

## 学位論文の要旨,

学位の種類	博 士	氏 名	Kuralay K. Atageldiyeva
<p>学位論文題目,</p> <p>Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor and a low carbohydrate diet affect gluconeogenesis and glycogen content differently in the kidney and the liver of non- diabetic mice</p> <p>(Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2)阻害薬と低炭水化物食は非糖尿病マウスの腎臓と肝臓における糖新生とグリコーゲン蓄積に異なった作用を及ぼす。)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>藤田 征弘、柳町剛司、水元 克俊、竹田 安孝、本庄 潤、滝山 由美、 安孫子 亜津子、牧野 雄一、羽田 勝計</p> <p>PLoS ONE 11(6): e0157672. 2016年</p> <p>doi:10.1371/journal.pone.0157672</p> <p>研究目的,</p> <p>炭水化物は生体の恒常性を維持するために必須の栄養素であり、エネルギー源として重要な役割を担っている。炭水化物は必要不可欠な栄養素であるが、その過剰摂取は肥満や2型糖尿病を誘発する。食事療法は、特に合併症を伴う肥満症患者にとって重要な治療法である。食事療法として、総カロリー制限が一般的であるが、低炭水化物食 (LCHD) や低脂肪食など特定の栄養素摂取を減少させる方法もある。低炭水化物食は食事由来の炭水化物を減少させることで食後血糖を低下させ、肥満やインスリン抵抗性を改善させる可能性が示唆されている。一方、新しい経口糖尿病薬である SGLT2阻害薬も、血糖降下作用のみならず、肥満やインスリン抵抗性を改善させる効果が期待されている。SGLT2阻害薬は、腎臓からブドウ糖再吸収を阻害し、尿糖排出を促進することでその薬理効果を発揮する。LCHD と SGLT2阻害薬はともにブドウ糖利用を低下させ、脂肪酸化やケトン体産生を促す。しかし、相違点を詳しく検討した研究は少ない。本研究では、正常マウスを用いて、LCHD と SGLT2阻害薬、その併用が糖代謝にどのように影響するか検討した。さらに肝臓と腎臓で、糖新生やグリコーゲン蓄積、脂肪酸代謝等にどう影響するかを検討した。</p>			

(1)

※用紙の大きさは、A4判とし23×17cmの枠内におさめ、パソコン等で印字すること。

※用紙は、各自で作成すること。

## 材料・方法,

マウスは6週齢の C57-B16J を用い、生理食塩水または SGLT2阻害薬(イプラグロフロジン (Ipra):3mg/kg 体重)を強制経口投与し、通常炭水化物食(NCHD)(炭水化物:タンパク:脂質(C:P:F) = 68:21:12% kJ)または低炭水化物食(LCHD)は、(C:P:F = 16:40:44% kJ)を自由摂食下に8週間飼育した。マウスは、LC (LCHD のみ)、LC+Ipra(LCHD と Ipra の併用)、NC(NCHD のみ; 対照)、NC+Ipra(NCHD と Ipra の併用)の4群に分け、体重、随時血糖値、摂餌量を56日目まで測定した。経口ブドウ糖負荷試験(OGTT 2mg/g 体重)は53日目に施行し、血糖値を0, 15, 30, 60, 90, 120分後測定した。インスリン負荷試験(ITT)は、4時間絶食後、0.6単位/kg 体重のレギュラーインスリンを腹腔内注射し、0, 30, 60, 90分後の血糖値を測定した。遊離脂肪酸(FFA)、ケトン体(3-OHBA)、中性脂肪(TG)は酵素色素法で、インスリンとグルカゴンは ELISA 法で測定した。実験最終日に全身麻酔下に屠殺・解剖後、精巣上体脂肪重量を測定した。また、腎臓と肝臓は、total RNA、TG/グリコーゲン組織含有量測定のため、液体窒素内にて測定まで保存した。また、組織の一部は、組織学的検討のために固定して、パラフィン切片を作成した。腎臓と肝臓での遺伝子発現は total RNA を抽出後、逆転写酵素にて cDNA を作成し、定量的 PCR 法を TaqMan アッセイで検討した。組織中の TG 含量は、KOH エタノールで消化後、エタノールで抽出し、中和後酵素色素法にて測定した。組織中のグリコーゲン含量は、Glycogen Assay Kit II を用いて、測定した。組織学的なグリコーゲ量の評価は、脱パラフィン後、ベストカルミン染色を用いて検討した。なお、統計学的な検討には one-way ANOVA または Student t-test を用い、 $p < 0.05$ を統計学的な有意とした。

## 成 績

各4群で随時血糖の推移には差を認めなかった。しかし、LC 群は4週日以降、ほかの3群より有意な体重増加を認めた。摂餌量(熱量)は、LC 群と NC+Ipra 群で差を認めなかったが、両群とも対照の NC 群より有意に多かった。尿糖は、SGLT2阻害薬治療群のみで検出された。空腹時血糖・インスリン値は、LC 群で NC、NC+Ipra 群に比較し有意に高値であった。空腹時グルカゴンは、NC 群に比してほかの3群で低値を示した。一方、TG は NC+Ipra でほかの3群より有意に高値であった。

OGTT では、SGLT2阻害薬は耐糖能を改善させたが、LCHD は改善させなかった。一方 LC 群では、ブドウ糖刺激インスリン分泌が増加していた。ITT では、LC 群でインスリン感受性の有意な低下を認めた。内臓脂肪量を推定するため精巣上体脂肪量を測定したが、LC 群は、ほかの3群に比較し有意な脂肪蓄積を認めた。以上、LC 群では脂肪蓄積、インスリン抵抗性をみとめた。

更に、SGLT2阻害薬と LCHD の糖新生に対する影響を腎臓と肝臓で比較した。SGLT2阻害薬単独(NC+Ipra)では、腎臓で糖新生に関わる酵素(*G6pc*, *Pck1*, *Fbp*)の遺伝子発現が増加し、逆に LC 単独は肝臓でこれらの遺伝子発現を増加させた。次に糖新生関わる酵素を調節する転写因子の発現も比較した。*FoxO1*と *Creb* の遺伝子発現は NC+Ipra の腎臓で増加し、LC の肝臓で増加していた。

SGLT2阻害薬は、腎臓でのグリコーゲンの沈着を促進したが、肝臓では著明にグリコーゲン沈着量減少させた。一方 LC 群では肝臓でのグリコーゲン蓄積の減少は認めなかった。その際グリコーゲン合成酵素である腎 *Gys1* と肝 *Gys2* の発現は変化がなかった。一方グリコーゲン分解系の *Pyg1* の発現は LC+Ipra 群の腎臓と LC 群の肝臓で増加していた。

SGLT2阻害薬は腎臓で  $\beta$  酸化(*Acad11*)と脂肪酸合成(*Fasn*)に関わる遺伝子発現を上昇させ、肝臓では *Fasn* の発現を低下させた。一方、LCHD は肝臓での *Acad11* の発現を上昇させた。なお、LCHD でなく SGLT 2 阻害薬が、肝臓での TG 含量を低下させたが、LCHD と SGLT2阻害薬の併用は、腎臓での TG 含量を増加させた。

## 考 案

正常マウスにおいて、LCHD は肝臓で、SGLT2阻害薬は腎臓で糖新生に関わる酵素の発現を増加させた。今回の検討で SGLT2阻害薬はインスリン感受性を改善して、糖負荷後の血糖値を低下させたが、これには尿糖排出が増加することで、負荷後高血糖が抑制され、過剰なインスリン分泌が抑制されるためだと考えられる。LCHD では、むしろ体重増加やインスリン抵抗性が惹起された。これは、炭水化物組成の低下や相対的なカロリー摂取増加が関わっているかもしれない

最近の臨床的検討で、SGLT2阻害薬は、2型糖尿病患者において内因性糖産生(EGP)を増加させることが報告されており、肝臓での糖新生の更新が想定されているが、我々の検討では少なくとも肝臓ではなく腎臓での糖産生亢進の可能性が示唆された。腎臓での糖新生には、肝臓とは独立した制御機構が想定されているが、我々の検討ではこの機序の解明に至っていない。

SGLT2阻害薬は、肝臓でのグリコーゲン量を低下させた。最近の報告で肝臓のグリコーゲン量の減少が神経系を介して脂肪分解を誘導することは報告されており、この機構が SGLT2阻害薬による代謝改善に関与している可能性が考えられる。

## 結 論

カロリー制限のない低炭水化物食(LCHD)は、非糖尿病マウスの代謝に悪影響を及ぼした。また、SGLT2阻害薬は腎臓で、低炭水化物食は肝臓で糖新生を誘導した。

引用文献,

(重要な引用文献 3 編以内を掲載すること。)




1. Obata A, Kubota N, Kubota T, et al. (2015) Tofogliflozin Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Accelerates Lipolysis in Adipose Tissue in Male Mice. *Endocrinology* 157(3):1029-42
2. Vallon V, Gerasimova M, Rose MA et al. (2014) SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014; 306(2):F194–204.
3. Izumida Y, Yahagi N, Takeuchi Y, et al. (2013) Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nat Commun.*;4:2316.

参考論文,

(参考論文 5 編以内を掲載すること。)

1. Kitsunai H, Makino Y, Sakagami H, Mizumoto K, Yanagimachi T, Atageldiyeva K, Takeda Y, Fujita Y, Abiko A, Takiyama Y, Haneda M. (2016) High glucose induces platelet-derived growth factor-C via carbohydrate response element-binding protein in glomerular mesangial cells. *Physiol Rep.* 4(6). pii: e12730
2. Yanagimachi T, Fujita Y, Takeda Y, Honjo J, Atageldiyeva KK, Takiyama Y, Abiko A, Makino Y, Kieffer TJ, Haneda M. (2016) Pancreatic glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) (1-30) expression is upregulated in diabetes and PEGylated GIP(1-30) can suppress the progression of low-dose-STZ-induced hyperglycaemia in mice. *Diabetologia.* 2016 Mar;59(3):533-41.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	Kuralay K.atageldiyeva
審査委員長 長谷部 直幸  審査委員 奥村 利勝  審査委員 鈴木 裕 			
学 位 論 文 題 目  Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor and a low carbohydrate diet affect gluconeogenesis and glycogen content differently in the kidney and the liver of nondiabetic mice  (Sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2)阻害薬と低炭水化物 食は非糖尿病マウスの腎臓と肝臓における糖新生とグリコーゲン 蓄積に異なった作用を及ぼす。)			
<p>SGLT2 阻害薬は、ブドウ糖再吸収阻害による尿糖排出促進をもたらし血糖降下作用を発揮する新規経口糖尿病治療薬であるが、体重減少、降圧作用、インスリン抵抗性改善など多面的な効果が期待される薬剤である。一方、低炭水化物食は、食後血糖の低下と肥満解消を期待して行われているダイエット法でもある。著者らは、これら二つの食事および薬物療法の糖代謝に及ぼす影響を、肝臓と腎臓の二臓器を対比して検討した。</p> <p>C57-black6 マウスを用い、正常炭水化物食群と低炭水化物食群に分け、それぞれに SGLT2 阻害薬として ipraglifrozin 併用の有無で計 4 群に分け 8 週間の比較検討がなされた。低炭水化物食群では、有意な体重増加を認め、空腹時血糖・インスリン値が有意に高値を示し、経口ブドウ糖負荷による耐糖能は不変であったが、インスリン抵抗性の増大とともに内臓脂肪量の増加を認めた。</p> <p>一方、ipraglifrozin 併用では、体重・内臓脂肪量に有意差を認めず、耐糖能およびインスリン抵抗性は改善した。</p>			

糖新生に関わるメッセージ発現を肝臓と腎臓で比較したところ、**ipraglifrozin** では、一部の糖新生関連酵素および転写因子の遺伝子発現の亢進が腎臓で認められたが、肝臓ではこれらは認められず、一方低炭水化物食では、肝臓でこれら糖新生関連酵素および転写因子の遺伝子発現の亢進が認められるものの腎臓では認められないという好対照の結果であった。またグリコーゲン沈着は、コントロール状態では圧倒的に肝臓に認められるが、**ipraglifrozin** 投与では腎臓でグリコーゲン沈着が増加し、肝臓で有意に減少することが示された。また $\beta$ 酸化に関わる遺伝子発現は **ipraglifrozin** では腎臓で、低炭水化物食では肝臓で増加することが示された。

本研究は、カロリー制限を伴わない低炭水化物食が、非糖尿病マウスの代謝に悪影響を及ぼすことを示し、さらに **SGLT2** 阻害薬が腎での糖新生とグリコーゲン蓄積をもたらすことを明らかにしたものである。腎における糖代謝の意義に関して未解明な部分が残されているものの、肥満症および糖尿病の食事・薬物療法に新知見をもたらす研究であり、その医学的意義は大きい。各審査員の質疑にも的確な回答が得られ、当該研究領域に十分な知識と経験を有していることが理解された。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと結論した。