

令和2年度(第25回)  
弘前大学医学部学術賞  
奨励賞受賞論文

GUO D, MIZUKAMI H, OSONOI S, TAKAHASHI K, OGASAWARA S, KUDO K, SASAKI T, YAGIHASHI S. Beneficial effects of combination therapy of canagliflozin and teneligliptin on diabetic polyneuropathy and  $\beta$ -cell volume density in spontaneously type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Metabolism*. 2020;107:154232. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154232.

## カナグリフロジンとテネリグリプチンの併用療法は自然発症2型糖尿病モデル Goto-Kakizaki ラットにおける神経障害と $\beta$ 細胞容積を改善する

中国医科大学附属第一病院 病理学講座  
弘前大学大学院医学研究科 分子病態病理学講座  
郭 丹 陽

### 【背景】

糖尿病性神経障害 (DPN) は糖尿病における最も早期から、かつ頻度が高い合併症である<sup>1)</sup>。足趾の異常感覚、痛み、感覚鈍麻などの症状があり、適切に治療なされないと切断になることがある。その発症機序に高血糖からのポリオール経路の活性化、PKCの異常活性化、酸化ストレス、終末糖化産物の沈着、その受容体を介したシグナル、炎症などが想定されている<sup>1)</sup>。特に、DPN早期の無髄小径神経機能不全は高血糖からの酸化ストレスの増加がその主体をなし、神経線維の脱落を促進する<sup>2,3)</sup>。

現在、DPNの根治的治療は確立されていないため、その予防、対症療法が主体となっている。DPNにおいては、体性神経と自律神経の両者が傷害される。自律神経は無髄の小径神経からなり、DPNにおいて傷害を受けやすいとされている。病理学的には腹腔内自律神経節での軸索終末に認められるジストロフィーや心臓などにおける無髄自律神経線維の減少が知られている。自律神経のうち、迷走神経の腓枝を介して、腓島副交感神経 (PPN) が $\beta$ 細胞の増殖、インスリン分泌を促進する。一方、2型糖尿病 (T2D) では腓 $\beta$ 細胞容積 ( $V_{\beta}$ ) の脱落が知られている<sup>4)</sup>。以上のことから、DPNによるPPN障害がT2Dにおける $V_{\beta}$ 低下に関与している可能性が予測される。 $V_{\beta}$ 低下はT2Dにおけるインスリン分泌不全と直接的に相関している。そのため、PPN傷害の改善がT2Dの根治的治療法の確立につながる可能性がある。しかしながら、その関係は未だ不明である。

2型糖尿病の経口治療薬であるDPP-4阻害薬は腸管から分泌されたGLP-1をはじめとするインクレチンの分解を阻害し、その効果を増強させる。DPP-4阻害薬は実験的にGLP-1を介した末梢神経保護作用が報告されている。一方、SGLT-2阻害薬は新規糖尿病治療薬であり、腎尿細管のグルコース再吸収を抑制して、抗糖尿病効果を発揮する。SGLT2阻害薬のDPNに対する効果は未だ不明であり、さらにDPP-4阻害薬、SGLT2阻害薬の二剤併用の効果もよく分かっていない。そこで、今回、DPP-4阻害薬とSGLT2阻害薬投与におけるT2DモデルGoto-Kakizakiラット (GK)  $V_{\beta}$ と無髄小径神経の関係について、検討を行った。

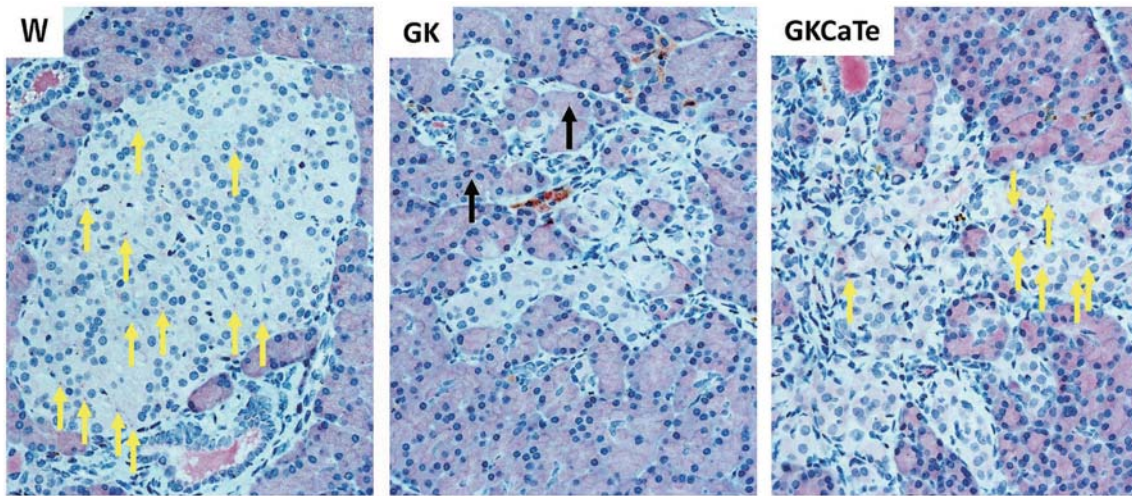


図1 膵島における VachT 陽性の副交感神経の分布

VachT 陽性の副交感神経はWの膵島内に赤のドット状に認められる (黄色矢印)。GK膵島では VachT 陽性副交感神経は膵島内には明らかではない。腺房組織には副交感神経が認められる (黒矢印)。GKCaTe では膵島内に VachT 陽性副交感神経が認められる (黄色矢印)。VachT; vesicular acetylcholine transporter, W; Wistar ラット, GK; Goto-Kakizaki ラット, GKCaTe; カナグリフロジン+テネリグリプチン投与 GK ラット。

## 【材料と方法】

雄性 GK および対照の Wistar ラット (W) を用いた。GK を SGLT2 阻害薬であるカナグリフロジン (10mg/kg/日, GKCa), DPP-4 阻害薬であるテネリグリプチン (10mg/kg/日, GKTe) 及び両薬投与群 (GKCaTe) に分けた (n=8)。5 週齢から24週間, 治療群はゾンデにて1日1回, 両剤を経口投与し, 経過観察した。投与期間中, 体重, 2g/kg グルコース負荷試験 (OGTT), グルコース刺激15分後のインスリン分泌 (GCI), 血中活性化 GLP-1 濃度を測定した。末梢神経の評価項目として, 神経伝導速度 (NCVs), 温覚閾値検査として Tail flick test (TFT) を行なった。24週間後, サクリファイス後, 膵臓, 皮膚を摘出し, 病理学的検索を行った。膵島容積, 内分泌細胞増殖能はインスリン, グルカゴン, ソマトスタチン, PP, Ki67 に対する免疫5重染色切片で検討した。PPN 線維は Vesicular acetylcholine transporter (VachT) に対する免疫染色で, 表皮内小径神経密度 (IENFD) は PGP9.5 に対する免疫蛍光染色で検討を行った。それぞれの相関について線形回帰分析にて統計的解析を行った。V<sub>β</sub> 低下を1.28% より低値とした時の IENFD のカットオフ値を決定するため, receiver operating characteristic (ROC) 曲線と area under the curve (AUC) が計算された。P 値が0.05より少ない時有意とした。

## 【結果】

投与24週間後で体重は GK で有意に低かった (p<0.05 vs W)。さらに GKCa および GKTeCa で GK に比し有意な体重低下が認められた (p<0.05)。OGTT において GK に比し GKTeCa>GKCa>GKTe の順で耐糖能改善効果が高かった。GCI において, 15分のインスリン分泌値 (Δ15min. IS) を求めると, GKは Wに比し有意にインスリン分泌の低下が認められた。Ca により GK の Δ15min. IS は改善しなかったものの, GKTeCa>GKTe の順に Δ15min. IS 改善効果が認められた (p<0.01 vs GK)。活性化 GLP-1 値は W と GK, GKCa で有意差は見られなかった。それに対し, GKTe で GK に比し有意に GLP-1 の増加が認められた (p<0.01)。GKTeCa でさらに分泌が充進していた (p < 0.05 vs GKTe)。NCVs は運動神経, 感覚神経ともに24週間で GK と W で明らかな差は認められなかった。GK で増加していた TFT 閾値は, GKCa, GKTe で有意に改善していた (p < 0.05 vs W)。そして, GKCaTe でさらなる改善がみられた (p < 0.05 vs GKCa, GKTe)。

Wに比し, GKで有意に低下していた $V_{\beta}$ は ( $p < 0.01$ ), GKCaでは有意な改善は見られなかった. 一方, GKTe ( $p < 0.05$ ) および GKCaTe ( $p < 0.01$ ) で $V_{\beta}$ の有意な改善が認められた. 病理学的に Ki67とインスリン共陽性細胞の割合で $\beta$ 細胞の増殖能を評価した. GKでWに比し $\beta$ 細胞の増殖能は有意に低下を示していた ( $p < 0.01$ ). GKCaではその改善はられなかった一方で, GKTeではGKに比し有意に改善していた ( $p < 0.05$  vs GK). GKCaTeでは更なる改善が認められた ( $p < 0.05$  vs GKTe). VachT陽性PPN線維を免疫染色切片で評価すると, VachT陽性線維はWでは腓島細胞内, 周囲にドット状に豊富に観察される. それに対し, GKではVachT陽性神経線維密度はWTに比し有意に低下していた ( $p < 0.01$ ). VachT陽性PPN線維密度は治療群で有意に改善し, 特にGKCaTeで最も改善が認められた ( $p < 0.05$  vs GKCa or GKTe). IENFDはWに比しGKにおいて有意に低下していた ( $p < 0.01$ ). IENFDも各治療群で有意に改善し, 特にGKCaTeで最も改善が認められた ( $p < 0.01$  vs GKCa and  $p < 0.05$  vs GKTe). VachTは $V_{\beta}$ と, またIENFDも $V_{\beta}$ と正の相関を示していた ( $r = 0.55, p < 0.01, R = 0.54, p < 0.01$ ). 特に, 低 $V_{\beta}$ を1.28%と定義すると, ROC曲線解析においてIENFDカットオフ値16.39(感度0.86, 特異度0.82)が得られた.

### 【考察】

今回の検討により, T2Dにおいて腓島PPN線維が低下し,  $V_{\beta}$ の低下に関与しうることが初めて示された. これまでの報告ではげっ歯類で視床下部神経節を破壊することにより, PPN線維を通じ $\beta$ 細胞の増殖を促進することが知られている. また, 肝臓を刺激することにより, 視床下部, PPNを介して $\beta$ 細胞の増殖を促進する<sup>5)</sup>. 従って, われわれの結果からは, T2Dにおける $V_{\beta}$ 低下に対し, 腓島周囲PPNが治療標的になりうる可能性が示された.

しかしながら, これまでの検討ではヒトにおけるPPNの構築には決定的な所見は得られていない. ヒトにおいてはPPNにより放出されるアセチルコリンは $\alpha$ 細胞が分泌し, パラクライン様に作用することが知られている. 従って, 今回の結果はそのままヒトには当てはめることはできない可能性がある. ヒトにおけるPPNの構築を透明化による3D画像などでさらに検討する必要がある.

CaとTeの併用治療は単剤治療に比しGKで低下したIENFDとPPNと同時に $V_{\beta}$ を改善した. 機序の異なる併用治療は血糖改善作用が強化されると同時に, GLP-1の分泌をより促進し, DPNおよび $V_{\beta}$ の改善を促進したと考えられた. GLP-1は $\beta$ 細胞に存在する受容体を介して $\beta$ 細胞を直接的に保護する. またそれ以外にも, 腸管の自律神経において神経伝達物質として $\beta$ 細胞の増殖を促進することが知られている. 従って, 併用療法は, GLP-1による直接的 $\beta$ 細胞の増殖能亢進と同時にPPN線維を介した効果も得られた可能性がある.

今回の結果より, GKではIENFDは $V_{\beta}$ の予測マーカーである可能性がある. 現在, 様々なマーカーを用いて, 画像的に非侵襲的に $V_{\beta}$ を予測できるin vivoイメージングが精力的に探索されている. しかしながら, コストや正確性などの点から未だ実現化していない. 一般的には $V_{\beta}$ はHbA1cや罹病期間などと相関されているが, 具体的なカットオフ値は示されていない. ヒトにおいてはアミロイドの沈着や病態が多彩など, 実験モデルとは多くの点が異なっている. しかしながら, もしヒトにおいてもIENFDにより $V_{\beta}$ が予測できれば, T2Dの病態把握において非常に有用である. ヒトにおいてもデータの積み重ねを行い, 今回の結果が応用できるかどうか検証がさらに必要である.

### 【文献】

- 1) Mizukami H, Osonoi S. Collateral glucose-utilizing pathways in diabetic polyneuropathy. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):94.
- 2) Kudoh K, Mizukami H, Itabashi C, Fuke N, Osonoi S, Takeuchi Y, Wada K, et al. Lipopolysaccharide-binding

- protein is a distinctive biomarker of abnormal pain threshold in the general Japanese population. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020;8(1):e001739.
- 3) Osonoi S, Mizukami H, Itabashi C, Wada K, Kudoh K, Igawa A, Ogasawara S, et al. Increased oxidative stress underlies abnormal pain threshold in a normoglycemic Japanese population. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8306.
  - 4) Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Tsuboi K, Osonoi S, Yoshida T, Yagihashi S. Involvement of oxidative stress-induced DNA damage, endoplasmic reticulum stress, and autophagy deficits in the decline of  $\beta$ -cell mass in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2014;37:1966-74.
  - 5) Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno Kenji, et al. Regulation of pancreatic  $\beta$  cell mass by neuronal signals from the liver. *Science*. 2008;322(5905):1250-4.