized, 24-week, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes, obesity & metabolism* **13**, 928-938 (2011).
- 42 Cefalu, W. T. *et al.* Efficacy and safety of canagliflozin versus glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin (CANTATA-SU): 52 week results from a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet (London, England)* **382**, 941-950 (2013).
- 43 Food & Administration, D. Guidance for industry. Diabetes mellitus: developing drugs and therapeutic biologics for treatment and prevention. *FDA, Rockville, MD* (2008).
- 44 Kamiyama, H. *et al.* Effect of Switching from Sulphonylurea to Repaglinide Twice or Three Times Daily for 4 Months on Glycemic Control in Japanese Patients with Type 2 Diabetes. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* **55**, 1697-1703 (2016).
- 45 Basit, A., Riaz, M. & Fawwad, A. Glimepiride: evidence-based facts, trends, and observations (GIFTS). [corrected]. *Vascular health and risk management* **8**, 463-472 (2012).
- 46 Yokote, K., Terauchi, Y., Nakamura, I. & Sugamori, H. Real-world evidence for the safety of ipragliflozin in elderly Japanese patients with type 2 diabetes mellitus (STELLA-ELDER): final results of a post-marketing surveillance study. *Expert opinion on pharmacotherapy* **17**, 1995-2003 (2016).
- 47 Barnett, A. H. *et al.* Linagliptin for patients aged 70 years or older with type 2 diabetes inadequately controlled with common antidiabetes treatments: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)* **382**, 1413-1423 (2013).
- 48 Gallwitz, B. *et al.* Regardless of the degree of glycaemic control, linagliptin has lower hypoglycaemia risk than all doses of glimepiride, at all time points, over the course of a 2-year trial. *Diabetes, obesity & metabolism* **17**, 276-284 (2015).
- 49 Mitri, J. & Hamdy, O. Diabetes medications and body weight. *Expert opinion on drug safety* **8**, 573-584 (2009).
- 50 Draeger, E. Clinical profile of glimepiride. *Diabetes research and*

- clinical practice* **28 Suppl**, S139-146 (1995).
- 51 Tanaka, S., Honda, M., Wu, B. & Kazumi, T. Clinical features of normal weight Japanese patients with type 2 diabetes who had formerly been obese. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **18**, 115-121 (2011).
- 52 Sakai, S. *et al.* Efficacy and Safety of the SGLT2 Inhibitor Luseogliflozin in Japanese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Stratified According to Baseline Body Mass Index: Pooled Analysis of Data From 52-Week Phase III Trials. *Clinical therapeutics* **38**, 843-862.e849 (2016).
- 53 Sone, H., Ito, H., Ohashi, Y., Akanuma, Y. & Yamada, N. Obesity and type 2 diabetes in Japanese patients. *Lancet (London, England)* **361**, 85 (2003).
- 54 Kosaka, K., Kuzuya, T., Hagura, R. & Yoshinaga, H. Insulin response to oral glucose load is consistently decreased in established non-insulin-dependent diabetes mellitus: the usefulness of decreased early insulin response as a predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetic medicine* **13**, S109-119 (1996).