

論文の内容の要旨

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

岩本 真彦

[背景・目的]

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・栄養調査によると、「糖尿病が強く疑われる者」は 950 万人、「糖尿病の可能性が否定できない者」は 1100 万人と、両者を合わせ 2050 万人にのぼると推定され、糖尿病および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。

糖尿病の慢性合併症の多くは血管病変によって引き起こされ、小動静脈・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、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ている。

Sodium glucose co-transporter(SGLT)2 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インスリンを介さない血糖降下作用をもち、動物実験では肥満・耐糖能・インスリン抵抗性の改善、インスリン値の低下、肝臓での糖新生を亢進させると報告され、ヒトにおける第Ⅲ相臨床試験においても HbA1c 改善、体重増加抑制効果が報告されており、大血管症の抑制に期待できると考えられた。本実験では SGLT2 阻害薬 Tofogliflozin を用い、動脈硬化抑制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。

[実験方法・結果]

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适当であり、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 欠損マウスを選択した。

ApoE 欠損マウスは Streptozotocin (STZ) を腹腔内に投与することで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と報告されており、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が、高用量の STZ 投与は 1 型糖尿病を発症してしまうため、2 型糖尿病導入プロトコルの確立する目的

に ApoE 欠損マウスのバックグラウンドである野生型の C57BL/6J マウス (8-11 週齢) のを 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。STZ は用量・投与回数依存性に糖尿病導入率・1 型糖尿病発症率を増加させたが、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、以後の実験において STZ 投与プロトコルは 100mg/kg 2 回投与とした。

次に 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・随時血糖が均等になるよう 2 群 (Control 群/Tofogliflozin 群) に割り振り、9 週間の経過観察を経た後に 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。Tofogliflozin 投与後、体重は両群においてほぼ同程度で経過したが、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 (Control n=20, Tofogliflozin n=17)、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た (Control n=5, Tofogliflozin n=8)。また 10 週経過時の経口糖負荷試験では Tofogliflozin 群で有意に耐糖能は改善し (Control n=8, Tofogliflozin n=8)、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ず、血清インスリン値も測定したが両群共に検出感度未満であった (Control n=11, Tofogliflozin n=11)。11 週経過後の解剖では大動脈矢状断面積に対する plaque の付着率は Control 群 (0.2596 ± 0.0123) に対し、Tofogliflozin 群 (0.2086 ± 0.0084) で有意に抑制されたが、動脈硬化の著しい弓部のみの解析では両群間に差を認めなかった (Control 0.4625 ± 0.0259 、Tofogliflozin 0.4786 ± 0.0304) (Control n=11, Tofogliflozin n=11)。

続いて Tofogliflozin 投与期間を 9 週に短縮し再度組織学的評価を行ったところ、大動脈矢状断面積に対する plaque 付着率も 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。また大動脈弁輪部冠状断に対し、Oil red O 染色と抗 MOMA2 抗体免疫染色を行ったが、冠状断面積に対する陽性領域の面積は両群で差を認めなかった (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 , $p = 0.072$) (Control n= 12, Tofogliflozin n=14)。

さらに Tofogliflozin の抗動脈硬化作用のメカニズムを検討するため、Tofogliflozin 6 週投与の段階で解剖を行い、高血糖が動脈硬化に影響を及ぼす際に介するとされる血管内皮障害 (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) 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が、mRNA の発現量に関しては両群間において差を認めなかった (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おり、今回の抗動脈硬化作用は 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た。

大血管障害のリスクファクターとしては高血糖、脂質異常、高血圧、肥満、高インスリン血症が挙げられるが本研究の糖尿病合併動脈硬化モデルマウスは、両群共にインスリン検出感度未満で体重や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、実際 Tofogliflozin 群は随時血糖が約 200mg/dL 程度低く維持され、大動脈全体における plaque 付着率も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される遺伝子の mRNA はいずれも上昇を認めず、抗動脈硬化作用の分子メカニズムは不明であったが、これは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、または一律に動いていない、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、④Tofogliflozin 群は血糖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、今後の展望として①に関しては引き続き ApoE 欠損マウスを用いて様々なタイムコースでの mRNA の変化を検討し、micro array を行い網羅的な遺伝子解析を行うことも考慮する。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するが、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、本実験では Tofogliflozin 投与しても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、血圧に差は生じにくいのではないかと伺われた。

[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、糖尿病合併動脈硬化モデルマウスに Tofogliflozin を長期投与することで、体重・脂質に変化なく、血糖改善と動脈硬化の抑制を認め、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。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。