

糖尿病発症 ApoE 欠損マウスを用いた  
GLP-1 受容体作動薬及び SGLT2 阻害薬併用の  
動脈硬化性病変と腎病変への効果の解析  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系糖尿病内科学専攻

田久保 正洋

修了年 2023 年

指導教員 石原 寿光

## 【要約】

### 【背景・緒言】

国際糖尿病連合 (International Diabetes Federation, IDF)は 2021 年に世界で糖尿病を罹患した成人の数が 5 億 3,700 万人に増加し、糖尿病の有病率は 10.5%に達したと報告した [1]。心血管病や動脈硬化は糖尿病、メタボリックシンドローム、内臓脂肪型肥満、高尿酸血症、高血圧症などの危険因子を複数持つことで悪化が加速することが知られている [2]。近年、これらの危険因子に対する薬剤が心血管イベントの発生、あるいは死亡率を改善するかが注目されている。糖尿病性腎臓病 (Diabetic kidney disease, DKD)は糖尿病が発症に関与する慢性腎臓病であり、本邦においても 2018 年に典型的な糖尿病性腎症に加え、顕性アルブミン尿を伴わないまま糸球体濾過量が低下する非典型的な糖尿病関連腎疾患を含む概念として糖尿病性腎臓病と定義した [3]。DKD の病態生理学的な要因として血行動態、代謝、炎症、線維化の 4 つがあることが知られている。この 4 つの病態生理学的要因を標的とした治療の研究が進められている [4]。

近年登場した GLP-1 (Glucagon-like peptide-1)受容体作動薬、SGLT2 (Sodium-glucose cotransporter-2)阻害薬はそれぞれヒトの大規模臨床試験において、心血管疾患、腎疾患への有用性を示している [5, 6, 7, 8]。マウスを用いた基礎研究においても、GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬の心血管疾患、腎疾患への効果を示した研究は多く存在する [9, 10, 11, 12]。動脈硬化のモデルマウスである ApoE (Apolipoprotein E)欠損マウスで GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬それぞれが動脈硬化性病変や腎病変を改善することは示されているが、両薬剤の併用については動脈硬化性病変や腎病変抑制の相互作用や明確なメカニズムは未だ明らかになっていない。

## 【目的】

SGLT2 阻害薬と GLP-1 受容体作動薬の両薬剤併用において、単剤投与と比較し、心血管動脈硬化性病変や腎病変の発生を抑制するかを解明するために、糖尿病を発症した ApoE 欠損高脂血症マウスを用いて、SGLT2 阻害薬、GLP-1 受容体作動薬の単独投与、または両薬剤の併用投与を行い、大動脈と腎臓の組織学的な評価と、動脈硬化や腎障害に関連するマーカーの遺伝子発現の変化を検討した。

## 【対象と方法】

8 週齢の自然発症 ApoE 欠損高脂血症マウスに niotineamide 120 mg/kg、streptozotocin 100 mg/kg を隔日 2 回腹腔内投与し、2 型糖尿病高脂血症モデルマウスを作製した。マウスには 60%脂肪含有の高脂肪飼料を与えて飼育した。一部のマウスは糖尿病を発症させなかったコントロール群 (CTL 群)とした。糖尿病を発症させたマウスを無作為に 4 群へ分け、8 週間の薬剤投与を行った。Liraglutide 単独投与群 (LIRA 群)は、liraglutide (300 µg/kg)を腹腔内に 1 日 1 回投与した。Ipragliflozin 単独投与群 (IPRA 群)については ipragliflozin を 2 mg/kg/日で投与できるように調整した飼料を給餌した。両薬剤投与群 (COMBO 群)については両薬剤共に上記方法で投与した。両薬剤を投与しないマウスを未治療群とした。各群のマウスの体重と摂餌量を毎週測定した。薬剤投与終了 8 週後に腹腔内ブドウ糖負荷試験 (Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)を行い、各群の糖代謝への影響を評価した。同様に薬剤投与 8 週間終了後に血液試料と尿試料を採取し、解析した。薬剤投与 8 週間終了後に大動脈と腎臓を摘出し、大動脈と腎臓の組織学的評価を行った。また、摘出した大動脈と腎臓から RNA 抽出

を行い、動脈硬化関連項目、糖尿病性腎臓病関連項目の遺伝子発現の解析を、リアルタイム PCR 法を用いて行った。

## 【結果】

1 日平均摂餌量は CTL 群、未治療群、COMBO 群と比較して、LIRA 群で有意に低下した。また、CTL 群、未治療群、LIRA 群と比較して、IPRA 群で摂餌量が有意に増加した。17 週齢の体重は CTL 群と比較して、未治療群、LIRA 群、IPRA 群、COMBO 群で有意に低下した。また COMBO 群は IPRA 群と比較して体重が有意に低下した。9 週齢から 17 週齢の間の体重変化量は CTL 群、未治療群、IPRA 群と比較して、LIRA 群でそれぞれ有意に低下した。同様に CTL 群、未治療群、IPRA 群と比較して、COMBO 群でそれぞれ有意に体重変化量は低下した。

17 週齢マウスの IPGTT の結果は、CTL 群と比較して未治療群は 0 分値、30 分値、60 分値、120 分値、AUC (Area under curve) で血糖値が有意に上昇した。未治療群と比較して、LIRA 群、IPRA 群、COMBO 群は 30 分値、60 分値、120 分値、AUC で血糖値が有意に低下した。IPRA 群と LIRA 群を比較すると 120 分値で LIRA 群の血糖値が有意に低下した。IPRA 群と COMBO 群を比較すると、60 分値、120 分値、AUC で COMBO 群の血糖値が有意に低下した。

血中脂質については、HDL-cho が未治療群と比較して、IPRA 群と COMBO 群で増加し、LDL/HDL 比も未治療群と比較して、IPRA 群と COMBO 群で低下した。

大動脈の組織学的評価の結果として、大動脈洞の Oil red O 染色陽性面積割合は CTL 群  $4.4 \pm 0.5\%$  に対して、未治療群  $13.4 \pm 0.8\%$  と有意に増加し、COMBO 群の ORO 染色陽性面積割合は  $6.0 \pm 1.0\%$  と未治療群と比較して有意に低下した。

動脈硬化に関連する遺伝子発現の解析結果を以下に示す。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  は CTL 群と比較して未治療群で有意に増加した。同じく炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  と、その活性化に関わる NLRP3 も CTL 群と比較して未治療群で増加傾向であり、LIRA 群、IPRA 群、COMBO 群で低下傾向であったが、5 群間に有意差は認めなかった。単球の内皮細胞浸潤に関連する MCP-1 は CTL 群と比較して未治療群で有意に増加し、未治療群と比較して COMBO 群で有意に低下した。

17 週齢の腎臓の HE 染色標本ではいずれの群においても糖尿病性腎症に特徴的な所見や糸球体硬化像は観察できなかった。また糸球体面積、糸球体線維化面積は 5 群間に有意差を認めなかった。

糖尿病性腎臓病に関連する遺伝子発現の解析結果を以下に示す。腎臓での炎症に関連する IL-1 $\beta$  は未治療群と比較して、LIRA 群と COMBO 群で有意に低下した。同様に NLRP3 は CTL 群と比較して未治療群で有意に増加し、未治療群と比較して COMBO 群で有意に低下した。腎臓での内皮細胞障害に関連する ICAM-1 は未治療群と比較して、LIRA 群と COMBO 群で有意に低下した。LIRA 群と IPRA 群を比較すると IPRA 群のほうが有意に増加した。腎臓での線維化に関連する Collagen4a1 は CTL 群と比較して、未治療群で有意に増加し、未治療群と比較して LIRA 群、COMBO 群で有意に低下した。腎臓でのコレステロール排出に関連する ABCG1 は IPRA 群と比較して COMBO 群で有意に増加した。

## 【考察】

今回の研究では、9 週齢と早期から薬剤投与を行い、GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬の併用投与により、動脈硬化性病変の改善と、大動脈の MCP-1 遺伝子発現の改善を認めた。MCP-1 は単球の内皮細胞浸潤を惹起する機能があり、動脈硬化の発生に重要な役割を持つ [13]。GLP-1 受容体作動薬や SGLT2 阻害薬の投与により MCP-1 の発現が低下することを確認した報告も多い [10, 14]。今回 GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬の併用投与により、MCP-1 の発現低下を認めたことから、GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬の併用投与は単球の内皮細胞浸潤を抑制する可能性を示唆した。今回の研究では LIRA 群、COMBO 群ともに血糖降下作用は同等であるが、COMBO 群のみ動脈硬化性病変の有意な改善を認めた。このことから GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬の併用投与による動脈硬化の改善は、単純な血糖降下作用によるものだけでなく、動脈への直接的な相加作用がある可能性を示唆した。食欲の抑制が利かないマウスでは SGLT2 阻害薬による糖の排出により食欲が亢進し、体重増加すると考えられている [15, 16]。GLP-1 受容体作動薬と併用することで、SGLT2 阻害薬による食欲亢進を抑制し、COMBO 群で体重増加を抑制できた可能性を示唆した。血中脂質は COMBO 群で HDL-cho の改善を認めた。SGLT2 阻害薬、GLP-1 受容体作動薬による HDL-cho の改善が、動脈硬化性病変の改善に寄与している可能性を示唆した。

腎臓での組織学的評価の結果として、未治療群でも糸球体面積に変化はなく、糖尿病性腎症に典型的な糸球体所見も認めなかった。糸球体線維化も同様に変化が乏しかった。本研究のマウスでは血圧を上昇させる処置を行わなかった点と、糖尿病発症から比較的早期に腎組織学的評価をした点が組織学的な変化が

起きなかった原因と考える。腎臓での IL-1 $\beta$ 、NLRP3、Collagen4a1、ABCG1 の遺伝子発現は GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬の併用投与で改善した。このように腎病変に対する効果としては mRNA レベルで炎症、線維化、脂質代謝関連マーカーが GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬の併用投与で改善した可能性を示唆した。今回の研究の limitation として以下の 3 つが存在する。1 つ目は大動脈 mRNA の検体数が各群十分な数が得られなかったことが挙げられる。2 つ目は ipragliflozin を餌に混入し、24 時間給餌する方法では SGLT2 阻害薬の投与量に変動が起き、また空腹時間が十分に得られなかったことで、腎での  $\beta$  酸化亢進によるケトン体増加が起きなかった可能性があった。3 つ目は腎臓を糸球体や尿細管など組織ごとに分けて検討できていないことが挙げられる。

#### 【結語】

糖尿病を発症した脂質異常症マウスに対して、早期から GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬を併用投与することで、動脈硬化性病変と腎での炎症、線維化、脂質代謝関連マーカーの遺伝子発現が改善した。GLP-1 受容体作動薬と SGLT2 阻害薬の併用投与は動脈硬化性病変と腎病変に対して、有益な効果をもたらす可能性が示唆された。

## 【引用文献】

1. IDF diabetes atlas-10th edition, International Diabetes Federation, 2021.
2. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *J. Atheroscler. Thromb.* 18: 629–639 (2011).
3. 岡田浩一, 安田宣成, 旭浩一, 他. エビデンスに基づくCKD診療ガイドライン 2018. *日腎会誌.* 60: 1037-193 (2018).
4. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol.* 12: 2032-2045 (2017).
5. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, *et al.* Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 373: 2117-28 (2015).
6. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, *et al.* Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 375: 311-22 (2016).
7. Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, *et al.* Canagliflozin and renal outcomes in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 380: 2295-2306 (2019).
8. Mann JFE, Ørsted DD, Brown-Frandsen K, *et al.* Liraglutide and renal outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 377: 839-848 (2017).
9. Terasaki M, Hiromura M, Mori Y, *et al.* Amelioration of hyperglycemia with a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor prevents macrophage-driven atherosclerosis through macrophage foam cell formation suppression in type 1 and type 2 diabetic mice. *PLoS One.* 10: e0143396 (2015).
10. Koshiibu M, Mori Y, Saito T, *et al.* Antiatherogenic effects of liraglutide in hyperglycemic apolipoprotein E-null mice via AMP-activated protein kinase-independent mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 316: E895-E907 (2019).
11. Tomita I, Kume S, Sugahara S, *et al.* SGLT2 inhibition mediates protection from diabetic kidney disease by promoting ketone body-induced mTORC1 inhibition. *Cell Metab.* 32: 404-419 (2020).
12. Yin QH, Zhang R, Li L, *et al.* Exendin-4 ameliorates lipotoxicity-induced glomerular endothelial cell injury by improving ABC transporter A1-mediated cholesterol efflux in

diabetic apoE knockout mice. *J Biol Chem.* 291: 26487-26501 (2016).

13. Inoue S, Egashira K, Ni W, *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 106: 2700-6 (2002).
14. Taberner-Cortés A, Vinué Á, Herrero-Cervera A, *et al.* Dapagliflozin does not modulate atherosclerosis in mice with insulin resistance. *Int J Mol Sci.* 23: 9216 (2020).
15. Koike M, Saito H, Kohno G, *et al.* Effects of GLP-1RA and SGLT2i, alone or in combination, on mouse models of type 2 diabetes representing different disease stages. *Int J Mol Sci.* 22: 11463 (2021).
16. Okauchi S, Shimoda M, Obata A, *et al.* Protective effects of SGLT2 inhibitor luseogliflozin on pancreatic  $\beta$ -cells in obese type 2 diabetic db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 470: 772-782 (2016).