HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糖尿病ラットにおけるエンパグリフロジンによるミトコンドリア由来の活性酸素種産生の抑制と心房細動誘発性の低下に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	小泉，拓也
Description	配架番号：2759
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15441号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89945
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KOIZUMI_Takuya_abstract.pdf，論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　小泉　拓也

学 位 論 文 題 名

糖尿病ラットにおけるエンパグリフロジンによるミトコンドリア由来の活性酸素種産生の抑制と心房細動誘発性の低下に関する研究

（Empagliflozin suppresses mitochondrial reactive oxygen species generation and mitigates the inducibility of atrial fibrillation in diabetic rats）

【背景と目的】

心房細動は最も一般的な不整脈で、脳梗塞や心不全を合併し、生命予後を増悪させる。糖尿病は心房細動発症の危険因子であり、心房細動発症を抑制する糖尿病治療法の開発が期待されている。糖尿病による心房細動の発症機序は、主に心房の線維化による伝導遅延によって生じるリエントリーが原因と考えられている。また、糖尿病による心房の線維化進行には、活性酸素種の増加、炎症や神経体液性因子の活性化などによって、筋線維芽細胞からの細胞外基質の産生増加、蓄積が関与している。近年、ナトリウム・グルコース共輸送体（SGLT) 2 阻害薬が、2 型糖尿病患者において心房細動発症を抑制することが報告されている。糖尿病モデル動物実験において、ピオグリタゾンやグルカゴン様ペプチド-1 受容体作動薬などの血糖降下薬では線維化抑制効果や心房細動抑制効果を認めない一方、SGLT2 阻害薬ではこれらの心房リモデリング抑制効果が確認されており、血糖降下作用以外の機序が関与すると推察される。糖尿病では内因性の抗酸化能力を超えた過剰な活性酸素種による酸化ストレスによって、トランスフォーミング増殖因子 β などを介して線維化が進行する。ミトコンドリアは生体の約 95 %の酸素を消費し、多くの活性酸素種を産生するため、ミトコンドリアにおける過剰な活性酸素種の産生や酸化ストレスは、生体に大きな影響を与える。糖尿病では、高血糖によってピルビン酸が増加するため、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、フラビンアデニンジヌクレオチドのミトコンドリアへの取り込みが亢進し、電子伝達系での活性酸素種の産生が過剰に増加する。糖尿病モデル動物の心室筋では、SGLT2 阻害薬が NADPH オキシダーゼ活性を抑制し、活性酸素種の産生の低下、酸化ストレス抑制によって線維化を軽減したという報告や、心房筋のミトコンドリアの呼吸能を改善したという報告がある。しかし、SGLT2 阻害薬の心房への効果は十分に検討されておらず、ミトコンドリアの活性酸素種の過剰な産生と心房細動の抑制効果については報告されていない。本研究は、2 型糖尿病モデルラットを用いて、SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジンによるミトコンドリア由来の活性酸素種産生の減少と心房の線維化、心房細動の発症抑制効果について検討することを目的とした。

【材料と方法】

SD ラットにストレプトゾトシン (STZ) を投与し、高脂肪飼料を与え 2 型糖尿病モデルラットを作製した。STZ 投与後の血糖値が 300 mg/dl を超えたラットを糖尿病群 (DM 群) とした。治療介入群 (DM + EMPA 群) として、DM 群にエンパグリフロジンを 8 週間投与した。対照群には、通常飼料を与えた。ランゲンドルフ潅流心で心房性不整脈の誘発性と心房の伝導時間を評価した。マッソントリクローム染色で心房の線維化を評価し、線維化シグナルについて Realtime PCR とウェスタンブロッティングを用いて評価した。さらにミトコンドリア由来の活性酸素種と呼吸能を測定し、酸化ストレスマーカーとしてスーパーオキサイドジスムターゼとマロンジアルデヒドを評価した。ミトコンドリアの生合成に関連するアデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ (AMPK) - ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターγ 共役因子 (PGC)-1α シグナルとミトコンドリアのダイナミクスに関連する蛋白質発現についてウェスタンブロッティングで評価した。

【結果】

DM 群は対照群と比較して、心房性不整脈の誘発性、心房伝導時間、心房の線維化が増加したが、DM + EMPA 群でそれらは改善した。同様に線維化シグナルは、DM 群で過剰な発現を認めたが、DM + EMPA 群で抑制された。さらに DM 群では、ミトコンドリア由来の活性酸素種が過剰に産生され、ミトコンドリアの呼吸能が低下し、酸化ストレスマーカーは有意に上昇した。DM + EMPA 群ではミトコンドリア機能障害が改善し、ミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生が抑制され、酸化ストレスマーカーの低下を認めた。AMPK の蛋白質発現は 3 群で差を認めなかったが、リン酸化 AMPK と AMPK シグナルの下流に存在する PGC-1α とミトコンドリア転写因子 A (TFAM) の蛋白質発現は、対照群と比較して DM 群で有意に低下し、DM + EMPA 群でそれらは改善した。また、ミトコンドリアの融合に関連するミトフシン (Mfn) 1、Mfn2、およびオプティックアトロフィー1 の蛋白質発現は、DM 群で有意に増加し、一方でミトコンドリアの分裂に関するダイナミン関連蛋白 1 の蛋白質発現は DM 群で有意に低下した。これらのミトコンドリアのダイナミクスに関連する蛋白質発現の変化は、DM + EMPA 群では改善した。

【考察】

本研究では、エンパグリフロジンによって心房性不整脈の誘発性が抑制されることが明らかになった。糖尿病では、心房の線維化による伝導遅延が生じるため、心房細動の発症が増加すると考えられている。このためマッソントリクローム染色によって心房の線維化を評価し、心臓電気生理検査で心房の伝導速度を評価した。DM 群では線維化面積比が増加し伝導遅延が生じたが、エンパグリフロジンによって改善した。糖尿病における線維化の原因は種々の要因が挙げられるが、根底には過剰な活性酸素種の産生と酸化ストレスがある。活性酸素種と酸化ストレスは、核内因子 (nuclear factor: NF)-κB を介して線維化を促進すると考えられている。特にミトコンドリアでは体内で最も多くの活性酸素種が産生されるため、ミトコンドリア由来の活性酸素種と呼吸能、そして心房の酸化ストレスについて評価した。DM 群ではミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生、呼吸能の低下、心房の酸化ストレスマーカーの上昇を認めたが、エンパグリフロジンによって改善した。同様に、NF-κB を介した線維化シグナルの過剰なアップレギュレーションが、エンパグリフロジンによって改善した。これらの結果から、エンパグリフロジンがミトコンドリア機能障害の改善を介して、心房の線維化および心房性不整脈の誘発性の低下に寄与したと考えられる。現在、SGLT2 阻害薬のミトコンドリアへの作用機序は判明していないが、本実験では、ミトコンドリアの生合成に関連する AMPK 活性について注目した。AMPK はエネルギー代謝において中心的な制御因子であるが、ミトコンドリアの生合成に作用するだけでなく、抗酸化防御によってミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生を抑制する。また、AMPK はミトコンドリアの融合能や分裂能を介してダイナミクスに影響を与える。糖尿病では、AMPK 活性が低下していることが報告されており、エンパグリフロジンの AMPK への作用についてさらに調査した。AMPK の蛋白質発現は 3 群で差はなかったが、リン酸化 AMPK、PGC-1α および TFAM の蛋白質発現は、対照群と比較して DM 群で有意に低下し、DM + EMPA 群でいずれも改善し、エンパグリフロジンが AMPK 活性に作用していることが示された。イプラグリフロジンは、血糖値とは無関係に AMPK 活性を改善したという報告もあり、SGLT2 阻害薬による AMPK 活性の改善作用は、血糖降下作用に依存しない作用機序と推察される。

【結論】

2 型糖尿病モデルラットにおいて、エンパグリフロジンはミトコンドリアの過剰な酸化ストレスを軽減することで心房リモデリングを抑制し、心房性不整脈の誘発性を低下させた。またエンパグリフロジンは、部分的に AMPK シグナルを介して、ミトコンドリアの生合成とダイナミクスの機能障害を改善させたことが推察される。これらの結果より、SGLT2 阻害薬が 2 型糖尿病患者の心房細動発症を抑制する可能性が示唆された。