



Title	SGLT2阻害薬による膵β細胞保護作用の機序の解明〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	山内, 裕貴
Description	配架番号 : 2719
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14984号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85862
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAUCHI_Yuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 山内 裕貴

学 位 論 文 題 名

SGLT2 阻害薬による膵β細胞保護作用の機序の解明

(Elucidation of the mechanism underlying the preservation of pancreatic beta-cell mass and function by sodium glucose co-transporter 2 inhibitor)

【背景と目的】

2 型糖尿病におけるインスリン分泌低下の本質的な治療には膵β細胞の量と機能を保持することが重要である。われわれは Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬の 1 つであるルセオグリフロジンの投与により糖尿病モデルマウスでみられる高血糖や膵β細胞量・機能の低下が改善されることを明らかにした(Takahashi et al.,2018)。しかしながらその詳細な機序は明らかになっておらず、本研究ではルセオグリフロジンによる膵β細胞保護作用の機序を解明することを目的とした。

【対象と方法】

肥満 2 型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウス(雄 6 週齢)を普通食飼育群 (control 群) と 0.01%ルセオグリフロジン含有特別食飼育群 (luseo 群)に分けた。4 週間の飼育後に膵島を単離し DNA マイクロアレイ法および Real-time PCR 法による遺伝子発現の解析を行った。また単離膵島に対しサポニンによる透過処理を行い、高精度レスピロメーター (Oxygraph-2k)により、ミトコンドリアの電子伝達系を構成する各複合体の基質や阻害剤を加えた時の呼吸能を測定した。同時に superoxide dismutase (SOD)を加えて生成される hydrogen peroxide (H₂O₂)を、Amplex® Ultra red と反応させて蛍光物質とし、蛍光光度計により測定することでミトコンドリアにおける酸化ストレスを評価した。また膵切片の免疫染色と電子顕微鏡による観察によりミトコンドリアの形態学的評価を行った。さらに、単離膵島を用いてメタボローム解析を行い、代謝産物の濃度を評価した。

【結果】

DNA マイクロアレイ法による解析では、control 群と比べ luseo 群において発現が 1.5 倍以上に上昇している遺伝子が 300 個、0.67 倍未満に低下している遺伝子が 634 個であった。control 群と比べ luseo 群で発現が上昇している遺伝子の上位に、解糖系や電子伝達系に関する遺伝子が含まれていた。Pathway 解析では解糖系や tricarboxylic acid (TCA)サイクルに関連する代謝経路において有意な変化を認めた。Gene ontology 解析の生物学的プロセスでは luseo 群で発現が上昇している遺伝子のうち細胞周期や細胞分裂に関連する遺伝子が上位を占めた。Real-time PCR 法による解析では、ブドウ糖の細胞内取り込みに関わる

solute carrier family 2 member 2 (*Slc2a2*)や TCA サイクルでの糖代謝に関わる pyruvate carboxylase (*Pcx*)の遺伝子発現が luseo 群で有意に上昇していた。また TCA サイクルの反応に関わる複数の酵素の遺伝子発現が luseo 群で有意に上昇していた。ミトコンドリアの電子伝達系の呼吸能測定では、control 群と比べ luseo 群で Complex II 由来の呼吸能が有意に高かった。また luseo 群では control 群に比べ、Complex II および Complex I + II 由来の H_2O_2 の産生が有意に抑制されていた。ミトコンドリア外膜のマーカーである translocase of outer mitochondrial membrane 20 (Tom20)による免疫染色では、luseo 群においてミトコンドリアのネットワークが膵 β 細胞全体に広がっていたが、control 群ではネットワークが障害され断片化していた。luseo 群の膵 β 細胞におけるミトコンドリアの面積は control 群より有意に大きかった ($41.8 \pm 9.0 \mu m^2$ vs. $59.3 \pm 8.5 \mu m^2$, $p < 0.01$)。電子顕微鏡による観察では control 群でミトコンドリアの膨化を認めたが、luseo 群では膨化が抑制され形態が正常に保持されていた。膵 β 細胞の成熟や分化に関わる NK6 homeobox 1 (Nkx6.1)の免疫染色では、luseo 群で膵 β 細胞における Nkx6.1 陽性細胞の割合が有意に高かった ($75.3 \pm 3.5\%$ vs. $89.8 \pm 1.8\%$, $p < 0.01$)。メタボローム解析では、control 群と比べ luseo 群で TCA サイクルにおける中間代謝産物の濃度が高かった。また両群間で adenosine triphosphate (ATP)の濃度に差は認めなかったが、インスリン分泌に関わる nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)やグルタミン酸の濃度は luseo 群で高かった。さらに酸化ストレスの指標である oxidized glutathione (GSSG)と reduced glutathione (GSH)の比は luseo 群で有意に低かった。

【考察】

慢性的な高血糖は膵 β 細胞における reactive oxygen species (ROS)の産生を増加させ、ミトコンドリアの電子伝達系を障害することでさらに ROS の産生を増加させる悪循環を形成する (Giorgi et al., 2018)。Nkx6.1 はグルコーストランスポーターや、TCA サイクルでの反応に関わる *Pcx* の発現を調節し糖代謝を改善させるとともに膵 β 細胞の増殖にも関与しているが (Taylor et al., 2013)、抗酸化酵素の遺伝子導入による酸化ストレスの抑制は、*db/db* マウスにおいて低下している Nkx6.1 の発現を改善することが報告されている (Guo et al., 2013)。本研究において、SGLT2 阻害薬による血糖改善効果はミトコンドリアにおける過剰な ROS の産生とそれによる電子伝達系 Complex II の障害という悪循環を是正したと考えられる。過剰な酸化ストレスの抑制は Nkx6.1 の発現を改善し、TCA サイクルにおける糖代謝を改善したことで、膵 β 細胞量や機能の保護に寄与したことが示唆された。

【結論】

SGLT2 阻害薬による血糖改善効果は、ミトコンドリアにおける過剰な酸化ストレスの抑制と電子伝達系 Complex II の保護を介して、膵 β 細胞の成熟や分化に関わる Nkx6.1 の発現を改善し、膵 β 細胞量や機能を保護した可能性が示唆された。膵 β 細胞におけるミトコンドリアの電子伝達系 Complex II の保護は、2 型糖尿病の新たな治療ターゲットの 1 つとなるかもしれない。