



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	SGLT2阻害薬による膵β細胞保護作用の機序の解明 [全文の要約]
Author(s)	山内, 裕貴
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2719 他
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/2115/86079
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAUCHI_Yuki_summary.pdf



学位論文（要約）

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)

2022 年 3 月

北海道大学

山内 裕貴

Yuki Yamauchi

学位論文（要約）

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)

2022 年 3 月

北海道大学

山内 裕貴

Yuki Yamauchi

【背景と目的】

2 型糖尿病はインスリン作用不足による慢性の高血糖を主徴とする代謝症候群である。インスリン作用不足はインスリン抵抗性の増大とインスリン分泌の低下により生じる。インスリン分泌の低下には膵β細胞量の減少と膵β細胞機能の低下が密接に関与しており、膵β細胞量と機能を保護することは 2 型糖尿病の病態に即した本質的な治療と考えられる。

先行研究において、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が明らかとなった。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 SGLT2 阻害薬による膵β細胞保護作用の機序を解明し、2 型糖尿病における新たな治療ターゲットを探索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、10 週齢の時点で膵島を単離し、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 (H_2O_2)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 reactive oxygen species (ROS)産生を評価した。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遺伝子発現の解析では、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は 164 個、0.67 倍未満に低下している遺伝子は 309 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、ブドウ糖の細胞内取り込み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 control 群と比べ 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。また Real-time PCR 法による解析を行ったところ、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 control 群と比べ 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。遺伝子発現の解析結果からミトコンドリアに着目し、膵島におけるミトコンドリア機能について評価した。ミトコンドリアの電子伝達系の呼吸能は、control 群と比べ luseo 群で Complex II に由来する呼吸能が有意に高かった。また control 群と比べ luseo 群では、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。次に形態学的な評価としてミトコンドリア外膜のマーカーである translocase of outer mitochondrial membrane 20 (Tom20)の免疫染色を行った。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。control 群と比べ luseo 群で膵β細胞におけるミトコンドリアの面積は有意に大きかった ($41.8 \pm 9.0 \mu\text{m}^2$ vs. $59.3 \pm 8.5 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$)。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、control 群と比べ 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. $89.8 \pm 1.8 \%$, $p < 0.01$)。単離膵島のメタボローム解析による代謝産物の評価を行ったところ、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 control 群と比べ 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 control 群と比べ luseo 群で有意に低かった。

【考察】

SGLT2 阻害薬が膵β細胞に直接作用しないことや、高血糖自体が TCA サイクルや電子伝達系におけるブドウ糖代謝を低下させる主因であることから、本研究の結果は主にルセオグリフロジンによる高血糖の改善を介した間接的な効果と考えられる。慢性的な高血糖は膵β細胞における ROS の産生を増加させ、ミトコンドリアの機能不全とさらなる ROS の産生という悪循環を形成する。本研究ではルセオグリフロジンの投与が高血糖を改善し、膵β細胞におけるミトコンドリアの電子伝達系 Complex II に由来する呼吸能を改善し、ROS の産生を抑制することを示した。したがってルセオグリフロジンによるブドウ糖毒性の解除はこの悪循環を是正することで膵β細胞を保護する可能性が示唆された。

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* の発現を調節しブドウ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。NKX6.1 の発現は *db/db* マウスにおいて低下しているが、抗酸化酵素の遺伝子導入による酸化ストレスの抑制がその発現を改善することが報告されている。本研究において、過剰な酸化ストレスの抑制が膵β細胞における NKX6.1 の発現を改善し、TCA サイクルにおけるブドウ糖代謝を改善したことで、膵β細胞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、TCA サイクルにおけるブドウ糖代謝を改善することで膵β細胞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となるかもしれない。