



Title	SGLT2阻害薬による膵β細胞保護作用の機序の解明
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14984">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14984</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/86130">https://hdl.handle.net/2115/86130</a>
Type	doctoral thesis
File Information	YAMAUCHI_Yuki.pdf



学位論文

SGLT2 阻害薬による膵  $\beta$  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

SGLT2 阻害薬による膵  $\beta$  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

## 目次

発表論文目録及び学会発表目録.....	1 頁
1. 要旨 .....	2 頁
2. 略語表 .....	4 頁
3. 緒言 .....	6 頁
4. 目的 .....	9 頁
5. 対象と方法.....	10 頁
5.1 研究デザイン.....	10 頁
5.2 対象.....	10 頁
5.3 評価項目 .....	10 頁
5.4 随時血糖の測定.....	11 頁
5.5 膵島単離.....	11 頁
5.6 マイクロアレイ解析 .....	11 頁
5.7 Real-time PCR 法による解析.....	12 頁
5.8 単離膵島の透過処理.....	14 頁
5.9 ミトコンドリア呼吸能測定.....	14 頁
5.10 ミトコンドリアにおける ROS 産生の測定 .....	15 頁
5.11 アコニターゼ活性の測定 .....	15 頁
5.12 膵の組織学的評価 .....	16 頁
5.13 免疫組織染色（蛍光抗体法） .....	16 頁
5.14 電子顕微鏡による観察 .....	18 頁
5.15 メタボローム解析 .....	18 頁
5.16 統計学的解析.....	19 頁
6. 結果 .....	20 頁
6.1 随時血糖.....	20 頁
6.2 DNA マイクロアレイによる膵島の遺伝子発現の解析.....	22 頁
6.3 Real-time PCR 法による膵島の遺伝子発現の解析.....	31 頁
6.4 膵島におけるミトコンドリア呼吸能と酸化ストレスの評価 .....	35 頁
6.5 膵島におけるアコニターゼ活性の評価 .....	41 頁
6.6 膵β細胞のミトコンドリアの形態学的評価.....	43 頁
6.7 膵β細胞における NKX6.1 の発現.....	47 頁
6.8 膵島における細胞内代謝産物の評価 .....	50 頁
7. 考察 .....	56 頁
8. 結語 .....	59 頁

9. 結論 .....	60 頁
10. 謝辭 .....	61 頁
11. 利益相反 .....	62 頁
12. 引用文献.....	63 頁

# 発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として投稿中である。

1. Yuki Yamauchi, Akinobu Nakamura, Takashi Yokota, Kiyohiko Takahashi, Shinichiro Kawata, Kazuhisa Tsuchida, Kazuno Omori, Hiroshi Nomoto, Hiraku Kameda, Kyu Yong Cho, Toshihisa Anzai, Shinya Tanaka, Yasuo Terauchi, Hideaki Miyoshi, Tatsuya Atsumi. Luseogliflozin preserves the pancreatic beta-cell mass and function of *db/db* mice by improving mitochondrial function. *The Journal of Physiology*, Submitted.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yamauchi Y, Nakamura A, Yokota T, Takahashi K, Kawata S, Tsuchida K, Omori K, Nomoto H, Kameda H, Cho KY, Anzai T, Tanaka S, Terauchi Y, Miyoshi H, Atsumi T. Improved mitochondrial function by luseogliflozin prevents pancreatic beta-cell damage. American Diabetic Association's 81<sup>st</sup> Scientific Sessions (ADA 2021). 25-29 June, 2021. A virtual experience
2. Yamauchi Y, Nakamura A, Takahashi K, Kawata S, Tsuchida K, Omori K, Nomoto H, Kameda H, Cho KY, Yokota T, Anzai T, Miyoshi H, Terauchi Y, Atsumi T. Luseogliflozin protects pancreatic beta cells via improving mitochondrial metabolism. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (EASD 2020). 21-25 September, 2020. A virtual experience
3. 山内裕貴、中村昭伸、横田卓、高橋清彦、川田晋一郎、土田和久、大森一乃、野本博司、亀田啓、曹圭龍、安斉俊久、田中伸哉、寺内康夫、三好秀明、渥美達也。「SGLT2 阻害薬はミトコンドリア機能の改善を介し膵β細胞を保護する」。第64回日本糖尿病学会年次学術集会、2021年5月20-22日、Web
4. 山内裕貴、中村昭伸、三好秀明、関崎知紀、川田晋一郎、土田和久、柴山惟、大森一乃、高橋清彦、野本博司、亀田啓、曹圭龍、寺内康夫、渥美達也。「SGLT2 阻害薬ルセオグリフロジンによる膵β細胞保護作用の機序の解明」。第63回日本糖尿病学会年次学術集会、2020年10月5-16日、Web

# 1. 要旨

## 【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。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(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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)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 164 個、0.67 倍未満に低下している遺伝子が 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、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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 ( $41.8 \pm 9.0 \mu\text{m}^2$  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  $\beta$  細胞の成熟や分化に関わる Nkx6.1 (Nkx6.1) の免疫染色では、luseo 群で膵  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  細胞の成熟や分化に関わる Nkx6.1 の発現を改善し、膵  $\beta$  細胞量や機能を保護した可能性が示唆された。膵  $\beta$  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。

## 2. 略語表

本文中のおよび図中で使用した略語は以下の通りである.

<i>Aco2</i>	aconitase 2
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
ATP	adenosine triphosphate
CI_L	leak state respiration with complex I-linked substrates
CI_P	complex I-linked oxidative phosphorylation capacity
CI+II_P	complex I+II-linked oxidative phosphorylation capacity
CII_P	complex II-linked oxidative phosphorylation capacity
<i>Ccnd2</i>	cyclin D2
<i>Cox6a2</i>	cytochrome c oxidase subunit 6A2
<i>Cs</i>	citrate synthase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Glut2	glucose transporter2
GSH	reduced glutathione
GSSG	oxidized glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide
<i>Idh2</i>	isocitrate dehydrogenase 2
KRBH	Krebs-Ringer's solution bicarbonate / Hepes
Mafa	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
<i>Mdh2</i>	malate dehydrogenase 2
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NKX6.1	NK6 homeobox 1
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxide
<i>Ogdh</i>	oxoglutarate dehydrogenase
PBS	phosphate-buffered saline
Pcx	pyruvate carboxylase
Pdx-1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PFA	paraformaldehyde
RCR	respiratory control ratio

ROS	reactive oxygen species
ROX	residual oxygen consumption
SCR	substrate control ratio
<i>Sdha</i>	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit a
SGLT2	sodium–glucose cotransporter 2
<i>Slc2a2</i>	Solute carrier family 2 member 2
SOD	superoxide dismutase
TCA	tricarboxylic acid cycle
TMPD	N,N,N',N'-tert-methyl-p-phenyldiamine
Tom20	translocase of outer mitochondrial membrane 20

### 3. 緒言

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と定義される。インスリン作用不足は肥満等により生じる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すると考えられている。実際、健常人と比較して 2 型糖尿病患者では膵β細胞量が 60%も低下していることが報告されている(Butler et al., 2003)。また膵β細胞機能の低下は糖尿病発症早期から明らかであり、罹病期間に応じて進行性に低下していく(U.K. Prospective Diabetes Study Group., 1995; Ferrannini et al., 2005, Figure 1)。したがって、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。

本邦において 2014 年から実臨床で使用可能となった sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬は、近位尿細管からのブドウ糖の再吸収を抑制することで尿糖排出を亢進し、持続的に血糖を低下させる薬剤である。SGLT2 受容体は膵β細胞には発現していないことから (Chae et al., 2020)、SGLT2 阻害薬は主に血糖の改善を介して膵β細胞に間接的に作用すると考えられている。先行研究では、肥満糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスを用いて、SGLT2 阻害薬が膵β細胞に与える効果を検討している。この研究では SGLT2 阻害薬の 1 つであるルセオグリフロジンを *db/db* マウスに 4 週間投与したところ、投与していない群に比べ随時血糖は有意に低下し、膵β細胞量が増え、膵β細胞機能の指標である血糖インスリン比や膵島内インスリン量が増加したことを示した (Takahashi et al., 2018)。しかし、SGLT2 阻害薬が膵β細胞量や膵β細胞機能を保護するメカニズムは明らかになっていない。SGLT2 阻害薬が膵β細胞を保護するメカニズムを明らかにすることは、2 型糖尿病における新たな治療ターゲットを探索し今後の治療を発展させるうえで重要である。

膵β細胞の機能維持においてミトコンドリアは重要な役割を担っており、糖尿病モデルマウスでは膵β細胞のミトコンドリア機能が低下していることが報告されている(Haythorne et al., 2019)。さらに、ミトコンドリアは reactive oxygen species (ROS) の主要な産生源であり、高血糖は膵β細胞のミトコンドリアにおける過剰な ROS の産生を誘導しインスリン分泌を抑制する(Sakai et al., 2003)。したがって、膵β細胞におけるミトコンドリア機能不全は、2 型糖尿病の発症・進展に寄与している可能性がある。

本研究では、まず SGLT2 阻害薬の投与が *db/db* マウスの膵島にもたらす遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、その結果からミトコンドリアに着目した。そして仮説として、SGLT2 阻害薬が *db/db* マウスの膵島におけるミトコンドリア機能を改善し、過剰な ROS の産生を抑制することで膵β細胞を保護するのではないかと考え検証することとした。

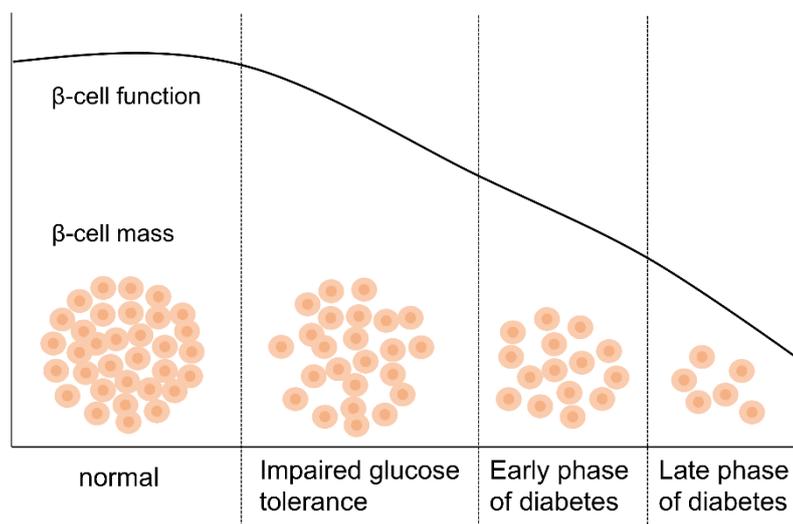


Figure 1. 膵 $\beta$ 細胞量・機能の推移  
膵 $\beta$ 細胞量・機能の経時的な変化を示した

## 4. 目的

先行研究により SGLT2 阻害薬が膵β細胞量を増加させ膵β細胞機能を改善することが明らかとなったが、その機序は明らかではない。そこで本研究では、SGLT2 阻害薬の一つであるルセオグリフロジンの投与により膵β細胞量や膵β細胞機能が保護される機序を解明し、2型糖尿病の新規治療ターゲットを探索することを目的とした。

## 5. 対象と方法

### 5.1 研究デザイン

6 週齢の雄性 *BKS.Cg-Dock7m* *+/+* *Leprdb/J* (*db/db*) マウスを、普通食飼育群 (control 群) と 0.01%ルセオグリフロジン含有食飼育群 (*luseo* 群) の 2 群に分けて 4 週間、10 週齢まで飼育した。

### 5.2 対象

6 週齢の雄性 *db/db* マウスは、オリエンタル酵母株式会社から購入した。すべての実験において、1 ケージあたり 2 匹または 3 匹のマウスを飼育した。マウスの飼育環境は、室温 25°C 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。実験には雄性のマウスを用いた。普通食は CE-2 (CLEA., Tokyo, Japan) を使用した。ルセオグリフロジン含有食は CE-2 に 0.01% のルセオグリフロジン (Taisho Pharmaceutical, Tokyo, Japan) を混餌し 4°C で保存して使用した。

### 5.3 評価項目

主要評価項目は負荷 4 週後のミトコンドリア呼吸能と酸化ストレスの産生とした。6 週から 10 週までの随時血糖を測定した。10 週齢のマウスの単離膵島を用いたマイクロアレイ解析、Real-time PCR 解析による遺伝子発現の検討を行った。また、10 週齢のマウスにおける膵組織の免疫組織学的染色、電子顕微鏡による観察を行った。さらに、単離膵島を用いたメタボローム解析による代謝産物の評価を行った。

## 5.4 随時血糖の測定

5.2 の条件で飼育した各群 30 匹のマウスの血糖値を 6 週齢から 10 週齢まで毎週自由摂食下で測定した。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。

## 5.5 膵島単離

5.2の条件で飼育したマウスを10週齢で屠殺し、開腹したのち総胆管を露出させた。十二指腸乳頭部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°Cで24分間温振した。その後、複数回に分けてfetal bovine serum (FBS: Gibco BRL, Paisley, UK)を添加した反応停止液 (Hanks' balanced salt solution :Sigma-Aldrich) を加え攪拌・上清の吸引を繰り返す、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。

## 5.6 マイクロアレイ解析

10 週齢、各群 4 匹のマウスの単離膵島からの全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出し、Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA)を使用した。差分発現遺伝子は、少なくとも 1.5 倍以上の変化を示した遺伝子と定義した。解析には Microarray Data Analysis Tool Ver 3.2 (Filgen, Nagoya, Japan)を用い、Pathway 解析は over-representation analysis approaches により行った。

## 5.7 Real-time PCR 法による解析

10 週齢、各群 3~4 匹のマウスの単離腓島から、RNeasy Mini Kit (Qiagen) 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<sup>®</sup> III, RNaseOUT, 5x Fast Standard Buffer (以上 Life Technologies) を用いて cDNA を作製し、power SYBR Green (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を用いた定量的 Real-time PCR 法で各種遺伝子発現量を定量した。使用したプライマー配列は、Table 1 に記載した。内因性コントロールとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

Table 1. 定量的 Real-time PCR 法に用いたプライマーの配列

Primer name	Sequence
<i>Gapdh</i>	
Forward	GGCCCCTCTGGAAAGCTGTGGTGT
Reverse	GTTGGGGGCCGAGTTGGGATAGG
<i>Slc2a2</i>	
Forward	TGTGCTGCTGGATAAATTCG
Reverse	TTCAGCAACCATGAACCAAG
<i>Pcx</i>	
Forward	CTGAAGTTCCAAACAGTTCGAGG
Reverse	CGCACGAAACACTCGGATG
<i>Cs</i>	
Forward	AACTCAGGACGGGTTGTTCCAG
Reverse	TAGTAATTCATCTCCGTCATGCC
<i>Aco2</i>	
Forward	TGGGTGGTGATTGGAGATGA
Reverse	ATCTGGGTCTCGTTGAAGGT
<i>Idh2</i>	
Forward	GAAGGTGTGCGTGGAGAC
Reverse	CCGTGGTGTTCAGGAAGT
<i>Ogdh</i>	
Forward	TGCAGATGTGCAATGATGAC
Reverse	GCAGCACATGGAAGAAGTTG
<i>Sdha</i>	
Forward	GGAACACTCCAAAAACAGACCT
Reverse	CCACCACTGGGTATTGAGTAGAA
<i>Mdh2</i>	
Forward	TTCAACACCAACGCTACCATTGTG
Reverse	GTGTTGCTCTGACGATGTCAAGG
<i>Nkx6.1</i>	
Forward	CTGCACAGTATGGCCGAGATG
Reverse	CCGGGTTATGTGAGCCCAA
<i>Ccnd2</i>	
Forward	AAGCCTGCCAGGAGCAAA
Reverse	ATCCGGCGTTATGCTGCTCT

## 5.8 単離腓島の透過処理

10 週齢、3~5 匹のマウスから単離された 500 個の腓島に、BIOPS (CaK<sub>2</sub>EGTA 2.77 mmol/L, EGTA 7.23 mmol/L, taurine 20 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 6.56 mmol/L, ATP 5.77 mmol/L, phosphocreatine 15 mmol/L, dithiothreitol 0.5 mmol/L, 4-morpholineethanesulfonic acid 50 mmol/L, pH 7.1)により 50 µg/mL に希釈したサポニン(Sigma-Aldrich)を添加し、氷上で 20 分間振盪した。振盪後、MiR05 (sucrose 110 mmol/L, K-lactobionate 60 mmol/L, EGTA 0.5 mmol/L, 0.1% essentially fatty acid-free bovine serum albumin, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L, taurine 20 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mmol/L, HEPES 20 mmol/L, pH 7.1) を添加し、氷上で 5 分間計 2 回振盪しサポニンを洗い流した。

## 5.9 ミトコンドリア呼吸能測定

5.8 で透過処理を行った 500 個の腓島を 1 検体とし、各群 7 検体のミトコンドリア呼吸能を高精度レスピロメーター (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria)により 37°C 下で測定した。500 個の腓島を Oxygraph-2k のチャンバーに加え、以下の順で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添加した。

- 1) glutamate (5 mmol/L), malate (1 mmol/L)
- 2) ADP (1.25 mmol/L)
- 3) succinate (10 mmol/L)
- 4) rotenone (0.5 µmol/L)
- 5) antimycin A (5 µmol/L)
- 6) ascorbate (0.5 mmol/L), N,N,N',N'-tert-methyl-p-phenyldiamine (TMPD, 2 mmol/L)
- 7) sodium azide (10 mmol/L)

最初に Complex I の基質である glutamate と malate を加え、電子のリークによる酸素消費(leak state respiration, CI\_L)を測定した。次に ADP を添加し、Complex I 由来の呼吸能(Complex I-linked oxidative phosphorylation capacity, CI\_P)を測定した。次に Complex II の基質である succinate を加え、Complex I+II 由来の呼吸能 (Complex I+II-linked oxidative phosphorylation capacity, CI+II\_P) を測定した。次に Complex I の阻害剤である rotenone を加え、Complex II 由来の呼吸能 (Complex II-linked oxidative phosphorylation capacity, CII\_P)を測定した。次に Complex I と

Complex III の阻害剤である antimycin A を加え、非ミトコンドリア由来の酸素消費である residual oxygen consumption (ROX) を測定し、この値を各測定値より差し引いた。次に Complex IV の基質である ascorbate と TMPD を加え、Complex IV 由来の呼吸能を測定した。最後に Complex IV の阻害剤である sodium azide を添加し、この値を Complex IV の呼吸能より差し引いた。測定値の解析には DatLab software version 7.0 (Oroboros Instruments) を用いた。またミトコンドリアの数に依存しない呼吸能の指標である respiratory control ratio (RCR) は CI\_P、CI+II\_P、CII\_P を CI\_L で除することで、呼吸能の比率である substrate control ratio (SCR) は CI\_P、CII\_P を CI+II\_P で除することで算出した。

## 5.10 ミトコンドリアにおける ROS 産生の測定

5.9 と同時に豚島のミトコンドリアにおける ROS 産生を Oxygraph-2k に備え付けられた蛍光光度計 (Fluorescence LED2-Module; Oroboros Instruments) により測定した。500 個の豚島を Oxygraph-2k のチャンバーに加え、superoxide dismutase (SOD, 5U/mL) を添加してミトコンドリアから発生する superoxide ( $O_2^-$ ) を hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) に変換した。次に horseradish peroxidase (1 U/mL) と Amplex® UltraRed reagent (10  $\mu$ mol/L; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を添加し作用させた。 $H_2O_2$  は Amplex® UltraRed reagent と 1 : 1 で反応し、その反応は horseradish peroxidase により触媒され、蛍光化合物である resorufin が生成される。resorufin の励起波長は 525 nm であり蛍光検出波長は 587 nm であった。ミトコンドリア呼吸能の測定中、resorufin の蛍光を連続的に記録した。 $H_2O_2$  の産生は、基質による干渉の可能性を排除するため、各基質の添加前後に  $H_2O_2$  を 0.1  $\mu$ mol/L ずつ添加して校正した。

## 5.11 アコニターゼ活性の測定

10 週齢の複数匹のマウスから単離された 250 個程度の豚島を 1 検体とし、各群 5 検体のアコニターゼ活性を Aconitase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を用いて測定した。豚島に Aconitase assay buffer (Tris-HCl) を 200  $\mu$ L 加え 1 分間のソニケーションを行い、4°C、800 g、10 分間で遠心した。上清のタンパク濃度を測定し、豚島から抽出したタンパクを 500~1000  $\mu$ g/mL の濃度になるよう Aconitase assay buffer で希釈した。96well プレートに希釈したタンパクとキット

の試薬を添付文書通りに添加し、37°C下で産生される NADPH の吸光度を検出波長 340 nm で 1 分おきに 30 分間測定した。測定値の変化量からアコニターゼ活性を算出した。

## 5.12 膵の組織学的評価

5.2 と同様の条件で 2 群のマウスを飼育し、10 週齢で各群 3 匹のマウスを屠殺し膵臓を切離した。切離した膵臓は 4% paraformaldehyde (PFA) / phosphate-buffered saline (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、各群 5 切片に対し下記に示す染色を実施した。

## 5.13 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を用いた。マイクロウェーブ法により 10 分間の加熱処理を行い、室温で 60 分間の自然冷却を行った。ヤギ血清 (Nichirei) を用いて 30 分間ブロッキングを行った後、PBS で希釈した一次抗体 (Table 2) 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 2) を 30 分間反応させた。次に、PBS で洗浄しインスリン抗体 (Table 2) を用いて 37°C で 60 分間反応させ、PBS で洗浄後に対応する二次抗体 (Table 2) を 30 分間反応させた。さらに、PBS で洗浄しグルカゴン抗体 (Table 2) を用いて 37°C で 60 分間反応させ、PBS で洗浄後に対応する二次抗体 (Table 2) を 30 分間反応させた。最後に PBS で洗浄し 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratory, Burlingame, USA) で対比染色を行った。

染色後、光学顕微鏡 BIOREVO BZ-9000、BZ-X710 (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。

Table 2. 免疫組織学的染色に使用した抗体

Primary antibodies			
Antigen	Source	Dilution	Company, Catalog#
Insulin	Guinea pig	1:1	Dako, IR002
Tom20	Rabbit	1:800	Cell Signaling Technology, 42406
Nkx6.1	Rabbit	1:1500	Cell Signaling Technology, 54551
Glucagon	Mouse	1:200	Sigma, G2654
Secondary antibodies			
Guinea pig IgG (Alexa Fluor 488)	Goat	1:200	Life Technologies, A11073
Rabbit IgG (Alexa Fluor 594)	Goat	1:200	Life Technologies, A11012
Mouse IgG (Cyanine 5)	Goat	1:200	Life Technologies, A10524

## 5.14 電子顕微鏡による観察

5.2と同様の条件で飼育した10週齢、各群2匹のマウスにチオペンタール0.01 mL/gを腹腔内投与し、痛み刺激に反応しなくなったことを確認し仰向けに固定した。開腹後、左肋骨を頭部方向へ切開し、心臓を露出させた。右心耳を同定し剪刀で切開後、翼状針を左心室に刺し、5~6 ml/分の速度で5分間PBSを注入した。その後、2.5%グルタルアルデヒドを同様に5~6 ml/分の速度で5分間注入し灌流固定を行い、臍組織を摘出した。摘出した臍組織を4℃下で2.5%グルタルアルデヒドにより3時間固定し、1%四酸化オスミウムで90分間、後固定した。その後、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。LKBウルトラミクロトームで超薄切片を作成し、銅グリッドにのせ、3%酢酸ウラニルと0.2%クエン酸鉛で染色した。その後、透過型電子顕微鏡(H-7100; Hitachi, Tokyo, Japan)で観察した。

## 5.15 メタボローム解析

2~3匹のマウスから単離した250個の臍島を1検体とし、各群4~5検体を2.8 mMのブドウ糖濃度に調整したKrebs-Ringer's solution bicarbonate/Hepes (KRBH) buffer (129 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mM KCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, pH7.4) 10mLを添加した10 cm dishに入れ、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で60分間pre-incubationした。その後、培養液を16.7 mMのKRBH bufferに交換し、30分間インキュベートした。その後、臍島を実体顕微鏡下に再回収して-80℃で凍結保存した。凍結した臍島5~10mg (250個/サンプル) に、20μMの内部標準物質 (H3304-1002、Human Metabolome Technologies, Inc.) を含む225μLの50%アセトニトリル水溶液を加え、冷却下で破砕機 (Micro Smash MS100R、Tomy Digital Biology Co.,Ltd., Tokyo, Japan) を用いて1,500rpm、120秒でホモジナイズした後、2,300×g、4℃で5分間遠心分離した。その後、上層400μLを5kDaカットオフフィルターで9,100×g、4℃、120分間遠心分離しタンパク質を除去した。濾液を遠心濃縮し、25 μLのMilli-Q水に再懸濁して、キャピラリー電気泳動-質量分析法による分析を行った。測定値は組織重量で補正した。メタボローム解析はHuman Metabolome Technologies, Inc.で行った。

## 5.16 統計学的解析

データは平均±標準偏差 (SD) で示された。2 群間の比較には対応のない Student's t-test を用いた。DNA マイクロアレイの Pathway 解析にはフィッシャーの正確確率検定を用いた。p 値は 0.05 未満を統計学的有意とした。統計解析は JMP Pro software (ver. 14.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。

## 6. 結果

### 6.1 随時血糖

随時血糖の推移について Figure 2 に示した。随時血糖値は、投与後から 10 週まで control 群と比べ luseo 群で有意に低下した。ルセオグリフロジンの投与直後から血糖は低下し、その効果が 10 週まで持続することが示された。

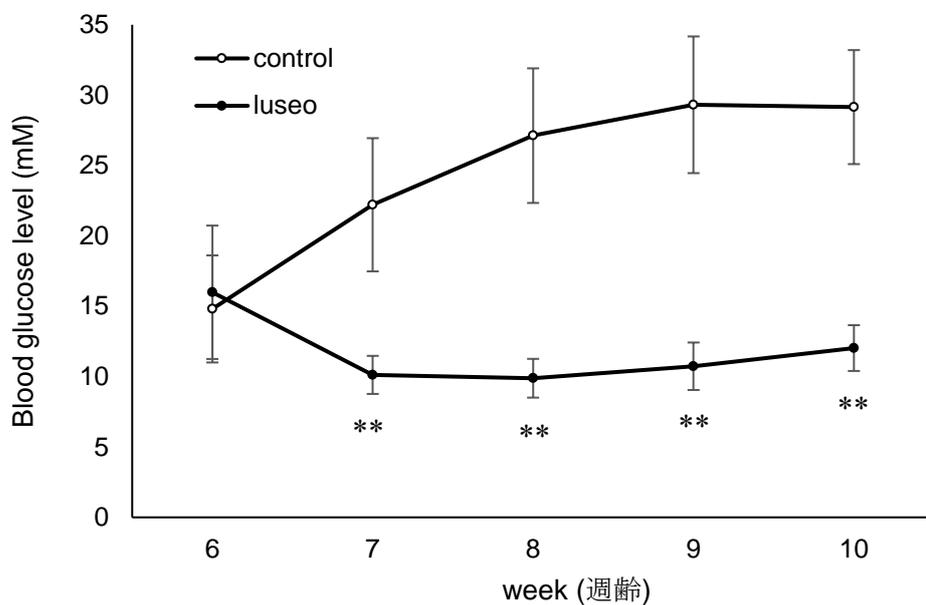


Figure 2. 随時血糖の推移

6週齢の *db/db* マウスに対してルセオグリフロジン投与開始後4週間の随時血糖を毎週同一条件下で測定した

control 群；白丸、luseo 群；黒丸（平均 ± SD）（n = 30） \*\*  $p < 0.01$  vs. control 群

## 6.2 DNA マイクロアレイによる膵島の遺伝子発現の解析

膵β細胞保護に関与する遺伝子を特定するために、両群のマウスから単離した膵島の遺伝子発現をマイクロアレイ解析で比較した。その結果、473 個の遺伝子が有意な変化を示し、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 164 個、0.67 倍以下に低下している遺伝子が 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に関わる *Slc2a2* やミトコンドリアの電子伝達系 Complex IV のサブユニットの 1 つである *Cox6a2* が含まれていた (Table 3)。Pathway 解析では control 群と比べ luseo 群において 4 つの Pathway が有意に上昇し、6 つの Pathway が有意に低下していた (Table 4)。luseo 群で発現が上昇している Pathway には解糖系と糖新生や脂肪酸生合成に関わる Pathway が含まれていた。これらの Pathway において、TCA サイクルでの糖代謝に関与する *Pcx* の遺伝子発現が上昇していた。Gene ontology 解析の生物学的プロセスでは control 群と比べ luseo 群において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 (Figure 3)。以上の結果から、ルセオグリフロジンによる膵β細胞保護にはブドウ糖取り込みやミトコンドリアにおける TCA サイクルでの糖代謝、電子伝達系が関連している可能性が示唆された。

Table 3. マイクロアレイ解析で発現が変動していた遺伝子

control 群と比べ luseo 群で発現が上昇していた遺伝子(Upregulated)と発現が低下していた遺伝子(Downregulated)をそれぞれ変動が大きい順に示した

< Upregulated genes >

Gene symbol	Fold-change	p-value	Gene symbol	Fold-change	p-value
Fam151a	5.20	<0.05	Kif20a	2.15	<0.05
Cox6a2	4.33	<0.05	Lgi2	2.15	<0.01
Slc2a2	3.98	<0.01	Kif20b	2.14	<0.05
Top2a	3.63	<0.01	Melk	2.13	<0.05
Casc5	3.43	<0.01	Cenpe	2.12	<0.05
Angptl7	3.23	<0.01	Atad2	2.09	<0.05
Mki67	3.23	<0.05	Defb1	2.09	<0.01
Pbk	3.08	<0.05	Olfm4	2.07	<0.01
Ccna2	2.88	<0.05	Plk1	2.01	<0.05
Maob	2.82	<0.01	Oip5	2.00	<0.05
Tpx2	2.73	<0.01	Prss53	1.98	<0.01
Tmem215	2.72	<0.05	Ccnd2	1.97	<0.01
Insrr	2.69	<0.05	Cenpf	1.96	<0.05
Shcbp1	2.64	<0.05	Prr11	1.95	<0.05
Slc30a8	2.62	<0.01	Ero1lb	1.94	<0.01
Kcnk9	2.59	<0.01	F13a1	1.93	<0.05
Prc1	2.59	<0.01	Mad211	1.93	<0.05
Sytl4	2.53	<0.05	Dtl	1.93	<0.01
Mafa	2.53	<0.05	Pcx	1.92	<0.05
Cdkn3	2.47	<0.05	Tmem255a	1.91	<0.05
Kif11	2.45	<0.05	Ttk	1.90	<0.05
Hmmr	2.44	<0.05	Ncapg2	1.89	<0.05
Stk32b	2.44	<0.05	Smc2	1.86	<0.05
Anln	2.44	<0.05	Galnt18	1.85	<0.01
Ppp1r1a	2.40	<0.05	H2afx	1.85	<0.01
Ncaph	2.35	<0.01	Ncapd2	1.85	<0.05
Ube2c	2.35	<0.05	Sgcz	1.84	<0.01
Ndc80	2.33	<0.05	Knstrn	1.84	<0.01
Nuf2	2.30	<0.05	Tmem229b	1.82	<0.05
Ccnb1	2.29	<0.05	Olf467	1.81	<0.05

Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value	Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value
Mir669d	1.80	<0.05	Glrx	1.60	<0.05
Cenpi	1.79	<0.01	Rad51	1.60	<0.01
Robo2	1.77	<0.05	Papss2	1.59	<0.05
Spdl1	1.77	<0.05	Gm13034	1.58	<0.05
Birc5	1.77	<0.05	Ogt	1.58	<0.05
Sphkap	1.76	<0.05	Gng12	1.58	<0.05
Stmn1	1.76	<0.05	Cenpn	1.58	<0.05
Vsnl1	1.75	<0.05	S100z	1.58	<0.05
Ucn3	1.75	<0.05	Tmem50b	1.57	<0.01
Nnat	1.74	<0.05	Dennd4c	1.57	<0.01
Itpkb	1.74	<0.05	Stil	1.57	<0.05
Mns1	1.74	<0.05	Kcng3	1.57	<0.05
Abhd2	1.72	<0.05	Igfals	1.57	<0.05
Smc4	1.72	<0.05	Mthfd2	1.56	<0.05
Snord11	1.70	<0.05	Gpr114	1.56	<0.05
Klhl7	1.70	<0.05	Ppp1r37	1.55	<0.01
Mybl1	1.70	<0.01	Cdca2	1.55	<0.05
Rbm14	1.69	<0.05	Banp	1.55	<0.05
Hadh	1.69	<0.01	Brcal	1.54	<0.05
Vmn1r157	1.69	<0.05	Slc39a10	1.54	<0.05
Trim59	1.68	<0.01	Mtbp	1.54	<0.01
Gas2l3	1.68	<0.05	Pcsk9	1.54	<0.05
Kif18b	1.67	<0.01	Mdm4	1.54	<0.05
Zwilch	1.64	<0.05	Aspm	1.54	<0.05
Diap3	1.64	<0.05	Slco1a1	1.53	<0.05
Hist2h2be	1.64	<0.01	Tbc1d31	1.53	<0.05
Cdc45	1.64	<0.05	AW011738	1.53	<0.05
P2ry1	1.64	<0.05	Tra2a	1.53	<0.05
Spc25	1.64	<0.05	Acvr1c	1.52	<0.05
Slc1a4	1.63	<0.05	Fancd2	1.52	<0.01
Sepsecs	1.62	<0.01	Hist1h2bb	1.52	<0.05
Gen1	1.62	<0.05	Pfkfb2	1.52	<0.01
Cyp39a1	1.61	<0.05	G2e3	1.52	<0.05
Olf43	1.61	<0.05	Ift80	1.51	<0.01
Cenpa	1.61	<0.05	Fpgt	1.51	<0.05

< Downregulated genes >

Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value	Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value
Spink3	0.09	<0.01	Tmed6	0.36	<0.01
Tm4sf20	0.11	<0.01	Cpa2	0.36	<0.05
Cck	0.13	<0.05	Rnase1	0.36	<0.05
Pla2g1b	0.16	<0.01	Sorcs2	0.38	<0.05
Prss1	0.20	<0.01	Cd36	0.39	<0.01
Gp2	0.21	<0.05	Taar7d	0.39	<0.05
Pnliprp2	0.22	<0.01	Igfbp5	0.40	<0.05
Pdia2	0.22	<0.05	Lrrc32	0.40	<0.05
Cuzd1	0.22	<0.05	Irak3	0.40	<0.01
Serpini2	0.23	<0.05	Egln3	0.41	<0.05
Tmem252	0.23	<0.01	Olf764	0.41	<0.05
Ctrc	0.24	<0.05	Cd14	0.41	<0.05
Sycn	0.24	<0.01	Flrt2	0.41	<0.05
Aqp12	0.24	<0.05	Dusp6	0.41	<0.05
Reg3a	0.25	<0.05	Rhou	0.42	<0.01
Fabp5	0.25	<0.01	Reg1	0.42	<0.05
Dmbt1	0.26	<0.01	Clps	0.42	<0.05
Csn3	0.27	<0.05	Slc37a2	0.42	<0.05
Fabp5	0.27	<0.01	Fam134b	0.42	<0.05
Amy2b	0.28	<0.05	Scarf2	0.43	<0.01
Gast	0.28	<0.01	Shh	0.43	<0.05
Sorcs1	0.28	<0.05	Slc1a1	0.43	<0.05
Cela3b	0.28	<0.01	Mt2	0.44	<0.05
Gsdma	0.28	<0.05	Rbpjl	0.44	<0.05
Serpina1a	0.30	<0.01	Pnliprp1	0.44	<0.05
Zg16	0.30	<0.05	Dnah11	0.44	<0.05
Morc1	0.31	<0.05	Gprc5a	0.44	<0.01
Cckar	0.32	<0.05	Try5	0.44	<0.05
Ros1	0.32	<0.05	Serpina7	0.45	<0.05
Clmp	0.33	<0.01	C1ql3	0.45	<0.05
Tc2n	0.34	<0.01	Vgf	0.46	<0.05
Cidea	0.34	<0.05	Sik1	0.46	<0.05
Anxa10	0.34	<0.05	Neurog3	0.46	<0.01
Slc38a3	0.35	<0.05	Scnn1a	0.47	<0.01
Prss2	0.36	<0.05	Msr1	0.48	<0.05

Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value	Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value
Gna14	0.48	<0.01	Gria1	0.54	<0.05
Krt19	0.48	<0.01	Cyp17a1	0.55	<0.05
Pnlip	0.49	<0.05	Lama2	0.55	<0.05
Mmp12	0.49	<0.05	Cped1	0.55	<0.05
Fbln2	0.49	<0.05	Rnf152	0.55	<0.05
Nespas	0.49	<0.05	Try4	0.55	<0.01
Tspan6	0.49	<0.05	Spry2	0.55	<0.01
Dcdc2a	0.49	<0.01	Aim1	0.56	<0.05
Fbln1	0.49	<0.01	Cpa1	0.56	<0.05
Rsph4a	0.50	<0.01	Ptprk	0.56	<0.05
Gp49a	0.50	<0.01	Vwf	0.56	<0.05
Cth	0.50	<0.05	Jag1	0.56	<0.05
Clec7a	0.50	<0.05	Rap1gap	0.56	<0.05
Cel	0.51	<0.05	Fam149a	0.56	<0.05
Cela1	0.51	<0.05	S100g	0.57	<0.01
Eln	0.51	<0.01	Hap1	0.57	<0.05
Inpp5f	0.51	<0.05	Bag3	0.57	<0.05
Fmo2	0.52	<0.05	Cela2a	0.57	<0.05
Smoc1	0.52	<0.05	Aldh1a1	0.57	<0.05
Cpb1	0.52	<0.01	Id2	0.57	<0.05
Slc38a11	0.52	<0.01	Gstm5	0.57	<0.05
Cpa3	0.52	<0.01	Ctsk	0.57	<0.05
Sor11	0.52	<0.05	Slc39a5	0.57	<0.05
Klk1b3	0.52	<0.05	Mgat4a	0.57	<0.05
Ache	0.53	<0.05	Enpp1	0.58	<0.05
Mrc1	0.53	<0.05	Lrrc8b	0.58	<0.01
Tcea3	0.53	<0.01	Pla2g7	0.58	<0.05
Mt1	0.53	<0.05	Sntb1	0.58	<0.01
Gatm	0.53	<0.01	Fhl2	0.58	<0.05
Bcmo1	0.53	<0.05	Bex2	0.58	<0.01
Rspo4	0.53	<0.05	Lrrc8b	0.58	<0.01
Cd24a	0.53	<0.01	Pla2g7	0.58	<0.05
Amigo2	0.53	<0.01	Sntb1	0.58	<0.01
Mapk4	0.54	<0.05	Fhl2	0.58	<0.05
Cadm1	0.54	<0.05	Bex2	0.58	<0.01

Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value	Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value
Gsto1	0.58	<0.05	Gamt	0.61	<0.05
Dscam	0.59	<0.05	Ckb	0.62	<0.05
Selp	0.59	<0.05	Ptprs	0.62	<0.01
Tmprss2	0.59	<0.01	Ptprg	0.62	<0.05
Hsd11b1	0.59	<0.05	Kcne3	0.62	<0.05
Ctrl	0.59	<0.05	Tnfrsf23	0.62	<0.05
Ntn4	0.59	<0.05	Arhgdig	0.63	<0.01
Tlr3	0.59	<0.05	Cpt1a	0.63	<0.01
Sdpr	0.59	<0.05	Sftpd	0.63	<0.05
Tnfrsf12a	0.60	<0.01	Srpx2	0.63	<0.05
Vmn1r17	0.60	<0.05	Cd9	0.63	<0.05
Pde6a	0.60	<0.05	Anxa11	0.63	<0.05
Dusp5	0.60	<0.05	Svop	0.63	<0.01
n-R5s97	0.60	<0.05	Tlcd2	0.63	<0.01
Ranbp31	0.60	<0.05	Lamb2	0.63	<0.05
Scube2	0.60	<0.05	Fabp5	0.63	<0.05
Tmbim4	0.60	<0.01	Olf1448	0.63	<0.05
Tdh	0.60	<0.01	Gstp1	0.63	<0.05
Timp2	0.61	<0.05	Ephx1	0.63	<0.05
Plat	0.61	<0.05	Mamdc2	0.64	<0.05
Plekha1	0.61	<0.05	Ppic	0.64	<0.05
Galnt3	0.61	<0.05	Pkhd1	0.64	<0.05
Ptprb	0.61	<0.01	Cldn4	0.64	<0.05
Arrdc4	0.61	<0.05	Bicc1	0.64	<0.05
Crip1	0.61	<0.05	Cntn3	0.64	<0.05
Gstp2	0.61	<0.05	Ndufa6	0.64	<0.05
Olf1065	0.61	<0.05	Fam198b	0.64	<0.05
Parm1	0.61	<0.01	Scn3a	0.64	<0.05
Plk2	0.61	<0.01	Fhl5	0.64	<0.05
Itgam	0.61	<0.05	Anxa11	0.64	<0.05
Adamts5	0.61	<0.05	Cyp1b1	0.64	<0.05
Bmp3	0.61	<0.05	Olfm1	0.64	<0.05
n-R5s93	0.61	<0.01	Ctrl	0.64	<0.01
Sash1	0.61	<0.05	Pex5l	0.65	<0.05

Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value	Gene symbol	Fold-change	<i>p</i> -value
Stmn3	0.65	<0.05	Mtmr11	0.66	<0.01
Tlr8	0.65	<0.05	Arhgef28	0.67	<0.01
Mpzl2	0.65	<0.01	Cd63	0.67	<0.05
Colec11	0.65	<0.05	Pvr	0.67	<0.05
Syt5	0.65	<0.01	Tspan15	0.67	<0.05
Ndufa1	0.65	<0.01	Sprr1a	0.67	<0.01
Nr4a1	0.65	<0.05	Pklr	0.67	<0.05
Crim1	0.65	<0.05	Rgs9	0.67	<0.05
Spred3	0.65	<0.05	Mettl7a3	0.67	<0.05
Tpm1	0.65	<0.05	Tspan1	0.67	<0.05
Alcam	0.65	<0.05			
Usp25	0.65	<0.05			
Ctsl	0.65	<0.05			
Irs2	0.65	<0.05			
Tubb4a	0.65	<0.05			
Rassf9	0.66	<0.05			
mt-Tm	0.66	<0.01			
Adam15	0.66	<0.05			
Meox2	0.66	<0.05			
Slco2a1	0.66	<0.05			
Dpp4	0.66	<0.05			
Smc6	0.66	<0.05			
Rabac1	0.66	<0.01			
Bhlhe40	0.66	<0.01			
Igdcc4	0.66	<0.01			
Prkcdpb	0.66	<0.05			
Ptk2b	0.66	<0.05			
Th	0.66	<0.05			
Pon3	0.66	<0.05			
Ldb2	0.66	<0.05			
Nr1h4	0.66	<0.01			
Oat	0.66	<0.05			
Scn3b	0.66	<0.01			
Dab2	0.66	<0.05			
Dync1i1	0.66	<0.01			

Table 4. Pathway 解析で発現が変動していた遺伝子群

control 群と比べ luseo 群で発現が上昇していた pathway と低下していた pathway を示した

	Changed genes	Total genes	Z-score	P-Value	Gene symbol
<Upregulated pathways>					
Fatty Acid Biosynthesis WP336_71737	2	22	4.91	0.01	Pcx, Hadh
IL7 Signaling Pathway WP297_69128	2	44	3.20	0.04	Ccna2, Ccnd2
Tryptophan metabolism WP79_73389	2	44	3.20	0.04	Hadh, Maob
Glycolysis and Gluconeogenesis WP157_69361	2	47	3.06	0.04	Pcx, Slc2a2
<Downregulated pathways>					
Dopaminergic Neurogenesis WP1498_60839	3	29	3.72	0.01	Aldh1a1, Shh, Th
Endochondral Ossification WP1270_72216	4	62	3.01	0.02	Enpp1, Ctsl, Adamts5, Plat
Glucocorticoid & Mineralocorticoid Metabolism WP495_71740	2	13	3.93	0.02	Hsd11b1, Cyp17a1
Retinol metabolism WP1259_71742	3	38	3.06	0.03	Aldh1a, Cd36, Bcmol
Biogenic Amine Synthesis WP522_69135	2	15	3.59	0.03	Ache, Th
Blood Clotting Cascade WP460_71727	2	20	2.97	0.04	Vwf, Plat

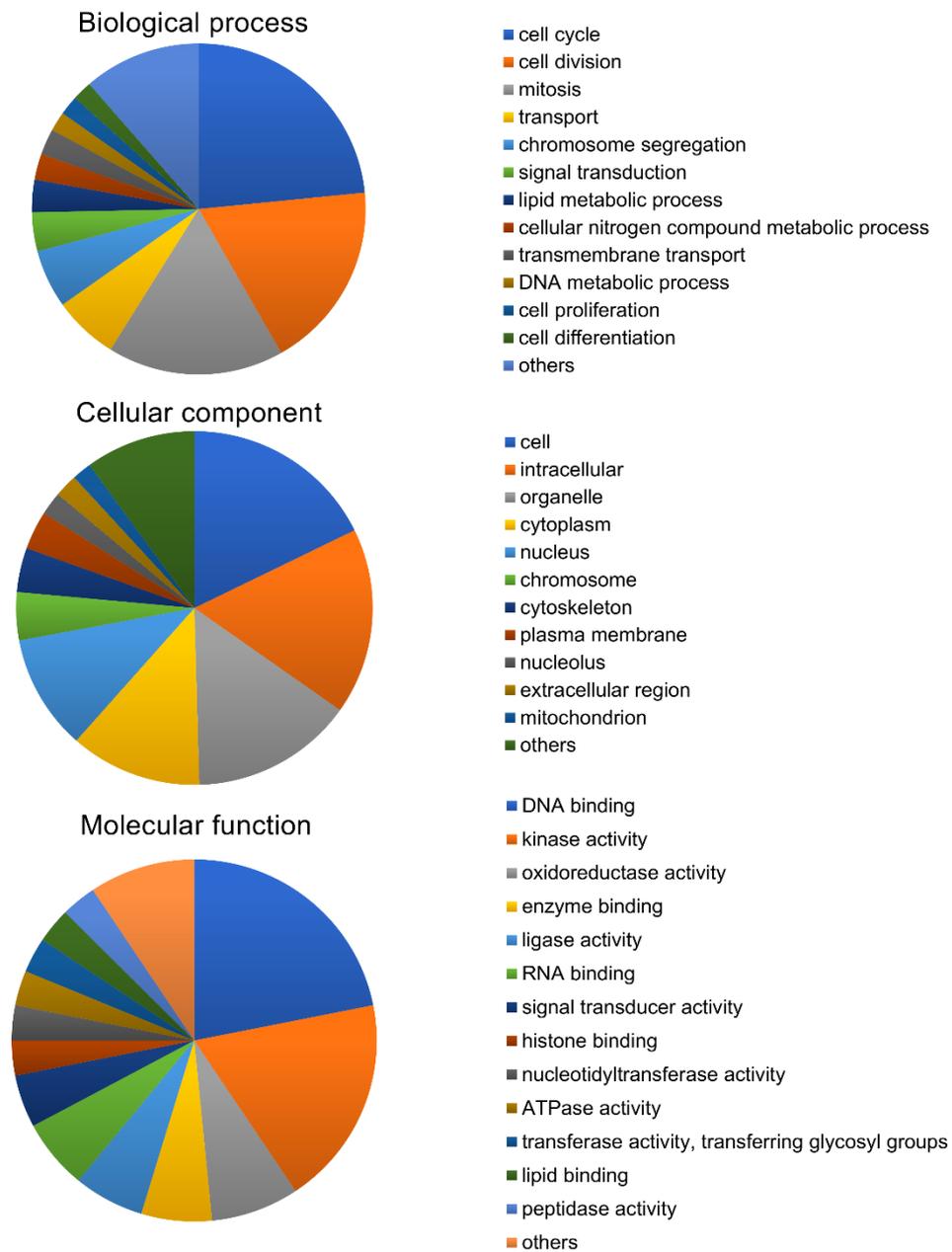


Figure 3. luseo 群で発現が上昇している遺伝子の Gene ontology 解析  
 マイクロアレイ解析で control 群と比べ luseo 群で発現が上昇していた遺伝子を  
 Gene ontology annotation に基づき分類した。

### 6.3 Real-time PCR 法による膵島の遺伝子発現の解析

マイクロアレイ解析で同定された遺伝子発現の変化を確認するために、Real-time PCR 法による膵島の遺伝子発現の解析を行った。マイクロアレイ解析の結果と同様、control 群と比べ luseo 群で *Slc2a2*、*Pcx* の発現は有意に上昇していた (Figure 4)。また、TCA サイクルにおける反応に関与する酵素である citrate synthase (*Cs*)、aconitase 2 (*Aco2*)、isocitrate dehydrogenase 2 (*Idh2*)、oxoglutarate dehydrogenase (*Ogdh*)、succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit a (*Sdha*) の遺伝子発現も luseo 群で有意に上昇していた (Figure 5)。さらに膵β細胞の成熟や分化に関わる *Nkx6.1* や細胞周期関連遺伝子である cyclin D2 (*Ccnd2*) の遺伝子発現が luseo 群で有意に上昇していた (Figure 6)。

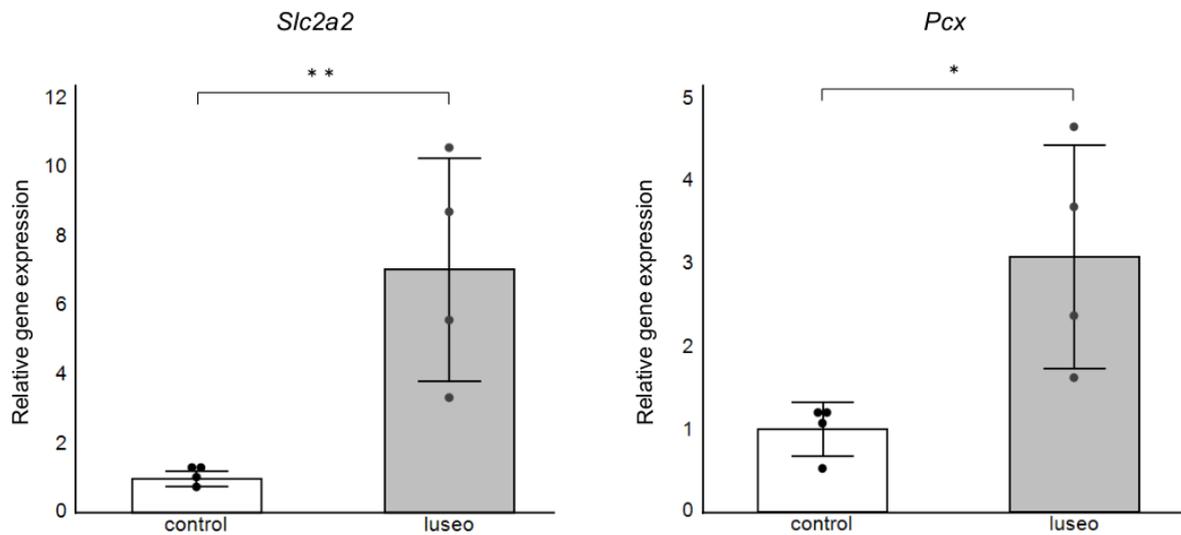


Figure 4. 単離臍島における糖代謝に重要な遺伝子の発現

10 週齢 (ルセオグリフロジン投与 4 週後) の *db/db* マウスの単離臍島において、*Slc2a2* と *Pcx* の遺伝子発現を Real-time PCR 法で定量的に評価した。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n=4$ ) (平均  $\pm$  SD) \*\*  $p < 0.01$ 、\*  $p < 0.05$

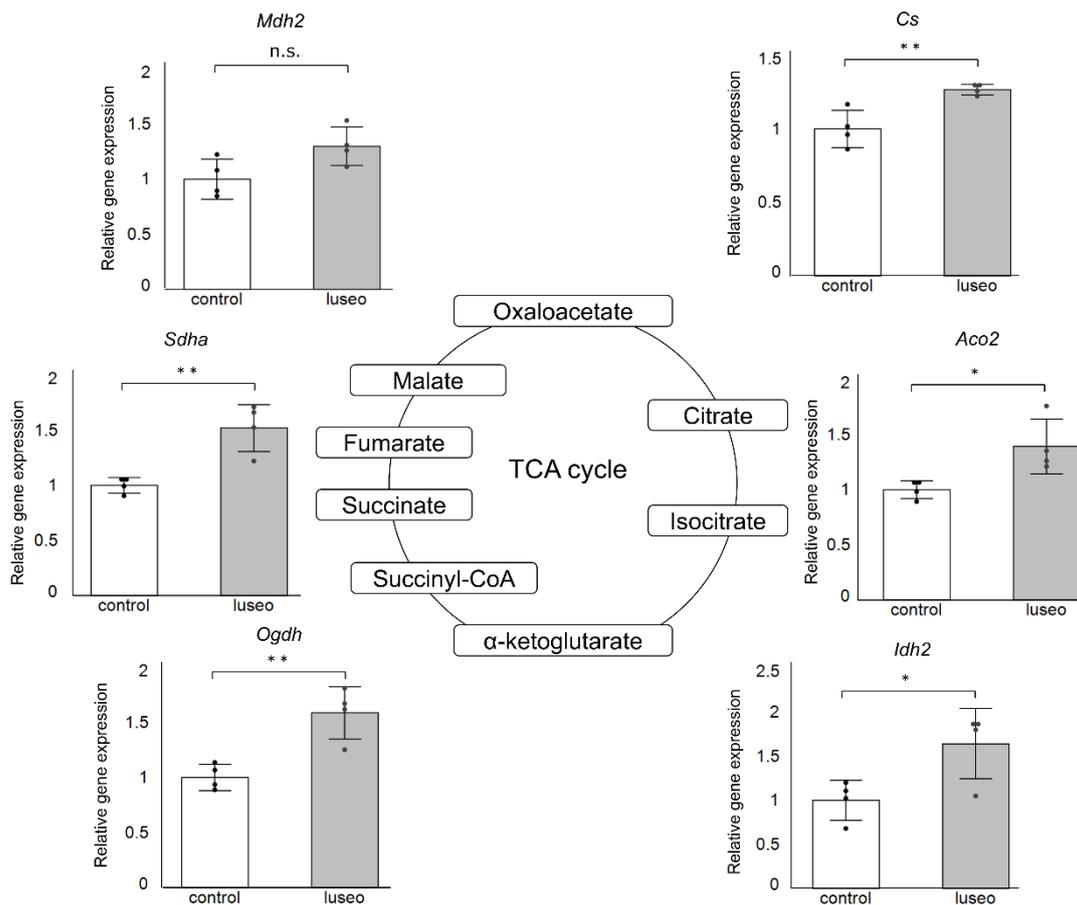


Figure 5. 単離臍島における TCA cycle での反応に関わる遺伝子の発現

10 週齢の *db/db* マウスの単離臍島において、TCA cycle での反応に関与する遺伝子の発現を Real-time PCR 法により定量的に評価した。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n = 4$ ) (平均  $\pm$  SD) \*\*  $p < 0.01$ 、\*  $p < 0.05$ 、n.s; not significant

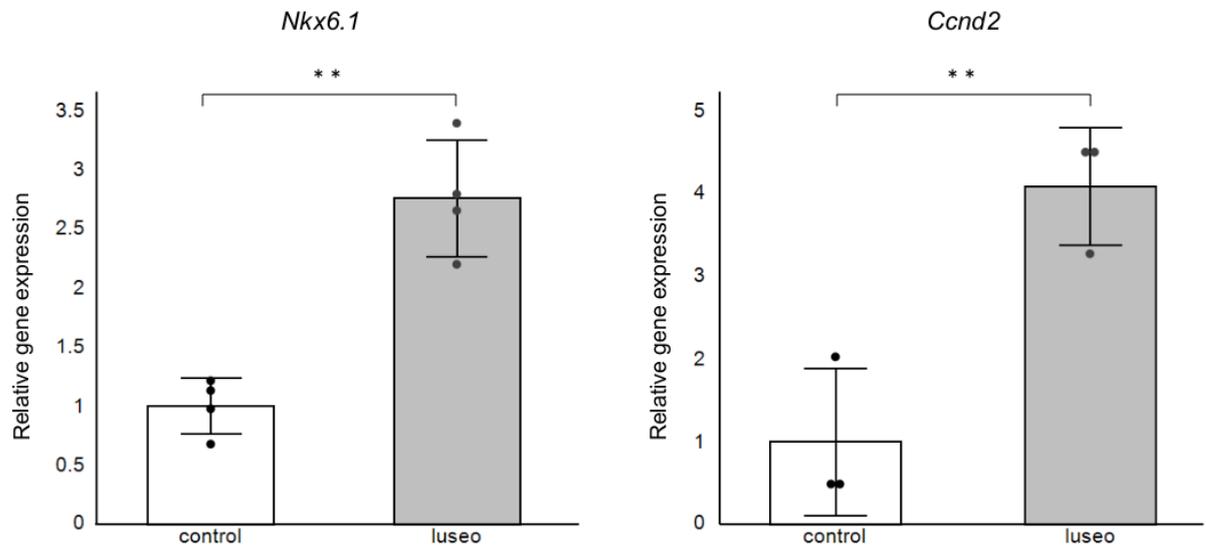


Figure 6. 単離膵島における膵β細胞の成熟や増殖に重要な遺伝子の発現

10 週齢の *db/db* マウスの単離膵島において、膵β細胞の成熟や増殖に関与する *Nkx6.1* と *Ccnd2* の遺伝子発現を Real-time PCR 法により定量的に評価した。内因性コントロールとして GAPDH を用いた。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n = 3-4$ ) (平均 ± SD) \*\*  $p < 0.01$

## 6.4 腓島におけるミトコンドリア呼吸能と酸化ストレスの評価

遺伝子発現の解析結果からミトコンドリアに着目し、腓島におけるミトコンドリア呼吸能について評価した。control 群と比べ luseo 群で Complex II 由来の呼吸能 (CII\_P) が有意に高かった (Figure 7)。一方、control 群と比べ luseo 群では Complex I 由来の呼吸能 (CI\_P) が有意に低かったが (Figure 7)、*db/db* マウスの腓島ではミトコンドリア全体の呼吸能に対して Complex I および Complex II 由来の呼吸能が占める比率を表す SCR が Complex I と比べ Complex II で顕著に高く (Figure 8)、腓島のミトコンドリアは Complex II を介した酸化的リン酸化が主体であることが示唆された。ミトコンドリアの数に依存しない呼吸能を反映する RCR については、luseo 群で Complex II の RCR が有意に高かった (Figure 9)。Complex IV の呼吸能については、両群間で有意な差は認められなかった (Figure 10)。

ミトコンドリアにおける酸化ストレスについて、 $H_2O_2$  の生成速度により評価した。control 群と比べ luseo 群では、Complex II および Complex I+II 由来の  $H_2O_2$  生成速度が有意に低下していた (Figure 11)。Complex I 由来の  $H_2O_2$  生成速度には、両群間で有意な差は認められなかった (Figure 11)。

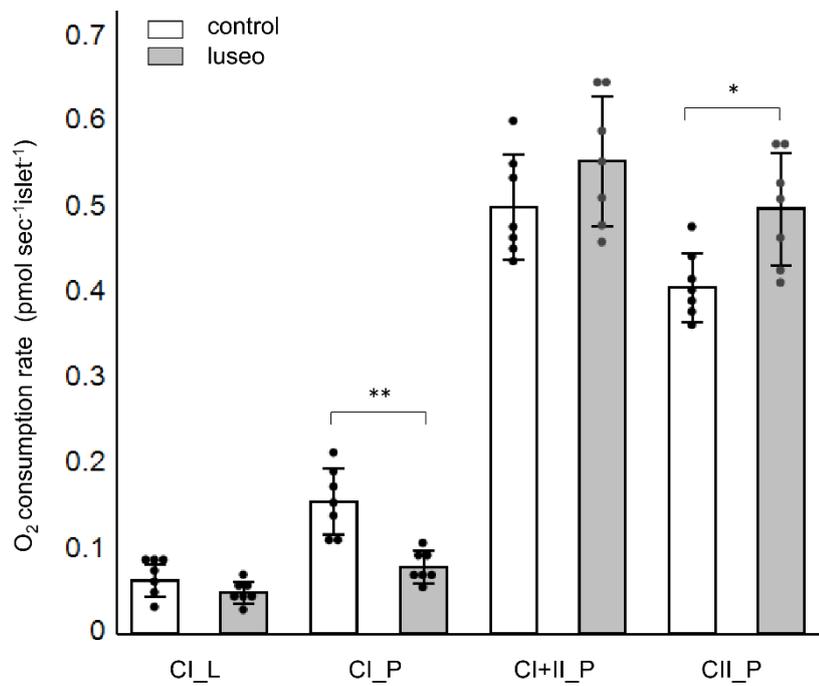


Figure 7. 膵島におけるミトコンドリア呼吸能

10 週齢の *db/db* マウスから単離した膵島におけるミトコンドリア呼吸能を評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n=7$ ) (平均  $\pm$  SD) \*\* $p < 0.01$ 、\* $p < 0.05$  CI\_L, プロトンリークに伴う酸素消費; CI\_P, Complex I 由来の呼吸能; CI+II\_P, Complex I+II 由来の呼吸能; CII\_P, Complex II 由来の呼吸能

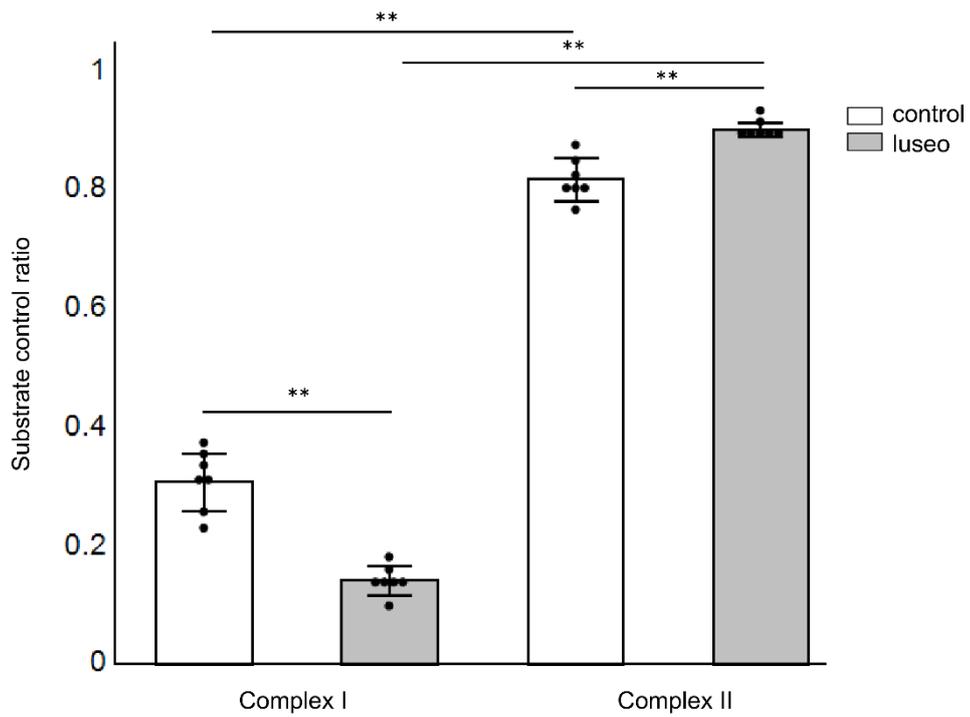


Figure 8. Substrate control ratio

Complex I+II の呼吸能に対し Complex I、Complex II の呼吸能が占める割合を算出し評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n=7$ ) (平均  $\pm$  SD) \*\*  $p < 0.01$

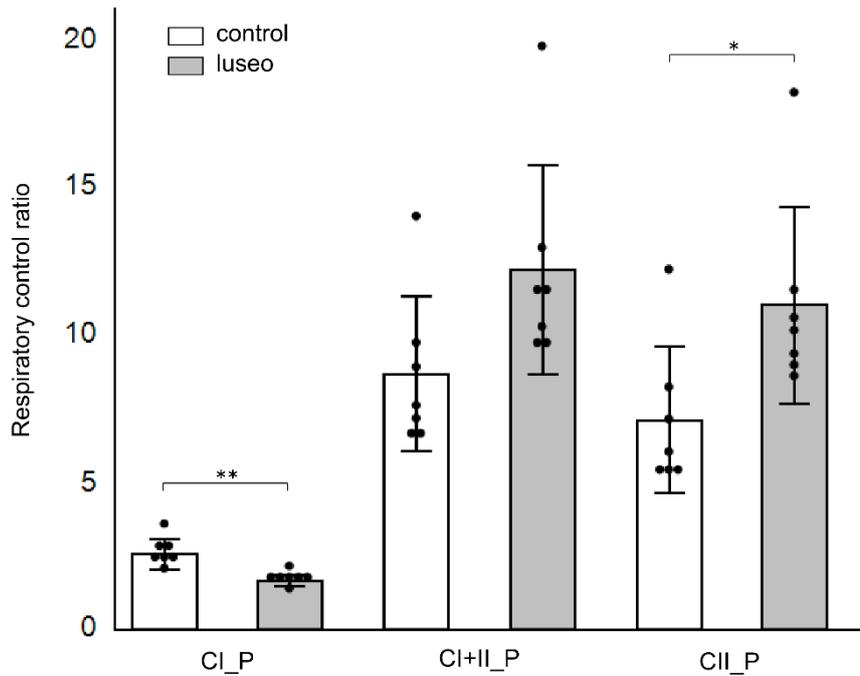


Figure 9. Respiratory control ratio

ミトコンドリアの個数に依存しない呼吸能の指標である Respiratory control ratio を算出し評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n=7$ ) (平均  $\pm$  SD) \*\*  $p < 0.01$ 、\*  $p < 0.05$

CI\_P, Complex I 由来の呼吸能; CI+II\_P, Complex I+II 由来の呼吸能; CII\_P, Complex II 由来の呼吸能

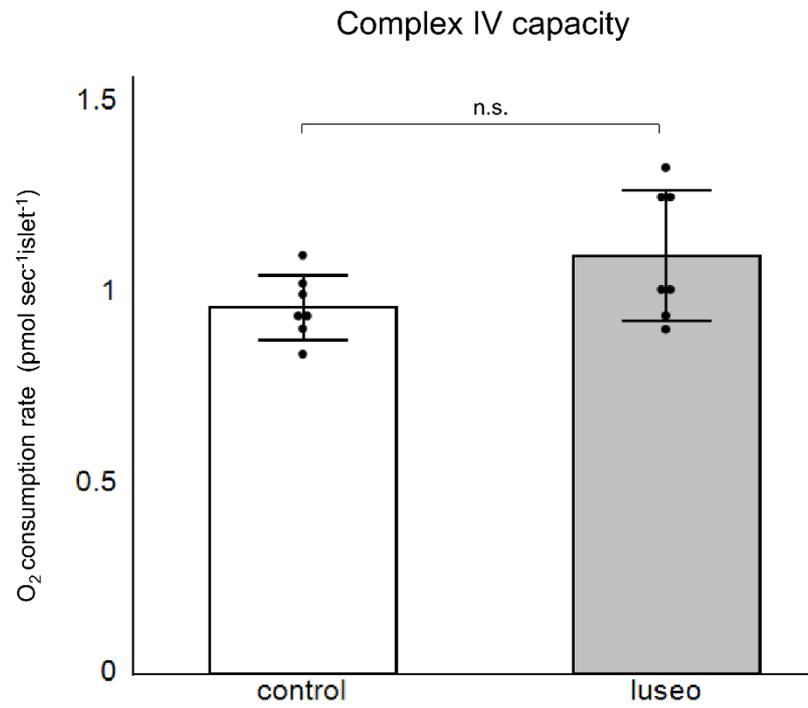


Figure 10. Complex IV における呼吸能

10 週齢の *db/db* マウスから単離した膵島における Complex IV の呼吸能を評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n = 7$ ) (平均  $\pm$  SD) n.s.; not significant

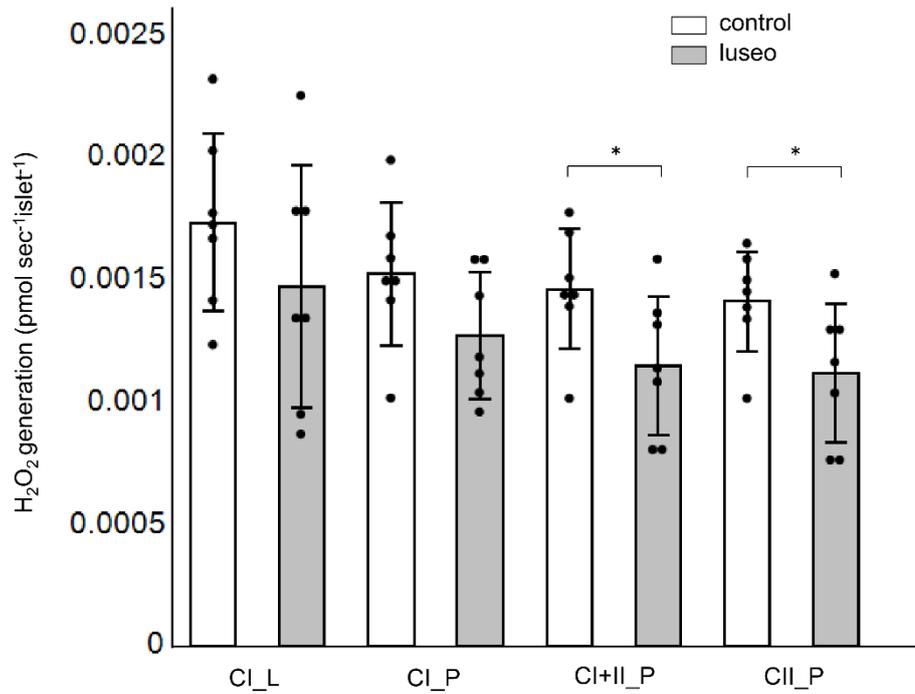


Figure 11. 膵島のミトコンドリアにおける ROS 産生

10 週齢の *db/db* マウスから単離した膵島のミトコンドリアにおける  $H_2O_2$  産生速度を評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n = 7$ ) (平均  $\pm$  SD) \*  $p < 0.05$   
 CI\_L, プロトンリークに伴う ROS 産生; CI\_P, Complex I 由来の ROS 産生; CI+II\_P, Complex I+II 由来の ROS 産生; CII\_P, Complex II 由来の ROS 産生

## 6.5 腓島におけるアコニターゼ活性の評価

ルセオグリフロジンの投与により腓島のミトコンドリアにおける酸化ストレスが低下していたことから、TCA サイクルにおける酵素の1つで酸化ストレスにより障害されやすいアコニターゼ活性を評価したが、アコニターゼ活性は両群間で有意差を認めなかった (Figure 12)。

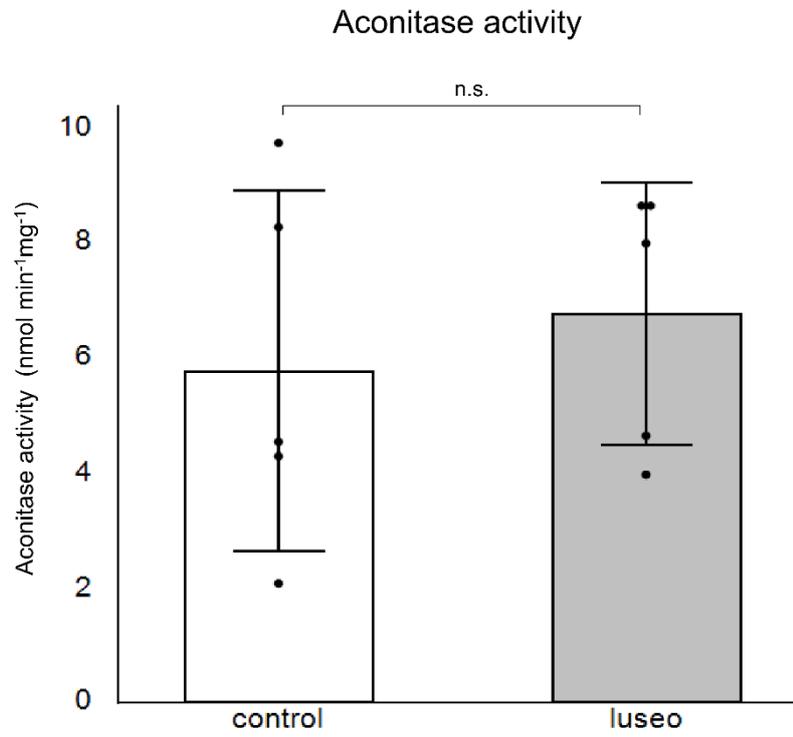


Figure 12. 膵島におけるアコニターゼ活性

10 週齢の *db/db* マウスから単離した膵島のアコニターゼ活性を評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) ( $n = 5$ ) (平均  $\pm$  SD) n.s.; not significant

## 6.6 膵β細胞のミトコンドリアの形態学的評価

膵β細胞におけるミトコンドリアの形態を、ミトコンドリア外膜のマーカーである Tom20 を用いた蛍光免疫染色と電子顕微鏡検査により評価した。免疫染色の結果、ミトコンドリアが形成するネットワークは control 群で断片化されていたが、luseo 群では膵β細胞全体に広がっていた (Figure 13)。また、膵β細胞においてミトコンドリアの占める面積は、control 群と比べ luseo 群で有意に大きかった (Figure 14)。さらに、電子顕微鏡で観察したところ control 群ではミトコンドリアの膨化やクリステ構造の破壊が散見された。一方、luseo 群ではミトコンドリアの形態は正常に保たれていた (Figure 15)。

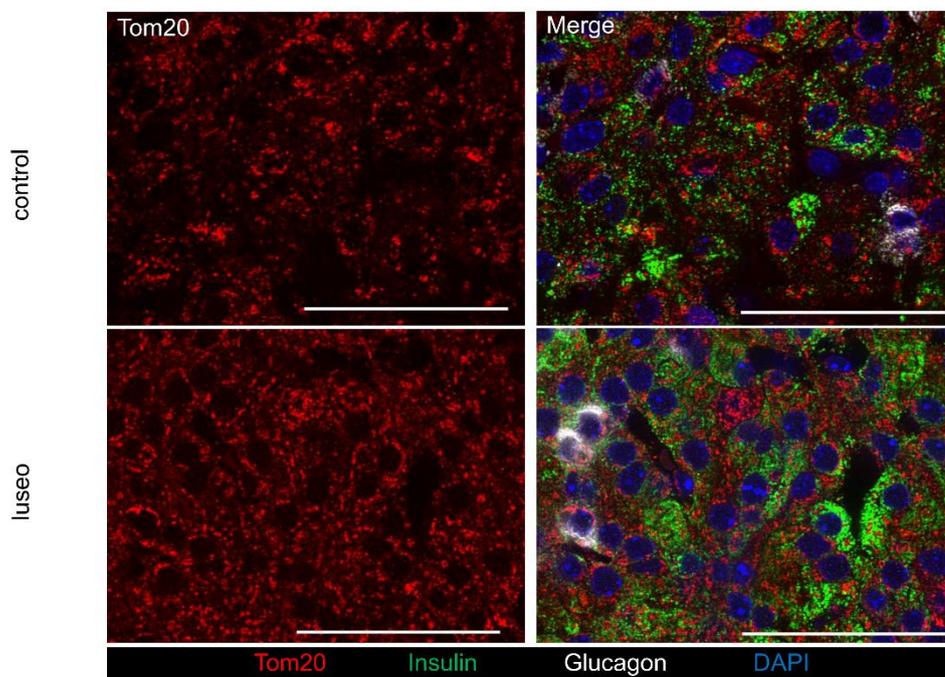


Figure 13. 膵β細胞における Tom20 による蛍光免疫染色

10 週齢の *db/db* マウスの膵組織切片を抗 Tom20 抗体、抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体により蛍光免疫染色法で染色し、核は DAPI で染色した。Tom20 (赤)、インスリン (緑)、グルカゴン (白)、DAPI (青)。白色の線は 50 $\mu$ m を示している。

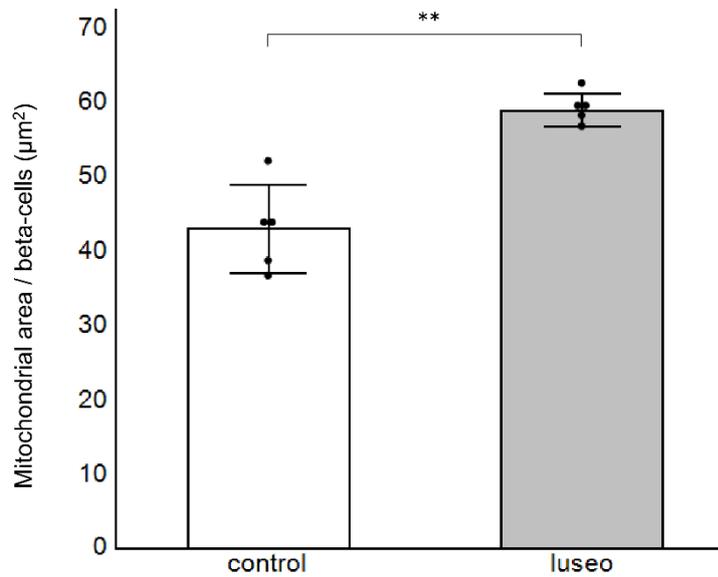


Figure 14. 膵β細胞における Tom20 染色陽性面積

10 週齢の *db/db* マウスの膵組織切片を抗 Tom20 抗体、抗インスリン抗体、抗グルカゴン抗体により蛍光免疫染色法で染色し、膵β細胞における Tom20 染色陽性面積の割合を算出した control 群 (白)、luseo 群 (灰色) (n=5) (平均 ± SD)  
 \*\* $p < 0.01$

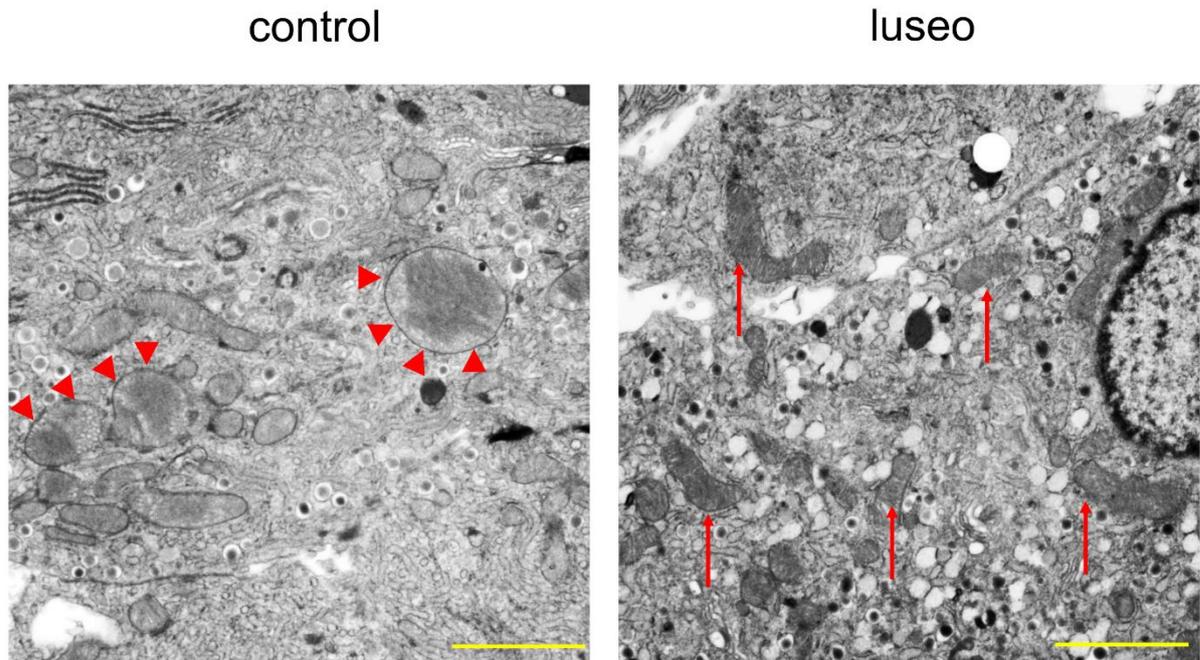


Figure 15. 膵β細胞におけるミトコンドリアの形態

10週齢の *db/db* マウスの膵組織切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛により染色し、透過型電子顕微鏡により観察した。膨化したミトコンドリア（赤矢頭）、正常のミトコンドリア（赤矢印）。黄色の線は2 $\mu$ mを示している。

## 6.7 膵β細胞における NKX6.1 の発現

NKX6.1 は膵β細胞において glucose transporter2 (*Glut2*)や *Pcx* の転写を直接的に調節し、糖代謝の改善や *Ccnd2* を介した膵β細胞増殖に関与している(Taylor et al., 2013)。そこで膵組織切片での蛍光免疫染色を行ったところ、NKX6.1 は luseo 群の膵β細胞において強く染色され (Figure 16)、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 (Figure 17)。

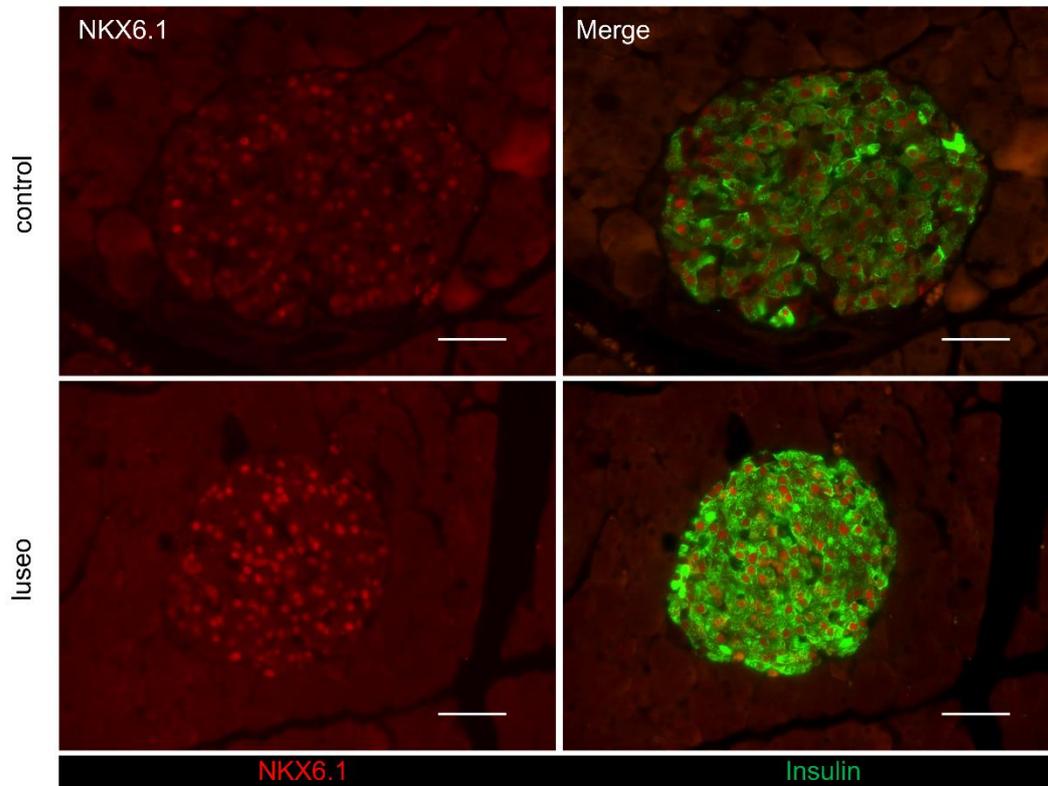


Figure 16. 膵組織切片における NKX6.1・インスリン二重蛍光免疫染色

10 週齢の *db/db* マウスの膵組織切片を抗 NKX6.1 抗体（赤）、抗インスリン抗体（緑）にて蛍光免疫染色法で二重染色した。白色の線は 50 $\mu$ m を示している。

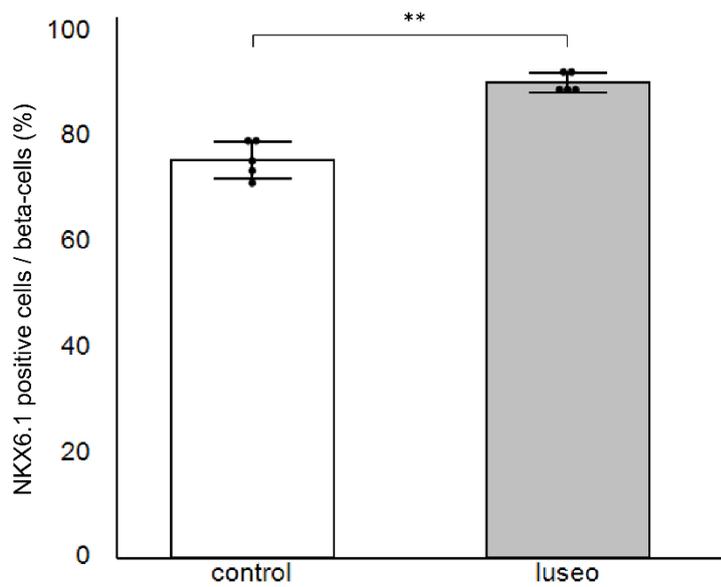


Figure 17. 膵β細胞におけるNKX6.1陽性細胞率

10週齢の $db/db$ マウスの膵β細胞におけるNKX6.1陽性細胞率を算出した。1匹のマウスにつき50個程度の膵島を観察し、NKX6.1陽性細胞数をカウントした。control群(白)、luseo群(灰色)( $n=5$ )(平均 $\pm$ SD) \*\* $p < 0.01$

## 6.8 豚島における細胞内代謝産物の評価

単離豚島のメタボローム解析による代謝産物の評価を行った。グルコース 6-リン酸、フルクトース 6-リン酸の濃度は control 群と比べ luseo 群で有意に高く (Figure 18)、細胞内への糖取り込みが亢進していると考えられた。一方、解糖系の中間代謝産物であるフルクトース 1,6-ビスリン酸、3-ホスホグリセリン酸、ホスホエノールピルビン酸の濃度は luseo 群で有意に低かった (Figure 18)。また、TCA サイクルにおける中間代謝産物であるアコニット酸、フマル酸、リンゴ酸の濃度は luseo 群で高かった (Figure 19)。これらの結果から、ルセオグリフロジンの投与により豚 $\beta$ 細胞内での糖代謝は解糖系優位から TCA サイクル優位へとシフトしていると考えられた。また、ATP の濃度に両群間で有意差は認めなかったが、インスリン分泌に関わる NADPH やグルタミン酸の濃度が luseo 群で高かった (Figure 20)。NADPH の産生や細胞増殖にペントースリン酸経路が関与することが知られているが (Ge et al., 2020)、ペントースリン酸経路における代謝産物の濃度に両群間で有意差は認められず (Figure 21)、ルセオグリフロジン投与による NADPH の増加は TCA サイクルに由来すると考えられた。さらに、抗酸化物質である GSH の濃度は luseo 群で有意に高く、GSSG の濃度は luseo 群で有意に低かった (Figure 22)。その結果、細胞内酸化ストレスの指標の 1 つである GSSG/GSH 比は control 群と比べ luseo 群で有意に低かった (Figure 22)。

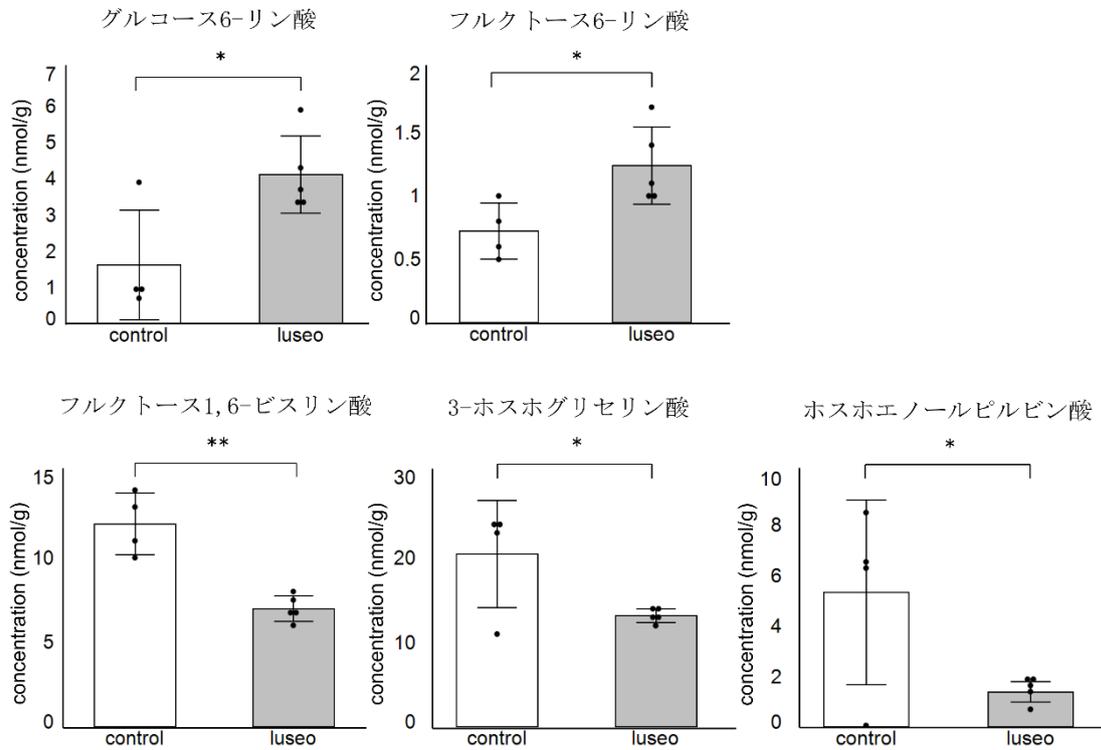


Figure 18. 膵島の解糖系における代謝産物

10 週齢の *db/db* マウスの膵島の解糖系における代謝産物をメタボローム解析で評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) (n=4-5) (平均 ± SD) \*\* $p < 0.01$ 、\* $p < 0.05$

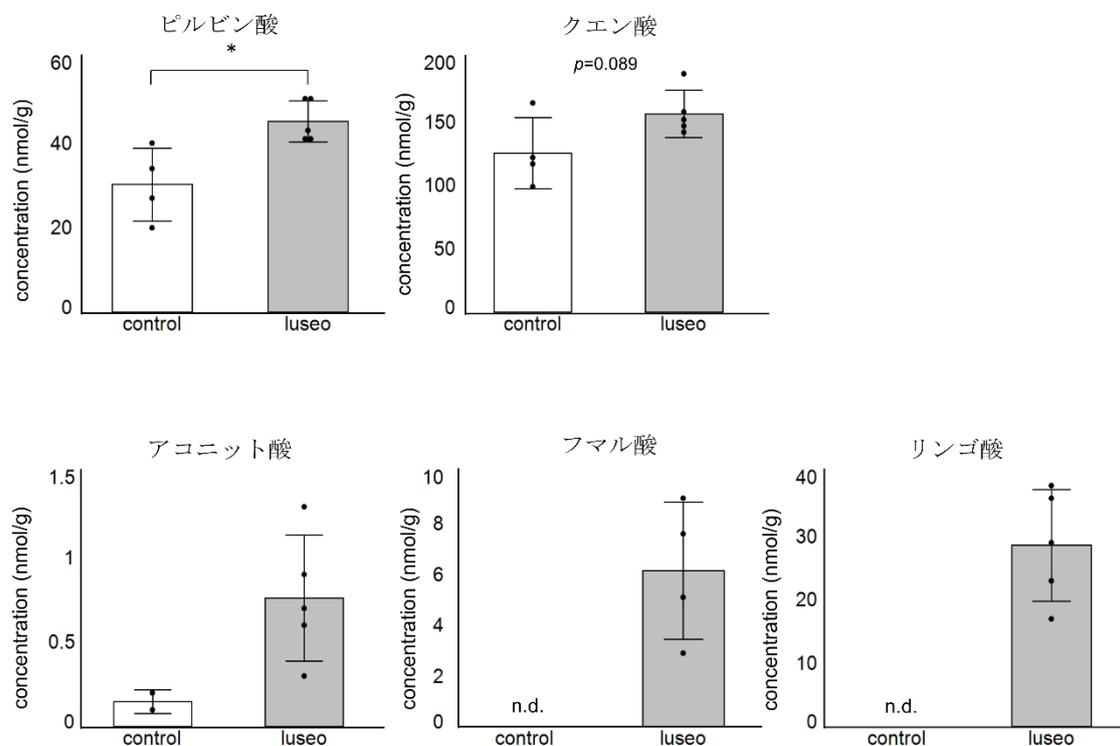


Figure 19. 膵島の TCA サイクルにおける代謝産物

10 週齢の *db/db* マウスの膵島の TCA サイクルにおける代謝産物をメタボローム解析で評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) (n=4-5) (平均 ± SD)  
 \* $p < 0.05$ 、n.d.; not detected (測定感度未満)

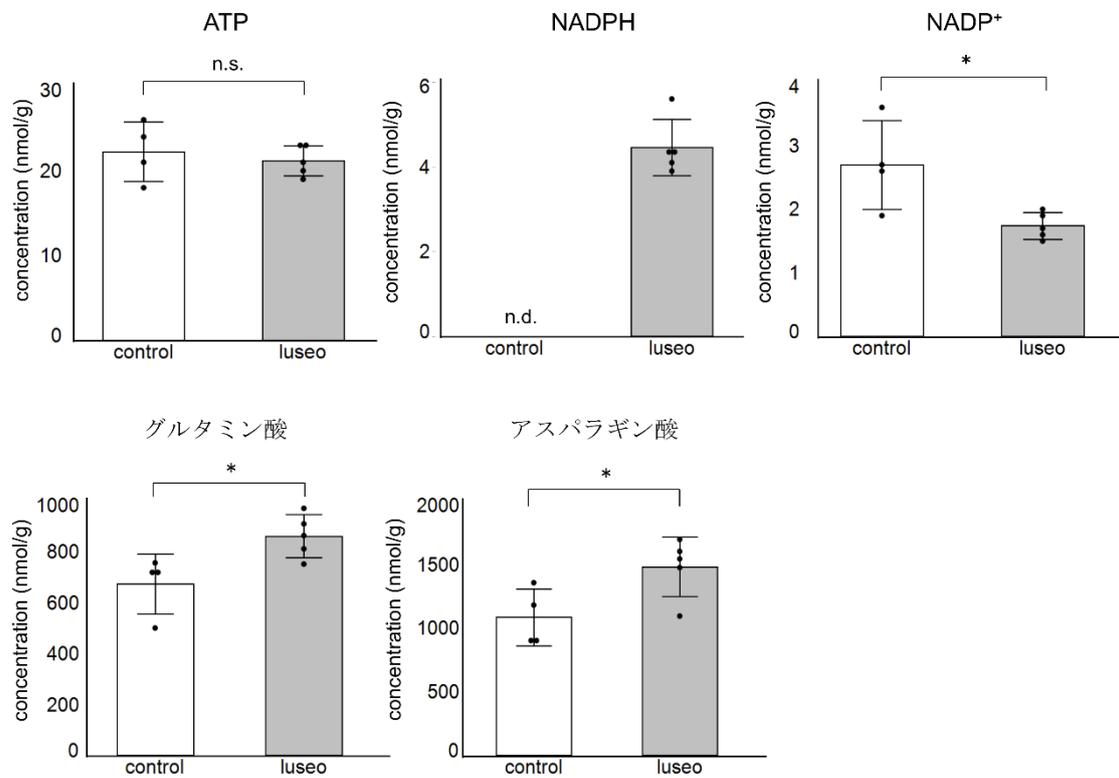


Figure 20. 膵島のインスリン分泌に関わる代謝産物

10 週齢の *db/db* マウスの膵島のインスリン分泌に関わる代謝産物をメタボローム解析で評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) (n=4-5) (平均 ± SD)

\* $p < 0.05$ 、n.s.; not significant、n.d.; not detected (測定感度未満)

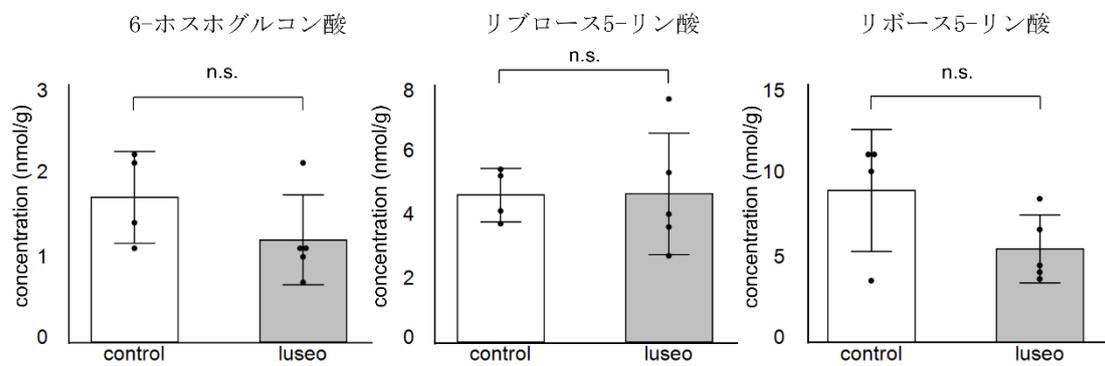


Figure 21. 腓島のペントースリン酸経路における代謝産物

10 週齢の *db/db* マウスの腓島のペントースリン酸経路における代謝産物をメタボローム解析で評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) (n=4-5) (平均 ± SD) n.s.; not significant

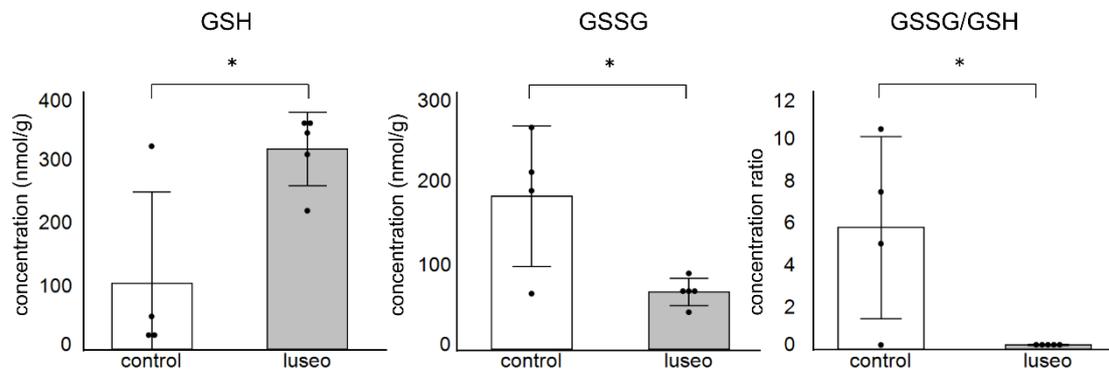


Figure 22. 腓島におけるグルタチオンの濃度

10 週齢の *db/db* マウスの腓島におけるグルタチオンの濃度をメタボローム解析で評価した。control 群 (白)、luseo 群 (灰色) (n=4-5) (平均  $\pm$  SD) \* $p < 0.05$

## 7. 考察

本研究では、SGLT2 阻害薬がミトコンドリア機能の改善を介して膵β細胞の量や機能を保護することを示した。我々は *db/db* マウスにおいて、ルセオグリフロジンの投与が膵島の Complex II 由来のミトコンドリア呼吸能を改善し、ミトコンドリアでの ROS の産生を減少させることを示した。さらに、ルセオグリフロジンの投与はミトコンドリアの形態を正常に維持し、膵β細胞の成熟や分化に関わる NKX6.1 の発現を増加させた。ルセオグリフロジンによるミトコンドリア機能の改善と NKX6.1 の発現の増加は、ブドウ糖代謝を解糖系優位から TCA サイクル優位へとシフトし、膵β細胞の保護に寄与したと考えられる。

SGLT2 阻害薬は膵β細胞に直接的には作用しないことや(Chae et al., 2020)、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(Haythorne et al., 2019)、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作用と考えられる。慢性的な高血糖は膵β細胞にブドウ糖毒性を引き起こすが、その一因は ROS 産生の増加にある(Poitout et al., 2008 ; Prentki et al., 2020)。過剰なミトコンドリアでの ROS 産生は、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生み(Giorgi et al., 2018)、膵β細胞の機能不全を引き起こす。我々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での過剰な 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細胞の障害を防ぐ可能性が示唆された。さらに本研究では、ルセオグリフロジンの投与によって膵島における GSH の濃度が増加することを示した。膵β細胞は抗酸化酵素の発現レベルが他臓器と比較して非常に低いため、酸化ストレスにより障害されやすいことがわかっている(Tiedge et al., 1997)。ルセオグリフロジンによる高血糖の改善は ROS 産生の抑制だけでなく、GSH などの抗酸化物質を増加させ酸化ストレスを軽減することで膵β細胞を保護する可能性が示唆された。

膵島のミトコンドリア呼吸能に対する SGLT2 阻害薬の効果はこれまで詳細に検討されていない。本研究では、膵島において電子伝達系の Complex I よりも Complex II を介した酸化的リン酸化が優位であることを示した。さらに、ルセオグリフロジンによる高血糖の改善は膵島の Complex II 由来の呼吸能を増加させ、ミトコンドリアでの ROS の産生を減少させた。従来 Complex I および III が主要な ROS の発生源とされてきたが(Kowaltowski et al., 2009)、近年では Complex II が強力な ROS の発生源の一つであることが認識されている(Drose et al., 2013 ; Quinlan et al., 2012)。したがって、ミトコンドリアの電子伝達系 Complex II は、

膵β細胞における正常なミトコンドリア機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究では、ルセオグリフロジンの投与がミトコンドリアのネットワークを改善し、ミトコンドリアの膨化を防ぐことも明らかにした。ミトコンドリアは融合、分裂、マイトファジーによってネットワークを形成しており、正常なネットワークの形成がミトコンドリア機能の保持に重要である(Mishra et al., 2014)。高血糖など、栄養が豊富な環境にさらされた膵β細胞はミトコンドリアネットワークの断片化を示す傾向があり、その結果膵β細胞のアポトーシスが起こる(Molina et al., 2009)。さらに、ミトコンドリアの膨化は過剰な酸化ストレスにより引き起こされ、膵β細胞機能の低下につながる(Molina et al., 2009 ; Liu et al., 2013)。これらの知見からルセオグリフロジンは高血糖を改善しミトコンドリアでの ROS の産生を抑制することで、ミトコンドリアの障害を防ぎ膵β細胞を保護している可能性が示唆された。

先行研究では、ルセオグリフロジンの投与が ROS 産生の抑制を介して V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (*Mafa*)や Pancreas/duodenum homeobox 1 (*Pdx1*)などの転写因子の発現を増加させ、膵β細胞の量と機能を保護する可能性が示唆された(Takahashi et al., 2018)。本研究ではさらに、ルセオグリフロジンが膵β細胞の成熟や分化に重要な NKX6.1 の発現を増加させることを示した。NKX6.1 の発現は酸化ストレスの軽減によって改善することから(Guo et al., 2013)、ルセオグリフロジンによる高血糖の改善が引き起こすミトコンドリアでの ROS 産生の低下が、NKX6.1 の発現の増加に寄与すると考えられる。NKX6.1 は、*Ccnd2* を介して膵β細胞の増殖を促進する(Taylor et al., 2013)とともに、*Pcx* を介して TCA サイクルで生成される NADPH やリンゴ酸などの膵β細胞の増殖に関わる基質を供給する(Xu et al., 2008 ; Liu et al., 2005)。本研究では、ルセオグリフロジンの投与により *Ccnd2* と *Pcx* の発現が亢進し、膵島における NADPH やリンゴ酸の濃度が増加したことを示した。したがって、ルセオグリフロジンの投与による NKX6.1 の発現の増加は、膵β細胞量の保持に大きな影響を与えていると考えられる。

ルセオグリフロジンの投与は膵島内で TCA サイクルから生成される NADPH の濃度を増加させたが、NADPH は膵β細胞の増殖だけではなく、インスリン分泌にも重要であることがわかっている(Jitrapakdee et al., 2010)。これまでの研究で、NADPH は電位依存性カリウムチャンネルを不活化することで膵β細胞の再分極を抑制し、細胞内へのカルシウム流入を増加させインスリン顆粒のエキソサイトーシスを誘発することが示されている(Ivarsson et al., 2005 ; MacDonald et al., 2005)。さらに本研究では、ルセオグリフロジンの投与によって膵島におけるグルタミン酸の濃度が増加することを示した。グルタミン酸は、TCA サイクルか

ら生成され、インスリン分泌を促進させる働きをもつ(Maechler et al., 1999)。最近の研究では、グルタミン酸がインクレチン誘導性にインスリン分泌を促進することが示された(Gheni et al., 2014)。したがって、ルセオグリフロジンによる膵β細胞機能の保護には、TCA サイクルで生成される NADPH とグルタミン酸が重要な役割を果たしていると考えられる。

既存の経口血糖降下薬の中には、ミトコンドリアの電子伝達系に作用するものが複数報告されている。メトホルミンは Complex I を阻害し、adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)の活性化を介して肝臓での糖新生を抑制する(Owen et al., 2000 ; Foretz et al., 2014)。また新規の経口血糖降下薬であるイメグリミンは、肝臓において Complex I を部分的に阻害する一方で Complex III の機能を保持することで Complex I からの過剰な ROS 産生を低下させる(Vial et al., 2015 ; Hallakou-Bozec et al., 2021)。今回ルセオグリフロジンの膵β細胞保護効果が、Complex II 由来の呼吸能の改善と、Complex II 由来の ROS 産生の低下に起因することを示した。したがって、組織選択性の問題は残るものの、膵β細胞において Complex II を保護することは、2型糖尿病の新たな治療標的となるかもしれない。

今回の研究にはいくつかの限界がある。第一に、週齢の進んだ *db/db* マウスに対する SGLT2 阻害薬の効果や、長期投与による効果を評価していない。ルセオグリフロジンの投与開始時期が早ければ早いほど膵β細胞に対する保護効果が大きくなるため(Kimura et al., 2018)、本研究は糖尿病発症初期にあたる6週齢の *db/db* マウスを対象とした。しかし今後、週齢や投与期間を変えたうえで本研究と同様の解析を行うべきである。第二に、ルセオグリフロジンの効果を他の血糖降下薬と比較できていない。他の血糖降下薬は膵β細胞に直接的に作用するか、あるいは血糖をルセオグリフロジンと同程度に十分低下させることができないからである。インスリンによる治療は血糖を同程度に低下させることができるが、インスリンシグナルによる膵β細胞への影響を排除することはできなかった(Omori et al., 2019)。したがって、ルセオグリフロジンが高血糖を改善するだけでなく、他因子を介して膵β細胞に特異的な作用を有するかを *in vivo* で検証することは難しく、今後の検討課題である。

## 8. 結語

ルセオグリフロジンを *db/db* マウスに 4 週間投与したところ、ブドウ糖毒性が解除され、膵島のミトコンドリアにおける ROS 産生が低下し、Complex II 由来の呼吸能が改善した。ルセオグリフロジンによる血糖改善効果は、ミトコンドリアでの過剰な ROS の産生と Complex II の障害という悪循環を是正し、膵β細胞の成熟や分化に関与する NKX6.1 の発現を増加させ、TCA サイクルにおける糖代謝を改善することで膵β細胞の保護に寄与した可能性が示唆された。今回の結果から、膵β細胞におけるミトコンドリアの電子伝達系 Complex II の保護が、2 型糖尿病の新たな治療ターゲットになるかもしれない。

## 9. 結論

肥満糖尿病モデルマウスにおいて SGLT2 阻害薬の 1 つであるルセオグリフロジンが膵  $\beta$  細胞量と機能を保護する機序を明らかにした。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。

6 週齢の雄性 *db/db* マウスを普通食飼育群 (control 群) と 0.01%ルセオグリフロジン含有食飼育群 (luseo 群) の 2 群に分けて 4 週間、10 週齢まで飼育したところ、

1. control 群と比べ luseo 群で随時血糖は有意に低下した
2. control 群と比べ luseo 群の膵島では糖の取り込みや TCA サイクル、電子伝達系に関する遺伝子発現が有意に上昇した
3. control 群と比べ luseo 群の膵島ではミトコンドリアの電子伝達系 Complex II 由来の呼吸能が高く、ミトコンドリアの ROS 産生は有意に低下した
4. control 群と比べ luseo 群の膵  $\beta$  細胞ではミトコンドリアのネットワークが保たれ面積が増加し、ミトコンドリアの膨化が抑制された
5. control 群と比べ luseo 群の膵  $\beta$  細胞では膵  $\beta$  細胞の成熟や分化に関わる NKX6.1 の発現が有意に上昇した
6. control 群と比べ luseo 群の膵島では糖代謝が解糖系優位から TCA サイクル優位へシフトし、インスリン分泌に関わる代謝産物の濃度が上昇した

これらの結果から、ルセオグリフロジンによるブドウ糖毒性の解除はミトコンドリアにおける過剰な ROS 産生と Complex II の障害という悪循環を是正し、NKX6.1 の発現を上昇させて TCA サイクルにおける糖代謝を改善することで、膵  $\beta$  細胞の量や機能を保護したと考えられる。

この研究は、膵  $\beta$  細胞におけるミトコンドリアの電子伝達系 Complex II の保護が、2 型糖尿病の新たな治療ターゲットになる可能性を示唆する。

今後は週齢の進んだ *db/db* マウスに SGLT2 阻害薬を投与した場合や、長期間投与した場合についても同様に検討する必要がある。また、今回の結果が血糖改善効果だけでなく SGLT2 阻害薬に特異的な効果によるものか明らかにすることは今後の検討課題である。

## 10. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室 博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室、渥美達也教授には指導教官として本研究の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。また同教室の中村昭伸先生、北海道大学病院医療・ヘルスサイエンス研究開発機構特任講師の横田卓先生には研究の立ち上げから論文作成に至るまで終始、丁寧かつ熱心に御指導、適切な御助言をいただきました。ここに心より深く感謝の意を表します。

また Olga Amengual 講師には英語の学会発表をはじめとするプレゼンテーションに関して有益な御討論、御助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。北海道大学大学院医学研究院 糖尿病・肥満病態治療学分野特任教授三好秀明先生、北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室の曹圭龍先生、亀田啓先生、野本博司先生、高橋清彦先生、大森一乃先生、土田和久先生、川田晋一郎先生には研究カンファレンスで有益な御討論、御助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

また当科実験助手の藤森なつみさん、渡邊真理華さん、北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室の佐藤真実さんの御協力なしに実験を遂行することは不可能でした。心より感謝を申し上げます。この他にもこの論文作成にあたり、ここに書ききれないくらい多くの御協力、御助言、御支援をいただきました。重ねまして心より感謝を申し上げます。最後に研究活動を支えてくれました家族に心から感謝致します。

## 11. 利益相反

開示すべき利益相反状態は以下の通りである。

本研究は大正製薬株式会社から研究費の支援を頂き実施された。ただし本研究の研究デザイン、データ収集・解析、論文執筆、発表において大正製薬株式会社は一切関与していない。

## 12. 引用文献

Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.

Chae H, Augustin R, Gatineau E, Mayoux E, Bensellam M, Antoine N, Khattab F, Lai BK, Brusa D, Stierstorfer B, et al. (2020). SGLT2 is not expressed in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells, and its inhibition does not directly affect glucagon and insulin secretion in rodents and humans. *Mol. Metab.* 42, 101071.

Drose S. (2013). Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 578-587.

Ferrannini E, Gastaldelli A, Miyazaki Y, Matsuda M, Mari A, DeFronzo RA. (2005). Beta-cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 493-500.

Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. (2014). Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 20, 953-966.

Ge T, Yang J, Zhou S, Wang Y, Li Y, Tong X. (2020). The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. *Front. Endocrinol.* 11, 365.

Gheni G, Ogura M, Iwasaki M, Yokoi N, Minami K, Nakayama Y, Harada K, Hastoy B, Wu X, Takahashi H, et al. (2014). Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. *Cell Rep.* 9, 661-673.

Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, Ren Z, Morciano G, Perrone M, Patalas-Krawczyk P, Borchard S, Jędrak P, Pierzynowska K, et al. (2018). Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 340, 209-344.

Guo S, Dai C, Guo M, Taylor B, Harmon JS, Sander M, Robertson RP, Powers AC, Stein R. (2013). Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 123, 3305-3316.

Haythorne E, Rohm M, van de Bunt M, Brereton MF, Tarasov AI, Blacker TS, Sachse G, Silva Dos Santos M, Terron Exposito R, Davis S, et al. (2019). Diabetes causes marked inhibition of mitochondrial metabolism in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nat Commun.* 10, 2474.

Hallakou-Bozec S, Vial G, Kergoat M, Fouqueray P, Bolze S, Borel AL, Fontaine E, Moller DE. (2021). Mechanism of action of Imeglimin - A novel therapeutic agent for type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 23, 664-673.

- Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renström E, Schuit FC. (2005). Redox control of exocytosis. Regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes* 54, 2132-2142.
- Jitrapakdee S, Wutthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ. (2010). Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 53, 1019-1032.
- Kimura T, Obata A, Shimoda M, Okauchi S, Kanda-Kimura Y, Nogami Y, Moriuchi S, Hirukawa H, Kohara K, Nakanishi S, et al. (2018). Protective effects of the SGLT2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic  $\beta$ -cells in db/db mice: The earlier and longer, the better. *Diabetes Obes. Metab.* 20, 2442-2457.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333-343.
- Liu Y, Shi S, Gu Z, Du Y, Liu M, Yan S, Gao J, Li J, Shao Y, Zhong W, et al. (2013). Impaired autophagic function in rat islets with aging. *Age* 35, 1531-1544.
- Liu YQ, Han J, Epstein PN, Long YS. (2005). Enhanced rat beta-cell proliferation in 60% pancreatectomized islets by increased glucose metabolic flux through pyruvate carboxylase pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E471-478.
- MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. (2005). Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360, 2211-2225.
- Maechler P, Wollheim C. (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402, 685-689.
- Mishra P, Chan DC. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 634-646.
- Molina AJ, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, Walzer G, Twig G, Katz S, Corkey BE, et al. (2009). Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58, 2303-2315.
- Omori K, Nakamura A, Miyoshi H, Takahashi K, Kitao N, Nomoto H, Kameda H, Cho KY, Takagi R, Hatanaka KC, et al. (2019). Effects of dapagliflozin and/or insulin glargine on beta cell mass and hepatic steatosis in db/db mice. *Metabolism* 98, 27-36.
- Owen MR, Doran E, Halestrap AP. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 348, 607-614.
- Poitout V, Robertson RP. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr. Rev.* 29, 351-366.

- Prentki M, Peyot ML, Masiello P, Madiraju SRM. (2020). Nutrient-induced metabolic stress, adaptation, detoxification, and toxicity in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 69, 279-290.
- Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 287, 27255-27264.
- Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, et al. (2003). Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 300, 216-222.
- Takahashi K, Nakamura A, Miyoshi H, Nomoto H, Kitao N, Omori K, Yamamoto K, Cho K, Terauchi Y, Atsumi T. (2018). Effect of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic beta cell mass in *db/db* mice of different ages. *Sci. Rep.* 8, 6864.
- Taylor BL, Liu FF, Sander M. (2013). Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep.* 4, 1262-1275
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733-1742.
- U.K. Prospective Diabetes Study Group. (1995). U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 year's therapy of type II diabetes: a progressive disease. *Diabetes* 44, 1249-1258.
- Vial G, Chauvin MA, Bendridi N, Durand A, Meugnier E, Madec AM, Bernoud-Hubac N, Pais de Barros JP, Fontaine É, Acquaviva C, et al. (2015). Imeglimin normalizes glucose tolerance and insulin sensitivity and improves mitochondrial function in liver of a high-fat, high-sucrose diet mice model. *Diabetes* 64, 2254-2264.
- Xu J, Han J, Long YS, Epstein PN, Liu YQ. (2008). The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 51, 2022-2030.