

博士論文

論文題目 SGLT2 阻害薬の抗動脈硬化作用：モデル動物を用いた検討

氏名 岩本 真彦

目次

1 要旨 :	P2
2 序文 :	P3
3 方法 :	P15
4 結果 :	P22
5 考察 :	P35
6 結論 :	P39
7 謝辞 :	P40
8 COI 開示 :	P41
9 文献 :	P42

・要旨

Sodium Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬は既存の経口血糖降下薬と異なりインスリンを介さず、腎特異的に発現している SGLT2 による再吸収を阻害し、尿中 glucose 排泄を促進することで血糖を改善させる。本研究では Apolipoprotein E (ApoE) 欠損マウスに Streptozotocin (STZ) を投与することでインスリン分泌低下型の 2 型糖尿病を誘導した糖尿病合併動脈硬化モデルマウスを用いて、SGLT2 阻害薬の耐糖能改善・抗動脈硬化作用を検討した。本実験において SGLT2 阻害薬投与による体重・脂質パラメーターの変動は認めず、長期における血糖改善の結果、抗動脈硬化作用を呈する可能性が示唆された。

・序文

1. 本邦の2型糖尿病の現状

本邦の糖尿病患者は年々増加を認めており、厚生労働省によって行われた平成24年の国民健康・栄養調査による(1)と、「糖尿病が強く疑われる者」(HbA1cの測定値がある者のうち、HbA1c (NGSP) 値が6.5%以上、または現在治療を受けている)は950万人、「糖尿病の可能性が否定できない者」(HbA1cの測定値がある者のうち、HbA1cが6.0%以上6.5%未満で、「糖尿病が強く疑われる者」以外)は1100万人と、両者を合わせ2050万人にのぼると推定されている(図1)。

「糖尿病が強く疑われる者」は平成9年以降増加の一途をたどり、「糖尿病の可能性が否定できない者」は平成19年の1320万人を最高として減少したものの、その数は依然として多く、糖尿病およびその合併症の管理は本邦の医療において重要な課題と考えられている。

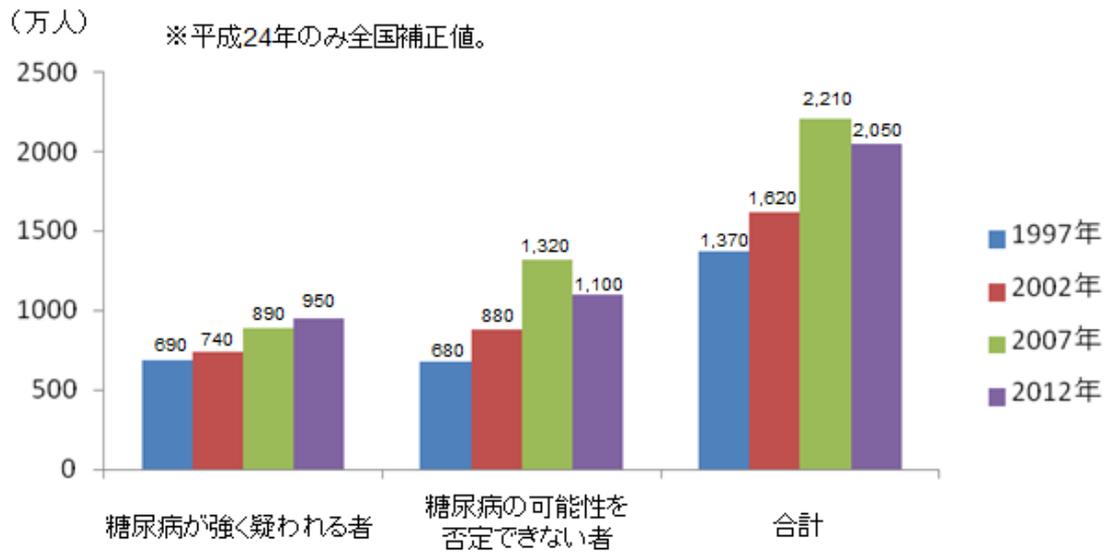


図1 平成24年国民健康・栄養調査

糖尿病はインスリン作用の不足により生じる慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群である。インスリン作用の不足は膵β細胞からのインスリン分泌の低下・欠乏およびインスリンの標的臓器（筋肉・肝・脂肪）におけるインスリン抵抗性の増大の両者が相まって引き起こされ（図2）、近年の2型糖尿病患者の増加は、過食（特に高脂肪食）・運動不足の結果引き起こされる肥満に伴うインスリン抵抗性の増大が原因と考えられている。

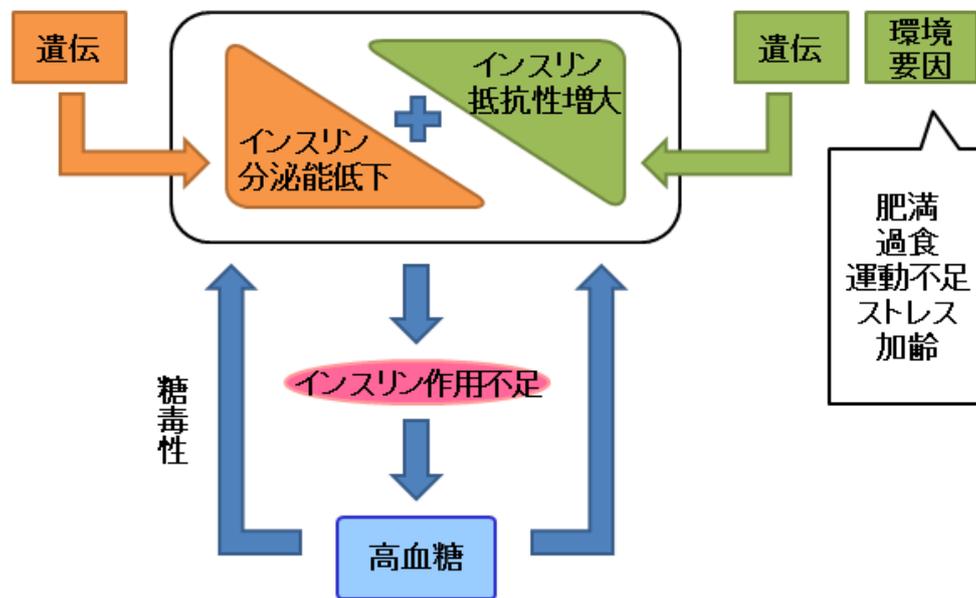


図2 2型糖尿病の発症メカニズム

2. 血糖コントロールと慢性合併症

糖尿病でみられる慢性合併症の多くは血管病変によって引き起こされ、小動脈・毛細血管に障害が生じる細小血管症と中大動脈に生じる大血管症に分類される。細小血管症は高血糖が発症要因であり糖尿病に特異性が高い合併症であるが、大血管症は高血糖だけでなく高血圧・脂質異常症などもあいまった結果の動脈硬化性病変を背景とする合併症である。

血糖コントロールと合併症の関連については種々の大規模臨床試験が行われている。1型糖尿病患者を対象とした DCCT (Diabetes control and complication trial) においてインスリン強化療法群 (1日3回以上のインスリン注射またはインスリン持続皮下注) は従来療法群 (1日2回以下のインスリン注射) と比較して細小血管症 (神経障害、網膜症、腎症) の発症・進展を抑制した (2)。また DCCT 試験終了後の経過を追跡した EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications) においては、介入終了により両群間の HbA1c の差はなくなったものの、DCCT 強化療法群で細小血管症の発症・進展の抑制に加え、大血管症および死亡率の低下を認めた (3,4,5)。また新規 2 型糖尿病患者を対象とした UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) では強化療法群は従来療法群と比較して試験終了時の 10 年では細小血管症の発症が抑制されたが大血管症および死亡率に差は認めなかった (6,7)。しかし、終了後 10 年の経過において

介入終了により両群間の HbA1c の有意差は認めなくなったものの、強化療法群ではやはり大血管症および死亡率の低下を認めた (8)。これら DCCT/EDIC および UKPDS の長期における大血管症・死亡率への影響はそれぞれ「Metabolic Memory」「Legacy effect」と呼ばれ、糖尿病では発症早期からの厳格な血糖コントロールが、大血管症・死亡率を低下させるために重要であると考えられるようになった。

一方、罹病期間が長く血管合併症のリスクが高い患者を対象に、より生理的な血糖値に近づけることを目標とした大規模臨床試験である ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes)、ADVANCE (Action in Diabetes and Vascular Disease Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation)、VADT (Veterans Affairs Diabetes Trial) が行われた (9,10,11) が、いずれも厳格なコントロールを行ったにも関わらず観察期間中には大血管症を抑制することはできず、むしろ重症低血糖や体重増加が目立ち、ACCORD は死亡率が有意に増加したため 3.5 年で試験が中止となった。

2003 年に発表された Steno-2 Study は微量アルブミン尿を伴う 2 型糖尿病患者を対象に、平均 7.8 年間血糖だけでなく血圧・脂質も管理することで強化療法群は従来療法群に比べ細小血管症が約 50%に抑制され、さらに心血管イベントも 53%抑制された (12)。また、その後平均 5.5 年間の追跡調査を行い合計 13.3 年

間の総死亡率の検討を行った結果、介入終了により両群のリスクファクター（HbA1c、脂質、血圧）の差は縮まったものの、強化療法群は従来療法群に比べ総死亡率・心血管死が有意に抑制されていた（13）。

これらの結果から大血管症の抑制には、早期からの厳格な血糖コントロール、低血糖・肥満・高インスリン血症を起こしにくい治療、血圧・脂質の管理も並行して行うことが重要であると考えられるようになった。

3. 経口血糖降下薬の歴史

経口血糖降下薬は 1950 年代にスルホニル尿素薬が開発され、次に 1960 年代にビグアナイド薬（乳酸アシドーシスの副作用のため 1978 年に使用禁止、1995 年に再承認）が開発されて以来、長期にわたって新規薬剤の開発がなく、1990 年代になり漸く α -グルコシダーゼ阻害薬、チアゾリジン薬、速効性インスリン分泌促進薬が使用されるようになったが、これらの経口血糖降下薬やインスリン製剤は肥満や高インスリン血症を助長してしまうデメリットも存在していた。2009 年になり Dipeptidyl Peptidase-4（DPP-4）阻害薬・Glucagon-like peptide-1（GLP-1）作動薬といったインクレチン関連薬が本邦で承認され、低血糖を起こしにくく、肥満も助長しにくいといった特徴から経口血糖降下薬の中心へとシフトしていった（14）。

さらなる新規薬剤として SGLT2 阻害薬が 2012 年に欧州、2013 年に FDA、2014 年に本邦で承認された。SGLT2 阻害薬は腎臓での再吸収を阻害し、尿中に glucose を排出するといったように本来の生理作用とは逆の作用で血糖を改善させており、これは従来の経口血糖降下薬のように、糖尿病により障害されたインスリン分泌低下もしくはインスリン抵抗性増大といった生理作用を改善させる性質とは一線を画す機序であった。

4. SGLT とは

SGLT は溶質のトランスポーターとして働く SLC (solute carrier) gene family の Slc5a family に属しており、SGLT 1~6 のアイソフォームが知られており、1987 年に Hidger らにより SGLT1 が、1994 年に Kanai らにより SGLT2 がクローニングされた (15,16)。

SGLT1,2 共に近位尿細管に発現し Na と glucose の共輸送を行うことで尿糖の再吸収を行っている。SGLT2 は近位尿細管の S1 分画に発現し、Na と glucose を 1:1 で共輸送し、glucose に対し低親和性であるが高い輸送能を持ち、原尿中の glucose の 90%を再吸収している。一方、SGLT1 は S1 分画より遠位である S2・S3 分画に発現し、Na と glucose を 1:2 で共輸送し、輸送能は低いが glucose に対し高親和性であり、原尿中の残った 10%の glucose の再吸収を担っている (図 3,4)。

また、その機序は明らかになっていないが 2 型糖尿病患者では近位尿細管での SGLT2 発現量が増加し、尿中 glucose の再吸収を亢進することで糖尿病の病態悪化を引き起こしていることが報告されている (17)。

SGLT1 は腎のほかに小腸にも多く発現し、glucose に加え galactose も基質としており、遺伝子変異により glucose・galactose の吸収不全による重度の下痢を認め、成長障害をはじめとした重篤な病態に陥るが (18)、SGLT2 は腎特異的に発現し glucose のみを基質とし、遺伝子変異は家族性腎性尿糖の原因となるものの (19)、生命予後に影響がないと報告されていたため、SGLT2 を選択的に阻害する SGLT2 阻害薬が開発されることとなった。

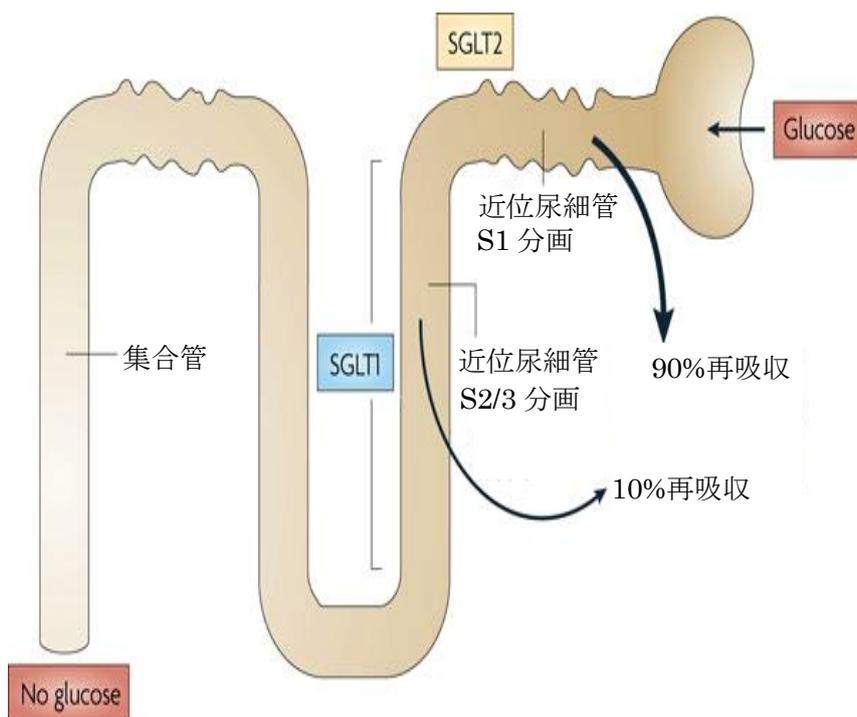


図 3 SGLT 1,2 の局在 (文献 20 より一部改変)

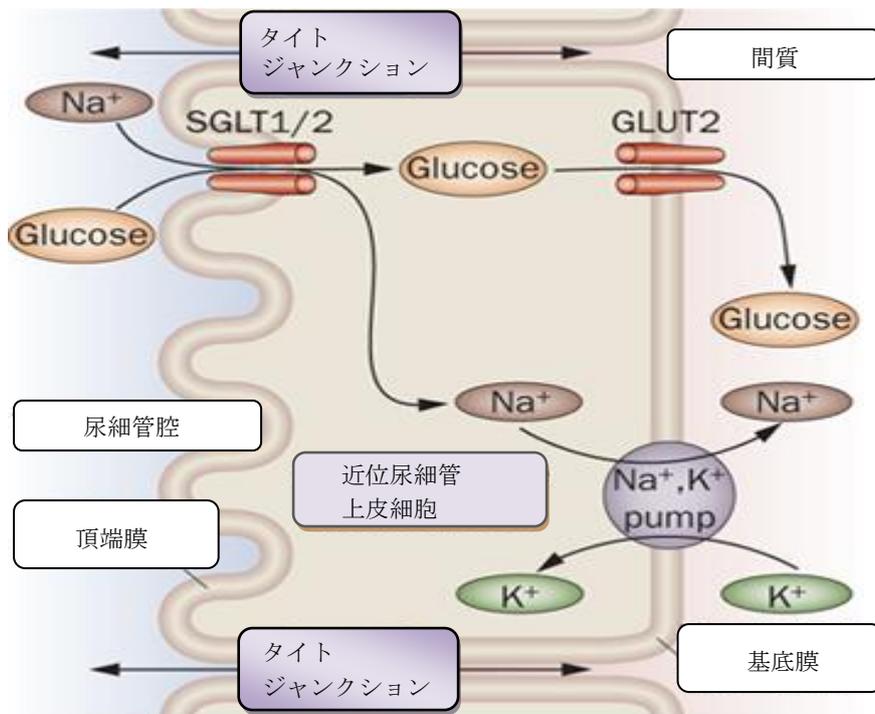


図4 SGLTの共輸送の模式図(文献21より一部改訂)

5. SGLT2阻害薬

SGLT阻害薬開発の発端となるフロリジンは1835年にリンゴの樹皮から単離された。1886年にVon Meringらがフロリジン投与により尿糖が出現することを発見し(22)、1970年代になってフロリジンはNa Glucose co-transporterを阻害することで尿糖の再吸収を抑制することが判明した(23)。一方フロリジンはSGLT1,2選択性を持たずに両者を阻害する点、代謝産物であるフロレチンがGLUTを非選択的に阻害してしまう点、経口摂取では活性を失う点などの短所から実用性は乏しいとされ、その誘導体からSGLT2阻害薬が開発され(24)、現在

Canagliflozin, Dapagliflozin, Ipragliflozin, Tofogliflozin, Empagliflozin, Luseogliflozin
 の 6 剤が存在し、それぞれ SGLT2 との選択性は図 4 の通りとなっている (25)。

阻害薬	IC50 hSGLT2 nM	SGLT2 選択性					
		hSGLT1	hSGLT3	hSGLT4	hSGLT5	hSGLT6	hSMIT1
Tofogliflozin	2.9±0.7	2900	19000	1500	540	6200	28000
Dapagliflozin	1.3±0.2	610	190000	3000	210	1300	22000
Canagliflozin	6.7±2.9	290	52000	2800	180	200	5600
Ipragliflozin	2.8±0.5	860	7700	4500	87	3500	21000
Empagliflozin	3.6±1.6	1100	62000	2200	110	1100	8300
Luseogliflozin	3.1±0.1	1600	8100	9800	280	220	7800
Phlorizin	16.4±5.2	11	1300	490	36	1000	25000

図 4 SGLT2 阻害薬の SGLT1-6, SMIT1 に対する SGLT2 親和性の比較

文献 25 より一部改訂

SGLT2 阻害薬を用いた動物実験の報告は数多く存在し、耐糖能を改善させること (26,27,28,29) に加え、Tofogliflozin を用いた実験では肥満・耐糖能の改善に加え、インスリン抵抗性の改善、インスリン値の低下、肝臓での糖新生の亢進させること (30) が報告されている。

ヒトにおいても第Ⅲ相臨床試験の結果が報告されており、Dapagliflozin では Metformin 1500mg/day 以上投与されている患者を対象とし placebo, Dapagliflozin 2.5, 5, 10mg 追加投与の 4 群に分けて 24 週経過を追った無作為抽出二重盲検 placebo 対象試験が行われ (31)、Dapagliflozin 群において低血糖が増加すること

なく HbA1c・空腹時血糖の改善を認め、体重に関しても有意に低下していた。インスリンとの併用に関してはインスリン 1 日 30 単位以上使用している患者を対象とし、placebo, Dapagliflozin 2.5, 5, 10mg 追加投与の 4 群に分けて 24 週経過を追った無作為抽出二重盲検 placebo 対象試験の結果が報告され (32)、Dapagliflozin 群において HbA1c の有意な低下を認め、placebo 群で体重・インスリン使用量が増加していたのに対し、Dapagliflozin 群ではいずれも減少していたが、低血糖の頻度も増加する結果となっていた。また placebo と Dapagliflozin 10mg を 24 週投与し、DEXA/MRI を用いて体脂肪量を評価した試験では、Dapagliflozin 群において内臓脂肪量・皮下脂肪量共に有意に減少を認めていた (33)。

Canagliflozin では Metformin 単剤治療の 2 型糖尿病患者を対象に行った無作為抽出二重盲検 placebo 対象試験の結果が 2012 年に報告されており (34)、対象患者を placebo, Canagliflozin 50, 100, 200, 300mg 1 日 1 回投与, Canagliflozin 300mg 1 日 2 回投与, Sitagliptin 100mg 投与に振り分けて 12 週経過した時点で評価した結果、Canagliflozin 群は placebo 群と比較し有意に HbA1c を低下し、かつ Sitagliptin 群と同等もしくはそれ以上に低下した。空腹時血糖に関しても Canagliflozin 群は placebo 群と比較し有意に低下し、また体重に関しては placebo 群・Sitagliptin 群いずれと比較しても有意に低下しており、低血糖に関しては全般的に出現が

少なく、明らかな増加を認めなかった。

また Tofogliflozin に関しても食事・運動療法のみ、もしくは Metformin 単剤治療の2型糖尿病患者を対象に行った無作為抽出二重盲検 placebo 対象試験の結果が2015年に報告されており (35)、placebo, Tofogliflozin 2.5, 5, 10, 20, 40mg 投与の6群に振り分けて12週経過した時点で評価した結果、Tofogliflozin の用量依存性に空腹時血糖・体重の低下を認め、耐糖能の改善および血圧の低下も認めた。また、Tofogliflozin 群でケトン体はわずかに上昇していたが、ケトン体比率に異常はなく、有害事象は両群でほぼ同程度で、重篤なものは認めなかった。

これらのようにヒト臨床試験の結果からは SGLT2 阻害薬は単剤ないしはインスリン抵抗性改善薬との併用では低血糖を起しにくく、HbA1c 改善に加え、体重増加抑制効果をもつことが示され、また動物実験では血糖・肥満の改善に加え、インスリン抵抗性の改善やインスリン値の低下も認めていることから、SGLT2 阻害薬は大血管症の抑制に期待できると考えられた。

そこで本実験は SGLT2 阻害薬の Tofogliflozin を用い、抗動脈硬化作用の有無およびそのメカニズムについて動脈硬化モデルマウスを用いて解明することを目的とした。

・方法

1. 動物

野生型マウスである C57BL/6J マウスは日本クレアから、ApoE 欠損マウス (C57BL/6J background) は Taconic 社からそれぞれ購入した。餌は通常食 (CE-2 : 水分 8.83%, 粗タンパク質 25.13%, 粗脂肪 4.92%, 粗繊維 4.42%, 粗灰分 6.86%, 可溶性無窒素物 49.84%, 100g あたりのエネルギー 344.3kcal) を日本クレアから購入した。マウスは 12 時間毎の明暗期の下、1 ケージに 3 匹ずつで群飼育し、動物飼育、すべての実験手法は東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った。動物実験計画書の受付番号は医 13-P-31 となっている。

2. STZ 投与

2 型糖尿病を誘発するために対象となるマウスに STZ (Sigma) 投与を行った。クエン酸三ナトリウム二水和物 (和光純薬工業) を 29.4mg/ml の濃度になるように超純水で溶解後 pH 4.5 になるように滴定し、クエン酸ナトリウム緩衝液を作成した。STZ の投与 4 時間前より絶食を開始した。STZ は投与直前に 5.0mg/ml になるようクエン酸ナトリウム緩衝液で溶解した。任意の量の STZ 溶解液を腹腔内に投与し、投与後 3 時間で絶食を解除した。

3. 糖尿病判定

STZ 初回投与日を day1 とし、day12 以降にグルテストミント（三和化学）を用いて随時血糖を測定し、250mg/dL が維持される個体を糖尿病個体とした。その中で体重減少、尿ケトン強陽性をきたす個体を 1 型糖尿病、そうでない個体を 2 型糖尿病と分類した。

4. Tofogliflozin 投与

混餌投与実験ではコントロールとしてエタノール溶媒混和したものと、Tofogliflozin 0.005%になるように餌に混和したものを通常食で作成し混餌投与を行った。

5. 経口糖負荷試験

経口糖負荷試験は、前日から 16 時間の絶食を行い、D(+) glucose 3g を生理食塩水（大塚）20ml に溶解し、マウス体重 1g あたり 10 μ l になるようにゾンデを用いて経口投与を行った。この結果 1.5g/kg のブドウ糖を負荷した計算となる。経口投与前、投与後 15 分、30 分、60 分、120 分の時点でヘパリンコートピペット（Drummond）を用いて全血採血を行い、各々の血糖値をグルテストミントを用いて測定し、投与前、投与後 15 分、30 分に採取したサンプルについては 4℃

8000回転10分間の遠心後に血清を回収し、インスリン値の測定に用いた。また、投与前の血清は中性脂肪値、総コレステロール値、遊離脂肪酸値の測定にも用いた。

6. 摂餌量・飲水量測定

群飼育であるため、餌・水の補充の際に補充前後の重量をそれぞれ計量することで、ケージ単位での1週間の摂餌量・飲水量を求め、その結果を個体数・日数で割ることで1個体あたりの日ごとの平均摂餌量・飲水量を算出した。

7. インスリン値、中性脂肪値、総コレステロール値、遊離脂肪酸値の測定

前日から16時間の絶食下で採血を行い、血清インスリン値は超高感度インスリン測定キット（森永）、中性脂肪値はトリグリセライドE-テストワコー（和光純薬工業）、総コレステロール値はコレステロールE-テストワコー（和光純薬工業）、遊離脂肪酸値はNEFA C-テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定を行った。

8. 大動脈矢状断染色

70%エタノールにスダンIV（和光純薬工業）粉末2gを入れ60℃で一晩置き

十分な飽和溶液を作り、その後室温で冷却し濾過した。また PHOSPHATE BUFFERED SALTS (TAKARA) 1錠を超純水 100ml で溶解し PBS を作製した。マウスにペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し麻酔をかけ、開腹開胸し、右心房をはさみで切って放血した。左心室から PBS 10ml をゆっくり注入し、(その後 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬工業) 10ml を同様にゆっくり注入し) 灌流した。腹腔内、胸腔内の臓器を除き、心臓の直前から腸骨動脈分岐直下までの大動脈を採取した。大動脈の周りの脂肪などを十分にトリミングした後、矢状切開し、前述のスタンIV飽和溶液に一晩つけた。その後スライドガラスに張り付け撮影し、winroof (三谷商事) を用いて大動脈全面積に対する plaque 面積比を測定した。

9. 心臓弁輪部染色

マウスにペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し麻酔をかけ、開腹開胸し、右心房をはさみで切って放血した。左心室から PBS 5ml をゆっくり注入し、その後 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬工業) 5ml を同様にゆっくり注入し灌流した。心臓を摘出し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液につけ、奈良病理研究所にて大動脈弁輪部の Oil Red O 染色および抗 Monocyte + Macrophage (MOMA-2) 抗体免疫染色 (ABCAM, ab33451) を依頼

した。スライドガラスを撮影し、winroof を用いて大動脈全面積に対する陽性領域面積比を測定した。

10. 大動脈 RNA 抽出

マウスにペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与し麻酔をかけ、開腹開胸し、右心房をはさみで切って放血した。左心室から PBS 5ml をゆっくり注入し、その後 RNA later (QIAGEN) 5ml を同様にゆっくり注入し、灌流した。腹腔内、胸腔内の臓器を除き、大動脈の上に RNA later を 0.5~1ml ほどかけ、大動脈のまわりの脂肪などをトリミングし、心臓の直前から横隔膜までの大動脈を採取し、0.5cm ずつカットし RNA later に浸した状態で、4°C で保存した。保存した大動脈を TRIzol (Life technologies Corporation) 1ml とともに、TOMY Micro Smash MS-100 (トミー精工) を用いてホモジェナイズを行った。十分に組織がホモジェナイズされたことを確認した後、クロロホルム 200 μ l を加え、15 秒間激しく転倒混和し、12000g15 分間の遠心を行い、上層を回収した。等量の 70% エタノールを加えて、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を精製した。

11. RNA 量測定と cDNA 合成

前述の精製した RNA を NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、

RNA 量を測定した。サンプルの RNA 含量が同量としオリゴ dT プライマーと MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystem) を用いて cDNA を合成した。

12. 定量的 RT-PCR

前述の合成された cDNA を ABI prism 7000R (Applied Biosystem) を用いて定量的 RT-PCR を行った。β-アクチン、ICAM1、VCAM1、MCP-1、CD68、Nox2、fibronectin、CHOP の TaqMan Probe は Applied Biosystem から購入した。すべての mRNA 発現量は内因性コントロールとして、β-アクチンを用いて補正した。使用した Probe は以下の通りである。

Taqman probe

β-アクチン	Mm01205647_g1
ICAM1	Mm00516024_g1
VCAM1	Mm00449197_m1
MCP-1	Mm00441242_m1
CD68	Mm00839636_g1
Nox2	Mm01287743_m1
Fibronectin	Mm01256744_m1

13. 統計学的解析

結果は平均±標準誤差で表記した。2 群間の有意差の有無に対する統計学的解析にはスチューデントの t 検定を用いて解析した。また、p 値<0.05 (*と表記)を統計学的に有意と扱い、p 値<0.01 を**と表記した。

・結果

1. 糖尿病合併動脈硬化モデルマウスの樹立

C57BL/6J マウスは動脈内の粥腫形成をきたしにくく大血管障害の組織学的評価には不適當であり、本実験では動脈硬化をきたしやすいマウスとして知られている ApoE 欠損マウスと LDL 受容体欠損マウスのうち、ApoE 欠損マウスを選択した。また ApoE 欠損マウスは STZ を腹腔内に投与することで β 細胞の apoptosis が誘導されインスリン分泌低下型の糖尿病を発症し、高血糖により動脈硬化が促進されることが報告されており (36)、かつ SGLT2 阻害薬の血糖降下作用による抗動脈硬化作用を比較しやすいと考えられた。一方、STZ は高用量では生存にインスリン投与が必須となる 1 型糖尿病を発症してしまうため、まずは STZ による 2 型糖尿病導入プロトコルの確立する目的の予備検討を行った。

ApoE 欠損マウスのバックグラウンドである C57BL/6J マウス (8-11 週齢) を STZ 150mg/kg 2 回投与 (day 1,5)、150mg/kg 1 回投与 (day 1)、75mg/kg 2 回投与 (day 1,5)、100mg/kg 2 回投与 (day 1,5) の 4 群に分け、糖尿病導入率、1 型糖尿病の発症の有無、STZ 投与後 10 週経過時の死亡個体数を比較したところ、STZ は用量および投与回数依存性に糖尿病導入率・1 型糖尿病の発症率を増加させたものの (図 5)、100mg/kg 2 回投与群は 1 型糖尿病の発症がなく、生存率・糖尿病導入率も良好であり、以後の STZ 投与プロトコルは 100mg/kg 2 回投与とした。

	個体数	糖尿病 導入率	day 1 体重[g]	day 18-20 体重[g]	血糖[mg/dL]	10週経過後 死亡個体数
150mg/kg 2回投与	24	24/24 100%	20.43 ±0.56	18.89 ±0.54	518.95 ±24.46	13
150mg/kg 1回投与	5	5/5 100%	23.10 ±1.62	20.50 ±1.72	584.50 ±77.33	3
100mg/kg 2回投与	13	13/13 100%	21.24 ±0.22	21.48 ±0.30	454.08 ±24.86	0
75mg/kg 2回投与	8	4/8 50%	23.43 ±1.18	23.68 ±0.97	409.75 ±51.32	0

図5 プロトコル別、糖尿病導入率・体重・随時血糖・死亡個体数

2. 代謝パラメーターの評価 (Tofogliflozin 11 週間通常食混餌投与)

Tofogliflozin による抗動脈硬化作用を評価するために、10-11 週齢の ApoE 欠損マウス雄に STZ 投与を行い、体重・随時血糖の経過が均等になるよう 2 群 (Control 群/Tofogliflozin 群) に割り振った。9 週間の経過観察において 2 型糖尿病の持続を確認した後、Control の通常食、または Tofogliflozin 0.005% 含有した通常食を 11 週間混餌投与した (図 6)。

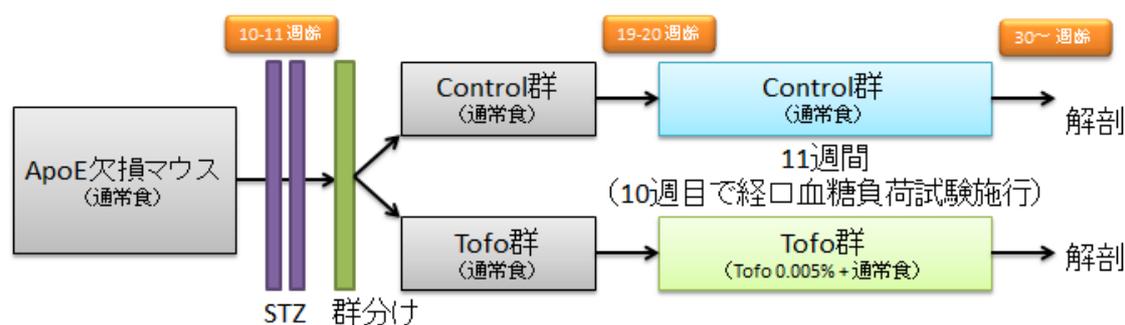
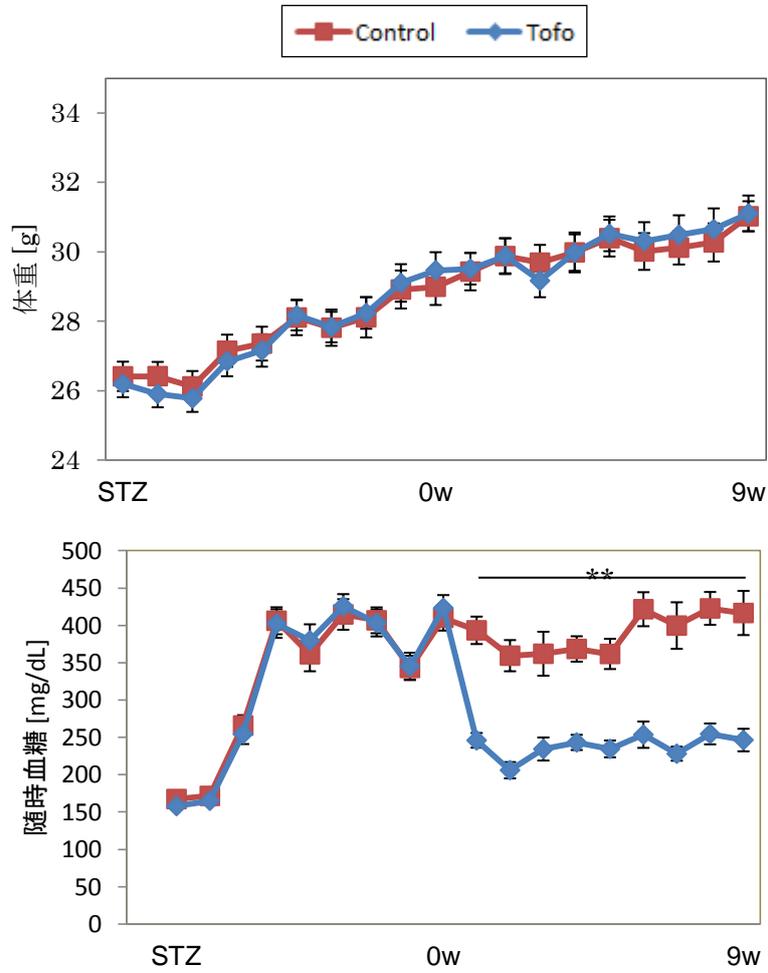


図 6 Tofogliflozin 11 週間通常食混餌投与実験プロトコル

STZ 投与から Tofogliflozin 投与開始までは両群の体重・随時血糖に差は認めず、Tofogliflozin 投与後 (1-9 週)、体重に関しては両群に差を認めないまま経過したが、随時血糖値は Control 群と比して Tofogliflozin 群で有意に低下し 200mg/dL 程度の差が維持されていた (Control n=20, Tofogliflozin n=17) (図 7)。また尿糖排泄亢進への代償性の変化のためか、Tofogliflozin 群において摂餌量は上昇傾向にあり、飲水量は有意に上昇していた (Control n=5, Tofogliflozin n=8) (図 8)。

図7 体重経過（上）と随時血糖経過（下）

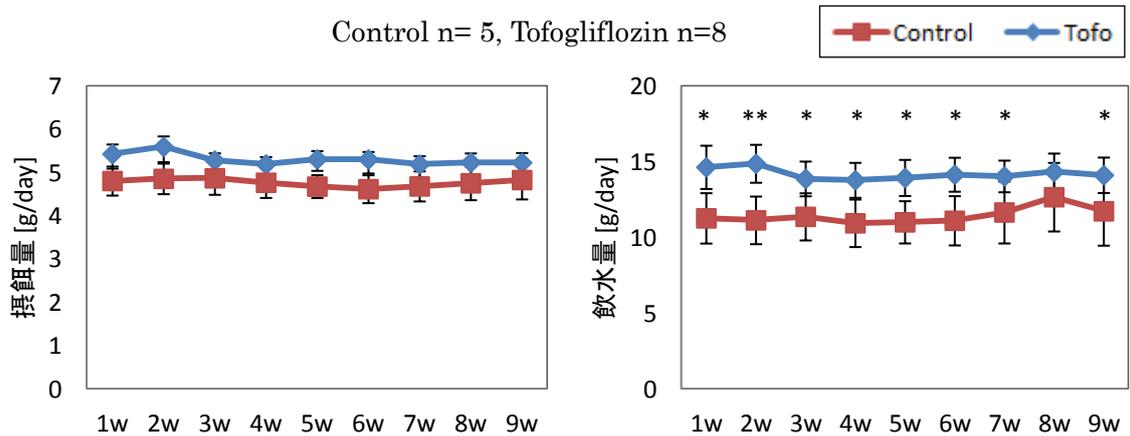
Control n= 20, Tofogliflozin n=17



(STZ: STZ 投与, 0w: Tofogliflozin 投与開始, 1 週間毎に測定)

図8 Tofogliflozin 投与開始後、摂餌量（左）と飲水量（右）経過

Control n= 5, Tofogliflozin n=8



10 週経過時の経口糖負荷試験では Control 群と比べ、Tofogliflozin 群で有意に耐糖能の改善を認めたが (Control n=8, Tofogliflozin n=8) (図 9)、0,15,30 分時の血清インスリン値は両群共に検出感度未満であった。また他の個体も含め 16 時間絶食時の血清を用いて中性脂肪値、総コレステロール値、遊離脂肪酸値を測定したが両群間に差を認めなかった (図 10) (Control n=11, Tofogliflozin n=11)。

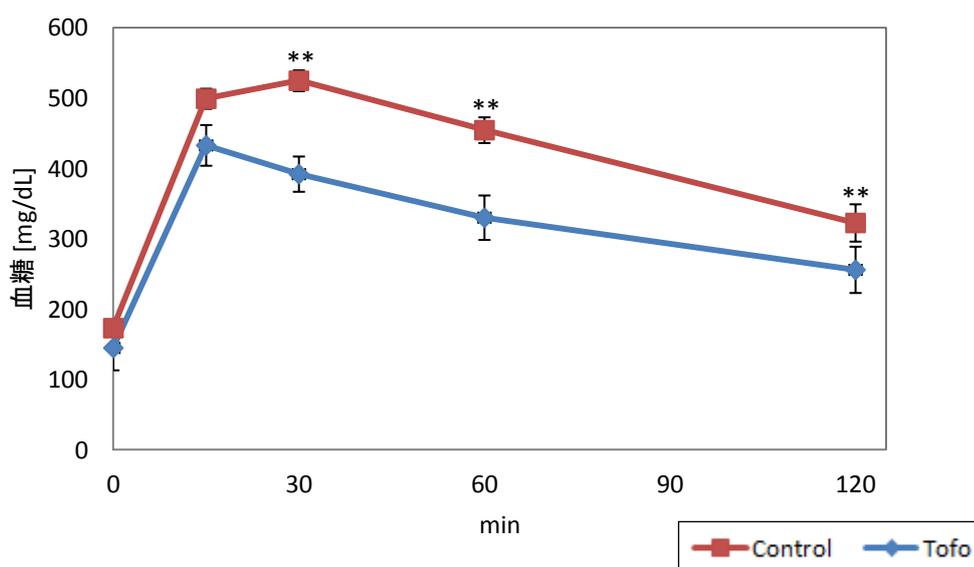


図 9 経口血糖負荷試験 (Control n=8, Tofogliflozin n=8)

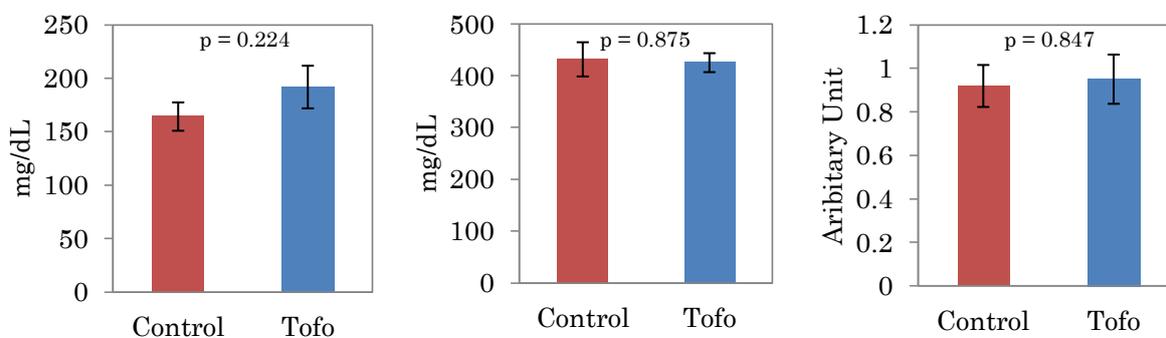


図 10 左：中性脂肪 中：総コレステロール 右：遊離脂肪酸

Control n= 11, Tofogliflozin n=11

3. 大動脈矢状断の組織学的評価 (Tofogliflozin 11 週間通常食混餌投与)

Tofogliflozin 投与 11 週経過後に解剖し、大動脈矢状断面積に対するスタンIV陽性を呈する plaque の付着率を求めた結果、大動脈全体では Control 群 (0.2596 ± 0.0123) に対し、Tofogliflozin 群 (0.2086 ± 0.0084) で有意 ($p < 0.01$) に抑制され Tofogliflozin の抗動脈硬化作用を認めたが、動脈硬化の著しい弓部に限定して場合は両群間に差を認めなかった (Control 0.4625 ± 0.0259 、Tofogliflozin 0.4786 ± 0.0304) (図 11,12) (Control n=11, Tofogliflozin n=11)。



図 11 大動脈スタンIV染色 (上 : Control 群 (n= 11) 下 : Tofogliflozin 群 (n=11))



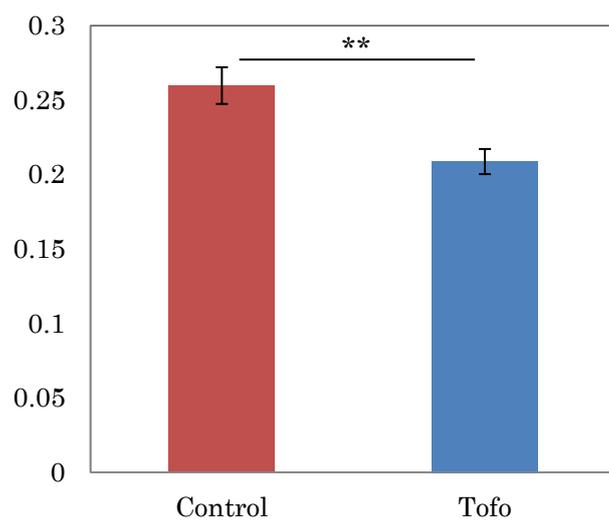


図 12-1 plaque 付着率 (大動脈全体)

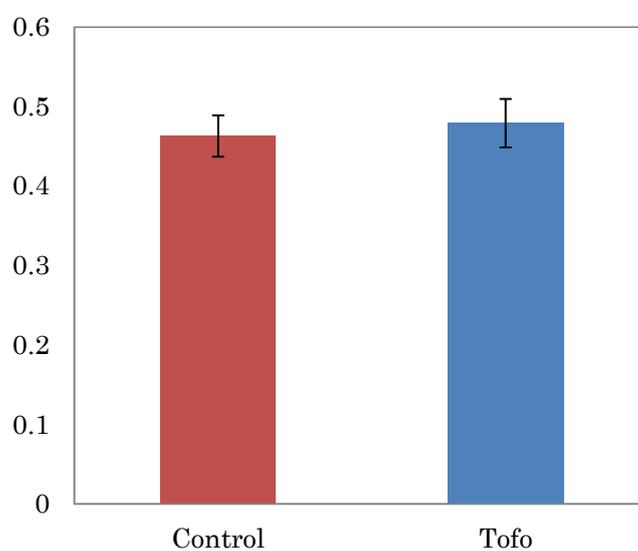


図 12-2 plaque 付着率 (大動脈弓部のみ)

Control n= 11, Tofogliflozin n=11

4. 大動脈矢状断・冠状断の組織学的評価 (Tofogliflozin 9 週間通常食混餌投与)

Tofogliflozin 11 週間投与実験において大動脈弓部は動脈硬化が著しく両群間で差を認めなかったため、投与期間を 9 週に短縮し組織学的評価を行った。

体重・随時血糖は 11 週間投与実験と同様の傾向を認め (図 14)、大動脈矢状断における plaque 付着率も同様に Control 群 (0.2266 ± 0.0171) に対し Tofogliflozin 群 (0.1669 ± 0.0105) で有意 ($p < 0.01$) に抑制され、Tofogliflozin の抗動脈硬化作用は再現性をもって確認された (図 15,16) (Control n=12, Tofogliflozin n=14)。

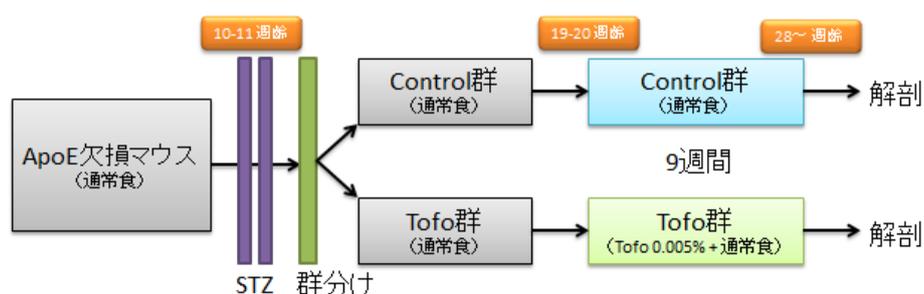


図 13 Tofogliflozin 9 週間通常食混餌投与実験プロトコル

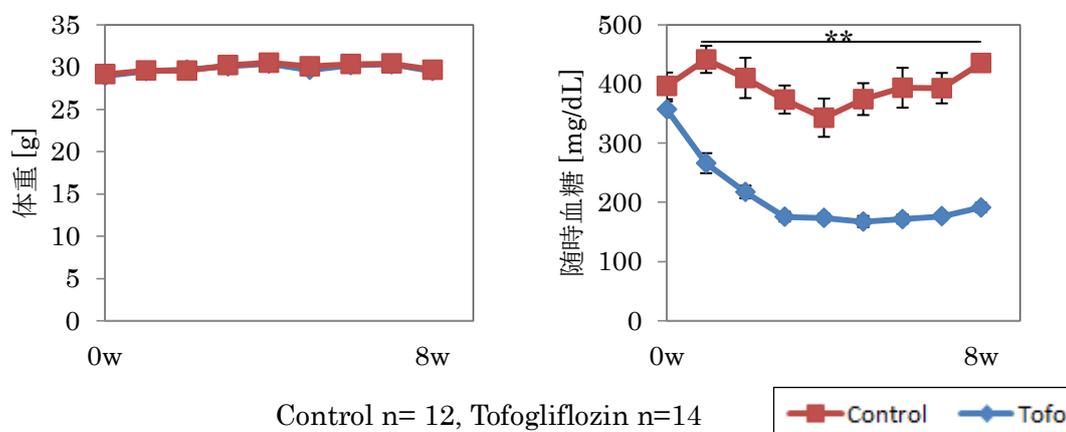


図 14 Tofogliflozin 投与後、体重 (左) 随時血糖 (右) 経過



図 15 大動脈スタンIV染色 (上:Control 群 (n= 12) 下:Tofogliflozin 群 (n=14))

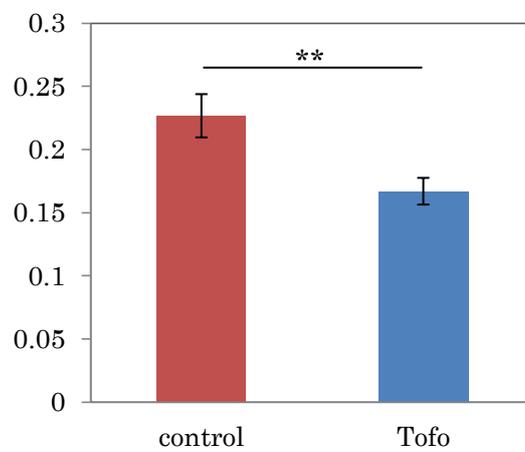


図 16 大動脈全体に対する plaque 付着率
Control n= 12, Tofogliflozin n=14

また本実験では同対象に矢状断のスタンIV染色に加え、大動脈弁輪部冠状断での Oil Red O 染色と抗 MOMA-2 抗体免疫染色による組織学的評価も行ったが (冠状断面積に対する陽性を呈する領域の比率)、両群間で統計学的有意差を認めず (Oil red O (Control 0.3116 ± 0.0122 , Tofogliflozin 0.3148 ± 0.0124 , $p = 0.853$)、抗 MOMA2 抗体免疫染色 (Control 0.2934 ± 0.0126 , Tofogliflozin 0.2596 ± 0.0127 , $p = 0.072$)、解剖のタイムコースや例数の再検討が必要と考えられた (図 17-20)。

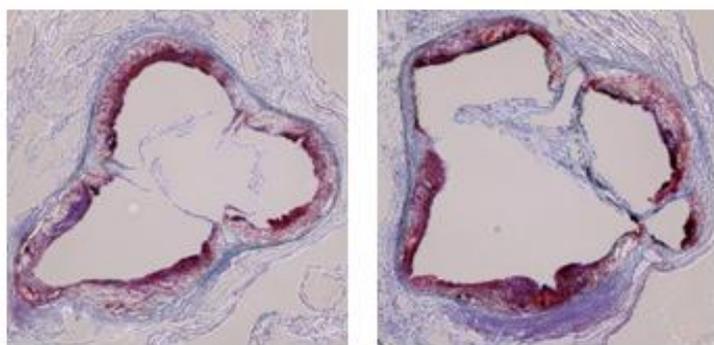


図 17 Oil Red O 染色

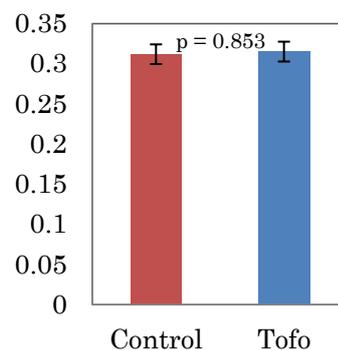


図 18 陽性領域面積比

左 Control 群 (n=12) 右 Tofogliflozin 群 (n=14)

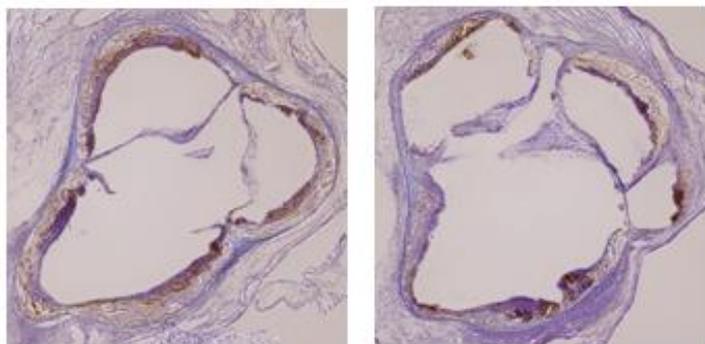


図 19 抗 MOMA2 抗体免疫染色

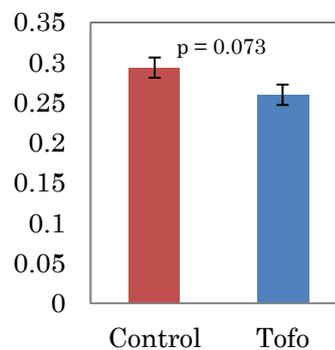


図 20 陽性領域面積比

左 Control 群 右 Tofogliflozin 群

5. 大動脈 mRNA 発現解析 (Tofogliflozin 6 週間通常食混餌投与)

Tofogliflozin 投与による抗動脈硬化作用のメカニズムを検討するため、高血糖が動脈硬化に影響を及ぼす際に介していると考えられる血管内皮障害 (接着分子 (ICAM-1・VCAM-1)、単球遊走因子 (MCP-1))、マクロファージ (CD68)、炎症性サイトカイン (IL-6)、酸化ストレス (NOX2) (37) や線維化 (fibronectin) に関する遺伝子の動脈全体における発現を評価した。

前述の実験と同様のプロトコルで糖尿病の導入および実験飼料投与を開始し、動脈硬化の形成過程における mRNA 発現を検討することを考慮し、Tofogliflozin 投与期間を 6 週に短縮し解剖を行った (図 21) (Control n=7, Tofogliflozin n=7)。

Tofogliflozin 投与期間中の体重・随時血糖は前述の実験と同様の傾向にあったが (図 22)、mRNA の発現量に関しては両群間において、統計学的に明らかな有意差を認めず (Control n=7, Tofogliflozin n=7) (図 23)、Tofogliflozin の抗動脈硬化作用のメカニズムは本実験では明らかにできなかった。

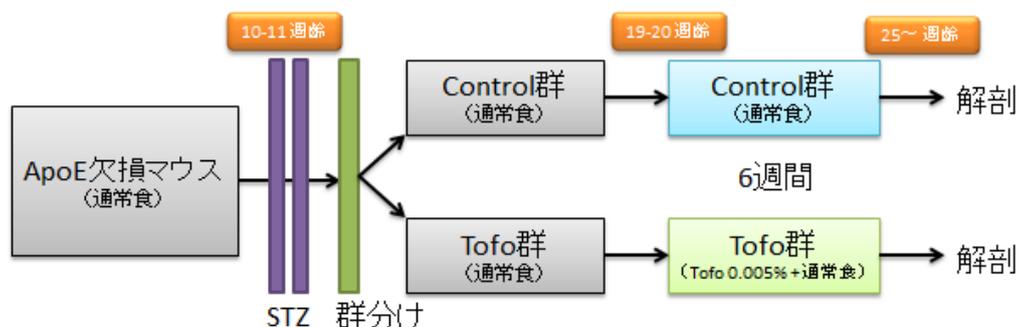


図 21 Tofogliflozin 6 週間通常食混餌投与実験プロトコル

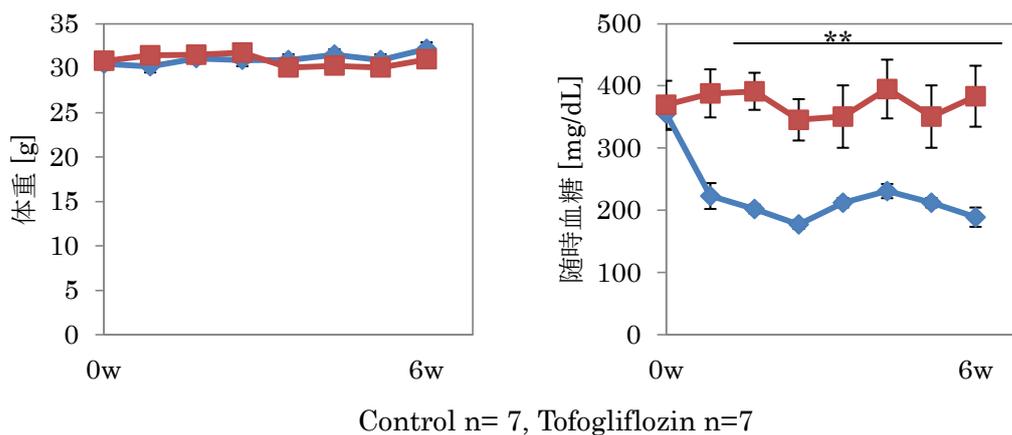


図 22 Tofogliflozin 投与後、体重（左）随時血糖（右）経過

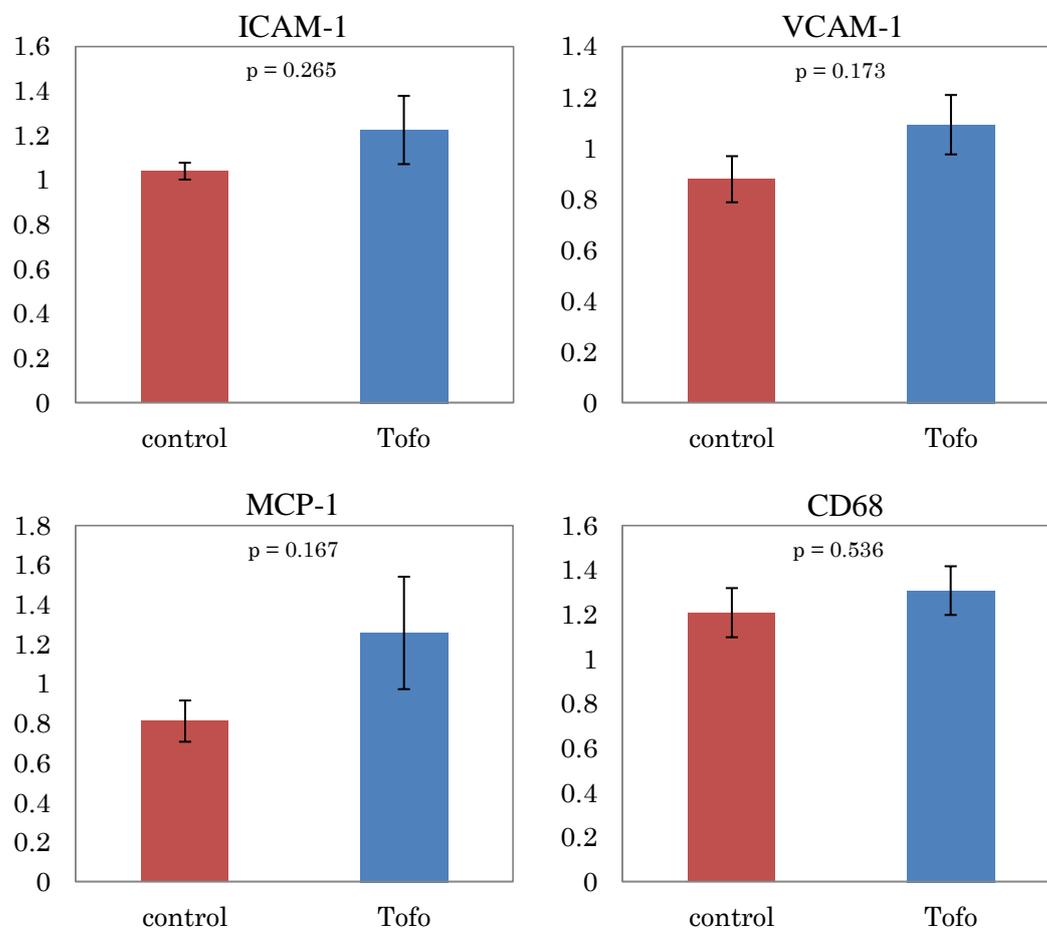


図 23-1 Tofogliflozin 投与 6 週後 大動脈 mRNA 発現 (β アクチンで補正)

Control n= 7, Tofogliflozin n=7

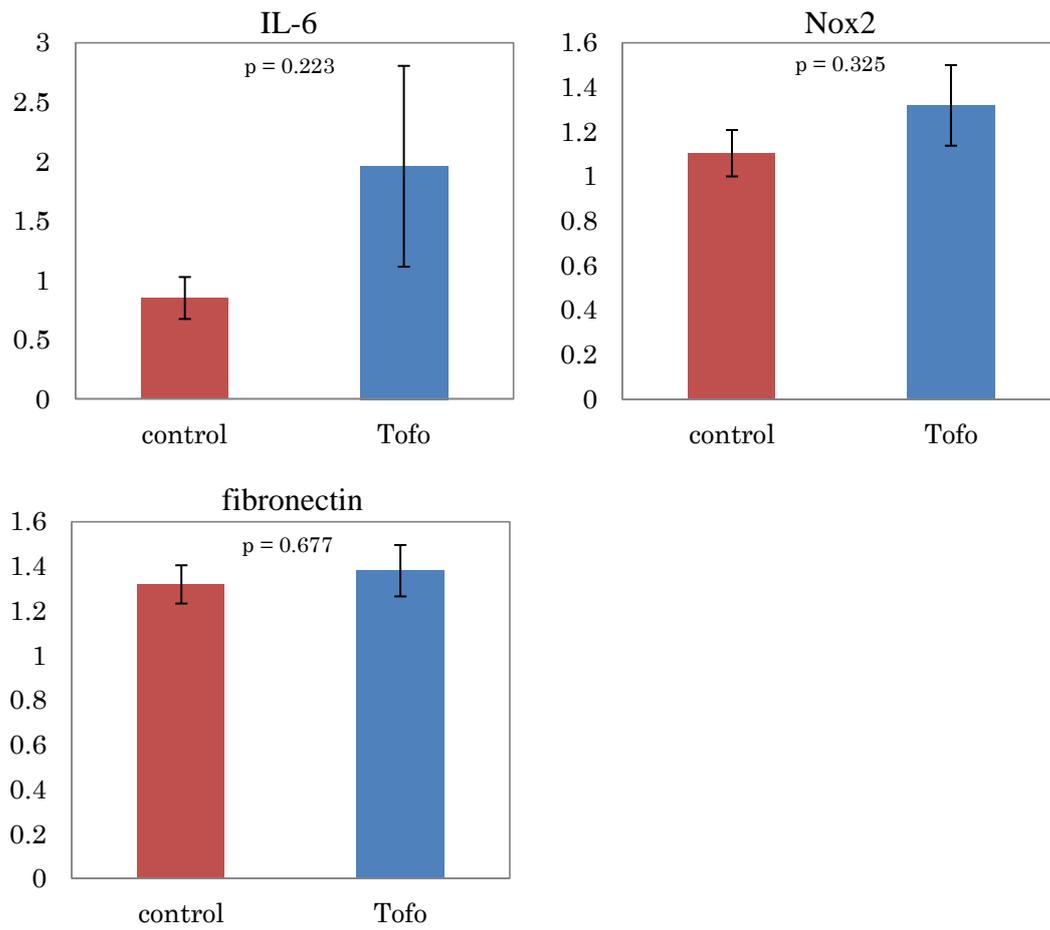


図 23-2 Tofogliflozin 投与 6 週後 大動脈 mRNA 発現 (β アクチンで補正)

Control n= 7, Tofogliflozin n=7

・考察

本研究では SGLT2 阻害薬である Tofogliflozin の抗動脈硬化作用を、通常食飼育下にて糖尿病合併動脈硬化モデルマウスを用いて検討した。

マウスおよびヒトにおいて SGLT2 は腎特異的に発現し、血管内皮に発現がないことが知られている (38,39)。したがって今回得られた抗動脈硬化作用に関しては SGLT2 阻害薬の動脈に対しての直接的な作用ではなく、何らかのパラメーター変動に伴う間接的な作用による影響である可能性が考えられる。

その候補となる大血管障害のリスクファクターとしては UKPDS、Steno-2 Study といった 2 型糖尿病患者を対象とした大規模臨床試験の結果からも高血糖、脂質異常、高血圧、肥満、高インスリン血症などが挙げられ、高血糖による酸化ストレスや炎症性サイトカインの上昇で血管内皮が障害された結果、接着因子 (ICAM-1、VCAM-1) およびケモカイン (MCP-1) の活性が亢進し、血管壁へのマクロファージの浸潤が促進されることで進行することが報告されている (37,40,41)。

本研究に使用した 2 型糖尿病合併 ApoE 欠損マウスは、インスリン分泌低下型で Control 群・Tofogliflozin 群いずれもインスリン値は検出感度未満であり、また非肥満でかつ両群の体重に差を認めず、さらに脂質パラメーターに差がないことから、血糖の変動による抗動脈硬化作用を見易いモデルと考えられた。

実際の血糖プロファイルとしては経口血糖負荷試験では Control 群・Tofogliflozin 群いずれも著明な高血糖をきたしてから漸減するパターンであったものの Tofogliflozin 群の方が試験開始後 30 分以降有意に血糖は低く、また自由摂食下でも両群とも慢性的な高血糖を呈していたが、Tofogliflozin 群は Control 群と比較して随時血糖が約 200mg/dL 程度低く維持されており、また動脈硬化の進展に関しては Tofogliflozin 9,11 週間通常食混餌投与実験の両方で Control 群と比して Tofogliflozin 群において大動脈全体における plaque 付着率が有意に抑制されていたことから、SGLT2 阻害薬には高血糖の是正および抗動脈硬化作用があると考えられた。

一方、Tofogliflozin 6 週間通常食混餌投与実験では高血糖が動脈硬化に影響を及ぼす際に介していると考えられる遺伝子の mRNA はいずれも上昇を認めておらず、現段階で Tofogliflozin の血糖改善を介した抗動脈硬化作用の分子メカニズムは不明となっている。これに関しては

- ① 高血糖やその改善に伴う遺伝子変化のタイムコースが非常に早期である、あるいは一律に動いていなかった。
- ② 高血糖以外の、血圧の変化など他の要因が動脈硬化に寄与した。
- ③ 動脈内の plaque の付着が著しく、内皮のみ採取することが困難であり動脈全体を採取して mRNA の発現を定量したため、内皮における mRNA

の変化の差が見えにくくなった。

- ④ Tofogliflozin 群は Control 群と比して血糖値は改善しているものの、正常化はしていないため有意差が出るほどの mRNA の差を認めなかった。

といった可能性が挙げられる。

今後の展望として、まず①に関しては引き続き ApoE 欠損マウスを用いて糖尿病導入早期を含め、治療開始後様々なタイムコースでの mRNA の変化を検討しつつ、Tofogliflozin 投与により有意な改善あるいは改善傾向を認める実験条件を模索し、さらには今後 micro array を行い網羅的な遺伝子解析を行うことも考慮する。また②に関しても、①と同時に今後の実験において血圧測定を行い検討していくが、既報において C57BL/6J マウスに Tofogliflozin 投与した場合、有意に体重の低下を認めたものの血圧は低下傾向にとどまっており (30)、本実験では ApoE 欠損マウスの体重が増えにくい表現型 (42) か、あるいは糖尿病を導入した影響か原因は現時点で定かではないが両群間に体重に差を認めていないことから、体液量の差も大きくなく血圧に大きな差は生じにくいのではないかと伺われる。

本実験においてはインスリン分泌を低下させた上で血糖の変動に着目し抗動脈硬化を検討したが、非糖尿病合併モデルの ApoE 欠損マウスに 1 日 2 回 glucose 負荷を行うことで食後高血糖を模し、未治療群と SGLT2 阻害薬による治療群を

比較した結果、2 群間において glucose 負荷による血糖プロファイルに差は認めなかったものの、glucose 負荷後早期のインスリン分泌が SGLT2 阻害薬治療群で低下し、動脈硬化も抑制されたという表現型の報告もあり (41)、メカニズムは不明なものの、SGLT2 阻害薬には血糖だけでなくインスリンを介した抗動脈硬化作用も併存している可能性が考えられ、今後は肥満モデルなどを用いて SGLT2 阻害薬投与によるインスリン値の変動、ないしは血管内皮におけるインスリン抵抗性の改善を認め、かつ抗動脈硬化作用を示すかどうかの解析を行うことも重要と考えられる。

・ 結論

本研究では

- ・ 2型糖尿病モデルマウス作成のための STZ 投与プロトコルを確立した
- ・ 糖尿病合併動脈硬化モデルマウスに Tofogliflozin を長期（9,11 週）投与することで、体重・脂質には変化をもたらさなかったが、再現性をもって血糖コントロールの改善と動脈硬化の抑制を認めた

以上より、SGLT2 阻害薬は血糖変動を介した抗動脈硬化作用がもつと考えられたが、現時点ではそのメカニズムは明らかではなく、今後の検討が必要である。

・謝辞

本研究を遂行するにあたり、御懇篤なる御指導・御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科教授の門脇孝先生に、厚く御礼申し上げます。

また本研究を進めるにあたり、多大なる御指導を頂きました、東京大学医学部附属病院病態栄養治療部准教授の窪田直人先生に深く感謝いたします。

併せて、理化学研究所統合生命医科学研究センター代謝恒常性研究チームの窪田哲也先生、東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科の高本偉碩先生、桜井賛孝先生、林高則先生、相原允一先生、川崎医科大学附属病院糖尿病・代謝・内分泌内科の小畑淳史先生、ならびに実験助手の平田詠信さん、長野あゆ美さん、小此木優子さん、辺見まさみさん、石川直樹さん、大内歩さん、岩上珠生さん、太田彬さん、小林祐佳さんに心より感謝いたします。

- ・ COI 開示

本学位論文に関連し、開示すべき COI 関係にある企業等

- ・ 共同研究費：興和創薬

- ・ 非財産的支援：興和創薬

・参考文献

- (1) 厚生労働省：平成 24 年国民健康・栄養調査
- (2) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of Intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329:977-986.
- (3) The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after trial of intensive therapy. *N Engl J Med.* 2000; 342.
- (4) Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005; 353(25): 2643-2653.
- (5) Martin CL, Albers J, Herman WH, Cleary P, Waberski B, Greene DA, Stevens MJ, Feldman EL. Neuropathy among the diabetes control and complications trial cohort 8 years after trial completion. *Diabetes Care.* 2006; 29(2): 340-344.
- (6) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment

- and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) . Lancet. 1998; 352(9131): 837-53
- (7) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) . Lancet. 1998; 352(9131): 854-65.
- (8) Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. N Engl J Med. 2008; 359(15): 1577-89.
- (9) Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH Jr, Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. N Engl J Med. 2008; 358(24): 2545-2559.
- (10) Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. N Engl J Med. 2008; 358(24): 2560-72.
- (11) Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zeive

- FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2009; 360(2): 129-39.
- (12) Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2003 Jan 30; 348(5): 383-93.
- (13) Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008 Feb 7; 358(6): 580-91.
- (14) Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet.* 2006 Nov 11; 368(9548): 1696-705.
- (15) Matthias A. Hediger, Michael J. Coady, Tyson S. Ikeda, Ernest M. Wright. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature.* 1987; 330(6146): 379-381.
- (16) Kanai Y, WS Lee, G You, D Brown, MA Hediger. The Human Kidney Low Affinity Na⁺/glucose Cotransporter SGLT2. *J. Clin. Invest.* 1994; 93(1):

397-404.

- (17) Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*. 2005 Dec; 54(12): 3427-34.
- (18) Turk E, Zabel B, Mundlos S, Dyer J, Wright EM. Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature*. 1991 Mar 28; 350(6316): 354-6.
- (19) Santer R, Calado J. Familial renal glucosuria and SGLT2: from a mendelian trait to a therapeutic target. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Jan; 5(1): 133-41.
- (20) Chao EC, Henry RR. SGLT2 inhibition-a novel strategy for diabetes treatment. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Jul; 9(7): 551-9.
- (21) Mather A, Pollock C. Renal glucose transporters: novel targets for hyperglycemia management. *Nat Rev Nephrol*. 2010 May; 6(5): 307-11.
- (22) Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005 Jan-Feb; 21(1): 31-8.

- (23) Silverman M, Black J. High affinity phlorizin receptor sites and their relation to the glucose transport mechanism in the proximal tubule of dog kidney. *Biochim Biophys Acta*. 1975 Jun 11; 394(1): 10-30.
- (24) Santer R, Calado J. Familial renal glucosuria and SGLT2: from a mendelian trait to a therapeutic target. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Jan; 5(1): 133-41.
- (25) Suzuki M, Honda K, Fukazawa M, Ozawa K, Hagita H, Kawai T, Takeda M, Yata T, Kawai M, Fukuzawa T, Kobayashi T, Sato T, Kawabe Y, Ikeda S. Tofogliflozin, a potent and highly specific sodium/glucose cotransporter 2 inhibitor, improves glycemic control in diabetic rats and mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Jun; 341(3): 692-701.
- (26) Imamura M, Nakanishi K, Suzuki T, Ikegai K, Shiraki R, Ogiyama T, Murakami T, Kurosaki E, Noda A, Kobayashi Y, Yokota M, Koide T, Kosakai K, Ohkura Y, Takeuchi M, Tomiyama H, Ohta M. Discovery of Ipragliflozin (ASP1941): a novel C-glucoside with benzothiophene structure as a potent and selective sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Bioorg Med Chem*. 2012 May 15; 20(10): 3263-79.
- (27) Liang Y, Arakawa K, Ueta K, Matsushita Y, Kuriyama C, Martin T, Du F, Liu Y, Xu J, Conway B, Conway J, Polidori D, Ways K, Demarest K. Effect of

- canagliflozin on renal threshold for glucose, glycemia, and body weight in normal and diabetic animal models. *PLoS One*. 2012; 7(2): e30555.
- (28) Yamamoto K, Uchida S, Kitano K, Fukuhara N, Okumura-Kitajima L, Gunji E, Kozakai A, Tomoike H, Kojima N, Asami J, Toyoda H, Arai M, Takahashi T, Takahashi K. TS-071 is a novel, potent and selective renal sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor with anti-hyperglycaemic activity. *Br J Pharmacol*. 2011 Sep; 164(1): 181-91.
- (29) Han S, Hagan DL, Taylor JR, Xin L, Meng W, Biller SA, Wetterau JR, Washburn WN, Whaley JM. Dapagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, improves glucose homeostasis in normal and diabetic rats. *Diabetes*. 2008 Jun; 57(6): 1723-9.
- (30) Obata A, Kubota N, Kubota T, Iwamoto M, Sato H, Sakurai Y, Takamoto I, Katsuyama H, Suzuki Y, Fukazawa M, Ikeda S, Iwayama K, Tokuyama K, Ueki K, Kadowaki T. Tofogliflozin Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Accelerates Lipolysis in Adipose Tissue in Male Mice. *Endocrinology*. 2015 Dec 29: en20151588.
- (31) Bailey CJ1, Gross JL, Pieters A, Bastien A, List JF. Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with

- metformin: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2010 Jun 26; 375(9733): 2223-33.
- (32) Wilding JP, Woo V, Soler NG, Pahor A, Sugg J, Rohwedder K, Parikh S; Dapagliflozin 006 Study Group. Long-term efficacy of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitus receiving high doses of insulin: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2012 Mar 20; 156(6): 405-15.
- (33) Bolinder J1, Ljunggren Ö, Kullberg J, Johansson L, Wilding J, Langkilde AM, Sugg J, Parikh S. Effects of dapagliflozin on body weight, total fat mass, and regional adipose tissue distribution in patients with type 2 diabetes mellitus with inadequate glycemic control on metformin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Mar; 97(3): 1020-31.
- (34) Rosenstock J, Aggarwal N, Polidori D, Zhao Y, Arbit D, Usiskin K, Capuano G, Canovatchel W. Dose-ranging effects of canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, as add-on to metformin in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012 Jun; 35(6): 1232-8.
- (35) Ikeda S, Takano Y, Cynshi O, Tanaka R, Christ AD, Boerlin V, Beyer U, Beck A, Ciorciaro C, Meyer M, Kadowaki T. A novel and selective sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor, tofogliflozin, improves glycaemic control and lowers

- body weight in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2015 Oct; 17(10): 984-93.
- (36) Tse J, Martin-McNulty B, Halks-Miller M, Kauser K, DelVecchio V, Vergona R, Sullivan ME, Rubanyi GM. Accelerated atherosclerosis and premature calcified cartilaginous metaplasia in the aorta of diabetic male Apo E knockout mice can be prevented by chronic treatment with 17 beta-estradiol. *Atherosclerosis*. 1999 Jun;144(2):303-13.
- (37) Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab*. 2011 Nov 2;14(5):575-85.
- (38) Sabolic I, Vrhovac I, Erer DB, Gerasimova M, Rose M, Breljak D, Ljubojevic M, Brzica H, Sebastiani A, Thal SC, Sauvant C, Kipp H, Vallon V, Koepsell H. Expression of Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT2 in rodents is kidney-specific and exhibits sex and species differences. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Apr 15; 302(8): C1174-88.
- (39) Chen J, Williams S, Ho S, Loraine H, Hagan D, Whaley JM, Feder JN. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Ther*. 2010 Dec; 1(2): 57-92.
- (40) Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis:

molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol.* 2002 Apr 8; 1: 1.

- (41) Popov D. Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes. *International Journal of Diabetes Mellitus* 2 (2010) 189–195
- (42) Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond.