

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17535

研究課題名（和文）SGLT2阻害薬による膵 細胞保護効果機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanisms of pancreatic beta-cell protection by SGLT2 inhibitor

研究代表者

神野 歩（Kanno, Ayumi）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：60757285

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病モデルdb/dbマウスにSGLT2阻害薬を早期から投与した群と後期から投与した群では膵 細胞量が有意に異なり、早期から投与した方が明らかに膵 細胞量は維持されていた。これは、早期から投与することによってエピジェネティック制御が関与していると考えられ、各群のマウス膵島における遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイ解析で遺伝子発現が亢進し、DNAメチル化が低下している遺伝子群を20個抽出し、それらに関しての特異的なプライマーを用いて個別に遺伝子発現解析を行った結果、SGLT2投与によってエピゲノム変化を介して遺伝子発現変化を呈している分子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、近年注目されている糖尿病治療薬による臓器保護効果の一端を解明することに近づいたと考えられる。特にSGLT2阻害薬による膵 細胞保護効果については、世界中の研究室から報告されているものの、その機序についてはまだ不明である。本研究計画では、DNAメチル化と遺伝子発現を組み合わせることによって、SGLT2阻害薬の膵 細胞保護効果において直接影響する候補分子の同定を行った。DNAメチル化を合わせて解析することで、さらに再現性の高い候補分子であると考えられる。これらの分子同定はSGLT2阻害薬を糖尿病患者に使用するうえで臓器保護効果の確認にも応用でき、臨床的に非常に意義が高いものである。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic  $\beta$ -cell volume was significantly different between groups of type 2 diabetes model db/db mice treated with SGLT2 inhibitor from early and late stage, and the pancreatic  $\beta$ -cell volume was clearly maintained in the group treated from early stage. This is thought to involve epigenetic regulation by early administration, and gene expression analysis was conducted in the mouse pancreatic islets of each group. We extracted 20 genes whose gene expression was upregulated and DNA methylation was downregulated by microarray analysis, and performed gene expression analysis using specific primers for each gene individually.

研究分野：代謝・内分泌学

キーワード：膵 細胞 2型糖尿病 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病人口は急速に増加しており、深刻な社会問題である。日本人は欧米人よりも低い BMI で糖尿病を発症しやすく、血糖上昇に反応して膵β細胞でインスリン分泌を増強させたり、量を増大させたりする代償機構が弱い遺伝的素因をもつ者が多いことが知られている。さらにこうした遺伝的素因に加え、戦後徐々に増加してきた肥満傾向の増大も日本人の膵β細胞量に影響を及ぼしていると考えられる。

最近代表者は、糖尿病治療薬の一つである SGLT2 阻害薬の早期投与が膵β細胞保護効果において非常に有効であることを報告した (Kanno A, et al. *J Diabetes Invest*, 10:577-590, 2019)。肥満糖尿病モデルマウスである db/db マウスに SGLT2 阻害薬を投与すると、遅い時期からの投与開始でも膵β細胞保護効果は認められるが、早期 (若い週齢) から投与を開始する方が、有意に効果が増強することが明らかとなった。その機序を解明すべく膵島を用いてマイクロアレイ解析をしたところ、Trefol Factor 2 (TFF2)、Gastroke 3 (GKN3)、Anterior Gradient 2 (AGR2) の 3 つの分子が共通して早期投与群の膵島で発現が亢進していた。これらの分子はいずれも細胞増殖・保護効果を持つことが既に知られており、SGLT2 阻害剤早期投与における重要な因子と考えられた。

しかしながら、これらの分子の発現亢進が、SGLT2 阻害剤特異的なものかどうかについては不明であり、また発現亢進の機序もまだわかっていない。糖毒性解除によるものと考えられるが、代表者の予備検討では、他の血糖降下薬と比べて有意に SGLT2 阻害剤は膵β細胞保護効果があると思われ、また他施設からも同様の結果が報告されている (*Metab Clin Exp*, 98:27-36, 2019)。SGLT2 阻害剤特異的な「遺産効果」の分子メカニズムを解明することが、2 型糖尿病における膵β細胞不全発症機序の解明につながり、また患者の病態に合わせた適切な治療方法の選択に繋がるものと期待される。

## 2. 研究の目的

最近代表者は、8 週齢から 6 週間 SGLT2 阻害剤を投与したマウスと、14 週齢から 6 週間 SGLT2 阻害剤を投与したマウスを用いて、それぞれ 20 週齢、26 週齢における膵β細胞量の測定を行った。その結果、8 週齢から、すなわち早期から SGLT2 阻害剤を投与した群の方が期間は同じでも膵β細胞保護効果が高いことが明らかとなった。そこで本研究計画では、その分子機序を明らかにすることを目的とした。前述したとおり、膵島を用いたマイクロアレイ解析では TFF2、GKN3、AGR2 といった分子の発現亢進が認められたが、これらの遺伝子発現の変化が、膵β細胞保護の「原因」となるものか「結果」によるものかは明らかではなかった。そこで、SGLT2 阻害剤早期投与が起こしうる分子機序を考えた。疾患において早期からの治療が後々にまで影響する効果を「遺産効果」と呼ぶが、その主要な機序としてエピジェネティクスが重要と言われている。そこで代表者は、既報と同様に、SGLT2 阻害剤を投与した時期・期間別に 4 群に分類し、それぞれの群から単離した膵島を用いて網羅的 DNA メチル化解析 (MBD-Seq) を行うこととした。これにより、早期の SGLT2 阻害剤が膵β細胞に及ぼす遺産効果の機序が解明されることが期待される。既に解析済みのマイクロアレイ解析と DNA メチル化解析を組み合わせることで、遺伝子発現変化が DNA メチル化によるものかどうか

を検討した。これらの解析を通じて、SGLT2 阻害剤による表現型の原因機序として高い再現性が期待され、今後の糖尿病診療における SGLT2 阻害剤使用選択の一助になるものと考えている。

### 3. 研究の方法

マウス：C57BL/KsJ 系統の db/db、db/m マウス(クレア・ジャパン)を 12 時間ごとの明暗室で飼育し通常食を与えた。血糖値と血清インスリン値については尾静脈より採血し測定を行った。尿量、尿糖排出量、摂餌量については個別代謝ケージ(クレア・ジャパン)を用いて 24 時間測定した。すべての実験は雄マウスを用いて行った。

マウスへのダパグリフロジン (dapa) 投与：2 型糖尿病モデルマウスの db/db マウスを、SGLT2 阻害剤である dapa と生理食塩水を投与した期間と時期により 4 つのグループに分類した。グループ 1 は 9 週齢から 20 週齢まで生理食塩水を経口投与(群)、グループ 2 は 9 週齢から 14 週齢までは体重 1 kg あたり 1 mg の dapa を、15 週齢から 20 週齢までは生理食塩水を経口投与(群)、グループ 3 は 9 週齢から 14 週齢までは生理食塩水を、15 週齢から 20 週齢までは体重 1 kg あたり 1 mg の dapa を経口投与(群)、グループ 4 は 9 週齢から 20 週齢まで体重 1 kg あたり 1 mg の dapa を経口投与した(群)。随時血糖、随時血清インスリン値、体重は 8 週齢から 1 週間毎に測定した。さらに 21 週齢からすべてのグループに体重 1 g あたり 1 mg の dapa を 6 週間、追加で経口投与した。コントロールとして db/m マウスを用いて同様の実験を行った。

免疫染色と膵島の形態学的解析：摘出した膵臓をボアン液で固定しパラフィンに包埋した後、4-5  $\mu\text{m}$  に薄切して切片を作成した。この切片を抗インスリン抗体と抗グルカゴン抗体(Agilent Technologies)でそれぞれ染色した。そして Cy3 と FITC 結合 2 次抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories)でそれぞれ検出した。膵細胞と膵細胞の定量法については既報を参考にした。TUNEL 染色は、膵島切片をアポトーシス in situ 検出キットワコー(Wako)を用いて標識した。Ki67 染色は、膵島切片を抗 Ki67 抗体(Abcam)で恒温静置し、Cy3 結合 2 次抗体で検出した。

単離膵島からの RNA 抽出：20 週齢の db/db、db/m マウスから各グループ 4 匹ずつ、既に報告している通りに膵島を単離した。総 RNA は RNeasy Mini Kit(Qiagen) を用いて手順通りに抽出した。RNA の量と質は推奨に従い、NanoDrop One Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc)と Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて測定した。抽出したサンプルはマイクロアレイ解析に用いた。

マイクロアレイデータの解析：検出されたそれぞれの強度はバックグラウンドを排除した Agilent feature 抽出ソフトウェアバージョン 11.5.1.1 を用いて定量した。標準化には Agilent GeneSpring ソフトウェアバージョン 14.8 を用いた(per chip: normalization to 75th percentile shift)。

網羅的 DNA メチル化解析：サンプルのクオリティチェック(QC)を行った後、メチル化 DNA 結合タンパク(MBD2b)を用いてメチル化 DNA に特異的に結合するタンパク質、抗体を用いてメチル化 DNA を濃縮し、シーケンスライブラリーを調製した。調製したシーケンスライブラリーは、illumina 社の次世代シーケンサーでシーケンスを行った。

統計学的検討：データは mean  $\pm$  SEM、2-tailed Student 's の t 検定による分散解析

を用いて評価した。\*: $P < 0.05$ 、\*\*: $P < 0.01$ とした。

#### 4. 研究成果

まず体重を測定したところ、db/db マウスに 8 週齢から dapa を投与した 群と 群では初期に体重減少が認められた。しかしながら 20 週齢時においては、 群 (dapa 非投与) と比較して有意な体重増加を認めた。

次に血糖値の経時的な測定を行った。Dapa 投与前には全群において約 350mg/dl の血糖値であったが、dapa を投与した 群と 群では投与後一週間で 200mg/dl 以下まで低下した。その後 dapa を投与していない 群と 群では 14 週齢時に 600mg/dl 近くまで上昇したが、 群では 200mg/dl 前後にとどまった。14 週齢より dapa 投与を 群と 群で入れ替えたところ、 群は速やかに 群と同程度の血糖値まで低下した。一方、 群は dapa を中止したことにより血糖値は急激に上昇したが、 群よりも有意に低い値を維持した。db/m マウスでは dapa による血糖値への大きな影響は認められなかった。

血清インスリン値を測定したところ、dapa 投与開始前の時点においては 群から 群まで全て同等の血清インスリン値が認められた。しかしながら実験終了時の 20 週齢では、他の群と比較して 群で有意に血清インスリン値が低下しており、 群、 群、 群では血清インスリン値が保たれていることから、これらの群においてはインスリン分泌が十分維持されていることが示唆された。

続いて各群における膵 細胞量の測定を行った。db/db マウスは若齢期においてはインスリン抵抗性に対して膵 細胞が代償的に過形成を起こすことが知られている。しかしながら db/db の 群では、20 週齢で db/m マウスとほぼ同程度の膵 細胞量まで減少していることが示された。それに対して、dapa を全期間 (12 週間) 投与した 群では約 3 倍の膵 細胞量を維持しており、糖毒性解除が膵 細胞量に及ぼす影響の大きさが明らかとなった。興味深いことに、期間の半分である 6 週間のみ dapa を投与した 群と 群でも 群と比べて膵 細胞量は有意に維持されていた。特に 群においては、dapa 終了後 6 週が経過しても膵 細胞量が有意に保たれていることが、20 週齢における血糖値の有意差に結びついていると考えられ、早期からの dapa 投与が長期にわたる膵 細胞量ならびに血糖値維持に役立つことが示唆された。

次に各群における膵島の形態を観察したところ、db/db の 群では膵 細胞量減少に加え、膵 細胞量の増加ならびに膵島構造の破綻などが認められた。db/db の 群では膵 細胞量だけではなく、膵島の形態においても非常に維持されていることが明らかとなった。 群、 群においても膵島形態は維持されていたが、 群とは異なり膵島中心部に膵 細胞の存在が認められた。

Dapa 投与の期間と時期が膵 細胞量に影響を及ぼすことが明らかになったが、長期的にはどのような効果を及ぼすかについて 4 群を比較するのは困難である。そこで、21 週齢より全 4 群に対して Dapa の投与を 6 週間行い、26 週齢で血糖測定、血清インスリン値測定、膵 細胞量測定を行った。その結果、26 週齢において、やはり 群が最も血糖値が高く、 群において最も血糖改善効果が高いということが明らかとなった。興味深いことに、 群と 群を比較してみたところ、 群の方が有意に血糖改善効果が高かった。血清インスリン値に関しては 群で有意に上昇しており、これにより血糖値が改善していると考えられた。また膵 細胞量を測定したところ、やはり 群が最も小さ

く、群が最も大きかったが、興味深いことに群の膵細胞量が群と比較して増大傾向を示していた。20週齢からの糖毒性解除によって最も膵細胞保護効果がもたらされたのは、群であったと思われる。

こうした表現型の違いが起こる機序を分子レベルで解明すべく、20週齢における群から群までの各マウスの膵島を用いてマイクロアレイ解析を行った。群、群、群それぞれを群と比較し、発現比2倍以上の遺伝子を抽出した。その結果、群で上昇したものが209、下降したものが1826、群で上昇したものが237、下降したものが3015、群で上昇したものが203、下降したものが547であった。

さらに遺伝子発現変化が早期から起こる機序として、エピジェネティクス修飾が関与している可能性が考えられる。代表者はエピジェネティクス修飾の一つであるDNAメチル化変化を網羅的に解析することとした。すなわち、DNAメチル化が遺伝子発現に影響していると考えられる分子の抽出を行った。DNAメチル化亢進かつ遺伝子発現減少した分子、あるいはDNAメチル化低下かつ遺伝子発現増加した分子の検討を行った。Dapaを12週間投与し続けた群と、12週間生食を与えた群、また後半6週間のみdapaを与えた群とを比較した結果、DNAメチル化低下かつ発現上昇を認めた分子はそれぞれ13、17種類であった。DNAメチル化亢進かつ発現低下を示した分子は、群と比較したC77370のみであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue H, Asahara SI, Sugiura Y, Kawada Y, Imai A, Hara C, Kanno A, Kimura-Koyanagi M, Kido Y.	4. 巻 534
2. 論文標題 Histone deacetylase 6 regulates insulin signaling in pancreatic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 896-901
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.078.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kanno A, Asahara SI, Furubayashi A, Masuda K, Yoshitomi R, Suzuki E, Takai T, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Bartolome A, Hirota Y, Yokoi N, Inaba Y, Inoue H, Matsumoto M, Inoue K, Abe T, Wei FY, Tomizawa K, Ogawa W, Seino S, Kasuga M, Kido Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 GCN2 regulates pancreatic cell mass by sensing intracellular amino acid levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e128820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.128820.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------