



Effects of imeglimin on mitochondrial function, AMPK activity, and gene expression in hepatocytes

穂積, かおり

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8777号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490002>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

**Effects of imeglimin on mitochondrial function, AMPK activity, and
gene expression in hepatocytes**

肝細胞におけるイメグリミンのミトコンドリア機能、AMPK 活性化、
遺伝子発現における効果

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

糖尿病・内分泌・総合内科学分野 糖尿病・内分泌内科学部門

(指導教員：小川 渉 教授)

穂積 かおり

【背景と目的】

イメグリミンは世界に先駆けて本邦で上市された糖尿病治療薬であり、その化学構造はメトホルミンと極めて類似している。イメグリミンは、膵 β 細胞に直接作用してグルコース依存性にインスリン分泌を促進させるという、メトホルミンと全く異なった機序で血糖低下作用を発揮すると考えられている。一方で、類似した化学構造を持つことから、両剤が類似した薬理作用を持つ可能性も推察されている。実際、イメグリミンが培養肝細胞での糖産生抑制やマウスにおける脂肪肝改善など、メトホルミン類似の効果を発揮するとの報告もあるものの、両剤の作用の類似点や相違点についての詳細は明らかではない。本研究では主に肝への作用に着目し、イメグリミンとメトホルミンの作用の類似性・相違性について解析した。

【方法と結果】

メトホルミンはミトコンドリア呼吸機能を抑制することが知られており、細胞外フラックスアナライザーを用いて両剤のミトコンドリア呼吸機能への影響を検討した。HepG2細胞にイメグリミンまたはメトホルミンをそれぞれ1mM、3mM、10mMで3時間作用させ、細胞外フラックスアナライザーで酸素消費率（OCR）を測定した。ミトコンドリア基礎呼吸でのOCRとATP産生能に連動したOCRは、両薬剤ともに濃度依存的に低下した。一方、ATP合成酵素阻害薬オリゴマイシン及び、脱共役剤であるFCCP投与後のミトコンドリア最大呼吸でのOCRは、メトホルミンでは1mMで有意に増加し10mMでは低下した。イメグリミンでは1mM、3mMで有意に増加し、10mMでは対照と差はなかった。また、マウス初代肝細胞についても同様に細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリア呼吸機能を評価した。メトホルミンとイメグリミンは、基礎呼吸と最大呼吸でのOCRを濃度依存的に低下させ、その作用効果は特にマウス初代肝細胞においてイメグリミンよりメトホルミンで大きかった。

次に、メトホルミンによるATP産生抑制がAMP-activated protein kinase (AMPK)の活性化に関連していることを考慮し、イメグリミンでの効果を検討した。HepG2細胞またはマウス初代肝細胞をメトホルミンまたはイメグリミンで3時間処理すると、AMPK α のThr172でのリン酸化が濃度依存的に誘導され、AMPKの活性化を確認した。また、初代肝細胞における両薬剤のAMPK α のリン酸化に対する効果は、イメグリミンよりメトホルミンで大きかった。

通常食飼育下のC57BL/6Jマウスに250mg/kgのメトホルミンまたはイメグリミンを腹腔内投与すると、1時間後の血糖値は有意に低下し、血漿インスリン濃度は影響を受けなかったが、両剤共に肝臓でAMPK α のリン酸化を亢進させた。

また、イメグリミン及びメトホルミンが肝臓の遺伝子発現量に与える影響を検討するため、HepG2細胞を両剤で処理し、RNA-sequencing (RNA-seq) による網羅的遺伝子発現解析を行った。両剤は極めて類似した遺伝子発現変化を誘導した一方で、両剤による遺伝子発現変化は、AMPKの活性化剤であるAICARによる変化とは異なったパターンを示した。また、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iを構成するNADHデヒドロゲナーゼ

ブユニットファミリーの複数の遺伝子の発現をメトホルミンが有意に減少させた一方で、イメグリミンは増加させた。呼吸鎖複合体IIIを構成するシトクロム b については、その発現量をメトホルミンは変化させず、イメグリミンは有意に増加させた。

【考察】

本研究では、最古の経口血糖降下薬の1つであるメトホルミンと化学構造の類似した新規経口血糖降下薬であるイメグリミンの、生化学的類似性と相違性について検討した。培養肝細胞におけるミトコンドリア機能および細胞内 ROS 含有量に対する両薬剤の効果は全体的に類似し、どちらも培養細胞とマウスの肝臓の両方で AMPK を活性化させた。さらに、HepG2 細胞において両薬剤は極めて類似した遺伝子発現変化を誘導した。したがって、これらの結果は、両薬剤が化学構造だけでなく、肝細胞において生化学的特性においても類似性を共有していることを示した。

メトホルミンはミトコンドリア呼吸鎖複合体Iを阻害し、細胞内 ATP 濃度を低下させることで AMPK を活性化させることが知られている。本研究では、イメグリミンがメトホルミンと同様に、肝細胞における ATP 産生に関連するミトコンドリア基礎呼吸能と最大呼吸能の両方を低下させることを示した。この結果は、イメグリミンが初代培養肝細胞における ATP/ADP 比を低下させるという既報と一致している。

AMPK は細胞内 AMP/ATP 比の増加に応答して活性化され、エネルギー代謝にさまざまな影響を及ぼす。AMPK の活性化は、さまざまな方法でメトホルミンの血糖降下効果に寄与すると考えられているが、AMPK に依存しないメカニズムも血糖降下作用に関与していると考えられている。メトホルミンはさらに、AMPK を介した抗腫瘍作用、抗アテローム性動脈硬化作用、抗炎症作用などの多面的な作用を持つことが報告されており、イメグリミンがこれらへの同様の作用を示すかどうか検討することは非常に興味深い。ミトコンドリア呼吸と AMPK 活性化に対するこれら両薬剤の効果は全体的に類似していたが、メトホルミンの効力はイメグリミンの効力よりも大きい傾向にあった。この結果は、初代肝細胞における ATP/ADP 比およびグルコース産生に対するイメグリミンの影響がメトホルミンの影響よりも小さいことを示した以前の研究と一致しており、イメグリミンの肝臓への作用は、メトホルミンよりも小さい可能性があると考えられる。

遺伝子発現に対するイメグリミンとメトホルミンの効果は類似しているにもかかわらず、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I (NADH-ユビキノン酸化還元酵素鎖) および III (シトクロム b) の成分をコードする遺伝子の発現は、イメグリミンによってのみ誘導された。既報では、高脂肪および高スクロース食をマウスに長期投与すると肝臓のミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の活性が阻害され、イメグリミン投与によりこの阻害は逆転した。シトクロム b 遺伝子の上方制御は、複合体 III 活性に対するイメグリミンの効果に寄与している可能性がある。

【結論】培養肝細胞においてイメグリミンとメトホルミンのミトコンドリア基礎呼吸での酸素消費抑制能、AMPK の活性化能、全般的な遺伝子発現誘導能は類似していたが、最大呼吸での酸素消費や一部のミトコンドリア関連遺伝子の発現については異なった効

果を示した。またマウスへの投与においても両剤は肝臓で AMPK を活性化した。すなわち、両剤は肝細胞に対して類似した作用を発揮するものの、ミトコンドリア関連遺伝子の発現やミトコンドリア呼吸機能に対しては一部異なった影響を及ぼす可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3348 号	氏 名	穂積 かおり
論 文 題 目 Title of Dissertation	Effects of imeglimin on mitochondrial function, AMPK activity, and gene expression in hepatocytes 肝細胞におけるイメグリミンのミトコンドリア機能、AMPK活性化、 遺伝子発現における効果		
審 査 委 員 Examiner	主 査 Chief Examiner 坂口 一彦 副 査 Vice-examiner 上田 佳彦 副 査 Vice-examiner 古屋敷 智之		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

【背景と目的】

イメグリミンは化学構造がメトホルミンと似ているが、膵β細胞への作用でインスリン分泌を促進し、メトホルミンとは異なる血糖低下機序を持つと考えられている。しかし、化学構造の類似性から、両薬剤には薬理作用の類似性もあり得る。この研究では、主に肝臓への作用に焦点を当て、イメグリミンとメトホルミンの作用の類似性と相違性を解析した。

【方法と結果】

HepG2 細胞とマウスの初代肝細胞にイメグリミンとメトホルミンを作用させ、ミトコンドリア呼吸機能への影響を細胞外フラックスアナライザーで測定した。両薬剤は濃度依存的にミトコンドリアの基礎呼吸と ATP 産生能に関連する酸素消費率（OCR）を低下させたが、最大呼吸での OCR は薬剤によって異なる反応を示した。また、AMP-activated protein kinase (AMPK)の活性化も、薬剤と濃度によって異なる効果が観察された。メトホルミンとイメグリミンは、C57BL/6J マウスへの投与後、肝臓で AMPKα のリン酸化を増加させ、血糖値を低下させた。さらに、HepG2 細胞での RNA-sequencing により、両剤が似た遺伝子発現変化を引き起こしたことが明らかになったが、ミトコンドリア関連遺伝子の発現には差異が見られた。

【考察】

本研究では、メトホルミンと化学構造が似ているイメグリミンについて、その生化学的類似性と相違性を検討した。培養肝細胞におけるミトコンドリア機能と細胞内 ROS 含有量への両薬剤の影響は類似しており、AMPK を活性化させる効果も両者に見られた。さらに、HepG2 細胞においても、両薬剤は似た遺伝子発現変化を引き起こした。このことから、イメグリミンとメトホルミンは肝細胞において生化学的特性が似ていることが示された。

メトホルミンはミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害し、AMPK を活性化することが知られている。イメグリミンも同様に、肝細胞におけるミトコンドリア呼吸能を低下させ、AMPK 活性化の効果を示した。これは、イメグリミンが ATP/ADP 比を低下させるという以前の研究と一致している。

AMPK の活性化は、メトホルミンの血糖降下効果に寄与すると考えられているが、AMPK に依存しないメカニズムもある。メトホルミンは抗腫瘍作用や抗アテローム性動脈硬化作用なども持つため、イメグリミンがこれらの効果を持つかの検討は興味深い。

ミトコンドリア呼吸と AMPK 活性化において、両薬剤は似ていたが、メトホルミンの効果はイメグリミンよりも大きかった。これは、イメグリミンの肝臓への作用がメトホルミンよりも小さい可能性があることを示唆している。また、ミトコンドリア関連遺伝子の発現に関しては、イメグリミンのみが特定の遺伝子の発現を誘導した。

【結論】

イメグリミンとメトホルミンは、培養肝細胞においてミトコンドリア基礎呼吸の酸素消費抑制能、AMPK 活性化能、遺伝子発現誘導能が似ていたが、最大呼吸の酸素消費や一部のミトコンドリア関連遺伝子の発現において異なる効果を示した。マウスへの投与でも、両薬剤は肝臓で AMPK を活性化した。これらの結果から、イメグリミンとメトホルミンは肝細胞に対して類似した作用を持ちながらも、ミトコンドリア関連の機能や遺伝子発現においては一部異なる影響を及ぼす可能性があると考えられる。

本研究は新規糖尿病治療薬イメグリミンの作用メカニズムをメトホルミンと比較して研究し、重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。