

研究結果報告書（和文）

2023年 1月 25日

<研究課題>

ナトリウム・グルコース共輸送体 2 (SGLT2) 阻害薬カナグリフロジン
は非糖尿病マウスの遅筋および速筋に異なる影響を及ぼす

代表研究者	九州大学病院内分泌代謝・糖尿病内科	助教	横溝 久
共同研究者	九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学		大塚裕子
	九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学	教授	小川佳宏
	九州大学病院内分泌代謝・糖尿病内科	講師	坂本竜一
	九州大学病院内分泌代謝・糖尿病内科	講師	宮澤 崇
	九州大学病院内分泌代謝・糖尿病内科	助教	佐藤直市
	九州大学病院内分泌代謝・糖尿病内科	助教	宮地康高
	九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学		池田陽介
	九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学		中村慎太郎
	九州大学生体防御医学研究所メタボロミクス分野	教授	馬場健史
	九州大学生体防御医学研究所メタボロミクス分野	准教授	和泉自泰
	九州大学生体防御医学研究所メタボロミクス分野	助教	高橋政友
	九州大学生体防御医学研究所メタボロミクス分野		小原佐智子
	九州大学生体防御医学研究所メタボロミクス分野		中尾素直

【抄録】

SGLT2 阻害剤で骨格筋の量と機能が低下する懸念がある。本研究では非糖尿病 C57BL/6J マウスに Vehicle または SGLT2 阻害薬カナグリフロジン (CANa) を投与して遅筋・速筋の重量と機能の評価し、CANa が遅筋と速筋の遺伝子発現や代謝産物に与える影響について検討した。SGLT2 阻害時には摂餌量の増加に伴って速筋機能が亢進したが、遅筋機能は影響を受けず、遅筋・速筋の重量は維持された。CANa 群の摂餌量を Vehicle 群の摂餌量に制限すると、CANa 群の速筋の重量と機能が低下したが、遅筋は変化しなかった。メタボローム解析では自由摂餌下で SGLT2 阻害時に速筋では解糖系代謝産物と ATP が増加し、遅筋では解糖系代謝産物が減少したが ATP は維持された。アミノ酸と遊離脂肪酸は SGLT2 阻害時に遅筋で増加したが、速筋では変化しなかった。SGLT2 阻害による遅筋と速筋の代謝への影響は摂餌量制限下で顕著となった。本研究により、SGLT2 阻害薬が糖代謝障害とは独立して遅筋と速筋に及ぼす影響の違いが明らかになり、サルコペニアのリスクが高い糖尿病患者における SGLT2 阻害薬の使用について新しい知見になると示唆される。

1. 研究の目的

1-1 遅筋線維と速筋線維

骨格筋はインスリン作用によるグルコースの取り込みと処理を通じて、グルコースのホメオスタシスを制御する主要な代謝器官である。骨格筋は収縮特性に基づいて、ミオシン重鎖 (MyHC) I を発現する遅筋線維と、MyHC IIa、IIx、IIb を発現する 3 つの速筋線維の 4 つの主要な線維タイプから構成される。例えば遅筋に分類されるヒラメ筋 (SOL) は MyHC I と IIa 線維の割合が高く、速筋に分類される長趾伸筋 (EDL) は MyHC IIb 線維の割合が高い。遅筋線維は速筋線維に対して 2~3 倍のミトコンドリア密度を示し、脂肪酸酸化によるエネル

ギー産生が特徴的であり、持続的な活動に適しているが、速筋線維は解糖系によるエネルギー産生が特徴的で瞬発的な活動に適している。廃用性筋萎縮、肥満、糖尿病では酸化系線維の割合が減少する報告がある一方で、解糖系線維の割合は加齢やサルコペニアによって減少する。現在までのところ、遅筋と速筋がどのような異なる制御を受けているか未解明である。

1-2 SGLT2 阻害薬の臓器代謝作用

SGLT2 阻害薬は腎近位尿細管でのグルコースの尿中排泄を促進する経口血糖降下薬である。SGLT2 阻害時の負のエネルギーバランスは、体重および脂肪量の減少につながる。腎臓を起点とする臓器ネットワークを考えると、

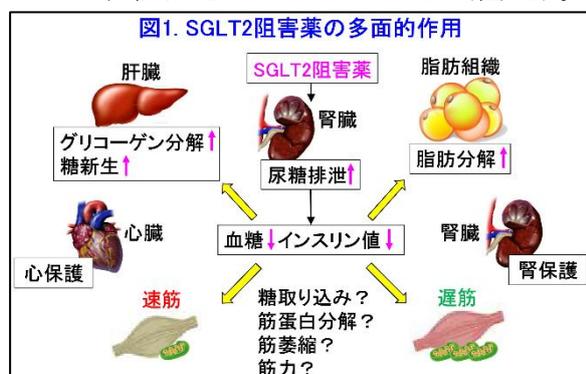
SGLT2 阻害薬が腎臓以外の遠隔臓器の様々な代謝経路に影響を与えると推測される。例えば我々は、SGLT2 阻害薬（イプラグリフロジンおよびカナグリフロジン）が、肥満マウスの脂肪肝を改善し、ヒト NASH のマウスモデルにおいて脂肪組織の「健全な拡大」と関連して非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に関連する肝細胞癌の発症を遅らせることを報告した。一方、SGLT2 阻害薬の心腎保護作用については、げっ歯類糖尿病モデルや糖尿病患者における臨床的・実験的報告がある。

1-3 SGLT2 阻害薬の骨格筋作用

一方で SGLT2 阻害薬は骨格筋の萎縮やサルコペニアを誘発することが懸念される。糖質・カロリー喪失に対する異化反応として、SGLT2 阻害薬は骨格筋の分解を誘発する。実際、ルセオグリフロジンは糖尿病患者の骨格筋量指数を有意に低下させている。一方、トホグリフロジンやダパグリフロジンは、糖尿病患者の骨格筋量を減らすことなく血糖コントロールを改善し、体重を減少させるなど、まだ一定の見解が得られていない。

1-4 非糖尿病における SGLT2 阻害薬の骨格筋作用

SGLT2 阻害薬はもともと血糖降下薬として開発されたが、EMPEROR-reduced 試験、DAPA-HF 試験、DAPA-CKD 試験などにおいて、糖尿病の有無にかかわらず心不全または慢性腎臓病の患者の治療薬として SGLT2 阻害薬を使用する有用性が蓄積されている。実際、これらのエビデンスに基づいて、いくつかの SGLT2 阻害薬は心不全や慢性腎臓病を有する非糖尿病患者の治療薬として世界的に使用されている。しかし骨格筋においては、SGLT2 阻害薬が糖代謝障害とは独立して遅筋や速筋に影響を与えるかどうか、またどのように影響を与えるかは、依然として不明である（図 1）。



そこで本研究では、非糖尿病モデルマウスを用い、CANA の骨格筋量および機能に対する影響について検討した。

2. 研究方法と経過

2-1 動物および実験プロトコル

11 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを購入し、九州大学大学院医学研究院附属ヒト疾患モデル研究センター動物実験施設において、温度・湿度・光量を調節した部屋で飼育し、水および通常飼料を自由摂取できるようにした。CANA は田辺三菱製薬株式会社医薬品化学研究所から提供された。12 週齢のマウスに、0.03% (w/w) (30 mg/kg) で CANA を含んだ飼料あるいは Vehicle 飼料を、2 週間または 4 週間自由に摂餌させた。1 日平均摂餌量、体重 (BW) および随時血糖 (BG) を週 1 回モニターした。実験終了後、マウスをイソペンタンで麻酔し、下大静脈から血液サンプルを採取した。筋肉、肝臓、脂肪の重量を測定した。SOL、EDL は使用時まで -80°C で保存した。SOL は遅筋として、EDL と TA は速筋として実験に使用した。すべての実験プロトコルは、九州大学動物実験倫理委員会の審査を受け承認された (プロトコル番号 A19-117-4)。動物を含むすべての方法は、関連ガイドラインや規則に従って実施した。

2-2 生化学的パラメーター

血糖値、血清インスリン濃度、血中 β -ヒドロキシ酪酸 (β -OHB) を測定した。

2-3 握力測定とトレッドミル運動

マウスの握力は MK-380CM/R (室町機械株式会社、東京、日本) を用いて、トレッドミル運動試験は、Ratbelt-2000 (株式会社アルコシステム、千葉、日本) を用いて測定した。

2-4 メタボローム解析

代謝物の抽出は、Bligh and Dyer の方法に修正を加えて、凍結骨格筋の粉碎物から行った。

2-5 DNA マイクロアレイ解析

株式会社セルイノベーターの助言をもとに cRNA を増幅し、技術的なサポートをいただいた。

2-6 統計解析

すべてのデータは平均値 \pm SEM で表した。統計解析は Student の t-test または Fisher の制約付最小有意差検定の一元配置分散分析で行った。P < 0.05 を統計的に有意とした。

3. 研究の成果

3-1 自由摂餌実験 (2 週間)

投与 2 週間後の Vehicle 投与マウスと CANA 与マウスでは、体重および随時血糖に有意な差はなかった。摂餌量は、Vehicle 投与マウスに対して CANA 投与マウスで有意に増加した (P < 0.01)。遅筋・速筋重量に有意な変化を認めなかった。遅筋機能を評価する有酸素・持久力運動である走行距離については、Vehicle 投与マウスと CANA 投与マウスの間に有意差

は認めなかった。一方、速筋機能を評価する握力は、CANA 投与マウスで増加した ($P=0.05$)。

3-2 ペアフィーディング(PF)実験(2週間)

摂餌量の増加が CANA 投与マウスの代謝表現型に影響を与える可能性があることから、CANA 投与マウスの摂餌量を Vehicle 投与マウスの摂餌量に制限した。体重および随時血糖は CANA 投与マウスで有意に減少した。CANA 投与マウスで遅筋重量は変化しない一方で、速筋重量は減少した。Vehicle 投与マウスと CANA 投与マウスの間で走行距離に差はなかった。一方握力は CANA 投与マウスにおいて有意に低下した。

3-3 自由摂餌実験と PF 実験(4週間): 代謝表現型

CANA 投与マウスは Vehicle 投与マウスと比較して、自由摂餌下では体重および随時血糖は影響を受けなかったが、PF 下ではいずれも減少した (図 2A, B)。CANA 投与マウスの摂餌量は、自由摂餌下において有意に増加した (図 2C)。遅筋重量は、自由摂餌および PF 下の CANA 投与マウスで維持された。一方で CANA 投与マウスの速筋重量は自由摂餌下では維持されたが、PF 下では有意に減少した (図 3A)。CANA 投与マウスの速筋機能 (握力) は自由摂餌下では影響を受けなかったが、PF 下で有意に低下した (図 3B)。遅筋機能 (走行距離) は 3 群間で差がなかった (図 3C)。

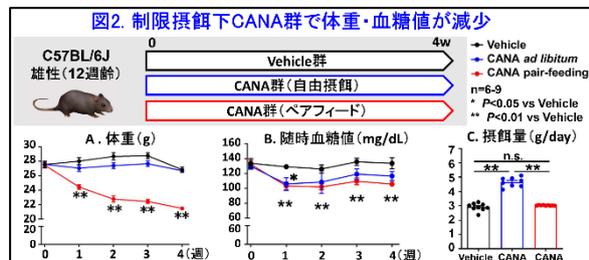


図2. 制限摂餌下CANA群で体重・血糖値が減少

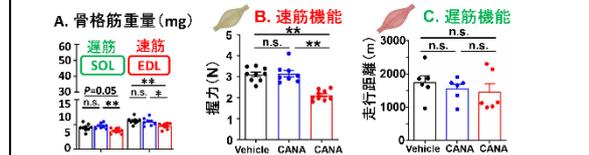


図3. 制限摂餌下CANA群で速筋優位に量・機能が低下

3-4 遅筋と速筋の遺伝子発現

Vehicle 投与マウスと PF 下 CANA 投与マウスの顕著な表現型の違いに注目し、4週間 PF 下で Vehicle 投与マウスと CANA 投与マウスの速筋と遅筋の遺伝子発現について解析した。4週間 PF により、CANA 投与マウスの速筋と遅筋において *Foxo1* や *Atrogin1* などの筋萎縮関連遺伝子の mRNA 発現は Vehicle 投与マウスに比べて増加した (図 4A, 図 5A)。 *Glut4* および解糖系酵素 *Hk2* の mRNA 発現は遅筋と速筋で影響を受けなかったが、 *Pfkf1* および

Pkm1 の発現は速筋で有意に減少した。 *Lat2*、 *Alt2*、 *Gs*、 *Ppara* および *Atgl* の mRNA 発現は、CANA 投与マウスの速筋と遅筋の両方で増加した。エネルギー代謝、ミトコンドリア合成、遅筋線維増加の制御に関与するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ 共役因子 1 α (*Pgc1a*) の mRNA 発現は、CANA 投与マウスの速筋では影響を受けなかったが、遅筋で有意に増加した。

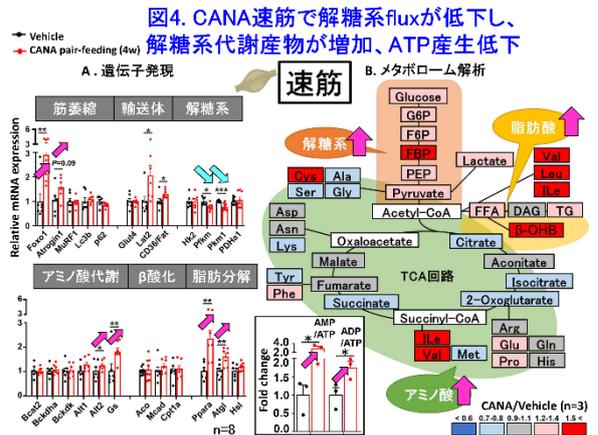


図4. CANA速筋で解糖系fluxが低下、解糖系代謝産物が増加、ATP産生低下

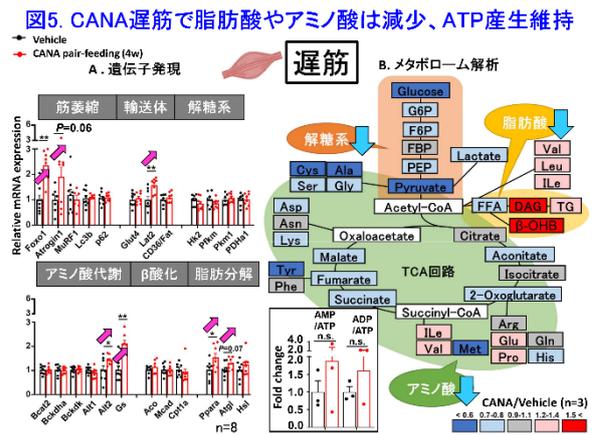


図5. CANA遅筋で脂肪酸やアミノ酸は減少、ATP産生維持

3-5 速筋と遅筋のメタボローム解析

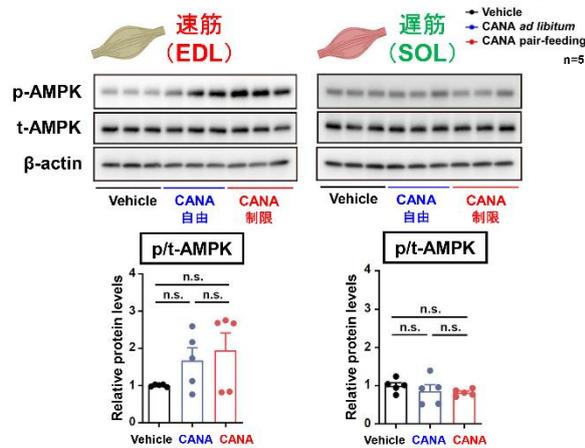
次に、速筋と遅筋の代謝産物に対する CANA の影響を調べた (図 4B, 図 5B)。CANA 投与マウスは Vehicle 投与マウスと比較して、速筋では一部のアミノ酸が増加傾向であったが、遅筋で一部のアミノ酸が有意に減少した。CANA 投与マウスの解糖系代謝産物は、速筋では増加したが遅筋で減少した。CANA 投与マウスの FFA は、速筋で増加したが遅筋で減少した。CANA 投与マウスの TCA 回路内の代謝産物は、速筋、遅筋で影響を受けなかった。AMP/ATP および ADP/ATP 比は、CANA 投与マウスの速筋では有意に増加したが、遅筋では影響を受けなかった。 β -OHB は CANA 投与マウスの速筋と遅筋で有意に増加した。

3-6 速筋と遅筋におけるリン酸化AMP活性化プロテインキナーゼ (p-AMPK) とリン酸化された哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (p-

mTOR) の発現に対する CANA の影響

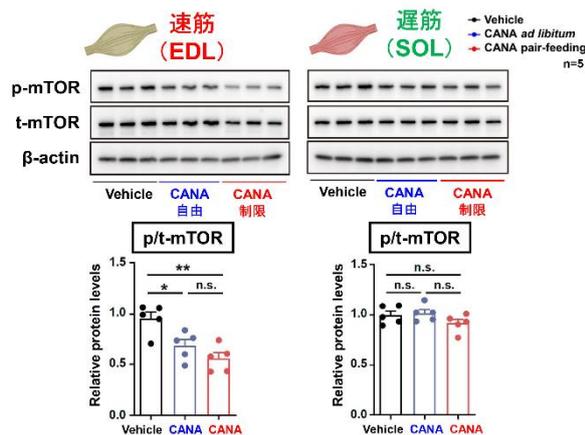
4 週間の自由摂餌および PF 下において、CANA 投与マウスの速筋で p-AMPK はやや増加したが、遅筋では影響がなかった (図 6)。

図 6. CANA 速筋でリン酸化 AMPK 増加傾向



p-mTOR 発現は、CANA 投与マウスの速筋において有意に減少し、PF 下で更に減少したが、遅筋では各群間に有意差はなかった (図 7)。

図 7. CANA 速筋でリン酸化 mTOR 減少



4. 今後の課題

本研究では CANA 投与により、自由摂餌時には骨格筋量は変化しないが PF 時に減少することを示した。これまでの研究で、いくつかのマウスモデルを用いて、SGLT2 阻害薬が骨格筋重量に与える影響について報告されている。膵 β 細胞の機能障害により糖尿病を発症した秋田マウスにエンパグリフロジン投与したところ、骨格筋量の減少が改善された。また、高脂肪食 (HFD) 負荷マウスに CANA を投与すると、摂餌量の増加を伴って骨格筋量の減少が改善した。今後、摂餌制限下での糖尿病や HFD 摂取など様々な状況で、SGLT2 阻害薬が骨格筋量にどのように影響するか検討する必要があると考える。

本研究では、CANA 投与マウスの速筋の ATP 産生は、自由摂餌下ではわずかに増加し、PF 下で減少した。CANA 投与マウスの遅筋で

は、PF 下であっても ATP 産生の減少は認めなかった。機序の一つとして PF 下の CANA 投与マウスにおいて、遅筋では FFA やアミノ酸からの ATP 産生を維持することで遅筋機能を維持し、速筋ではグルコース供給量の減少により解糖系フラックスが低下し、速筋機能が低下したと考えられる。したがって、SGLT2 阻害時の速筋と速筋の機能制御において、どの程度のグルコースが重要であることを解明するためには、低炭水化物食あるいはケトジェニック食等を用いたさらなる研究が必要である。

また本研究では雄マウスのみを使用した。エストロゲンが筋機能に重要な役割を果たすことが報告されており、エストロゲン機能の喪失は筋機能の変化に寄与し、サルコペニア、2 型糖尿病、メタボリックシンドロームおよび心血管疾患を含む様々な慢性疾患のリスクを増加させるため、雌マウスによる検討も必要であると考えられる。

今回の研究では非糖尿病 C57BL/6J マウスを用いることで、SGLT2 阻害の骨格筋への影響を糖代謝障害とは独立して評価した。一方で糖尿病はサルコペニアのリスク上昇と関連することが多く、特に高齢の糖尿病患者において身体活動不足や代謝障害につながることも知られている。したがって、糖代謝障害における速筋と遅筋に対する SGLT2 阻害効果の違いを解明するためには、様々な病因の糖尿病マウスを用いた研究が必要と考えられる。

5. 研究成果の公表方法

代謝特性の異なる遅筋と速筋において SGLT2 阻害薬が異なる影響をもたらすことが示され、2022 年 2 月に *Biochemical Journal* 誌に掲載された (下記論文)。本研究成果は、非糖尿病患者において SGLT2 阻害薬を使用する際、骨格筋代謝にもたらす影響を十分に考慮する必要性を示すことが示唆される。

論文発表

H. Otsuka, H. Yokomizo, S. Nakamura, Y. Izumi, M. Takahashi, S. Obara, M. Nakao, Y. Ikeda, N. Sato, R. Sakamoto, Y. Miyachi, T. Miyazawa, T. Bamba, Y. Ogawa. Differential effect of canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, on slow and fast skeletal muscles from nondiabetic mice. *Biochem J.* 2022 Feb 11; 479(3):425-444.

謝辞

本研究に支援を頂いた三井住友海上福祉財団にこの場を借りて御礼を申し上げます。

Differential effect of canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, on slow and fast skeletal muscles from nondiabetic mice

Primary Researcher: Hisashi Yokomizo
Assistant professor, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Co-researchers: Hiroko Otsuka
Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Yoshihiro Ogawa
Professor, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Ryuichi Sakamoto
Lecturer, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Takashi Miyazawa
Lecturer, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Naoichi Sato
Assistant professor, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Yasutaka Miyachi
Assistant professor, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Yosuke Ikeda
Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Shintaro Nakamura
Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Takeshi Bamba
Professor, Division of Metabolomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Yoshihiro Izumi
Associate professor, Division of Metabolomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Masatomo Takahashi
Assistant professor, Division of Metabolomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Sachiko Obara
Division of Metabolomics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Motonao Nakao
Division of Metabolomics, Medical Institute of Bioregulation,
Kyushu University, Fukuoka, Japan

There has been a concern that sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors could reduce skeletal muscle mass and function. Here, we examine the effect of canagliflozin (CANA), an SGLT2 inhibitor, on slow and fast muscles from nondiabetic C57BL/6J mice. During SGLT2 inhibition, fast muscle function is increased, as accompanied by increased food intake, whereas slow muscle function is unaffected, although slow and fast muscle mass is maintained. When the amount of food in CANA-treated mice is adjusted to that in vehicle-treated mice, fast muscle mass and function are reduced, but slow muscle was unaffected during SGLT2 inhibition. In metabolome analysis, glycolytic metabolites and ATP are increased in fast muscle, whereas glycolytic metabolites are reduced but ATP is maintained in slow muscle during SGLT2 inhibition. Amino acids and free fatty acids are increased in slow muscle, but unchanged in fast muscle during SGLT2 inhibition. The metabolic effects on slow and fast muscles are exaggerated when food intake is restricted. This study demonstrates the differential effects of an SGLT2 inhibitor on slow and fast muscles independent of impaired glucose metabolism, thereby providing new insights into how they should be used in patients with diabetes, who are at a high risk of sarcopenia.