



| | |
|---------------------|---|
| Title | 選択的SGLT2阻害薬エンパグリフロジンの糖尿病性心筋症に対する心室筋細胞内カルシウムハンドリング改善を介した心室性不整脈抑制効果の検討 [論文内容及び審査の要旨] |
| Author(s) | 門坂, 崇秀 |
| Description | 配架番号 : 2755 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第15437号 |
| Issue Date | 2023-03-23 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/89884 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | KADOSAKA_Takahide_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 門坂 崇秀

学位論文題名

選択的 SGLT2 阻害薬エンパグリフロジンの糖尿病性心筋症に対する心室筋細胞内カルシウムハンドリング改善を介した心室性不整脈抑制効果の検討

(Empagliflozin attenuates arrhythmogenesis in diabetic cardiomyopathy by normalizing intracellular Ca^{2+} handling in ventricular cardiomyocytes)

【背景と目的】

糖尿病の罹患者数は全世界的に増加傾向であり、2019年時点で世界の全人口の8.3%にあたる4億6000万人、2045年には9.6%の7億人まで増加することが予測されている。糖尿病罹患者は健常人と比較して心臓突然死のリスクが約2倍であり、1歳から35歳の若年者に限ると8.6倍にも上がることが報告されている。その原因として糖尿病性心筋症が注目されている。糖尿病性心筋症は「冠動脈硬化や高血圧を伴わない糖尿病患者の心機能障害を伴う臨床状態」とされ、その背景には細胞内カルシウムハンドリング異常が存在することが報告されている。細胞内カルシウムハンドリング異常により、拡張期細胞内カルシウム濃度の上昇が起こる。その代償機構としてナトリウム-カルシウム交換輸送体による細胞内からのカルシウムの組み出しが起こることで、心筋細胞活動電位の再分極後の第4相に一過性内向き電流が生じ、遅延後脱分極(Delayed After Depolarization; DAD)による撃発活動が生じる。一方で、元来糖尿病治療薬として創薬された選択的 SGLT2 阻害薬の心保護作用が大きな注目を集めている。選択的 SGLT2 阻害薬は SGLT2 受容体に作用することでナトリウムとグルコースの取り込みを抑制するが、心筋細胞には SGLT2 が存在せず、心保護作用の機序については議論の対象となっている。他方で、SGLT2 阻害薬がナトリウム-水素分子の交換輸送体 NHE (Na^+/H^+ exchanger) に作用することで細胞内カルシウム濃度を低下させるという報告もあるが、SGLT2 阻害薬の NHE に対する作用に否定的な報告も散見される。現在までに SGLT2 阻害薬が直接的に心筋細胞のカルシウムハンドリングを改善するかは結論が出されておらず、その機序については未だ不明である。本研究は、SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジンの心臓、および心筋細胞への直接的な作用として、カルシウムハンドリングおよび心室性不整脈の誘発性に与える影響とその作用機序を明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】

2型糖尿病動物としてレプチン受容体欠損モデルマウスである db/db マウス (db/db 群) の16週齢を使用し、対象群としてそのヘテロ接合体のオス (control 群) を用いた。心エコーを用いて心収縮能や心室内腔、壁厚、心拍数を計測した。頸動脈から左心室に挿入したマイクロメータチップカテーテルで左室内圧を測定し、左室収縮能および拡張能の評価を施行した。実験は、control 群、db/db 群、および db/db マウスに $1\mu\text{M}$ のエンパグリフロジンを投与する EMPA 群の3群で行った。ランゲンドルフ灌流心で心室性不整脈の誘発性の評価を行った。グルコース標識蛍光色素である 2-NDBG を用いて単離心筋細胞におけるエンパグリフロジンのグルコース取り込み抑制の評価を行った。免疫ブロット法で細胞内カルシウムハンドリング制御蛋白の発現量を評価した。単離心筋細胞を用い共焦点レーザー顕微鏡でカルシウムウェーブ、カルシウムスパーク、小胞体カルシウム含有量およびカルシウムトランジェントを測定し、穿孔パッチクランプ法で DAD の記録を行った。

【結果】

db/db 群は control 群と比較して心収縮能に有意差は認めなかったが、心拍数は有意に低かった。左室内圧においては db/db マウスで negative dP/dt 及びその時定数 tau の有意な低下・延長が見られ、弛緩障害を呈していた。不整脈の誘発性は、イソプロテレノールおよび高濃度カルシウム負荷によって、db/db 群で心室性期外収縮の頻度の増加を認めたが、エンパグリフロジンの灌流により抑制された。db/db 群では control 群と比較してカルシウムスパークの頻度の増加および小胞体のカルシウム含有量の低下を認めたが、エンパグリフロジンの投与によりこれらは有意に改善した。また、db/db 群で有意にカルシウムウェーブが増加していたが、こちらもエンパグリフロジンにより有意な改善を認めた。一方で NHE 阻害薬であるカリポライドの投与ではこれらの改善効果は限定的であった。エンパグリフロジンにより改善が得られた細胞内カルシウムハンドリングは O-GlcNAcase の阻害薬であるチアメット G により打ち消された。免疫ブロットでは db/db 群で RyR および CaMKII のリン酸化が有意に増加していたが、エンパグリフロジンの投与により有意に低下した。心筋全体の O-GlcNAcylation は db/db 群で有意に増加し、エンパグリフロジンの投与により有意に低下した。細胞内へのグルコース取り込みは control および db/db どちらにおいてもエンパグリフロジンの投与により有意に抑制された。

【考察】

本研究ではエンパグリフロジンが db/db マウスの心室筋細胞において O-GlcNAcylation の基質であるグルコースの細胞内への取り込みを抑制し、心室筋細胞全体の O-GlcNAcylation は抑制されていた。また、細胞内カルシウムハンドリングはエンパグリフロジンにより改善し、心室性不整脈の発生も抑制される結果となった。

細胞内カルシウム制御蛋白のうち、CaMKII およびホスホランバンは O-GlcNAcylation により機能異常をきたすことが報告されている。CaMKII は Ser²⁸⁰ の O-GlcNAcylation により機能が亢進し、Thr²⁸⁶ の自己リン酸化や RyR の過リン酸化によって小胞体からのカルシウムリークを引き起こし、細胞内カルシウム濃度の上昇が生じる。一方で SERCA2a の制御蛋白であるホスホランバンは Ser¹⁶ の O-GlcNAcylation によって CaMKII や PKA を介したリン酸化が阻害されることで SERCA2a の機能低下をきたすことが報告されている。本研究でおこなった細胞内カルシウムの観察では糖尿病群で、小胞体からのカルシウムリークが増加し、SERCA2a の機能が低下していたが、エンパグリフロジンの投与によりこれらが改善する結果が得られた。しかし、O-GlcNAcase の阻害薬をエンパグリフロジンに加えて投与した結果、db/db マウスの心筋細胞では、これらのエンパグリフロジンの効果を打ち消す結果が得られた。以上の結果から、エンパグリフロジンの不整脈抑制効果および、細胞内カルシウムハンドリング改善効果にはカルシウムハンドリング制御蛋白の O-GlcNAcylation が関与している可能性が示唆された。また、エンパグリフロジンには O-GlcNAcylation の基質であるグルコースの取り込み抑制作用がみられたことから、O-GlcNAcylation 抑制効果は何らかのグルコーストランスポーターを介しているのではないかと考えられた。

【結論】

エンパグリフロジンは糖尿病モデルマウスの拡張障害期の心臓において心室性不整脈抑制作用および細胞内カルシウムハンドリング改善効果を有していた。その作用機序はこれまで不明であったが、本研究で細胞内へのグルコース取り込みを抑制することにより細胞内カルシウムハンドリング制御蛋白の O-GlcNAcylation の抑制が関与していることが明らかとなった。