



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15437
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89976
Type	doctoral thesis
File Information	KADOSAKA_Takahide.pdf



学位論文

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)

2023 年 3 月

北海道大学

門坂 崇秀

学位論文

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)

2023 年 3 月

北海道大学

門坂 崇秀

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1 頁
1. 要旨.....	2 頁
2. 略語表.....	5 頁
3. 緒言.....	6 頁
4. 実験方法.....	10 頁
4.1 実験動物.....	10 頁
4.2 血糖測定.....	10 頁
4.3 心筋繊維化評価.....	10 頁
4.4 心エコー.....	10 頁
4.5 血行動態測定.....	11 頁
4.6 不整脈誘発性の検討.....	11 頁
4.6.1 ランゲンドルフ灌流心.....	11 頁
4.6.2 高濃度カルシウムおよび薬剤負荷による不整脈誘発性.....	12 頁
4.6.3 電気刺激による不整脈誘発性.....	12 頁
4.7 免疫ブロット法.....	13 頁
4.7.1 タンパク質抽出.....	14 頁
4.7.2 タンパク質濃度測定.....	14 頁
4.7.3 サンプルの調整.....	15 頁
4.7.4 電気泳動.....	15 頁
4.7.5 ウェスタンブロッティング.....	15 頁
4.7.6 Coomassie brilliant blue(CBB)染色.....	16 頁
4.7.7 ブロッキング〜一次抗体反応〜二次抗体反応.....	16 頁
4.7.8 検出.....	17 頁
4.8 心筋細胞のグルコース取り込み能の測定.....	17 頁
4.8.1 心筋細胞単離.....	17 頁
4.8.2 細胞染色〜観察.....	18 頁
4.9 カルシウムイメージング.....	18 頁
4.9.1 心筋細胞単離.....	18 頁
4.9.2 カルシウム色素染色.....	18 頁
4.9.3 共焦点レーザー顕微鏡.....	18 頁

4.10	電気生理学的記録	19 頁
4.10.1	心筋細胞単離	19 頁
4.10.2	ホールセルパッチクランプ法	20 頁
4.11	統計学的検討	21 頁
5.	実験結果	22 頁
5.1	動物特性、心エコーデータ	22 頁
5.2	左室心筋繊維化評価	25 頁
5.3	血行動態評価	26 頁
5.4	不整脈誘発性評価	26 頁
5.4.1	薬剤負荷による不整脈誘発性の評価	26 頁
5.4.2	電気刺激による不整脈誘発性の評価	28 頁
5.5	タンパク発現量評価	29 頁
5.5.1	細胞内カルシウムハンドリング制御タンパクの発現量の比較	29 頁
5.5.2	心筋の O-GlcNAc 付加の比較	29 頁
5.6	選択的 SGLT2 阻害薬の心筋細胞グルコース取り込みへの影響	31 頁
5.7	エンパグリフロジンの細胞内カルシウムハンドリング改善効果	34 頁
5.7.1	カルシウムウェーブの評価	34 頁
5.7.2	カルシウムスパークの評価	36 頁
5.7.3	小胞体カルシウム含有量の評価	37 頁
5.7.4	電気刺激によるカルシウムトランジェント	39 頁
5.7.5	SERCA2a の機能および NCX の活動性の評価	42 頁
5.8	細胞内カルシウムハンドリングに対する O-GlcNAc 付加の影響	44 頁
5.9	ホールセルパッチクランプ法による膜電位記録	47 頁
6.	考察	49 頁
7.	総括及び結論	53 頁
8.	謝辞	54 頁
9.	利益相反	55 頁
10.	引用文献	56 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. Takahide Kadosaka, Masaya Watanabe, Hiroyuki Natsui, Takuya Koizumi, Motoki Nakao, Taro Koya, Hikaru Hagiwara, Rui Kamada, Taro Temma, Fuyuki Karube, Fumino Fujiyama, and Toshihisa Anzai. Empagliflozin attenuates arrhythmogenesis in diabetic cardiomyopathy by normalizing intracellular Ca^{2+} handling in ventricular cardiomyocytes. American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology

本研究の一部は以下の学会・研究会において発表した。

1. Empagliflozin attenuates Arrhythmogenesis via inhibition of *O*-GlcNAcylation in diastolic dysfunction phase of diabetic cardiomyopathy. Takahide Kadosaka, Masaya Watanabe, Hiroyuki Natsui, Takuya Koizumi, Motoki Nakao, Taro Koya, Hikaru Hagiwara, Rui Kamada, Taro Temma, and Toshihisa Anzai. ESC Congress 2022 26 to 29 August, Barcelona, Spain.

1. 要旨

【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汲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 SGLT(sodium glucose co-transporter) 2 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 (sodium/hydrogen 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マノ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 μ M のエンパグリフロジン(empagliflozin, EMPA)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-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose 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タンパク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、ホールセル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。左室内圧測定では db/db マウスで左室内圧陰性最大変化率 - dP/dt の絶対値及び左室圧曲線の減衰時定数 τ 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 OGA(*O*-N-acetylgalactosaminidase)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(ryanodine receptor)および CaMKII(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II)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*-GlcNAc (*O*-N-acetylgalactosamine)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 マウスおよび db/db マウス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*-GlcNAc 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*-GlcNAc 付加は抑制されていた。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タンパクのうち、CaMKII およびホスホランバンは *O*-GlcNAc 付加により機能異常をきたすことが報告されている。CaMKII

(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) は Ser²⁸⁰ の *O*-GlcNAc 付加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。一方で筋小胞体カルシウム ATP アーゼ (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, SERCA2a) の制御タンパクであるホスホランバンは Ser¹⁶ の *O*-GlcNAc 付加によって Ser16 及び Thr17 の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 *db/db* マウスで、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、チアメット G 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タンパクの *O*-GlcNAc 付加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*-GlcNAc 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*-GlcNAc 付加の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タンパクの *O*-GlcNAc 付加の抑制が関与していることが明らかとなった。

2.略語表

ANOVA: analysis of variance

BSA: bovine serum albumin

CaMKII: calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

CBB: Coomassie Brilliant Blue

CICR: calcium induced calcium release

DAD: delayed after depolarization

EAD: early after depolarization

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

EMPA: empagliflozin

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GLUT: glucose transporter

LV: left ventricle

LVDd: left ventricular diastolic diameter

LVDs: left ventricular systolic diameter

NCX: sodium/calcium exchanger

NHE: sodium/hydrogen exchanger

OGA: *O*-*N*-acetylgalactosaminase

OGT: *O*-*N*-acetylgalactosamine transferase

O-GlcNAc: *O*-*N*-acetylgalactosamine

PBS: phosphate-buffered saline

PLB: phospholamban

PVC: premature ventricular contraction

PVDF: polyvinylidene difluoride

RyR: ryanodine receptor

SERCA2a: sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

SGLT: sodium glucose co-transporter

TBS: Tris-buffered saline

TBST: Tris-buffered saline with polyoxyethylene sorbitan monolaurate

VT: ventricular tachycardia

3.緒言

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 万人と報告されているが、2030 年には 9.2 %にあたる 5 億 7800 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おり、大きな社会問題となっている(Saeedi et al., 2019)。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高いことが報告されており、そのリスクは約 2 倍、1 歳から 35 歳の若年者に限ると 8.6 倍にも上ることが、デンマークのコホート研究から報告されている(Lynge et al., 2020)。その原因として糖尿病性心筋症が注目されている(Jia et al., 2018)。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」と定義され(Authors/Task Force et al., 2013; Jia et al., 2018; Yancy et al., 2013)、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(Boudina and Abel, 2010; Jia et al., 2016; Popescu et al., 2019)。

一般的に、不整脈の発生機序には三つの成因があるとされる。一つ目は何らかの異常により洞結節以外で自発性の活動電位が発生する異常自動能、二つ目は興奮伝搬回路が形成され回路内を旋回するリエントリー、三つ目は活動電位の発生が引き金となって振動性の後脱分極(after depolarization)が生じ、それが閾値に達すると、自発興奮が発生する撃発活動である。撃発活動は、活動電位のプラトー相（第 2 相）あるいは再分極相（第 3 相）から発生する早期後脱分極 (early after depolarization, EAD)、活動電位再分極終了後の第 4 相に生じる遅延後脱分極 (delayed after depolarization, DAD) の二つに大別される（図 1-1）。

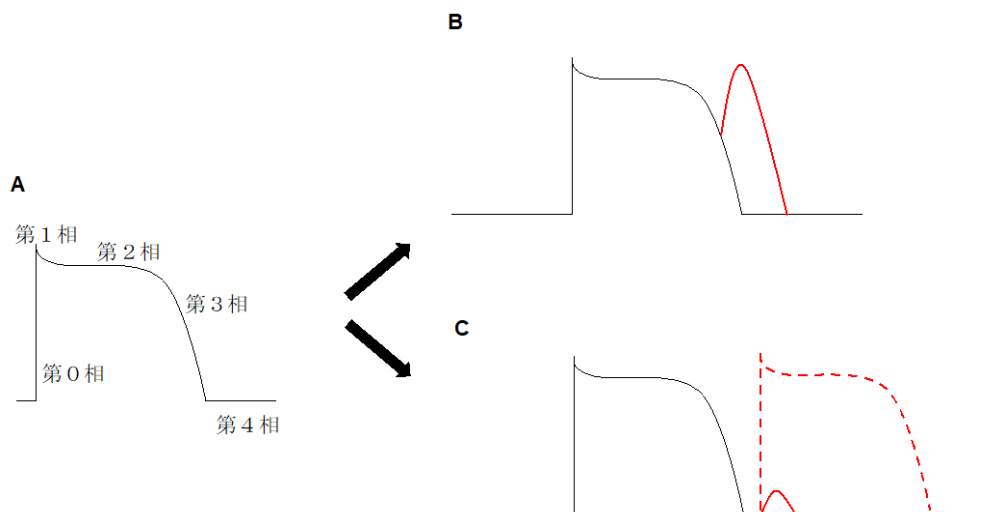


図 1-1 早期後脱分極と遅延後脱分極の膜電位の図

心筋細胞の膜電位の模式図を示す。縦軸が膜電位、横軸が時間を表す。

撃発活動は正常膜電位（A）に変化がおき、活動電位の第 2 相または第 3 相におきる早期後脱分極（B）、第 4 相におきる遅延後脱分極（C）に大別される。

DAD は、細胞内カルシウム過負荷をきたす状態における、ナトリウム-カルシウム交換輸送体 (sodium/calcium exchanger, NCX) を介した脱分極である(Nattel and Dobrev, 2012)。細胞内カルシウム過負荷は小胞体のリアノジン受容体 (ryanodine receptor, RyR) (カルシウム放出チャネル) に構造的、機能的変化が生じることで小胞体からの自発的なカルシウム放出 (カルシウムリーク) が起こり(Schweitzer et al., 2017)、それに呼応して NCX を主体とした一過性内向き電流が生じることで DAD が発生する。カルシウムリークが生じる一因として、細胞内カルシウム濃度の上昇によりカルモジュリンが活性化し、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) に結合すると、その立体構造に変化が生じて、活性化部位が露出し、CaMKII の自己リン酸化と RyR の Ser²⁸¹⁴ をリン酸化することで RyR の過リン酸化が起こることが報告されている(Yano et al., 2000)。このような RyR の機能異常は、カテコラミン誘発多型性心室頻拍や、心不全で生じていることが報告されている(Schweitzer et al., 2017)。

RyR は小胞体上に存在し、心筋の収縮などを統制する細胞内カルシウムの調整に関与する。活動電位に伴い電位依存性カルシウムチャネルを介して細胞内へ流入したカルシウムが、RyR に結合し小胞体から細胞質へのカルシウム放出 (calcium induced calcium release, CICR) を起こす。細胞質に放出されたカルシウムは、細胞外への流出、あるいは筋小胞体カルシウム ATP アーゼ (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, SERCA2a)によって小胞体内への取り込まれることで、拡張期の細胞内カルシウム濃度が低下する。SERCA2a の機能はホスホランバンによって調節され、ホスホランバンのリン酸化によって SERCA2a の機能は亢進する。この心筋細胞内のカルシウムの生理的制御をカルシウムハンドリングと呼ぶ(Ciofalo and Thomas, 1965) 。一方で、一時的で局所的な RyR からカルシウムを放出する現象はカルシウムスパークと呼ばれ、CICR が次々と伝搬する現象はカルシウムウェーブと呼ばれる(Cheng et al., 1996)。

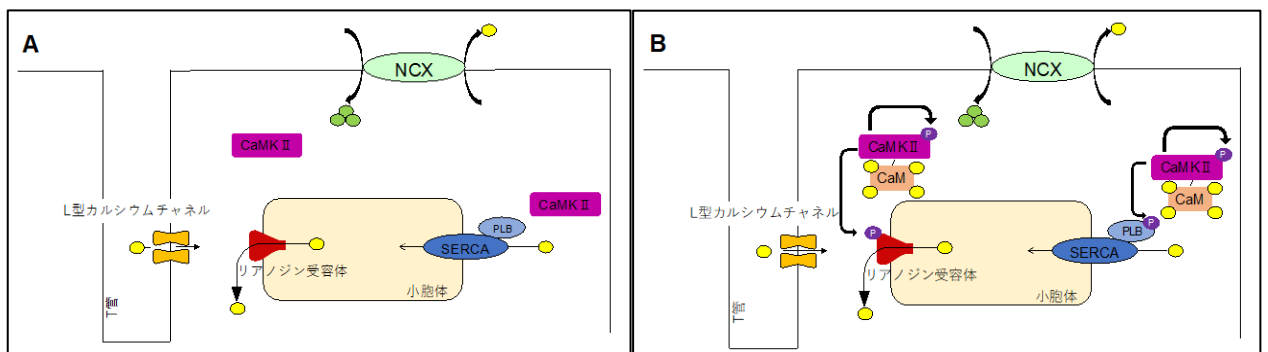


図 3-2 細胞内カルシウムハンドリングの図

細胞内カルシウムハンドリングの模式図を示す。

電位依存性カルシウムチャネルである L 型カルシウムチャネルを介した細胞内へのカルシウム流入により RyR を介した小胞体からのカルシウム放出 (CICR) が生じる (A)。細胞内カルシウム濃度の上昇により CaMKII が活性化した状態では、CaMKII 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が生じる (B)。

糖尿病性心筋症において CaMKII の翻訳後修飾の一つである O 結合型 β -N-アセチルグルコサミン (*O*-N-acetylgalactosamine, *O*-GlcNAc) 付加がこのような細胞内カルシウムハンドリングに異常を来すことが報告されている (Hegyi et al., 2021)。*O*-GlcNAc 付加は細胞内に取り込まれたグルコースを基質として、*O*-GlcNAc 転移酵素 (*O*-N-acetylgalactosamine transferase: OGT) によってセリン及びスレオニン残基の水酸基に β -N-アセチルグルコサミンという単糖の *O*-グルコシド結合による酵素的付加が起こることでシグナル伝達に参与する (Erickson et al., 2013)。この *O*-グルコシド結合は *O*-GlcNAc 加水分解酵素 (*O*-N-acetylgalactosaminidase: OGA) により解除される。

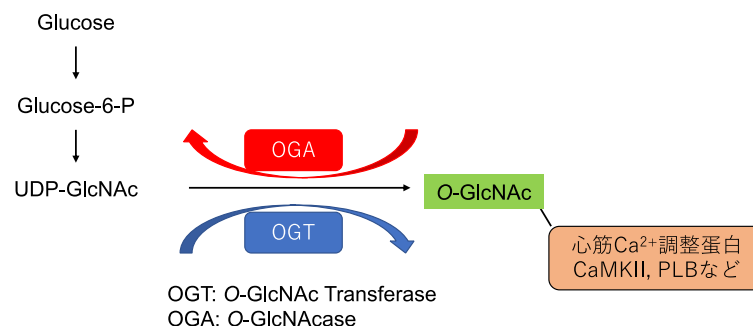


図 3-3 タンパクの *O*-GlcNAc 付加の図

細胞内に取り込まれたグルコースを基質として OGT が CaMKII やホスホランバン (phospholamban, PLB) といったタンパク質に *O*-GlcNAc を付加する。OGA は逆に *O*-GlcNAc を除去する。

一方で、近年の循環器治療薬で最も大きな注目を集めている薬剤の一つに選択的 SGLT (sodium glucose co-transporter) 2 阻害薬がある。選択的 SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジンは心血管疾患既往のある 2 型糖尿病患者を対象とした EMPA-REG OUTCOME 試験において有意に全死亡と心不全入院を減らすことが示された (Zinman et al., 2015)。その後も、他の選択的 SGLT2 阻害薬も含めて心疾患に対する良好なアウトカムを示すことが報告され、現在では心不全の基本治療薬として使用されるようになった (Anker et al., 2021; McMurray et al., 2019; Neal et al., 2017; Perkovic et al., 2019; Wiviott et al., 2019)。また、近年エンパグリフロジンを初めとする選択的 SGLT2 阻害薬には心臓突然死を抑制する効果があることも報告されている

(Fernandes et al., 2021; Umapathi et al., 2021)。しかし、以前より心筋細胞には SGLT2 が存在しないことが知られており、これまで選択的 SGLT2 阻害薬の心筋への直接効果、細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制する効果があることが報告されている一方で、その作用機序はいまだ議論的となっている(Baartscheer et al., 2017; Mustroph et al., 2018; Trum et al., 2020; Uthman et al., 2018)。

我々は選択的 SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジンが拡張障害期の糖尿病性心筋症において細胞内カルシウムハンドリングの改善を介して、心室性不整脈を抑制するという仮説を立て、その作用機序について検証を行うことを目的とした (図 3-4)。

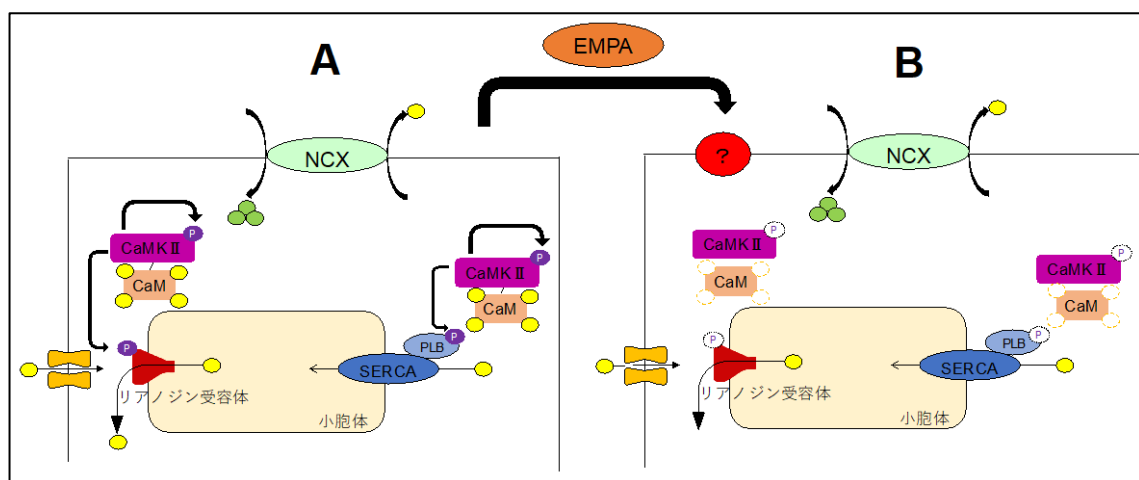


図 3-4.本研究の概要

糖尿病では CaMKII の活性化により RyR の過リン酸化が生じ、小胞体からのカルシウムリークが増加している (A)。ここに選択的 SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジン (empagliflozin, EMPA) を投与することで CaMKII の活性および RyR の過リン酸化を抑制することで小胞体からのカルシウムリークが減少し、細胞内のカルシウム濃度の低下や、細胞内カルシウムハンドリングの改善を介して、撃発活動を介した心室性不整脈を抑制するのではないかと考えた (B)。

4.実験方法

本研究の全実験は、北海道大学医学部医学研究科東南研究棟 ES4-201 室（承認番号 2021-010）で行った。また、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」および「国立大学法人北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」を遵守して、動物実験計画「心臓突然死の予防のための心臓電気生理的検討」（承認番号 18-0077）の一研究として行った。

4.1 実験動物

糖尿病性心筋症モデルとして 16 週齢のオスの遺伝的レプチン受容体欠損 2 型糖尿病モデルマウスである *db/db* マウス (C57BLKS/J-*lepr*^{db/db})、対照群として同週齢のヘテロ接合体 (C57BLKS/J-*lepr*^{db/+}) を使用した (Burke et al., 2017)。

4.2 血糖測定

8 週齢から 18 週齢のマウスのテールカットを行い、血糖測定器を用いて尾静脈から血糖測定を行った。

4.3 心筋繊維化評価

抗凝固を目的として塩酸ヘパリン（400 国際単位；AY Pharma, Tokyo, Japan）を腹腔内投与した。5 分後、マウスを頸椎脱臼により屠殺して心臓を摘出し、氷冷した PBS（phosphate-buffered saline）上で心周囲組織及び心房を除去した。その後 10 % ホルマリンで固定した。乳頭筋レベルで 5 μm に切り出しし、マッソントリクローム染色を行い繊維化の評価を行った。

4.4 心エコー

心エコー法は非侵襲的な検査といわれているが、実験動物においては安静を保つことが極めて難しいため、麻酔薬を用いることがある。しかし、麻酔薬によって心抑制が生じることで正しい心機能を評価できないことが報告されており、手技に習熟していれば非麻酔下での心エコー法が推奨されている (Vatner, 1978; Vatner and Braunwald, 1975)。そのため、本研究では非麻酔下で心エコー法を行った。検査台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、除毛クリームでマウスの前胸壁を除毛した。超音波診断装置および 12 MHz リニアプローブを用いて、2D 胸骨傍短軸像乳頭筋レベルで最適な像を描出した。M モード法に切り替え、記録紙スピード 40 mm/sec で記録の上、心拍数、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室前壁壁厚、左室後壁壁厚、左室内径短縮率を計測した（図 4-1）。

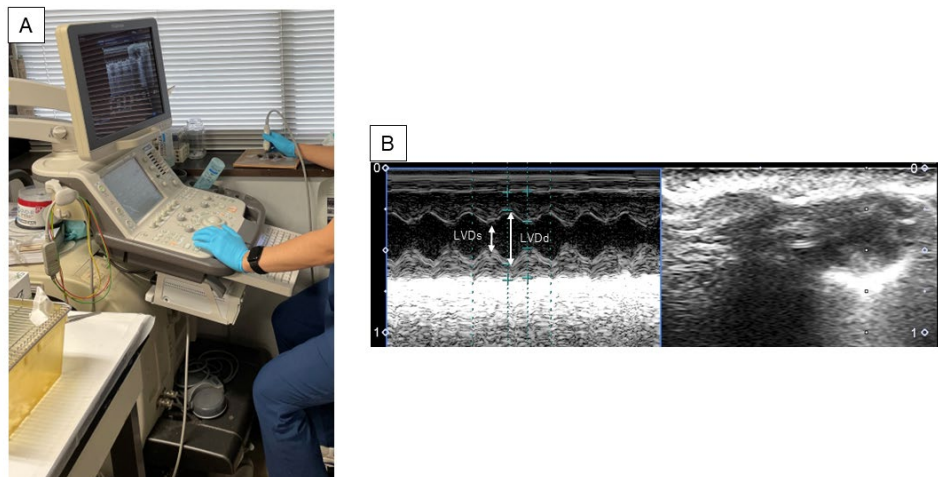


図 4-1. 心エコー検査の写真

奥に準備したマウスと検査台を設置し、心エコーを行った (A)。取得したエコー画像の一例 (B)。

4.5 血行動態測定

メデトミジン塩酸塩 (0.3 mg/kg 体重；共立製薬, Tokyo, Japan)、ミダゾラム (4 mg/kg 体重；アステラス製薬, Tokyo, Japan)、ブトルファノール (5 mg/kg 体重；Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan) の 3 種混合液を腹腔内に投与し、痛み刺激でも反応がない程度の麻酔で鎮静を得た。血行動態測定は、1.4-Fr^{※1} マイクロマノメータチップカテーテル (Millar Instruments, Houston, Texas, USA) を右頸動脈へ挿入し左室へカテーテルを進め、左室圧を測定した。

※1 Fr(フレンチ)：カテーテルの外径を示す単位。1 Fr = 1/3 mm。

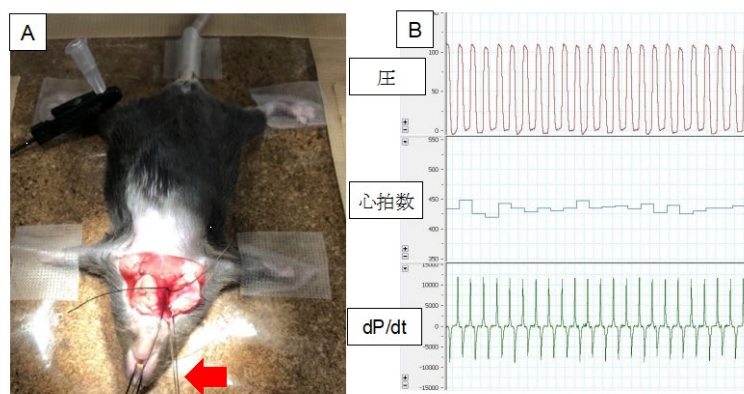


図 4-2. マイクロマノメータチップカテーテルによる血行動態測定の実際

十分な麻酔下で右内頸動脈に 1.4-Fr マイクロマノメータチップカテーテル (←) を挿入し左室内圧を測定している (A)。得られた左室内圧データの一例 (B)。

4.6 不整脈誘発性の検討

4.6.1 ランゲンドルフ灌流心

- 1) 抗凝固を目的として塩酸ヘパリンを腹腔内投与した。
- 2) 5分後、マウスを頸椎脱臼により屠殺して心臓を摘出し、氷冷したカルシウム Tyrode 液^{※1}に漬けた。

※1 カルシウム Tyrode の組成 (pH 7.4) : 143 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.33 mM NaH₂PO₄, 5 mM HEPES, 5.5 mM glucose, 0.5 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂

- 3) カルシウム Tyrode 液内で胸腺組織を除き、上行大動脈を露出させた。
- 4) 上行大動脈に 23 ゲージ針を挿入し、4-0 絹糸で固定した。
- 5) ランゲンドルフ装置に接続した。37 °Cに保温し、酸素でバブリングしたカルシウム Tyrode 液で逆行性灌流を開始した。
- 6) 灌流中は回路内に 3.5-Fr マイクロマノメータチップカテーテルを挿入し圧データの観察を行った。回路内圧が 60 ~ 80 mmHg となるように流量を調整した。
- 7) 灌流心は 37 °Cに保温されたチャンバー内で固定し、数分間拍動が安定していることを確認した後、実験に使用した。

4.6.2 高濃度カルシウム及び β -アドレナリン受容体刺激による不整脈誘発性

摘出灌流心の左室心尖部と上行大動脈に挿入した 23 ゲージ針にそれぞれ心電図記録用の単極電極を装着した。control マウス及び *db/db* マウスに対して 3.6 mM のカルシウムを含む高濃度カルシウム Tyrode に 1 μ M イソプロテレノールを含んだ Tyrode を灌流した場合と、*db/db* マウスに 1.8 mM カルシウム Tyrode に 1 μ M イソプロテレノール及び 1 μ M エンパグリフロジンを含む Tyrode を灌流した場合の 3 群で比較した。心電図は左室及び上行大動脈に挿入した 23 ゲージ針に装着した電極で PowerLab 4/26 (AD Instruments, Dunedin, New Zealand) を用いて測定した。QRS 波形が前の心拍と異なり、頻拍周期が変化した場合に心室性期外収縮 (premature ventricular contraction, PVC) と定義し、PVC 波形が 3 連発以上のものを心室頻拍 (ventricular tachycardia, VT) と定義し、これらの発生率を評価した。

4.6.3 電気刺激による不整脈誘発性

摘出灌流心の左室側壁に単極ペーシング電極、左室心尖部と上行大動脈に挿入した 23 ゲージ針にそれぞれ心電図記録用の単極電極を装着した。高濃度カルシウム及び β -アドレナリン受容体刺激による不整脈誘発性評価の後に 10 分間、通常の Tyrode 液で灌流したのちに左室側壁のペーシング電極から以下の 2 つのプロトコールを行った (Clasen et al., 2018)。

- ① 連続刺激法： 50 msec のペーシングサイクルレングス長で2秒間の刺激を与えた。1回のプロトコルでVTが発生しない場合は3回まで繰り返した。
 - ② 期外刺激法： 90 msec のペーシングサイクル長で10発刺激を加え、11発目から80 msec に短縮したペーシングサイクル長で期外刺激を3連で加えた。VTが発生しない場合は期外刺激を10 msec ずつ短縮し、40 msec まで行った。
- 心電図は左室心尖部と上行大動脈に挿入した23ゲージ針に装着した電極でPowerLab 4/26（AD Instruments、Dunedin、New Zealand）を用いて測定した。PVC波形が3連発以上のものをVTと定義した。

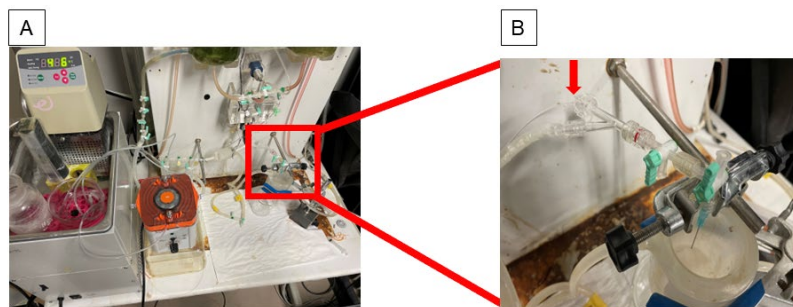


図 4-3. ランゲンドルフ装置の写真

左に恒温槽、真ん中にペリスタティックポンプがあり、右手に摘出した心臓を設置する (A)。摘出した心臓の周囲には、風を防ぎ、温度を一定に保つためのチャンバーを設置し、チャンバー内は温水が灌流している(B)。↓ は、回路内に挿入した 3.5 Fr-マイクロマノメータチップカテーテルを示す。

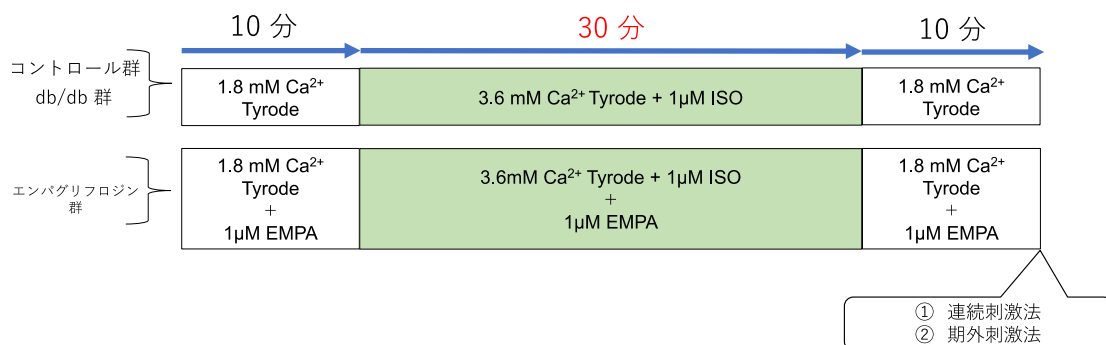


図 4-4. 不整脈誘発プロトコル

4.7 免疫ブロット法

頸椎脱臼後に、心筋を迅速に摘出しランゲンドルフ灌流心の手技を用いて、図 4-5 のようなプロトコルで溶液を逆行性灌流した心筋を速やかに液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。心筋からのタンパク質抽出、電気泳動、および免疫ブロットを以

下の手順で行った(Tenma et al., 2018)。

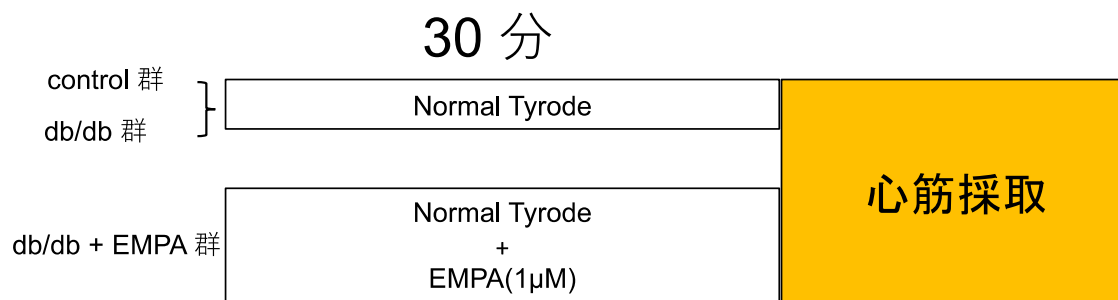


図 4-5 タンパク発現量評価前の心筋灌流プロトコール

4.7.1 タンパク質抽出

1) 凍結保存したサンプルを氷上で解凍した。氷冷した 10 × Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology [CST], Danvers, Massachusetts, USA) を蒸留水で 10 倍希釈し、99.5%エタノール (Wako, Osaka, Japan) で希釈した 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) およびセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼを阻害するプロテアーゼインヒビターカクテル錠である complete Mini (Roche, Indianapolis, Indiana, USA) を 1 錠添加した。組織サンプルを入れ、ダウンス型ホモジナイザー (BioMasher II, nippi, Tokyo, Japan) でホモジナイズした。

2) ホモジナイズしたサンプルを遠心分離し (15,000 g, 10 分, 4 °C)、ペレットを吸引しないように上清を新しいエッペンドルフチューブに移した。長期保存のため、−80 °Cで冷凍保存した。

4.7.2 タンパク質濃度測定

抽出したサンプルタンパク質の濃度測定は、以下の手順の通り、ビシンコニン酸法で測定を行った。

- 1) CELLSTAR 96 穴マイクロプレート (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria) に BCA™ Protein Assay Reagent A と BCA™ Protein Assay Reagent B (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA) を 50 対 1 の割合で混合し、各ウェルに 200 μl ずつ分注した。
- 2) ブランクとして 1 ウェル空白を置き、2 mg/ml のアルブミンスタンダードを 1、2、4、8、12、16 μl ずつウェルに混合した。
- 3) 測定するサンプルは各 2 μl ずつウェルに注入した。

- 4) 37℃で 30 分間インキュベートした。
- 5) タンパク濃度測定装置本体 (Immuno Mini Model NJ-2300, Biotec, Tokyo, Japan) およびソフト (Immuno mini, Biotec, Tokyo, Japan) で、540 nm 波長の吸光度を計測した。
- 6) スタンダードタンパク質の平均値の一次直線を算出し、スタンダードタンパク質濃度から得た検量線を基にサンプルタンパク質濃度を算出した。上記のタンパク質濃度測定は、スタンダード、サンプルとも同一サンプルを二重で各ウェルに置き、2 つの平均値で算出した。

4.7.3 サンプルの調製

- 1) 2-メルカプトノールを添加した Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 用サンプル緩衝液で、2.5 µg/µl のサンプル溶液を作製した。ボルテックスミキサーで溶液を攪拌した。
- 2) MULTI HEATER TYPE MH-36 (WAKAMORI CO., LTD. Tokyo, Japan) にて 100℃で 5 分間加温した。
- 3) 短時間遠心してエッペンドルフチューブの蓋に付着した水滴を落とし、ボルテックスミキサーで攪拌した。

4.7.4 電気泳動

- 1) 電気泳動槽 (Criterion セル, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA) に SDS-PAGE 泳動緩衝液^{*1}を注入し、電気泳動用のタンパク質ゲルをセットした。電気泳動用のタンパク質ゲルは Criterion TGX プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories) のうち AnyKD のものを使用した。
*1 SDS-PAGE 泳動緩衝液の組成: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS
- 2) 10 µl のサンプルをピペットマンで各ウェルに注入し、サンプルレーンの端に分子量マーカーである、カラーマーカー (Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range, Bio-Rad Laboratories) を注入した。
- 3) POWER PAC 300 (Bio-Rad Laboratories) にて、60 V の定電圧で 30 分間、引き続いて 120 V の定電圧でおよそ 1 時間 30 分泳動し、サンプルがゲルの先端まで移動するのを確認して泳動を終了した。

4.7.5 ウェスタンブロッティング

セミドライ式およびウェット式ブロッティングを併用し転写した。

1. セミドライ式ブロッティング

- 1) タンパク質ゲルを PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜である Trans-Blot Turbo™ (Bio-Rad Laboratories) の上に乗せた。
 - 2) 1.0 A、25 V で 30 分間転写した。
2. ウェット式ブロッティング
- 1) PVDF 膜をあらかじめメタノールで 1~2 分間浸した後に、転写緩衝液に濾紙と共に浸した。
タンパク質ゲルをタンク式ブロッティング装置の陽極から順に、スポンジ→濾紙→PVDF 膜→ゲル→濾紙→スポンジとなるように重ね、20 V の定電圧で 20 時間転写した。

4.7.6 Coomassie Brilliant Blue (CBB)染色

泳動後、ゲルを蒸留水で 3 回、各 5 分間洗浄した後に CBB 溶液に浸し、室温で 1 時間振とうした。その後、蒸留水で 3 回洗浄し、背景と比べてタンパク質のバンドが鮮明になるまで洗浄を続けた。

4.7.7 ブロッキング～一次抗体反応～二次抗体反応

1 次抗体には、抗ホスホランバン抗体 (1:5000, #ab219626, abcam, Cambridge, UK)、抗ホスホランバン-pThr17 抗体 (1:1000, #sc-24565, Santa Cruz, Dallas, Texas)、抗 CaMKII 抗体 (1:5000, #ab52476, abcam)、抗 CaMKII-pThr286 抗体 (1:2000, #ab171095, abcam)、抗 SERCA2 ATPase 抗体 (1:5000, #ab137020, abcam)、抗リアノジン受容体抗体 (1:5000, #ab2868, abcam)、抗リアノジン受容体-pSer2814 抗体 (1:2500, #A010-31AP, Badrilla, Leeds, UK)、抗 O 結合型 β -N-アセチルグルコサミン抗体 (1:1000, #NB300-524, Novus biologicals, centennial, Colorado) を用い、2 次抗体には、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (1:20,000, ab205718, Abcam)、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ ヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (1:20,000, ab97023, Abcam) を用いた。

- 1) メンブレンをブロッキング溶液に移して、室温で 1 時間振蕩した。ブロッキング溶液には TBST(Tris-buffered saline with polyoxyethylene sorbitan monolaurate)を溶媒として 3%スキムミルクおよび 3 %BSA を作製し用いた。
- 2) 1×TBST*¹ で振蕩しながら洗浄 (10 分間×3 回) した。
- 3) 1 次抗体希釈液 (ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈) に浸し、4℃で 1 晩抗体反応を行った。
- 4) 1×TBST で振蕩しながら洗浄 (10 分間×3 回) した。
- 5) 2 次抗体希釈液 (ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈) に浸し、室温で 1 時間

抗体反応を行った。

- 6) 1×TBST で振蕩しながら洗浄（10 分間×3 回）した。

*1 1×TBST の組成：20×トリス緩衝生理食塩水（0.4 M Tris/HCl (pH 7.6)、3 M NaCl）を純水で 20 倍に希釈し、0.1% となるように polyoxyethylene sorbitan monolaurate（Tween 20[®], 和光, Osaka, Japan）を加えた。

4.7.8 検出

- 1) PVDF 膜の全面を覆うように検出試薬をかけ、3 分間室温で静置した。検出試薬には ECL Prime（RPN2232, GE Healthcare, Little Chalfont, UK）を使用した。
- 2) ウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステムで可視化されたバンドを検出した。

画像解析ソフト Image J（U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, US）を用いて集積光濃度を定量して解析した。なお、O-GlcNAc に関しては CBB 染色で評価した総タンパク質発現量をその他のタンパクに関しては GAPDH（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）をコントロールとして補正した。

4.8 心筋細胞のグルコース取り込み能の測定

4.8.1 心筋細胞単離

麻酔下で心筋を迅速に摘出し、以下の手順で心筋細胞を単離した。

- 1) 抗凝固目的に塩酸ヘパリンを腹腔内投与した。
- 2) 5 分後、マウスを屠殺して心臓を摘出し、氷冷した Perfusion buffer 液^{*1}に漬けた。

*1 Perfusion buffer 液（pH 7.4）の組成：135 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.33 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM 2, 3-Butanedione-monoxime, 5 mM Taurine

- 3) Perfusion buffer 内で胸腺組織を除き、上行大動脈を露出した。
- 4) 上行大動脈に 23 ゲージ針を挿入し、4-0 絹糸で固定した。
- 5) ランゲンドルフ装置（図 3-5）に接続した。37°C に保温し、酸素でバブリングした Perfusion buffer 液で逆行性灌流を 3 ml/時間で開始した。
- 6) 1 分後に酵素液に変更した。酵素液は、Perfusion buffer 液にコラゲナーゼ（0.5 mg/ml, WAKO, Tokyo, Japan）とプロテアーゼ（0.1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を溶解したものを使用した。

- 7) 10 分後、BufferA に漬けた。BufferA は Perfusion buffer 液に BSA (5 mg/ml, NACALAI TESQUE, Kyoto, JAPAN) を溶解したものを使用した。
- 8) BufferA 内で両心房を取り除いて残った心室筋を小切片に切除し、100 μ m セルストレーナー (Falcon, Tewksbury, MA, USA) で濾過した。
- 9) 10 分後、沈殿したペレットを 1.2 mM カルシウム Tyrode 液^{*2}に移した。単離心筋細胞は単離後 4 時間以内に使用した。

^{*2} 1.2 mM カルシウム Tyrode 液 (pH = 7.4) の組成 : 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM HEPES, 10 mM glucose

4.8.2 細胞染色～観察

ガラスボトムディッシュ (Matsunami, Osaka, Japan) に、40 μ g/ml に希釈したラミニン (Wako, Osaka, Japan) を添加し、常温で 1 時間インキュベートした。残った溶液を吸引し、穏やかに蒸留水でリンスした。300 μ M の 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose と単離した心筋細胞を滴下し、90 分間、37 °C で暗所に静置した。その後、溶液を穏やかにリンスし、蛍光顕微鏡 BZ-X 710 (KEYENCE Corporation, Osaka, Japan) で観察を行った。

4.9 カルシウムイメージング

4.9.1 心筋細胞単離

4.8.1 の方法と同様に行った。

4.9.2 心筋細胞のカルシウム色素染色

ガラスボトムディッシュに、40 μ g/ml に希釈したラミニンを添加し、常温で 1 時間インキュベートした。残った器質を吸引し、穏やかに蒸留水でリンスした。ガラスボトムディッシュに 5 μ M の Fluo-4 AM、0.04 % (w/v) pluronic F-127、1.25 mM Probenecid (Dojindo, Kumamoto, Japan) を含む 1.2 mM カルシウム Tyrode を添加し、心筋細胞を滴下した。遮光下、室温で 1 時間インキュベートした。その後、溶液を取り除き、1.2 mM カルシウム Tyrode 液を添加した。インキュベートから観察の間に用いるすべてのカルシウム Tyrode に対して各種薬剤を投与して実験を行った。

4.9.3 共焦点レーザー顕微鏡

カルシウムスパークの測定は、アルゴンイオンレーザーと倒立顕微鏡 (Axio Observer Z.1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を組み合わせた共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-710, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用した。対物レンズは、油浸

Plan-Neofluor 対物レンズ（40 倍、開口数 1.3）を使用し、励起波長を 488 nm、蛍光波長を 493-630 nm とした。ガラスボトムディッシュに装着した電極による field stimulation により心筋細胞の電気刺激（矩形波、7-10 V、0.75 msec）を 0.5 Hz で行った。撮影はラインスキャンモードで行った。ラインスキャンモードは設定した線上を繰り返しスキャンすることで、1 次元の空間情報と 2 次元の時間情報を含む 2 次元画像を作製する。単離心筋細胞の縦軸に平行な線上を繰り返しスキャンした（327.9 Hz）。

4.9.3-1 カルシウムトランジェント

0.5 Hz で field stimulation をおこない定常状態に達した後、ラインスキャンモードで撮像した。撮影した画像は Image J で解析し、心筋細胞の縦軸に平行に、拡張期の基線となっている蛍光強度（F0）に対する蛍光強度（F）の比率（F/F0）を測定した。

4.9.3-2 カルシウムウェーブ

0.5 Hz で field stimulation を行い、安定してカルシウムトランジェントを認める細胞のみを解析対象とした。カルシウムトランジェントが定常状態に達した後にペーシングを停止し、約 1 分間のカルシウムウェーブの回数を比較した。

4.9.3-3 カルシウムスパーク

Tyrode 液に 1 μ M のイソプロテレノールを投与した。0.5 Hz で field stimulation を行い、安定してカルシウムトランジェントを認める細胞のみを解析対象とした。カルシウムトランジェントが定常状態に達した後にペーシングを停止し、約 5 秒間のカルシウムスパークを観察した。カルシウムスパークは、Image J の自動分析プログラムである SparkMaster を使用して計算した（sparks $\cdot$ sec⁻¹ $\cdot$ 100 μ m⁻¹）。

4.9.3-4 小胞体カルシウム含有量

0.5 Hz で field stimulation を行い、安定してカルシウムトランジェントを認める細胞のみを解析対象とした。カルシウムトランジェントが定常状態に達した後にペーシングを停止し、10 mM のカフェインを急速投与した。撮影した画像は Image J で解析し、F/F0 を測定した。

4.10 電気生理学的記録

4.10.1 心筋細胞単離

4.8.1 の方法と同様に行った。

4.10.2 ホールセルパッチクランプ法

パッチクランプ法による膜電位固定を行い、全細胞電流を測定した。パッチクランプ法は、単離心筋細胞にガラス電極を接近させ陰圧をかけることで細胞と一体化させ、細胞全体の電位や電流を測定する手法である。パッチ電極はガラス管キャピラリー（Borosilicate Glass Capillaries. World Precision Instruments, Inc, Sarasota, Florida, USA）を牽引器（Model P-97, Stutter Instrument Company, California, USA）で引いて作製し、熱線に近づけて先端の形状を整えるヒートポリッシュを行った後、Pipette solution 液^{*1}で満たした。ガラス電極は抵抗値が 2~5 M Ω のものを使用した。細胞内電位の測定は EPC10 パッチクランプ増幅器（HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz, Germany）を用いて記録し、増幅器に内蔵されたアナログ-デジタル変換回路から細胞内電位のデータを出力して、コンピューターに記録した。膜電流の記録およびパルスプロトコル制御には、Patchmaster ソフトウェア（HEKA Elektronik）を使用した。

単離心筋細胞をプレート上に滴下し、固着のため 5 分間待った。その後 Bath solution 液を滴下し、顕微鏡による目視及び電極の抵抗の変化を指標に単離細胞と電極を接触させ、シリンジにて陰圧をかけギガオームシールを形成した。さらに陰圧をかけることで細胞膜を破り、ホールセルを形成した。パッチクランプ法は室温にて行った（24~25 °C）。以下の 2 つのプロトコルで実験的に DAD の観察を行った。静止膜電位が -60 mV 以下の細胞を解析の対象とした。

プロトコル 1 : 1 nA、3 msec、0.5 Hz の電流を 5 回与えたのち、30 秒間で起きる活動電位を解析した。

プロトコル 2 : 1 分間 10 Hz でバーストペーシングを行った後に、1 分間の膜電位の観察を行った。

0.5 msec 以内に 1 mV 以上電位が上昇したものを DAD、膜電位が脱分極しオーバーシュートしたものを自発的活動電位（spontaneous action potential）と定義した。

※1 Pipette solution 液（pH 7.25）の組成: 30 mM KCl, 110 mM K-aspartate, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.1 mM EGTA.

※2 Bath solution 液（pH 7.4）の組成: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose.

4.11 統計学的検討

得られた数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。等分散性の検定を行った後に、2 群間の平均値の差の検定は、Student's *t*-test を用いて行い、対応のある 2 群間の平均値の差の検定は Paired *t*-test を用いた。3 群間以上の平均値の差の検定に関しては、必要に応じて one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。

2 群間の頻度検定に関しては Fisher の正確検定を用いて行った。解析ソフトは Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) を使用した。 $p < 0.05$ を有意と定義した。

5. 実験結果

5.1 動物特性、心エコーデータ

図 5-1 に 8 週から 18 週までの体重、随時血糖値の推移を示す。db/db 群は control 群と比較して体重、血糖値ともに有意に高い値を一貫して示していた。表 5-1 に 16 週齢での体重と血糖値の平均値を示す。心エコーで評価した左室拡張末期径と左室内径短縮率の経時的な変化を、図 5-2 に 2 群の代表的な心エコー画像、表 5-2 に 16 週齢での心エコー指標を示す。16 週齢では db/db 群は有意に心拍数が低かったが、左室内径短縮率に有意差を認めなかった。

表 5-1 16 週齢での体重および血糖値評価

データは平均±標準誤差。* $p < 0.05$ vs control 群

	control 群 (n=10)	db/db 群 (n=10)
体重, g	30.0 ± 0.6	48.8 ± 1.7*
血糖値, mg/dL	160 ± 8	436 ± 30*

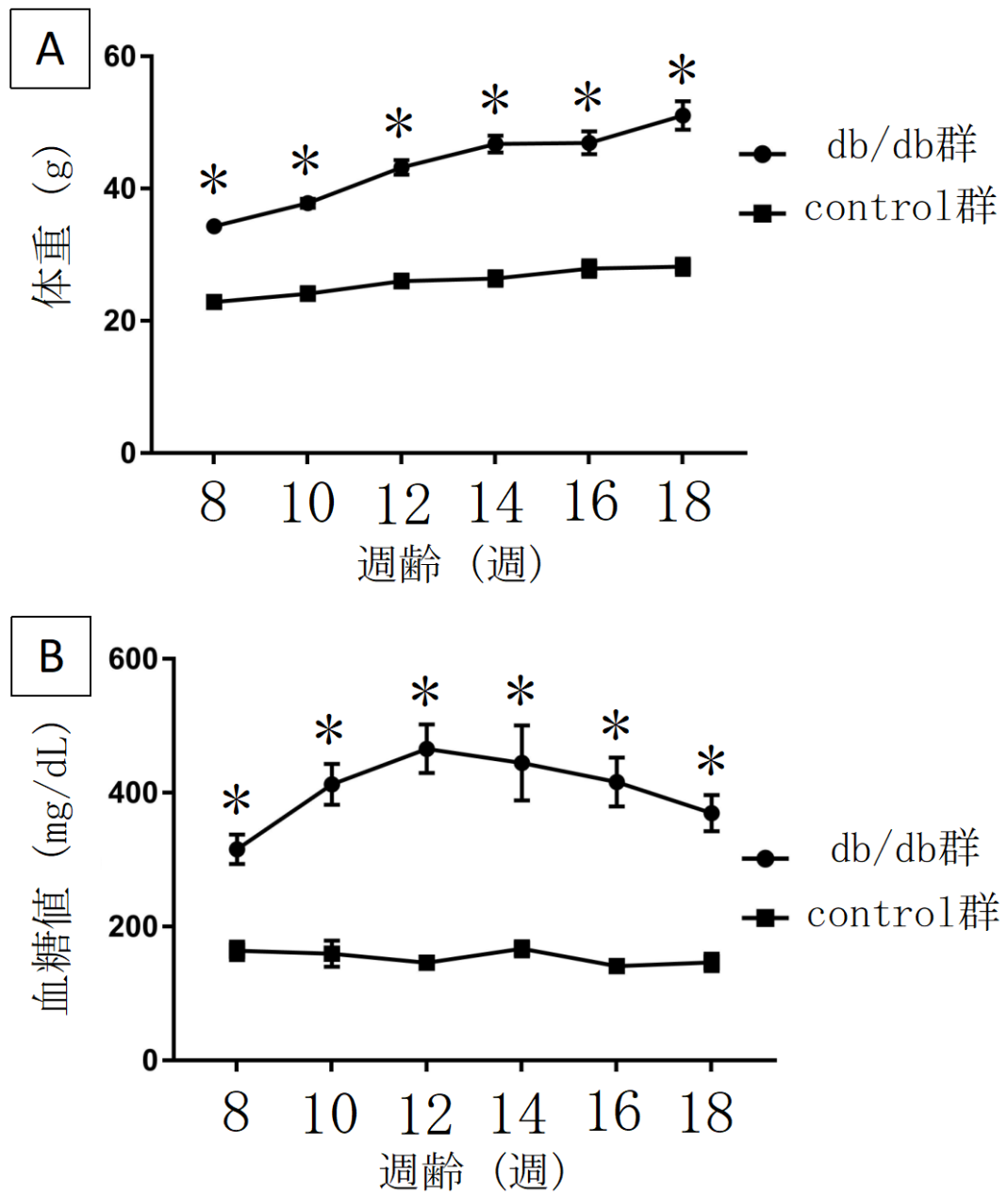


図 5-1 体重と血糖値の経時的な変化

8 週から 18 週までの体重および血糖値の推移を観察した。Unpaired t test を用いて検定を行った。* $p < 0.05$ vs. control 群。

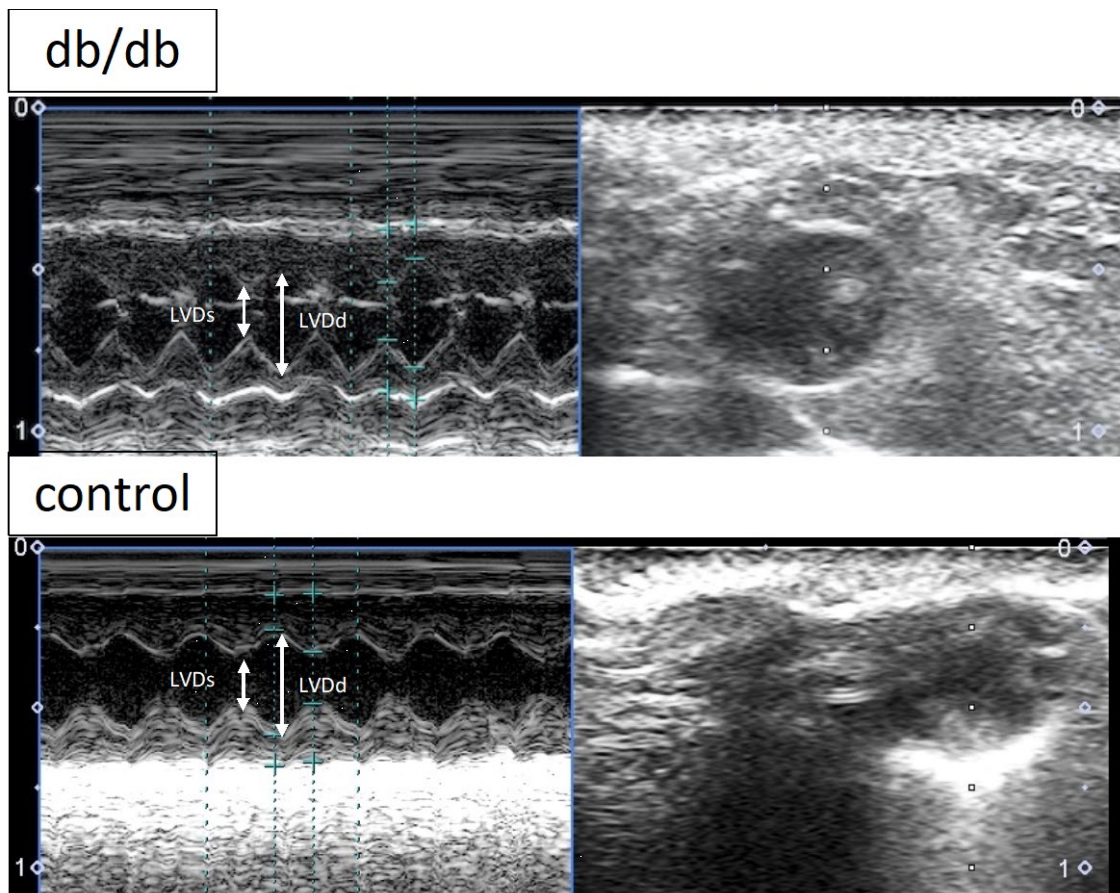


図 5-2 db/db 群および control 群の代表的な心エコー画像

db/db マウスおよびコントロールマウスの代表的な心エコー画像。胸骨傍短軸像乳頭筋レベル、M モード法で記録した。LVDd : left ventricular end-diastolic diameter (左室拡張末期径)、LVDs : left ventricular end-systolic diameter (左室収縮末期径)

表 5-2 16週齢での心エコー指標

データは平均±標準誤差。* $p < 0.05$ vs control群

	control群 (n=10)	db/db 群 (n=10)
心拍数, 回/分	628 ± 14	546 ± 7*
左室拡張末期径, mm	3.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1
左室収縮末期径, mm	1.4 ± 0.05	1.3 ± 0.09
左室内径短縮率, %	57.2 ± 0.9	57.9 ± 2.0
左室前壁厚, mm	1.1 ± 0.04	1.1 ± 0.05
左室後壁厚, mm	1.1 ± 0.04	1.1 ± 0.06

5.2 左室繊維化評価

図 5-2 に左室乳頭筋レベルのマッソントリクローム染色標本および繊維化率の比較の図を示す。両群ともに繊維化率は2%前後であり有意差を認めなかった。

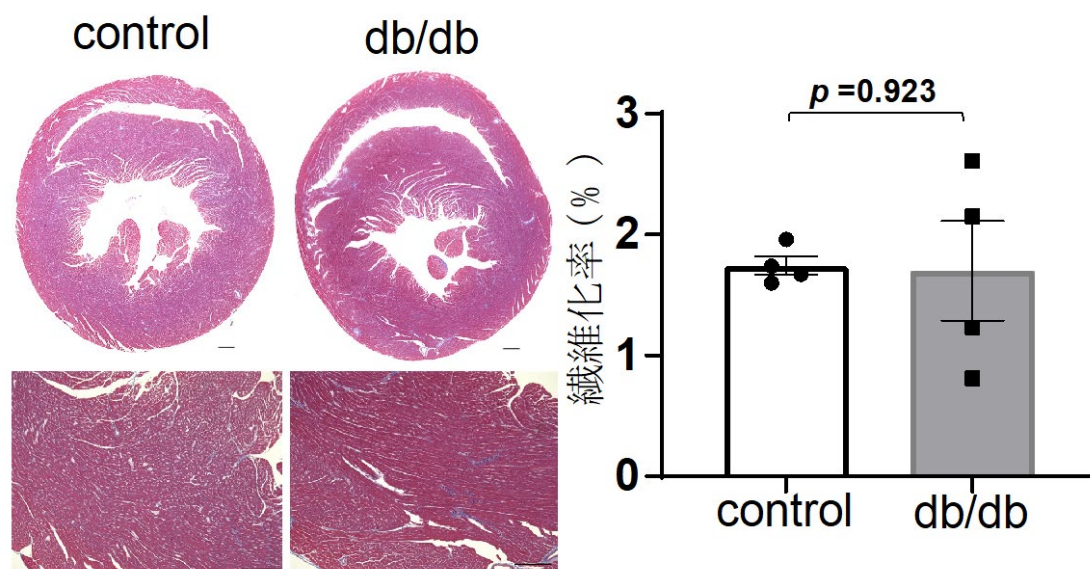


図 5-2 左室繊維化評価の図

(左) コントロールマウスおよび *db/db* マウスの代表的なマッソントリクローム染色標本の画像 (スケールバー; 上 300 μm、下 200 μm)。 (右) コントロール群、

db/db 群の心筋繊維化率の比較。データは平均値±標準誤差。Unpaired t test を用いて検定を行った。

5.3 血行動態評価

表 5-3 に 16 週齢でのマイクロマノメータチップカテーテルによる左室内圧測定の結果を示す。心エコー検査と同様に心拍数は有意に db/db 群で低下していたが、左室収縮期圧や左室内圧陽性最大変化率 + dP/dt、左室拡張末期圧に有意差を認めなかった。一方で、拡張能の指標とされる左室内圧陰性最大変化率 - dP/dt の絶対値および左室圧曲線の減衰時定数 τ は db/db 群で有意に低下、延長しており、16 週齢の db/db マウスは拡張障害を呈していることが示された。

表 5-3 16週齢での血行動態指標

データは平均±標準誤差。* $p < 0.05$ vs control群

	control群 (n=5)	db/db 群 (n=5)
心拍数, 回/分	496 ± 36	434 ± 44*
左室収縮期圧, mmHg	104 ± 10	106 ± 12
左室拡張末期圧, mmHg	2.8 ± 0.9	4.0 ± 1.7
+ dP/dt, mmHg/sec	9687 ± 1252	9710 ± 1124
- dP/dt, mmHg/sec	- 7609 ± 666	- 6512 ± 750*
Tau, msec	9.9 ± 0.77	13.5 ± 3.1*

5.4 不整脈誘発性評価

拡張障害期の糖尿病性心筋症のモデルである 16 週齢の db/db マウスの電気生理学的特性および心室性不整脈の誘発性を評価することと、エンパグリフロジンの心室性不整脈抑制効果を評価するためにランゲンドルフ灌流心を用いて評価を行った。

5.4.1 薬剤負荷による不整脈誘発性の評価

摘出したマウスの心臓への逆行性灌流を開始10分後に心拍が安定しているもの

を選択し、2倍のカルシウム濃度のTyrode液に1 μ Mのisoproterenolを添加した溶液を灌流して不整脈の誘発性を評価した。図5-3に示すようにdb/db群ではcontrol群と比較して有意に心室性期外収縮の発生数が増加していた。また、arrhythmia score (van der Werf et al., 2011)もdb/db群において有意に増加した。一方でエンパグリフロジン灌流することでそれらは有意に抑制された。しかし、VTの発生数や二段脈や2連発の期外収縮といったcomplex PVCの発生数には有意な差はみられなかった。

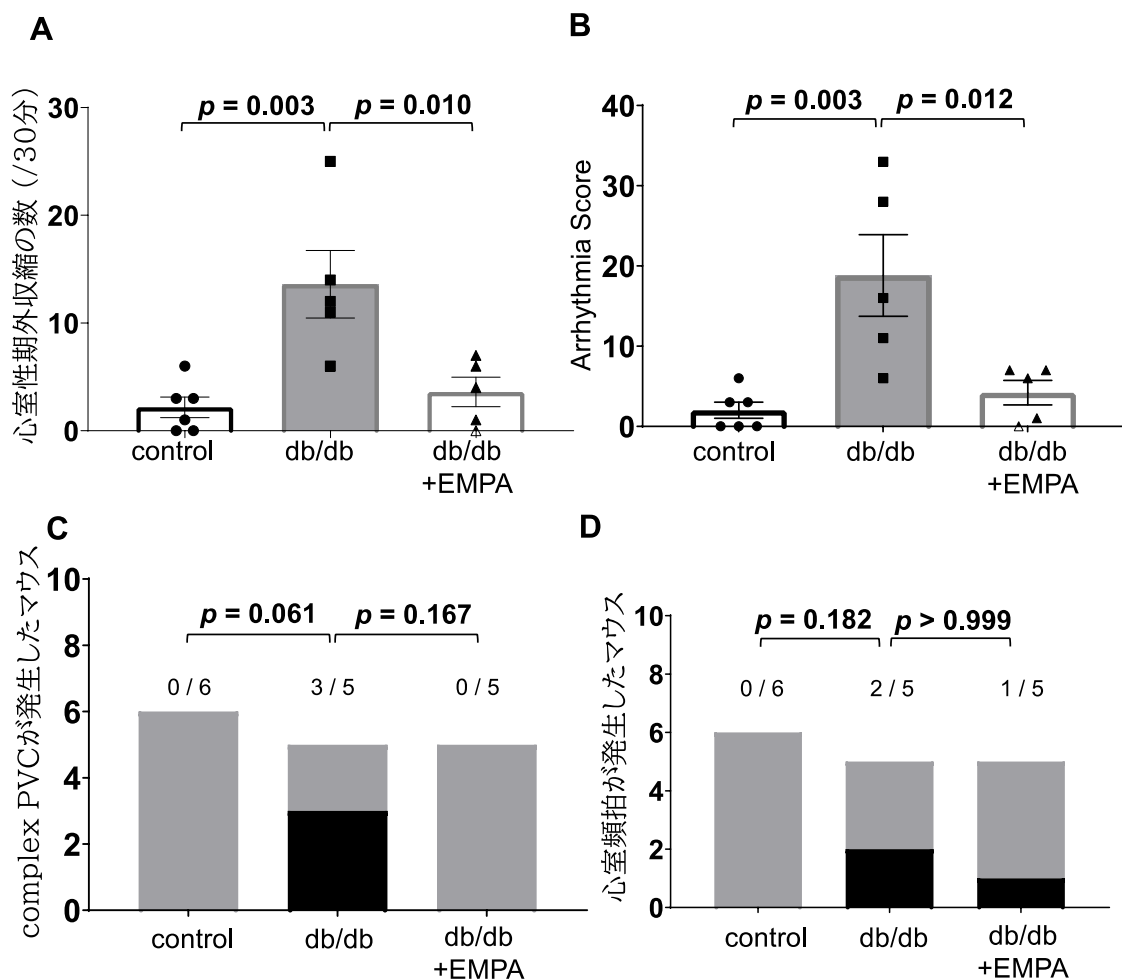


図 5-3 薬剤負荷による不整脈誘発性評価

30 分間の薬剤負荷による心室性期外収縮の発生数 (A)、arrhythmia score (B) complex PVC が発生したマウス数 (C) および心室頻拍が発生したマウス数 (D) の 3 群間の比較。(A) および (B) のデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。(C) (D) はフィッシャーの正確確率検定を用いて行った。

5.4.2 電気刺激による不整脈誘発性の評価

Isoproterenol を除去する目的での 10 分間のカルシウム Tyrode の灌流後に電気刺激による不整脈誘発性の評価を行った。①連続刺激法ではほぼすべての摘出心で刺激早期に 2:1 伝導となってしまうため、②期外刺激法のみでの評価を行うこととした。結果は電気刺激による心室頻拍の発生数は 3 群間で有意な差はみられなかった。

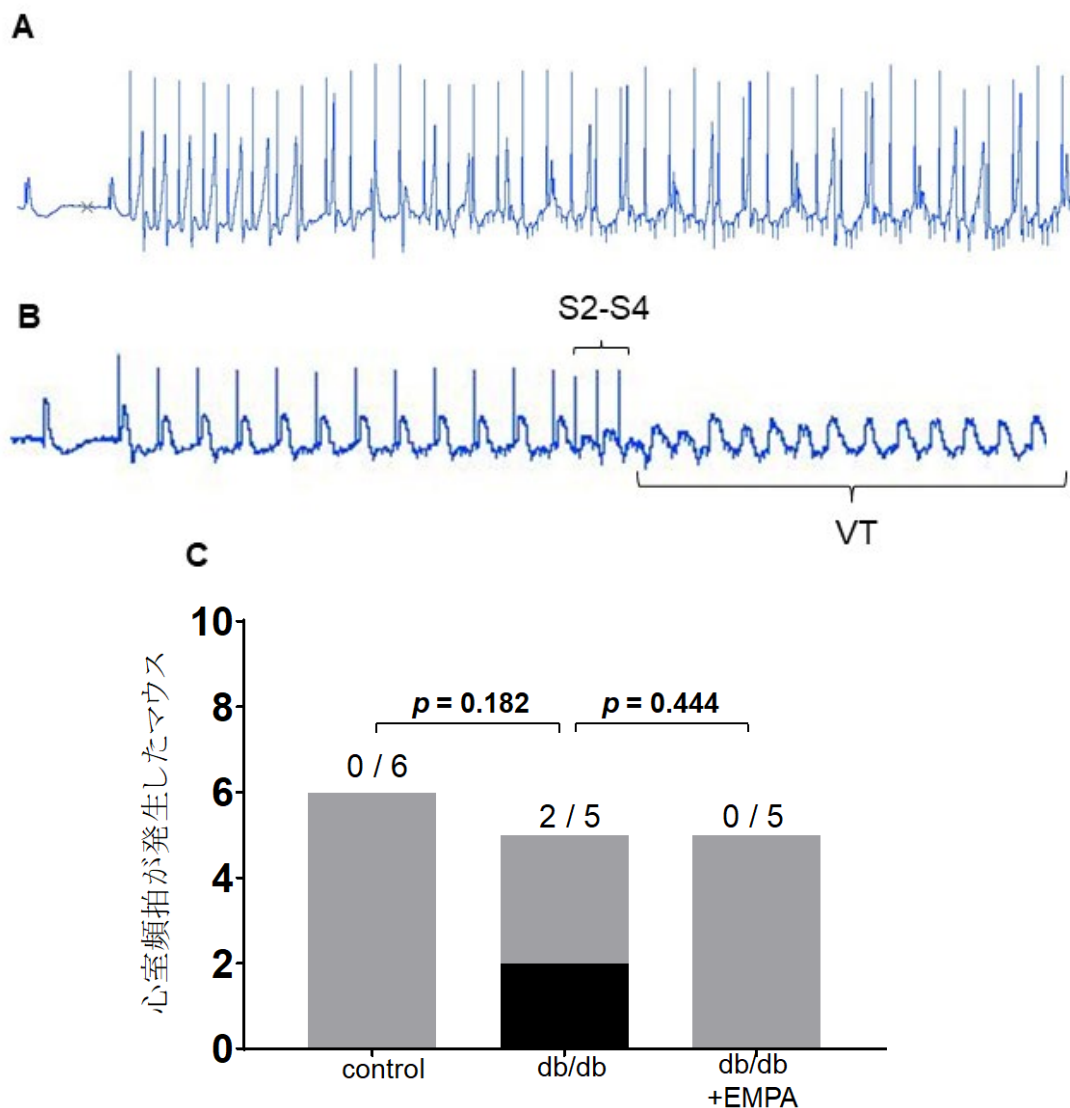


図 5-4 電気刺激による不整脈誘発性の評価

(A) 連続刺激法、(B) 期外刺激法の例。(C) 期外刺激法で心室頻拍が発生したマウスの数の 3 群間での比較。群間比較はフィッシャーの正確確率検定を用いて行った。

5.5 タンパク発現量評価

5.5.1 細胞内カルシウムハンドリング制御タンパクの発現量の比較

細胞内カルシウムハンドリングの制御にかかわるタンパク発現量及び、それらのエンパグリフロジンによる影響を比較するため、30 分間の通常 Tyrode 液およびエンパグリフロジン 1 μ M を含有する Tyrode 液を灌流した後の心筋のタンパク発現量を免疫ブロット法で評価した。RyR の発現量は 3 群間で有意差を認めなかったが[1.0 $\pm$ 0.16 (control, n = 8)、0.63 $\pm$ 0.08 (db/db, n = 8)、0.96 $\pm$ 0.08 (db/db + EMPA, n = 8)、 p = 0.013, one-way ANOVA]、CaMKII による RyR のリン酸化は db/db 群で有意に増加し、エンパグリフロジンの灌流により抑制された[1.0 $\pm$ 0.11 (control, n = 8)、1.76 $\pm$ 0.26 (db/db, n = 8)、1.13 $\pm$ 0.12 (db/db + EMPA, n = 8)、 p = 0.013, one-way ANOVA]。SERCA2a の発現量は 3 群間で有意差を認めなかった[1.0 $\pm$ 0.16 (control, n = 5)、0.83 $\pm$ 0.07 (db/db, n = 5)、0.81 $\pm$ 0.09 (db/db + EMPA, n = 5)、 p = 0.436, one-way ANOVA]。CaMKII の発現量に 3 群間で有意差を認めなかったが[1.0 $\pm$ 0.08 (control, n = 5)、1.17 $\pm$ 0.09 (db/db, n = 5)、1.19 $\pm$ 0.08 (db/db + EMPA, n = 5)、 p = 0.265, one-way ANOVA]、CaMKII の Thr286 の自己リン酸化は糖尿病で増加し、エンパグリフロジンの投与により有意に抑制される結果となった[1.0 $\pm$ 0.08 (control, n = 5)、1.38 $\pm$ 0.08 (db/db, n = 5)、1.02 $\pm$ 0.05 (db/db + EMPA, n = 5)、 p = 0.005, one-way ANOVA]。一方で、ホスホランバンの発現量に 3 群間で有意差はなく[1.0 $\pm$ 0.10 (control, n = 5)、1.54 $\pm$ 0.21 (db/db, n = 5)、1.26 $\pm$ 0.21 (db/db + EMPA, n = 5)、 p = 0.145, one-way ANOVA]、CaMKII によるホスホランバンの Thr17 のリン酸化も 3 群間で有意差を認めなかった[1.0 $\pm$ 0.26 (control, n = 5)、0.96 $\pm$ 0.15 (db/db, n = 5)、1.18 $\pm$ 0.17 (db/db + EMPA, n = 5)、 p = 0.722, one-way ANOVA]。以上の結果から、拡張障害期の糖尿病性心筋症の心室筋では CaMKII の自己リン酸化の増加により RyR の過リン酸化が増加しているが、エンパグリフロジンの投与によりこれらが抑制されることが示された。つまり、エンパグリフロジンは糖尿病性心筋症において活性化した CaMKII を抑制していることが分かった。一方で SERCA2a の制御タンパクであるホスホランバンの CaMKII のリン酸化は糖尿病では増加しないことがわかった。

5.5.2 心筋タンパクの O-GlcNAc 付加の比較

CaMKII による細胞内カルシウムハンドリング制御タンパクのリン酸化の増加およびエンパグリフロジンによる、これらのリン酸化の抑制のメカニズムとして CaMKII の翻訳後修飾の 1 つである O-GlcNAc 付加に注目し、心筋全体でのタン

パクの *O*-GlcNAc の評価をおこなった。db/db 群では心筋全体のタンパクの *O*-GlcNAc 付加が増加し、エンパグリフロジンの投与により有意に抑制された[1.0 ± 0.07 (control, $n = 5$)、 1.48 ± 0.14 (db/db, $n = 5$)、 1.03 ± 0.04 (db/db + EMPA, $n = 5$)、 $p = 0.005$ 、one-way ANOVA]。これらの結果から、心筋細胞で *O*-GlcNAc 付加が増加しており、エンパグリフロジンはこれを有意に抑制することで CaMKII の活性を抑制している可能性が示唆された。

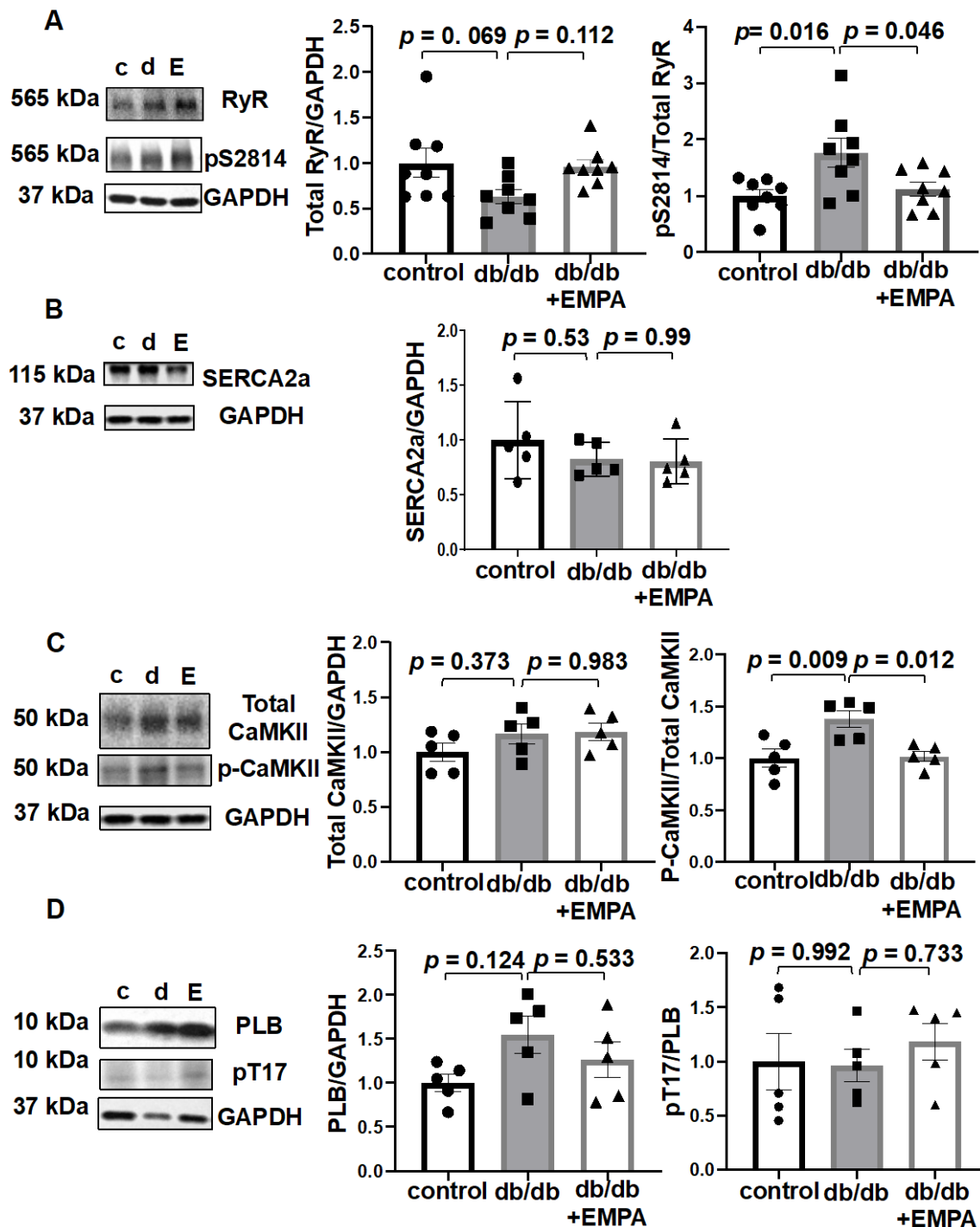


図 5-5 細胞内カルシウム制御タンパクの比較

(A) リアノジン受容体およびその CaMKII によるリン酸化(pSer2814)の比較、
 (B) SERCA2a の発現量の比較。(C) CaMKII およびその自己リン酸化
 (pThr286) の比較。(D) ホスホランバンおよびその CaMKII によるリン酸化
 (pThr17) の比較。GAPDH に対する各タンパクの発現量の比を計算した。control
 群のタンパク発現量を 1 として規格化したときのデータを示している。データは平

均値±標準誤差で示した。one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。

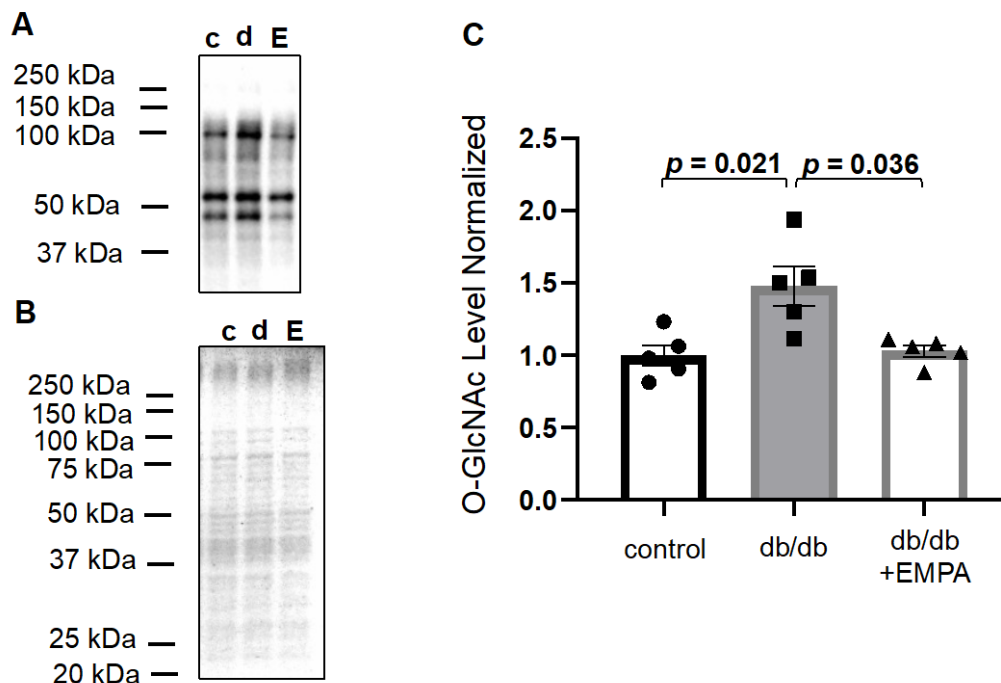


図 5-6 心室筋全体の *O*-GlcNAc の比較

免疫ブロット解析で心室筋全体の *O*-GlcNAc の発現を定量評価した。代表的な *O*-GlcNAc のブロットを示す (A)。CBB 染色の代表的なブロット (B)。control 群のタンパク発現量を 1 として規格化したときのデータ (C)。データは平均値±標準誤差で示した。one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。

5.6 選択的 SGLT2 阻害薬の心筋細胞グルコース取り込みへの影響

続いて SGLT2 受容体が発現していないはずの心室筋においてエンパグリフロジンが *O*-GlcNAc 付加を抑制するメカニズムとして、エンパグリフロジンが他のグルコーストランスポーターに作用して細胞へのグルコースの取り込みを抑制している可能性を考えた。そこで、2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose の細胞への取り込みを蛍光強度により比較することで細胞内へのグルコース取り込み能を検証した。結果は control マウス、*db/db* マウスどちらの心室筋細胞においてもエンパグリフロジンは細胞内へのグルコースの取り込みを抑制していた [1.0 ± 0.06 (control, $n = 30$ 、マウス 4 匹) vs. 0.76 ± 0.07 (control + EMPA, $n = 26$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.011$, unpaired t test], [1.0 ± 0.05 (*db/db*, $n =$

37、マウス 4 匹) vs. 0.65 ± 0.04 (control + EMPA、n = 37、マウス 4 匹)、 $p < 0.001$ 、unpaired t test]。以上の結果から、エンパグリフロジンが *O*-GlcNAc の基質であるグルコースの細胞内への取り込みを抑制することで *O*-GlcNAc 付加を抑制している可能性が示唆された。

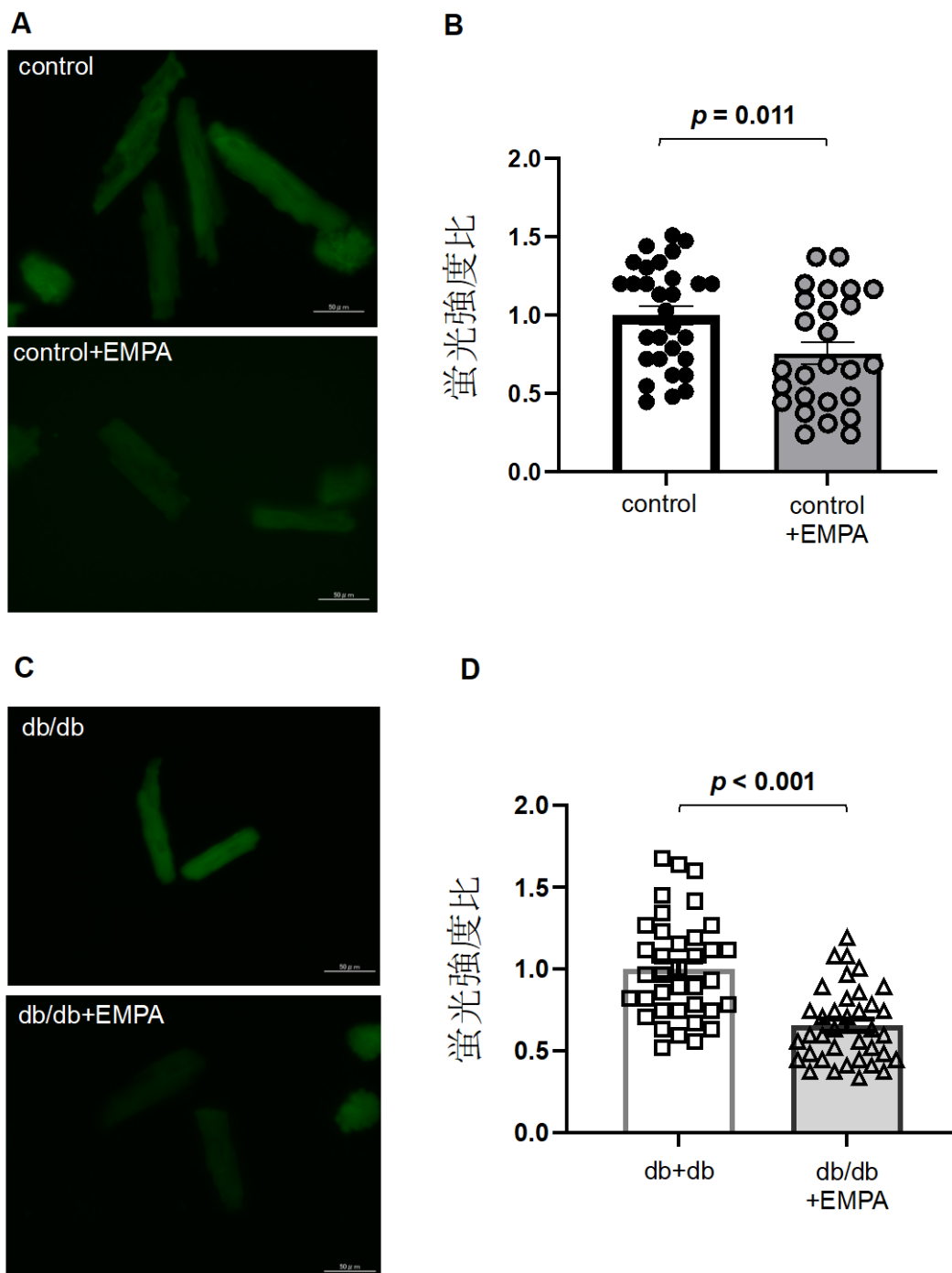


図 5-7 エンパグリフロジンの心室筋に対するグルコース取り込み抑制の評価

(A) 上 : control マウス、下 : control マウスにエンパグリフロジン (EMPA) を投与し、観察した代表的な画像 (スケールバー 50 μ m)。 (B) control 群の細胞の蛍光強度を 1 として規格化したときのデータ。 (C) 上 : *db/db* マウス、下 : *db/db* マウスにエンパグリフロジン (EMPA) を投与し、観察した代表的な画像 (スケールバー 50 μ m)。 (D) *db/db* 群の細胞の蛍光強度を 1 として規格化したときのデータ。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。Unpaired t test を用いて検定を行った。

5.7 エンパグリフロジンの細胞内カルシウムハンドリング改善効果

エンパグリフロジンの心室性期外収縮抑制効果は細胞内カルシウムハンドリング改善効果を介するものであるという仮説の元で細胞内カルシウム動態の観察をおこなった。また、既報から選択的SGLT2阻害薬の作用機序はNHEを介するものではないかと考え、その阻害薬であるカリポライド(cariporide)を用いた検証を並行して行った(Mustroph et al., 2018; Uthman et al., 2018)。

5.7.1 カルシウムウェーブの評価

カルシウムウェーブの数は control 群と比較して *db/db* 群で有意に増加し、エンパグリフロジンで有意に抑制された。エンパグリフロジンに追加して *O*-GlcNAcase の阻害薬であるチアメット G (ThmG) を投与することで再度カルシウムウェーブは増加した[1.4 ± 0.46 (control, $n=20$ 、マウス 4 匹)、 4.16 ± 0.72 (*db/db*, $n=19$ 、マウス 5 匹)、 1.33 ± 0.73 (*db/db* + EMPA, $n=15$ 、マウス 4 匹)、 4.77 ± 1.23 (*db/db* + EMPA + ThmG, $n=17$ 、マウス 4 匹)、 $p=0.003$, one-way ANOVA]。カルシウムウェーブがみられた細胞数に関しても同様の結果であった[40.0 % (control, $n=20$ 、マウス 4 匹)、84.2 % (*db/db*, $n=19$ 、マウス 5 匹)、26.7 % (*db/db* + EMPA, $n=15$ 、マウス 4 匹)、76.5 % (*db/db* + EMPA + ThmG, $n=17$ 、マウス 4 匹)、フィッシャーの正確検定]。一方で当初エンパグリフロジンの作用部位として想定していた、NHE の阻害薬であるカリポライドを *db/db* マウスの単離心筋細胞に投与することでも有意なカルシウムウェーブ数の抑制効果が見られたが[4.00 ± 0.64 (*db/db*, $n=17$ 、マウス 4 匹)、 2.06 ± 0.61 (*db/db* + cariporide, $n=17$ 、マウス 5 匹)、 $p=0.036$, unpaired t test]、カルシウムウェーブが見られた細胞数に関しては有意差が見られなかった[88.2 % (*db/db*, $n=17$ 、マウス 4 匹)、47.1 % (*db/db* + cariporide, $n=17$ 、マウス 5 匹)、 $p=0.057$, フィッシャーの正確検定]。

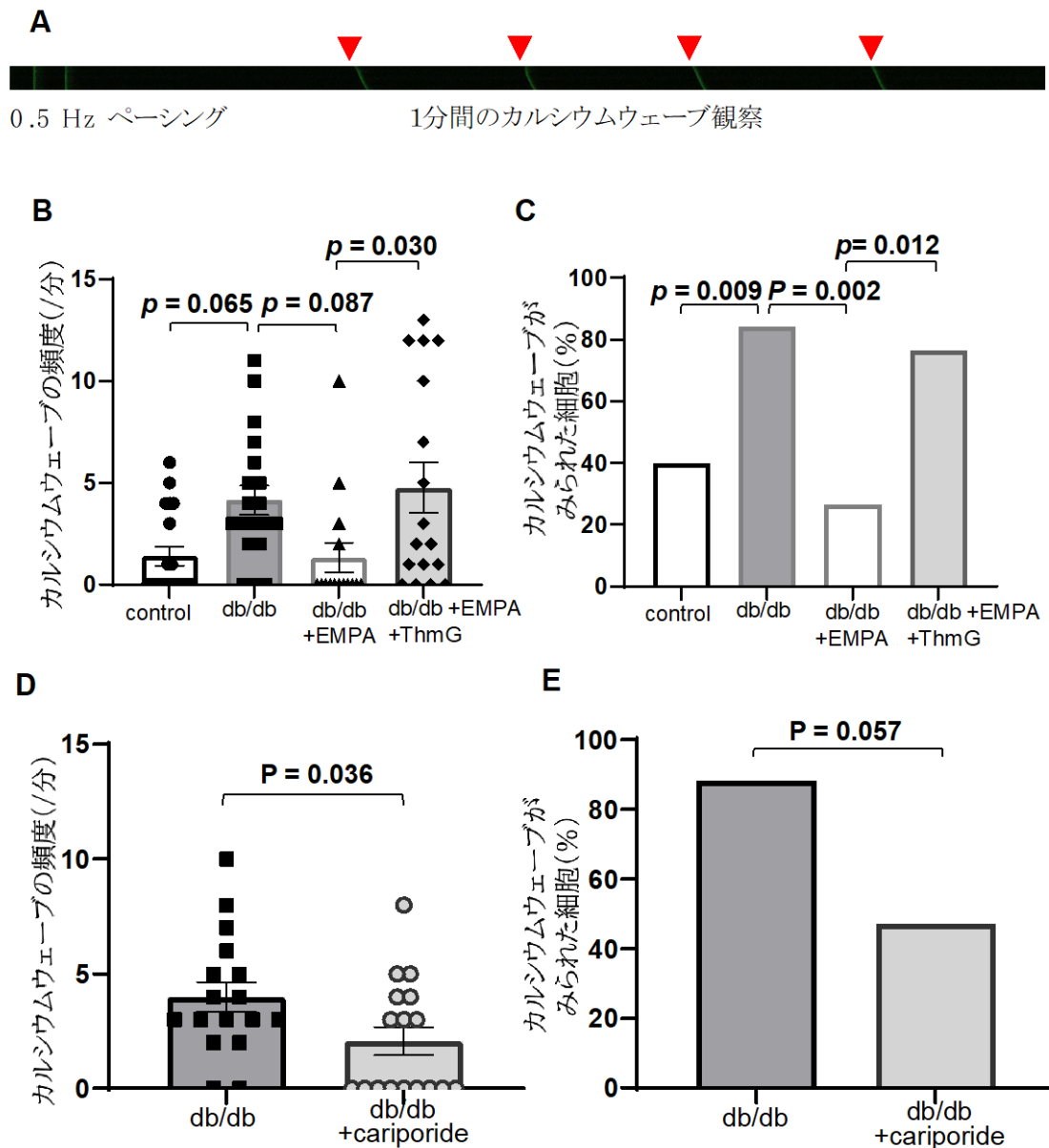


図 5-8 カルシウムウェーブの評価

(A) カルシウムウェーブ (▼) のラインスキャンモードによる記録の代表的画像。control 群、db/db 群、db/db+EMPA 群、db/db+EMPA+ThmG 群の 1 分間当たりのカルシウムウェーブの頻度 (B) および 1 分間の観察によりカルシウムウェーブがみられた細胞の割合 (C) の比較。db/db 群、db/db+cariporide 群の 1 分間当たりのカルシウムウェーブの頻度 (D) および 1 分間の観察によりカルシウムウェーブがみられた細胞の割合 (E) の比較。(B) (D) のデータは平均値±標準誤差。(B) (C) は one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。(D) (E) は unpaired t test を用いて検定を行った。

5.7.2 カルシウムスパークの評価

カルシウムスパークの頻度は control 群と比較して db/db 群で有意に増加し、エンパグリフロジンで有意に抑制された。エンパグリフロジンに追加して *O*-GlcNAcase の阻害薬であるチアメット G を投与することで再度カルシウムスパークは増加した[0.82 ± 0.17 (control、n = 12、マウス 4 匹)、 3.07 ± 0.39 (db/db、n = 22、マウス 4 匹)、 1.18 ± 0.23 (db/db + EMPA、n = 24、マウス 4 匹)、 2.49 ± 0.52 (db/db + EMPA + ThmG、n = 17、マウス 6 匹)、 $p < 0.001$ 、one-way ANOVA]。一方でカリポライドを db/db マウスの単離心筋細胞に投与してもカルシウムスパークの頻度の低下は得られなかった[3.01 ± 0.35 (db/db、n = 20、マウス 4 匹)、 2.46 ± 0.60 (db/db + cariporide、n = 23、マウス 5 匹)、 $p = 0.450$ 、unpaired t test]。

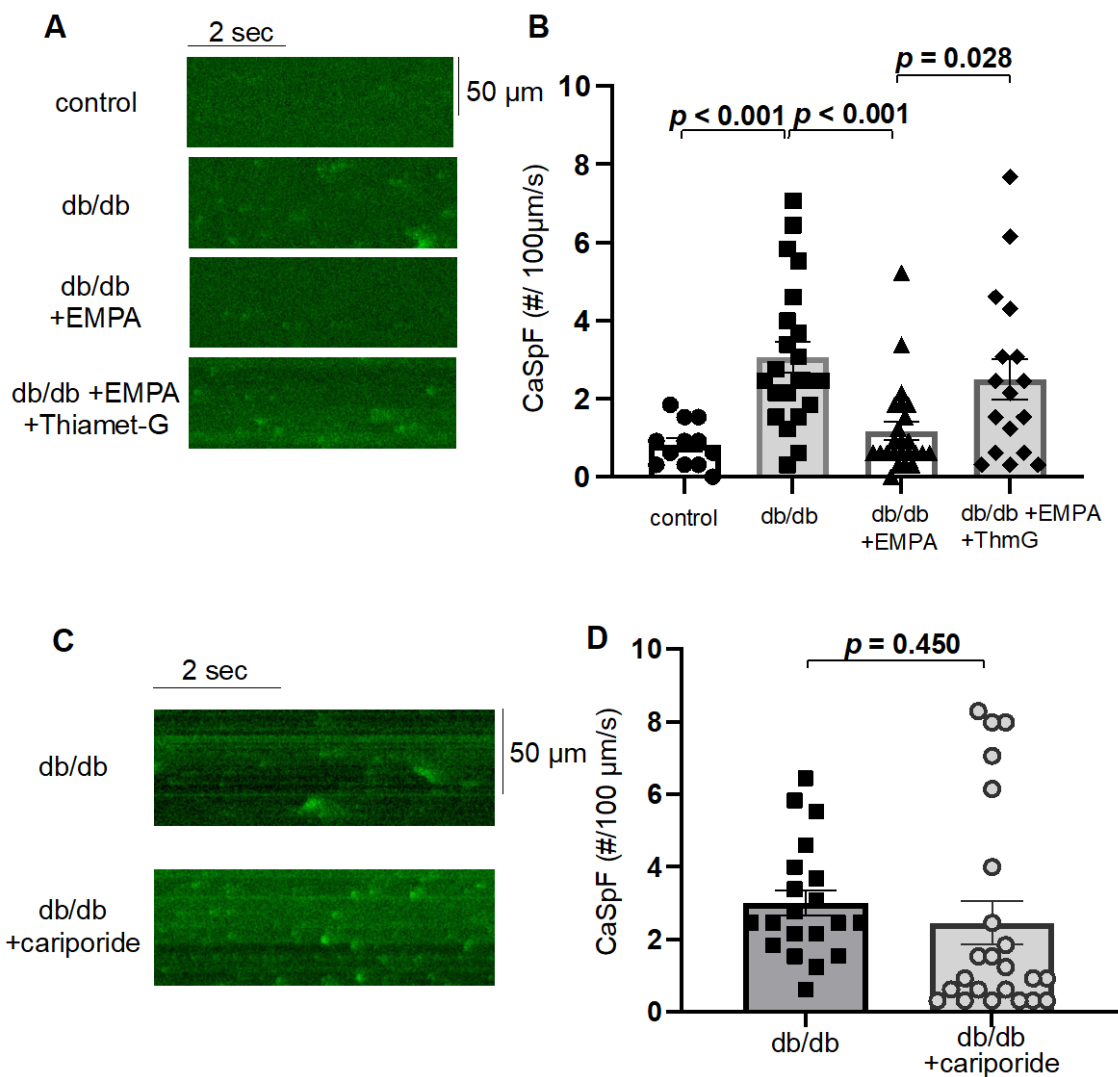


図 5-9 カルシウムスパークの評価

(A) (C) 各群のカルシウムスパークのラインスキャンモードによる記録の代表的画像。(B) control 群、db/db 群、db/db+EMPA 群、db/db+EMPA+ThmG 群のカルシウムスパークの頻度。(D) db/db 群、db/db+cariporide 群のカルシウムスパークの頻度。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。(B) は one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。(D) は unpaired t test を用いて検定を行った。

5.7.3 小胞体内カルシウム含有量の評価

小胞体のカルシウム含有量进行评估する目的で、10 mM のカフェインの急速投与を行った。control 群と比較して db/db 群では小胞体カルシウム含有量の有意な低下を認めたが、エンパグリフロジンを投与することで小胞体カルシウム含有量

の有意な増加が認められた。しかし、エンパグリフロジンに加えてチアメット G を投与することで、再度小胞体カルシウム含有量の有意な低下を認めた[12.70 ± 1.01 (control、n = 13、マウス 10 匹)、 8.00 ± 0.58 (db/db、n = 16、マウス 9 匹)、 11.33 ± 0.69 (db/db + EMPA、n = 13、マウス 10 匹)、 7.31 ± 0.69 (db/db + EMPA + ThmG、n = 10、マウス 9 匹)、 $p < 0.001$ 、one-way ANOVA]。一方で、カリポライドの投与では小胞体カルシウム含有量の有意な増加は認められなかった[7.81 ± 0.42 (db/db、n = 12、マウス 7 匹)、 9.02 ± 0.91 (db/db + cariporide、n = 9、マウス 5 匹)、 $p = 0.202$ 、unpaired t test]。

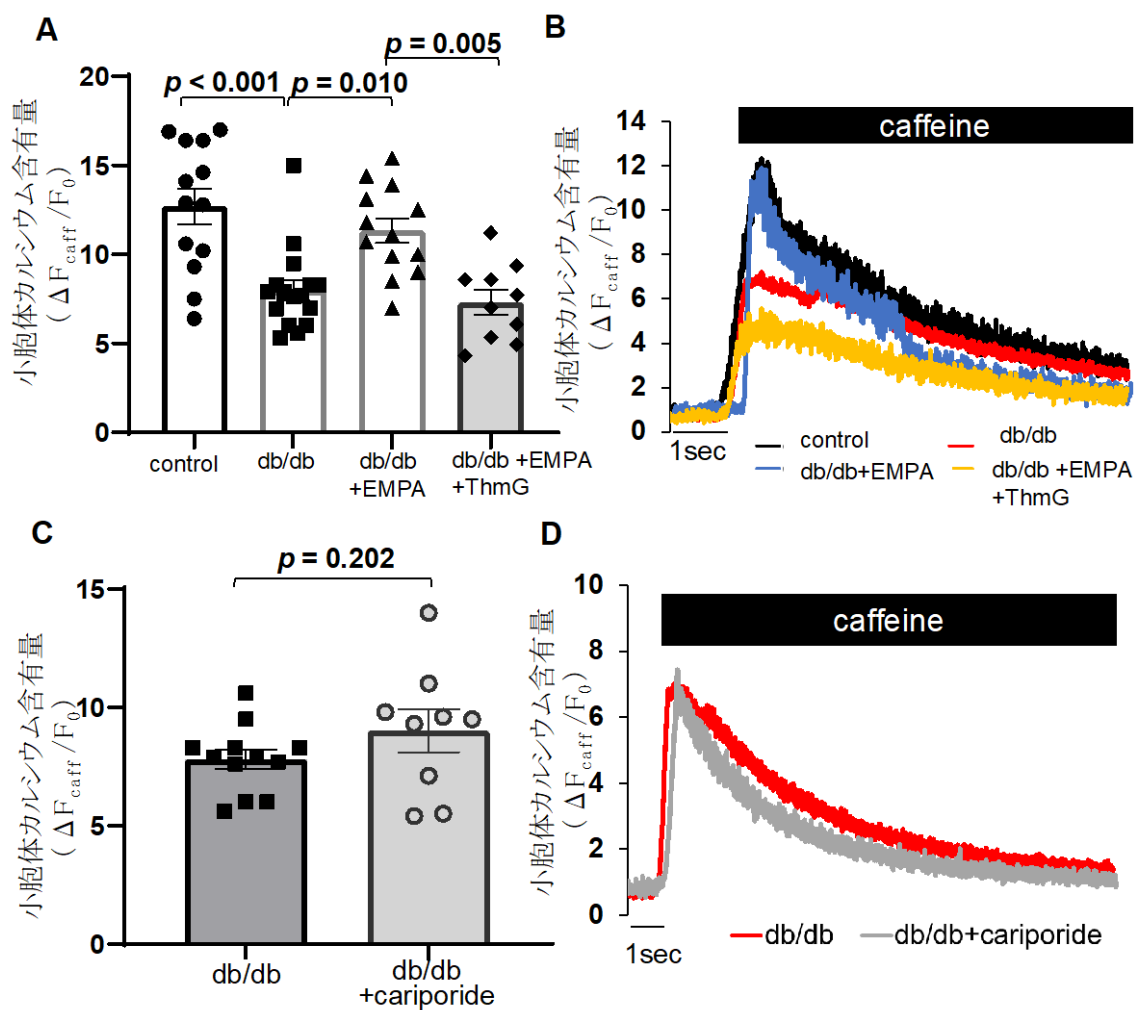


図 5-10 小胞体のカルシウム含有量の評価

カルシウム蛍光色素染色をおこなったマウスの心筋細胞を共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードで撮像した。電気刺激で定常状態に達したのちに刺激を停止した後からカフェイン滴下までの蛍光強度の平均値を F_0 とし、 F_0 との比 ($\Delta F_{\text{caff}}/F_0$) を求めた。(A) control 群、db/db 群、db/db+EMPA 群、db/db+EMPA+ThmG 群

の小胞体カルシウム含有量のグラフ、(B) 各群の代表的な蛍光強度比のプロット、(C) db/db 群、db/db+cariporide 群の小胞体カルシウム含有量のグラフ、(D) db/db 群、db/db+cariporide 群のカフェイン投与時の蛍光強度比のプロット。データは平均値±標準誤差で示した。(A) は one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。(C) は unpaired t test を用いて検定を行った。

5.7.4 電気刺激によるカルシウムトランジェント

5.7.4-1 電気刺激によるカルシウムトランジェントへのエンパグリフロジンの影響の評価

0.5Hz で field stimulation をおこない定常状態に達した後、ラインスキャンモードで撮像し、カルシウムトランジェントの評価を行った。カルシウムトランジェントの波高値は control マウスと比較して db/db マウスで有意に低下し、エンパグリフロジンの投与により有意に改善した。エンパグリフロジンにチアメット G を追加投与しても波高値に変化はみられなかった[5.86 ± 0.29 (control、n = 28、マウス 4 匹)、 4.67 ± 0.27 (db/db、n = 35、マウス 5 匹)、 5.93 ± 0.39 (db/db + EMPA、n = 29、マウス 4 匹)、 6.07 ± 0.31 (db/db + EMPA + ThmG、n = 32、マウス 6 匹)、 $p = 0.004$ 、one-way ANOVA]。カルシウムトランジェントの減衰時間の時定数 τ は control マウスと比較して db/db マウスで有意に延長し、エンパグリフロジンの投与により有意に短縮した。エンパグリフロジンにチアメット G を追加投与しても τ には有意な変化がみられなかった[121.5 ± 5.04 (control、n = 28、マウス 4 匹)、 183.2 ± 13.01 (db/db、n = 35、マウス 5 匹)、 112.8 ± 11.99 (db/db + EMPA、n = 29、マウス 4 匹)、 142.6 ± 11.58 (db/db + EMPA + ThmG、n = 32、マウス 4 匹)、 $p < 0.001$ 、one-way ANOVA]。カルシウムトランジェントの半減期は control マウスと比較して db/db マウスで有意に延長し、エンパグリフロジンを投与することで有意に短縮した。しかし、エンパグリフロジンにチアメット G を追加投与することで有意な延長がみられた[90.84 ± 7.64 (control、n = 28、マウス 4 匹)、 125.5 ± 8.97 (db/db、n = 35、マウス 5 匹)、 70.43 ± 8.34 (db/db + EMPA、n = 29、マウス 4 匹)、 120.6 ± 9.68 (db/db + EMPA + ThmG、n = 32、マウス 6 匹)、 $p < 0.001$ 、one-way ANOVA]。

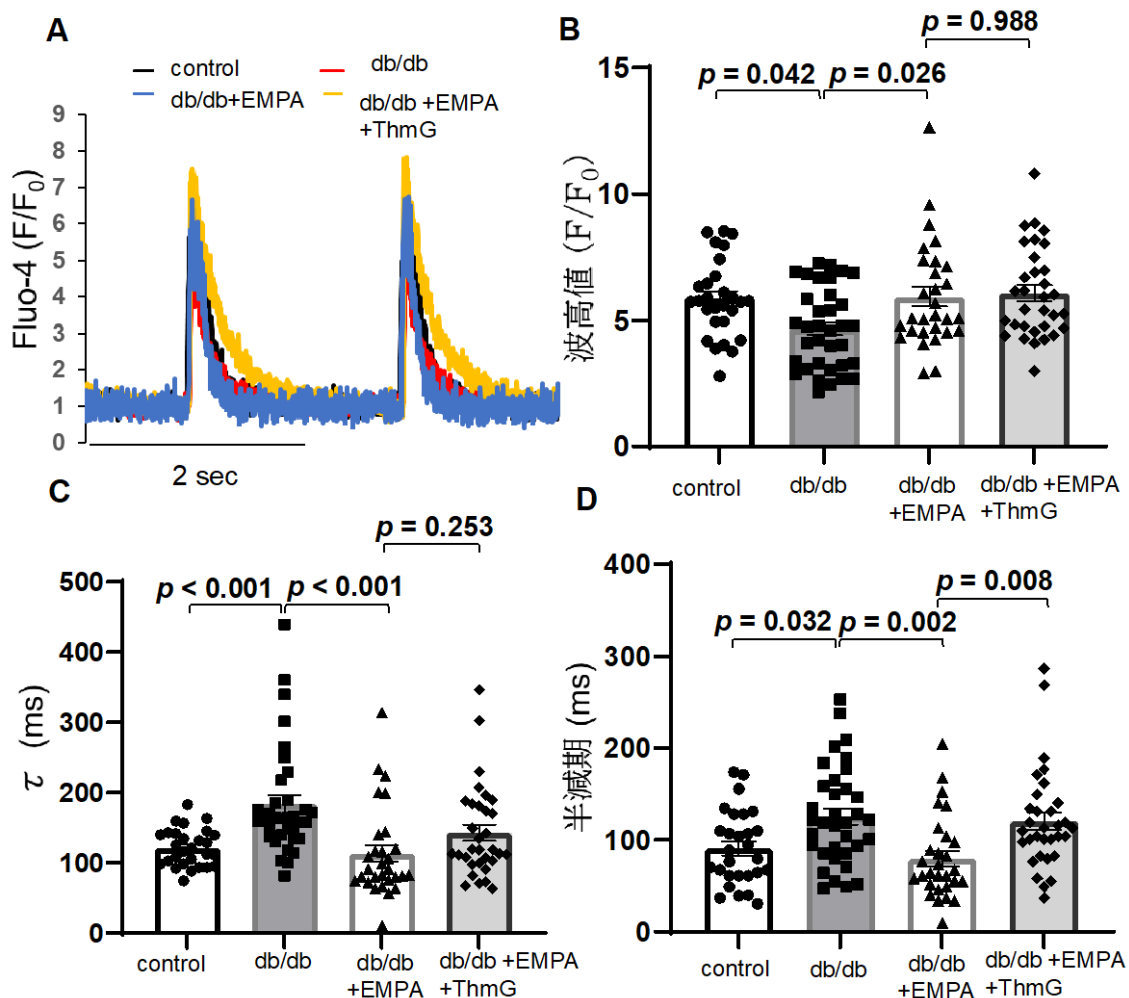


図 5-11 エンパグリフロジンのカルシウムトランジェントに与える影響

カルシウム蛍光色素染色をおこなったマウスの心筋細胞を共焦点レーザー顕微鏡のラインスキャンモードで撮像した。Field stimulation で定常状態に達したのちに記録を行った。(A) 各群の代表的な蛍光強度比のプロット。(B) 各群のカルシウムトランジェントの波高値のグラフ。(C) 各群のカルシウムトランジェントの減衰時間の時定数 τ のグラフ。(D) 各群のカルシウムトランジェントの半減期のグラフ。データは平均値±標準誤差で示した。one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。

5.7.4-2 電気刺激によるカルシウムトランジェントへのカリポライドの影響の評価

db/db マウスの心筋細胞におけるカルシウムトランジェントの波高値はカリポライドの投与により増加する傾向を認めたが、有意な差ではなかった[4.70 ± 0.31 (db/db, $n = 26$ 、マウス 4 匹)、 5.53 ± 0.29 (db/db + cariporide, $n = 31$ 、マウ

ス 5 匹)、 $p = 0.055$ 、unpaired t test]。カルシウムトランジェントの減衰時間の時定数 τ はカリポライドの投与より有意に短縮した [171.0 ± 12.17 (db/db、 $n = 26$ 、マウス 4 匹)、 129.1 ± 6.56 (db/db + cariporide、 $n = 31$ 、マウス 5 匹)、 $p = 0.003$ 、unpaired t test]。カルシウムトランジェントの半減期はカリポライドを投与しても変化がみられなかった [119.4 ± 9.88 (db/db、 $n = 26$ 、マウス 4 匹)、 115.4 ± 5.47 (db/db + cariporide、 $n = 31$ 、マウス 5 匹)、 $p = 0.716$ 、unpaired t test]。

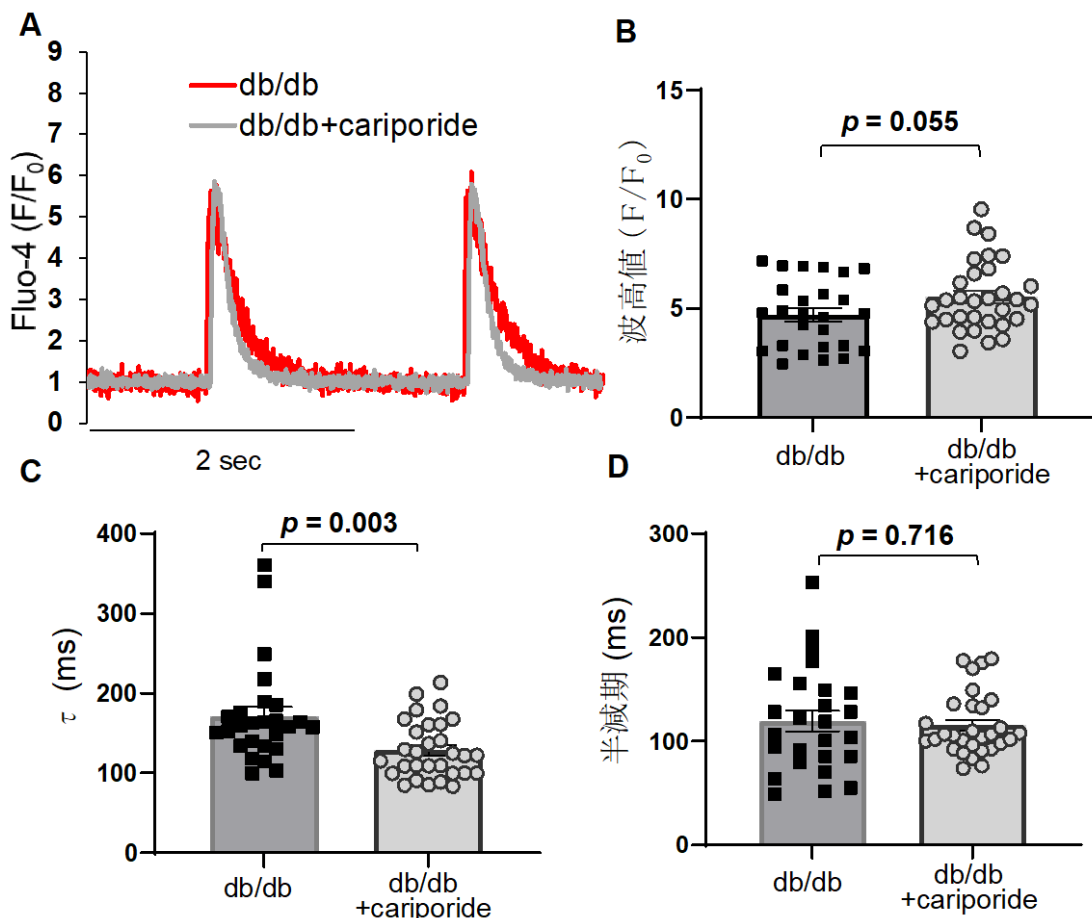


図 5-12 カリポライドがカルシウムトランジェントに与える影響

(A) 各群の代表的な蛍光強度比のプロット。(B) 各群のカルシウムトランジェントの波高値のグラフ。(C) 各群のカルシウムトランジェントの減衰時間の時定数 τ のグラフ。(D) 各群のカルシウムトランジェントの半減期のグラフ。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。検定は unpaired t test を用いて行った。

以上の細胞内カルシウム制御タンパクの発現量の評価と細胞内カルシウム観察の結果から、①db/db マウスの心室筋細胞では CaMKII の活性化によりリアノジ

ン受容体の過リン酸化が起こり、カルシウムスパークを一つの指標とする、小胞体からのカルシウムリークが増加し、小胞体のカルシウム含有量が低下することで、細胞質内の拡張期カルシウム濃度が増加し、カルシウムウェーブが増加していること、②エンパグリフロジンはCaMKIIによるリアノジン受容体の過リン酸化を抑制し、カルシウムリークを減少させることで細胞質内の拡張期カルシウム濃度を減少させることが示された。しかし、エンパグリフロジンはSERCA2a機能の一つの指標であるカルシウムトランジェントの半減期を有意に減少させたが、従来エンパグリフロジンの作用部位として提唱されていたナトリウム-水素交換輸送体の阻害薬であるカリポライドでは同様の結果が得られなかった。そこで、さらにSERCA2aの機能について細胞内カルシウム動態の面から詳細に評価するために、既報を参考にカフェイン急速投与時のカルシウムトランジェントおよびfield stimulation時のカルシウムトランジェントそれぞれの減衰時間の時定数 τ からSERCA2aの機能およびNCXの活動性を算出し、評価を追加した(Sato et al., 2021) (Hohendanner et al., 2015)。

5.7.5 SERCA2aの機能およびNCXの活動性の評価

controlマウスと比較してdb/dbマウスではSERCA2aの機能が有意に低下していたが、エンパグリフロジンを投与することで有意な改善が得られた。エンパグリフロジンにチアメットGを加えることでSERCA2aの機能は有意に低下した[7.35 ± 0.48 (control, n = 11, マウス 8 匹)、 4.51 ± 0.55 (db/db, n = 16, マウス 10 匹)、 8.32 ± 0.90 (db/db + EMPA, n = 12, マウス 9 匹)、 5.47 ± 0.77 (db/db + EMPA + ThmG, n = 10, マウス 7 匹)、 $p < 0.001$, one-way ANOVA]。一方でカリポライドの投与はdb/dbマウスのSERCA2aの機能に有意な影響を与えなかった[5.57 ± 0.64 (db/db, n = 10, マウス 6 匹)、 5.75 ± 1.20 (db/db + cariporide, n = 6, マウス 4 匹)、 $p = 0.887$, unpaired t test]。それに対してNCX活動性はcontrolマウスと比較してdb/dbマウスでは機能が亢進しており、エンパグリフロジンを投与することで低下がみられた。エンパグリフロジンにチアメットGを追加投与してもエンパグリフロジンの効果を完全には打ち消さなかった[130.9 ± 11.07 (control, n = 11, マウス 8 匹)、 236.3 ± 26.04 (db/db, n = 16, マウス 10 匹)、 125.1 ± 10.91 (db/db + EMPA, n = 12, マウス 9 匹)、 201.9 ± 30.39 (db/db + EMPA + ThmG, n = 10, マウス 7 匹)、 $p = 0.001$, one-way ANOVA]。カリポライドはdb/dbマウスのNCXの活動性には有意な影響を与えなかった[191.0 ± 24.46 (db/db, n = 10, マウス 6 匹)、 179.2 ± 28.37 (db/db + cariporide, n = 6, マウス 4 匹)、 $p = 0.764$, unpaired t test]。以上の結果から、エンパグリフロジンは

SERCA2a の機能を改善するが、カリポライドは同様の効果を持たないことが示された。

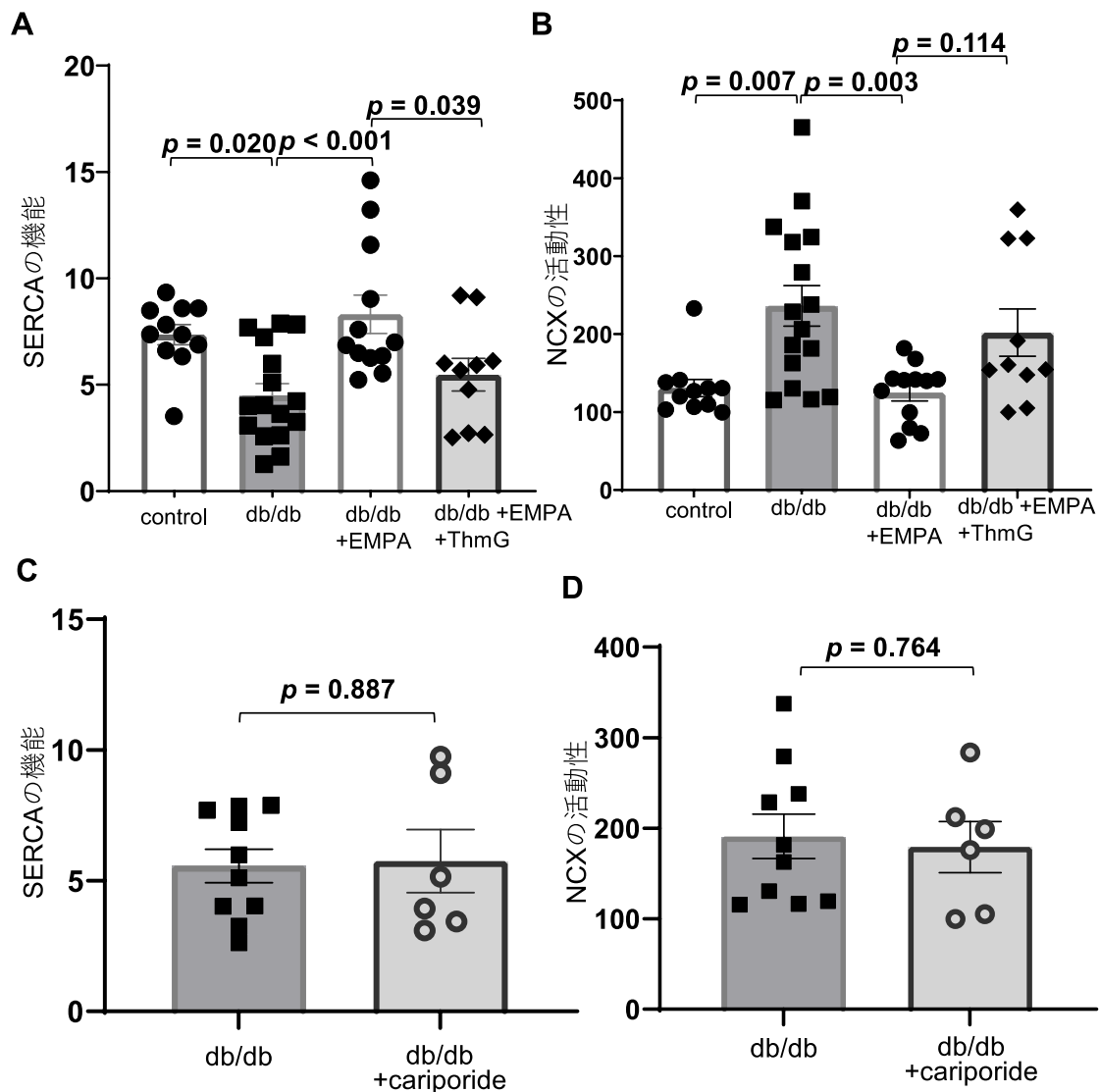


図 5-13 エンパグリフロジンおよびカリポライドが SERCA2a の機能及び NCX の活動性に与える影響

(A) control 群、db/db 群、db/db+EMPA 群、db/db+EMPA+ThmG 群の SERCA2a の機能のグラフ。(B) control 群、db/db 群、db/db+EMPA 群、db/db+EMPA+ThmG 群の NCX activity のグラフ。(C) db/db 群および db/db+cariporide 群の SERCA2a の機能のグラフ。(D) db/db 群および db/db+cariporide 群の NCX activity のグラフ。データは平均値±標準誤差で示した。(A) (B) は one-way analysis of variance (ANOVA) を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法を用いた。(C) (D) は unpaired t test を用いて検定を行った。

5.8 細胞内カルシウムハンドリングに対する *O*-GlcNAc 付加の影響

O-GlcNAc 付加の心室筋細胞内カルシウムハンドリングに与える影響を検討するために、control マウスの単離心筋細胞に対して、*O*-GlcNAcase 阻害薬であるチアメット G を投与してカルシウムハンドリングの評価を行った。チアメット G を投与することで control マウスの単離心筋細胞と比較して、カルシウムウェーブの頻度は増加し[0.64 ± 0.24 (control, $n = 25$ 、マウス 4 匹)、 3.88 ± 0.77 (control + Thiamet-G, $n = 25$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.036$, unpaired t test]、カルシウムウェーブがみられた細胞数も有意に増加した[28.0% (control, $n = 25$ 、マウス 4 匹)、 76.0% (control + Thiamet-G, $n = 25$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.002$ 、フィッシャーの正確検定]。カルシウムスパークに関しても同様で、チアメット G を投与することで有意な頻度の増加を認めた[1.30 ± 0.27 (control, $n = 22$ 、マウス 4 匹)、 2.19 ± 0.30 (control + Thiamet-G, $n = 24$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.033$, unpaired t test]。小胞体のカルシウム含有量はチアメット G を投与することで低下する傾向がみられた[12.18 ± 0.95 (control, $n = 13$ 、マウス 4 匹)、 9.66 ± 1.02 (control + Thiamet-G, $n = 12$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.084$, unpaired t test]。カルシウムトランジェントについては、波高値が有意に低下し[7.97 ± 0.53 (control, $n = 36$ 、マウス 4 匹)、 6.22 ± 0.37 (control + Thiamet-G, $n = 33$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.001$, unpaired t test]、減衰時間の τ [184.9 ± 9.07 (control, $n = 36$ 、マウス 4 匹)、 241.1 ± 18.12 (control + Thiamet-G, $n = 33$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.006$, unpaired t test]、半減期[128.2 ± 6.29 (control, $n = 36$ 、マウス 4 匹)、 166.8 ± 12.52 (control + Thiamet-G, $n = 33$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.006$, unpaired t test]はどちらも延長していた。また、SERCA2a の機能は低下し [5.92 ± 0.54 (control, $n = 12$ 、マウス 4 匹)、 4.14 ± 0.57 (control + Thiamet-G, $n = 8$ 、マウス 4 匹)、 $p = 0.040$, unpaired t test]、NCX 機能は亢進している [167.6 ± 14.29 (control, $n = 12$)、 244.0 ± 35.7 (control + Thiamet-G, $n = 8$)、 $p = 0.036$, unpaired t test] という結果が得られた。以上の結果から、*O*-GlcNAc 付加は小胞体からのカルシウムリークを増加し、小胞体のカルシウム含有量を低下させていた。さらに、カルシウムトランジェントについても *db/db* マウスの単離心筋細胞でみられたものと同様に波高値を低下させ、減衰時間の τ および半減期を延長させる効果がみられた。

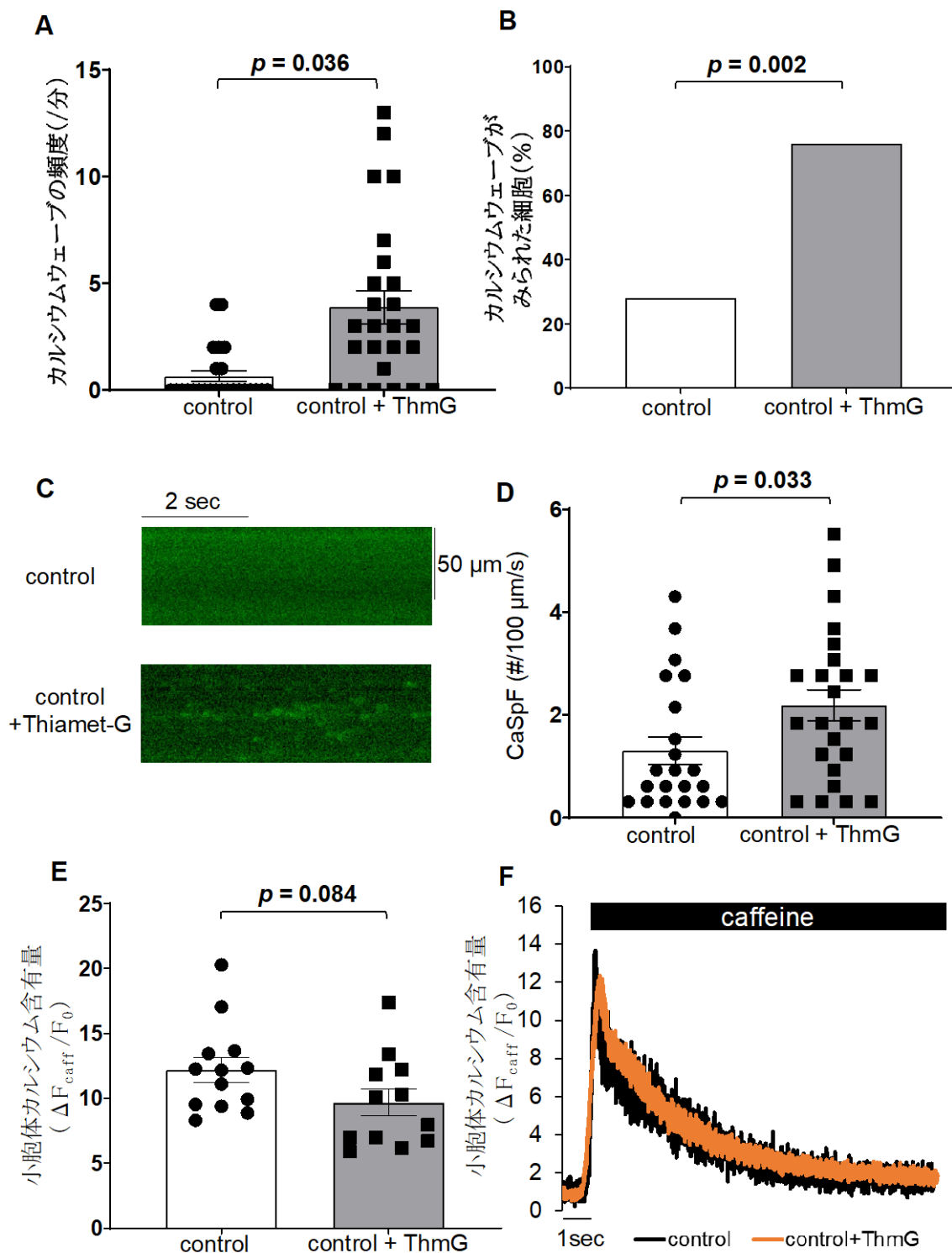


図 5-14 チアメット G を control マウスの単離心筋細胞に投与した際のカルシウムウェーブ、カルシウムスパーク、小胞体カルシウム含有量の変化

(A) 1 分間にみられたカルシウムウェーブの頻度のグラフ、(B) 1 分間でカルシウムウェーブがみられた細胞の割合、(C) 各群の代表的なカルシウムスパークのラインスキャンモードによる記録の代表的画像、(D) カルシウムスパークの頻度

のグラフ、(E) 小胞体カルシウム含有量のグラフ、(F) 代表的なカフェイン投与によるカルシウムトランジェントの蛍光強度比のプロット。データは平均値±標準誤差で示した。検定は unpaired t test を用いて行った。

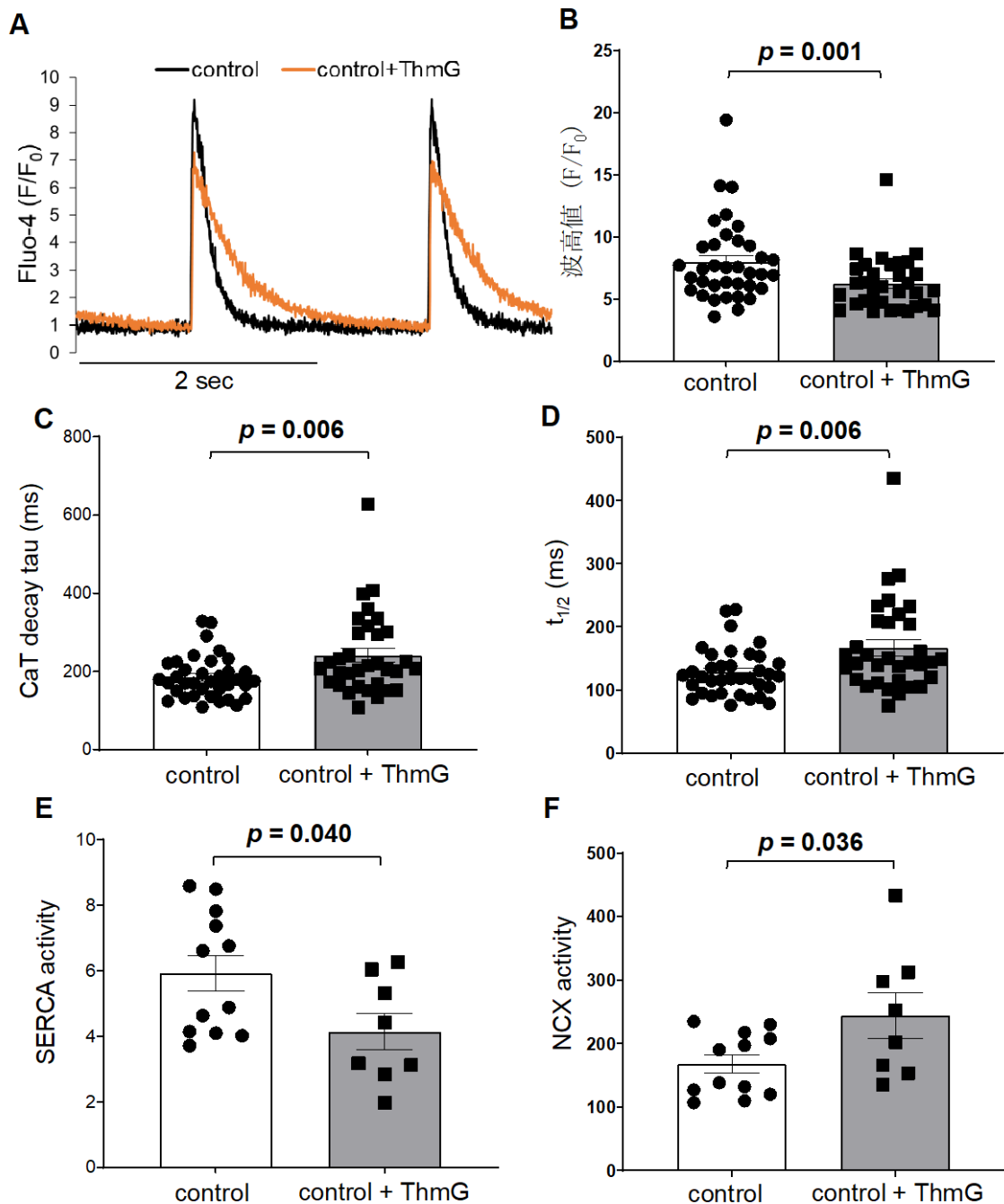


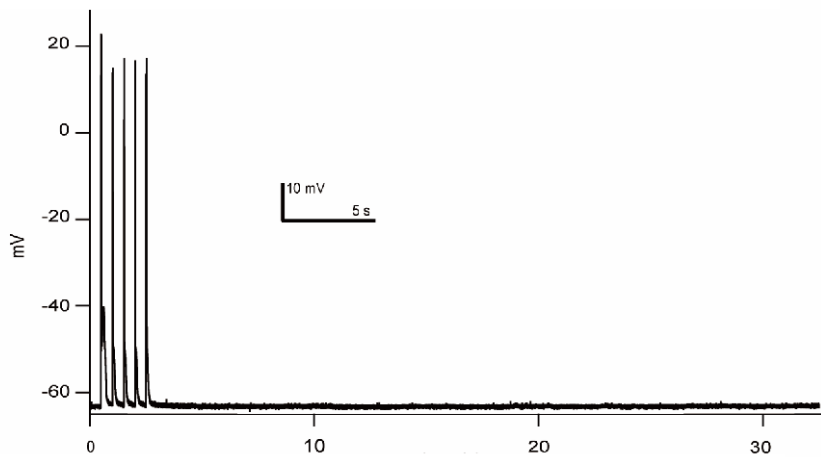
図 5-15 チアメット G を control マウスの単離心筋細胞に投与した際のカルシウムトランジェント、SERCA2a の機能の変化

(A) 代表的な電気刺激によるカルシウムトランジェントの蛍光強度比のプロット、カルシウムトランジェントの波高値 (B)、減衰時間の τ (C)、半減期 (D) のグラフ、(E) カフェイン投与時および field stimulation 時のカルシウムトランジェントの減衰時間の τ から算出された SERCA2a の機能のグラフ。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。検定は unpaired t test を用いて行った。

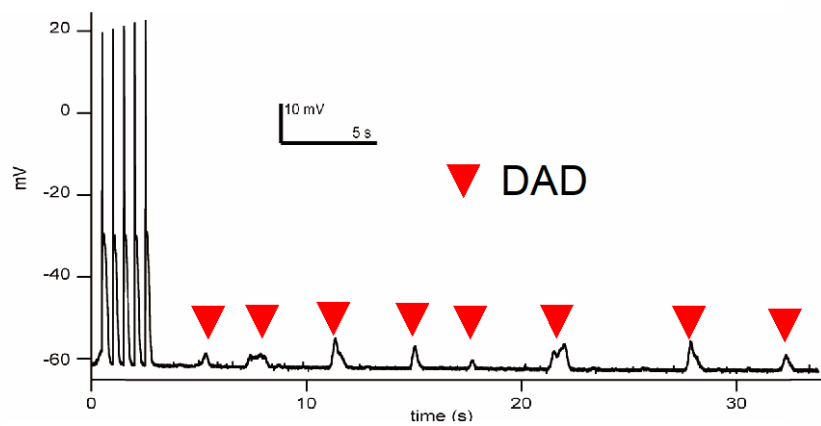
5.9 ホールセルパッチクランプ法による膜電位記録

エンパグリフロジンはカルシウムスパークの頻度、カルシウムウェーブの頻度を抑制し、カルシウムハンドリング異常の改善を認めた。このカルシウムハンドリング異常の改善が、膜電位に与える影響を評価するため、拡張期の自発的な活動電位の頻度をパッチクランプ法で評価した。十分な細胞数の記録ができなかったため、図 5-16 に db/db 群の心筋細胞におけるホールセルパッチクランプ法による膜電位の代表例のみを示す。

A controlマウス (プロトコール1)



B *db/db*マウス (プロトコール1)



C *db/db*マウス (プロトコール2)

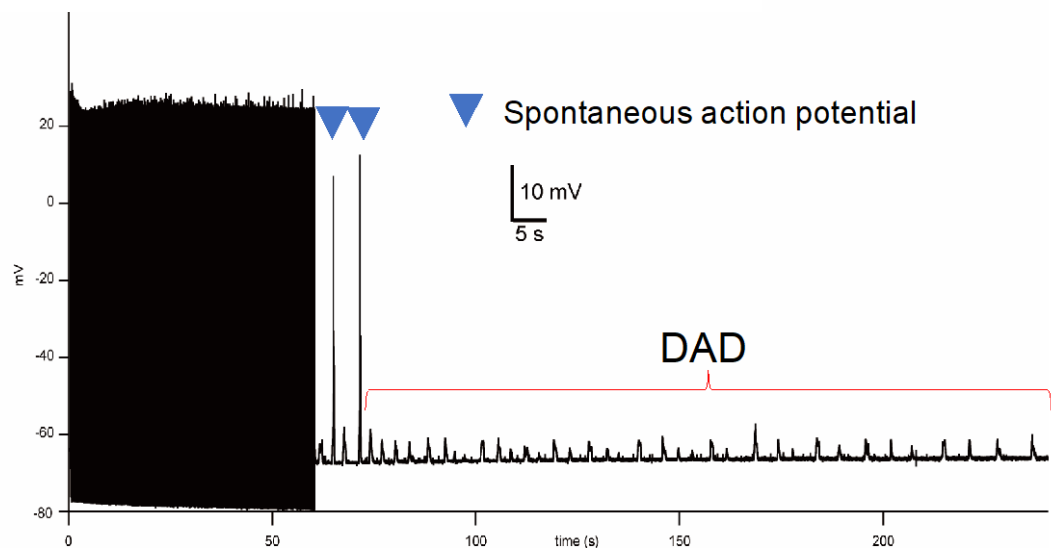


図 5-16 ホールセルパッチクランプ法による *db/db* 群心筋細胞の膜電位記録
プロトコール1により記録した control マウス (A)、*db/db* マウス (B) の単離心筋細胞の膜電位の代表例。プロトコール2 では *db/db* マウスの単離心筋細胞でより多くの DAD が観察された (C)。

6. 考察

私は本研究を通じて以下の知見を明らかにした。

- 1) 拡張障害期の糖尿病性心筋症においてカルシウムハンドリング異常を背景とした心室性不整脈の増加が見られた。
- 2) エンパグリフロジンは心室性不整脈の誘発性を抑制した。
- 3) エンパグリフロジンは心筋細胞におけるグルコース取り込みを抑制し、心筋全体の O-GlcNAc 付加を抑制した。
- 4) エンパグリフロジンは小胞体からのカルシウムスパークやカルシウムウェーブを抑制し、小胞体のカルシウム含有量を増加させた。
- 5) エンパグリフロジンは細胞内カルシウムハンドリングを改善した。
- 6) チアメット G はエンパグリフロジンのカルシウムハンドリング改善効果を打ち消した。

6.1 拡張障害期糖尿病性心筋症における心室性不整脈の誘発性とエンパグリフロジンの抑制効果

糖尿病性心筋症は無症状の段階から心筋の繊維化、stiffness の上昇が起こり、徐々に拡張障害、収縮障害と進行していくことが知られている(Boudina and Abel, 2010; Jia et al., 2016; Jia et al., 2018)。収縮障害が顕在化した病期では他の心不全と共通する病態が混在し、心室性不整脈が増加することがすでに報告されている(Popescu et al., 2019)。今回私は収縮障害が顕在化する前段階である拡張障害期の糖尿病性心筋症では心室性期外収縮が増加するが、心室頻拍は増加しないことを示した(図 5-3、図 5-4)。また、エンパグリフロジンの急性投与が心室性期外収縮の発生を有意に抑制することを初めて示した(図 5-3)。本研究で心室頻拍の誘発率が上昇しなかった背景には心筋の繊維化増加によるリエントリー回路が形成される以前の病期であったことが要因と推察される。一方で、糖尿病では心筋の繊維化が起こることが報告されており(Russo and Frangogiannis, 2016)、このような病期では心室頻拍の誘発率が上昇することが予測される。しかし、SGLT2 阻害薬は慢性投与により繊維化を抑制することが報告されているため(Arow et al., 2020)、慢性投与では今回我々が示した激発活動による期外収縮だけではなく、心室頻拍などの持続性不整脈の予防にもつながる可能性があると考える。

6.2 エンパグリフロジンのカルシウムハンドリング改善効果について

これまで、エンパグリフロジンが心筋細胞において拡張期細胞内カルシウム濃度を低下させることは報告されていたが、多くは NHE などに作用することで細胞内のナトリウム負荷を軽減することによる二次的な作用という見解であった (Mustroph et al., 2018; Uthman et al., 2018)。また、これまでエンパグリフロジンの急性投与による細胞内カルシウムハンドリングを詳細に検討した報告はなかった。今回私はエンパグリフロジンがカルシウムウェーブ (図 5-8)、カルシウムスパーク (図 5-9) を減少させ、小胞体のカルシウム含有量を増加させることを示した (図 5-10)。これらの結果は免疫ブロット法で見られた CaMKII による RyR のリン酸化の増加により、小胞体からのカルシウムリークが増加し、拡張期の細胞内カルシウム濃度が増加することを反映するものと考えられた。また、その他にもペーシング時のカルシウムトランジェントの波高値の増加と減衰時間の τ 、半減期の短縮効果がみられた (図 5-11)。半減期は細胞質から小胞体へのカルシウム取り込みを主に行っている SERCA2a の機能を反映していると言われており、ペーシング時、カフェイン投与時のカルシウムトランジェント両者の減衰時間の τ から算出した SERCA2a の機能が、*db/db* マウスでは低下し、エンパグリフロジンの投与により改善する結果となった。免疫ブロット法では SERCA2a の発現量は *db/db* マウスで低下しておらず、SERCA2a の機能をコントロールしているホスホランバンの発現量やリン酸化にも有意な差がみられなかった。これらの結果から、エンパグリフロジンのカルシウムハンドリングへの作用を検証するためにはさらに追加実験が必要であると考えた。

6.3 エンパグリフロジンのタンパク O-GlcNAc 付加の抑制について

ホスホランバンは SERCA2a を抑制的に制御するため、ホスホランバンがリン酸化修飾されると SERCA2a の機能は亢進する。このため、*db/db* マウスで観察された CaMKII の活性化亢進はホスホランバンのリン酸化を亢進し、結果として SERCA2a 機能は亢進するはずであるが、本研究では *db/db* マウスで SERCA2a 機能が低下し、エンパグリフロジンの投与によって SERCA2a 機能の改善を認めた。これらの結果から、*db/db* マウスにおける SERCA2a の機能低下については、

CaMKII の活性化以外の機序が関与していることが示唆された。タンパクの O-GlcNAc 付加は 2 型糖尿病で亢進し、糖尿病性心筋症の病態に深く関連していることが報告されている(Banerjee et al., 2016)。また、心筋細胞内のカルシウムハンドリングに関しても、CaMKII の Ser280 が O-GlcNAc により修飾されることで CaMKII の機能亢進が生じ、カルシウムスパークが増加すること(Hegyi et al., 2021)、ホスホランバンの Ser16 が O-GlcNAc 付加されることによりホスホキナーゼ A による Ser16 のリン酸化だけではなく CaMKII による Thr17 のリン酸化も阻害され、SERCA2a の機能低下が生じることが示されている(Haudek et al., 2010)。今回の実験結果と既報からエンパグリフロジンは CaMKII の Ser280、ホスホランバンの Ser16 の O-GlcNAc 付加を抑制することでカルシウムハンドリングの改善効果が得られるのではないかと考えた。しかし、本研究では CaMKII やホスホランバンなどの個々のタンパクの O-GlcNAc に関する検討はすることができなかったため、これらは今後の検討課題の一つと考える。

6.4 エンパグリフロジンの心室筋への直接作用について

今回の全ての実験系は ex vivo 及び in vitro で行い、エンパグリフロジンの心筋への直接作用を観察した。しかし、これまでの報告では心筋細胞には SGLT2 受容体が存在しないとされてきた(Mustroph et al., 2018)。Li らはエンパグリフロジンがグルコーストランスポーターである GLUT(glucose transporter) 1、4 及び SGLT2 に高い親和性を持ち、放射性同意元素を用いたランゲンドルフ灌流心の実験で、エンパグリフロジンが心筋へのグルコース取り込みを抑制することを報告した(Li et al., 2021)。今回の実験で私は単離心室筋細胞においてもエンパグリフロジンの投与によりグルコース取り込みが抑制されることを示した。以上の結果からエンパグリフロジンは O-GlcNAc の基質であるグルコースの細胞内への取り込みを抑制することで、O-GlcNAc 付加を抑制し、細胞内カルシウムハンドリングを改善させるのではないかと考えた。しかし、本研究内ではエンパグリフロジンが、いずれのグルコーストランスポーターに作用しているかということまでは検討できていないことや、他の SGLT2 阻害薬にも同様の効果がみられるのか、またはエンパグリフロジンに特異的な効果であるのかを今後検証する必要があると考える。

6.5 エンパグリフロジンの効果とナトリウム-水素交換輸送体(NHE)阻害薬カリポライドのカルシウムハンドリングに与える影響の比較

これまで SGLT2 受容体の存在しない心筋細胞に対する選択的 SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジンの直接作用は NHE 阻害作用によるものであるという報告が複数みられた(Mustroph et al., 2018; Uthman et al., 2018)。そこで、NHE 阻害薬であるカリポライドの *db/db* マウスの心筋細胞に対する作用を検証したが、エンパグリフロジンの投与により観察されたようなカルシウムリークの減少効果や SERCA2a 機能の改善効果は見られなかった。少なくとも今回我々が示した糖尿病性心筋症の心室筋細胞におけるエンパグリフロジンのカルシウムハンドリング改善効果は NHE 阻害作用のみによるものではないと考えた。

6.6 本研究の限界

第一に細胞内カルシウムハンドリングと不整脈の誘発性について検証を行ったが、心筋細胞の膜電位の観察が十分に行えていない。糖尿病性心筋症では不整脈の原因として遅延ナトリウム電流が増加していることが報告されており(Jin et al., 2019; Lu et al., 2013)、エンパグリフロジンが CaMKII を抑制することで遅延ナトリウム電流を減らすことも報告されているが(Hegyi et al., 2022; Philippaert et al., 2021)、これらの可能性については十分に検証できていない。第二に本研究ではエンパグリフロジンの心筋細胞内へのグルコース取り込み抑制効果を示したが、その作用が GLUT1 や GLUT4、SGLT1 などいずれのグルコーストランスポーターに作用して得られたものであるかについてまで検証ができていない。最後に、心筋全体の O-GlcNAc 付加の評価を行ったが、CaMKII やホスホランバンなど特定のタンパクの O-GlcNAc 付加の変化までは評価できていないことが挙げられる。

7. 総括及び結論

本研究の結果から明らかになった事項の要約を以下に述べる。

1. 拡張障害期の糖尿病性心筋症では心室性不整脈の誘発性が増加しており、エンパグリフロジンの急性投与により、不整脈の誘発性は抑制された。
2. 拡張障害期の糖尿病性心筋症の心筋細胞では細胞内カルシウムハンドリング異常が存在し、エンパグリフロジンはカルシウムハンドリング異常を改善した。
3. エンパグリフロジンの作用機序として細胞内へのグルコース取り込み抑制によるタンパクの O-GlcNAc 付加を減少させることが、細胞内カルシウム制御タンパクに影響を与えている可能性が示唆された。

本研究ではエンパグリフロジンの心室性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を示した。その機序としてこれまで報告されていた、NHE 阻害作用ではなく、細胞内へのグルコース取り込みを抑制することで、タンパク翻訳後修飾の一つである O-GlcNAc 付加の抑制により得られる可能性を示した。実臨床ではエンパグリフロジンは血糖効果薬として広く使用されており、経口投与により心筋への直接作用のみならず血糖降下作用により基質であるグルコースの血中濃度が低下することでさらに O-GlcNAc 付加が抑制されることが期待される。また、非糖尿病心不全モデルである圧負荷モデルマウスでも O-GlcNAc 付加の増加が報告されていることから(Umapathi et al., 2021)、糖尿病以外の心不全にもその抑制作用によるカルシウムハンドリングの改善効果が期待でき、今後検証すべき課題の一つであると考ええる。近年では標的タンパクの修飾部位に特異的な抗体を作製することも不可能でなく、タンパクの O-GlcNAc 付加が心不全の病態進行の一因であることが証明されれば、新たな心不全治療のターゲットとなることが期待でき、新規治療薬の創薬への発展も期待される。

8. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 安斉俊久教授に感謝申し上げます。

北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 渡邊昌也助教には博士課程での研究全般・学位論文作成に、御多忙の中、多くの御指導をして頂き大変感謝申し上げます。

重ねて、親身なご助言を頂きました北海道大学大学院医学研究院内科学講座循環病態内科学教室 天満太郎助教、甲谷太郎特任助教、並びに北海道大学大学院医学研究院心不全遠隔医療開発学分野 中尾元基特任助教、医療法人 春林会 華岡青洲記念病院 鎌田墨先生、市立釧路総合病院 萩原光先生に深く感謝の意を表します。

本研究において、御協力をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野循環病態内科学教室 小泉拓也医員、夏井宏征医員並びに循環病態内科学教室員の先生方に深く感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者としてホールセルパッチクランプ法による細胞膜電位観察に御助力頂きました北海道大学大学院医学研究院解剖学分野組織細胞学教室 藤山文乃教授、苅部冬紀助教に深く感謝申し上げます。

また本研究の実験遂行にあたり多大なご助力をいただきました実験助手の木村友紀様、また医局秘書室の皆様に厚く御礼を申し上げます。

本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

2023 年 3 月
門坂 崇秀

9. 利益相反

この研究は、Boehringer Ingelheim 社からの助成金による支援を受けて行われました。また、エンパグリフロジンはBoehringer Ingelheim 社から提供していただきました。しかし、Boehringer Ingelheim 社はデータの収集、分析、解釈には関与していません。

10. 参考文献 **Uncategorized References**

Anker, S.D., Butler, J., Filippatos, G., Ferreira, J.P., Bocchi, E., Bohm, M., Brunner-La Rocca, H.P., Choi, D.J., Chopra, V., Chuquiure-Valenzuela, E., *et al.* (2021). Empagliflozin in Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med* 385, 1451-1461.

Arow, M., Waldman, M., Yadin, D., Nudelman, V., Shainberg, A., Abraham, N.G., Freimark, D., Kornowski, R., Aravot, D., Hochhauser, E., *et al.* (2020). Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor Dapagliflozin attenuates diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol* 19, 7.

Authors/Task Force, M., Ryden, L., Grant, P.J., Anker, S.D., Berne, C., Cosentino, F., Danchin, N., Deaton, C., Escaned, J., Hammes, H.P., *et al.* (2013). ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 34, 3035-3087.

Baartscheer, A., Schumacher, C.A., Wust, R.C., Fiolet, J.W., Stienen, G.J., Coronel, R., and Zuurbier, C.J. (2017). Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na(+) through inhibition of the cardiac Na(+)/H(+) exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia* 60, 568-573.

Banerjee, P.S., Lagerlof, O., and Hart, G.W. (2016). Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med* 51, 1-15.

Boudina, S., and Abel, E.D. (2010). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord* 11, 31-39.

Burke, S.J., Batdorf, H.M., Burk, D.H., Noland, R.C., Eder, A.E., Boulous, M.S., Karlstad, M.D., and Collier, J.J. (2017). db/db Mice Exhibit Features of Human Type 2 Diabetes That Are Not Present in Weight-Matched C57BL/6J Mice Fed a Western Diet. *J Diabetes Res* 2017, 8503754.

Cheng, H., Lederer, M.R., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1996). Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 270, C148-159.

Ciofalo, F.R., and Thomas, L.J., Jr. (1965). THE EFFECTS OF ZINC ON CONTRACTILITY, MEMBRANE POTENTIALS, AND CATION CONTENT OF RAT ATRIA. *J Gen Physiol* 48, 825-839.

Clasen, L., Eickholt, C., Angendohr, S., Jungen, C., Shin, D.I., Donner, B., Furnkranz, A., Kelm, M., Klocker, N., Meyer, C., *et al.* (2018). A modified approach for programmed electrical stimulation in mice: Inducibility of ventricular arrhythmias. *PLoS One* 13, e0201910.

Erickson, J.R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R.J., Despa, F., Hart, G.W., Ripplinger, C.M., *et al.* (2013). Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502, 372-376.

Fernandes, G.C., Fernandes, A., Cardoso, R., Penalver, J., Knijnik, L., Mitrani, R.D., Myerburg, R.J., and Goldberger, J.J. (2021). Association of SGLT2 inhibitors with arrhythmias and sudden cardiac death in patients with type 2 diabetes or heart failure: A meta-analysis of 34 randomized controlled trials. *Heart Rhythm* 18, 1098-1105.

Haudek, K.C., Patterson, R.J., and Wang, J.L. (2010). Inhibition of phospholamban phosphorylation by O-GlcNAcylation: implications for diabetic cardiomyopathy. *Glycobiology* 20, 1199-1207.

Hegyi, B., Fasoli, A., Ko, C.Y., Van, B.W., Alim, C.C., Shen, E.Y., Ciccozzi, M.M., Tapa, S., Ripplinger, C.M., Erickson, J.R., *et al.* (2021). CaMKII Serine 280 O-GlcNAcylation Links Diabetic Hyperglycemia to Proarrhythmia. *Circ Res* 129, 98-113.

Hegyi, B., Mira Hernandez, J., Shen, E.Y., Habibi, N.R., Bossuyt, J., and Bers, D.M. (2022). Empagliflozin Reverses Late Na(+) Current Enhancement and Cardiomyocyte Proarrhythmia in a Translational Murine Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circulation* 145, 1029-1031.

Hohendanner, F., Walther, S., Maxwell, J.T., Kettlewell, S., Awad, S., Smith, G.L., Lonchyna, V.A., and Blatter, L.A. (2015). Inositol-1,4,5-trisphosphate induced Ca²⁺ release and excitation-contraction coupling in atrial myocytes from normal and failing hearts. *J Physiol* 593, 1459-1477.

Jia, G., DeMarco, V.G., and Sowers, J.R. (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 12, 144-153.

Jia, G., Hill, M.A., and Sowers, J.R. (2018). Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res* 122, 624-638.

Jin, X., Jiang, Y., Xue, G., Yuan, Y., Zhu, H., Zhan, L., Zhuang, Y., Huang, Q., Shi, L., Zhao, Y., *et al.* (2019). Increase of late sodium current contributes to enhanced susceptibility to atrial fibrillation in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 857, 172444.

Li, X., Lu, Q., Qiu, Y., do Carmo, J.M., Wang, Z., da Silva, A.A., Mouton, A., Omoto, A.C.M., Hall, M.E., Li, J., *et al.* (2021). Direct Cardiac Actions of the Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor Empagliflozin Improve Myocardial Oxidative Phosphorylation and Attenuate Pressure-Overload Heart Failure. *J Am Heart Assoc* 10, e018298.

Lu, Z., Jiang, Y.P., Wu, C.Y., Ballou, L.M., Liu, S., Carpenter, E.S., Rosen, M.R., Cohen, I.S., and Lin, R.Z. (2013). Increased persistent sodium current due to decreased PI3K signaling contributes to QT prolongation in the diabetic heart. *Diabetes* 62, 4257-4265.

Lynge, T.H., Svane, J., Pedersen-Bjergaard, U., Gislason, G., Torp-Pedersen, C., Banner, J., Risgaard, B., Winkel, B.G., and Tfelt-Hansen, J. (2020). Sudden cardiac death among persons with diabetes aged 1-49 years: a 10-year nationwide study of 14 294 deaths in Denmark. *Eur Heart J* 41, 2699-2706.

McMurray, J.J.V., Solomon, S.D., Inzucchi, S.E., Kober, L., Kosiborod, M.N., Martinez, F.A., Ponikowski, P., Sabatine, M.S., Anand, I.S., Belohlavek, J., *et al.* (2019). Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med* 381, 1995-2008.

Mustroph, J., Wagemann, O., Lucht, C.M., Trum, M., Hammer, K.P., Sag, C.M., Lebek, S., Tarnowski, D., Reinders, J., Perbellini, F., *et al.* (2018). Empagliflozin reduces Ca/calmodulin-dependent kinase II activity in isolated ventricular cardiomyocytes. *ESC Heart Fail* 5, 642-648.

Nattel, S., and Dobrev, D. (2012). The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation

pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Eur Heart J* 33, 1870-1877.

Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K.W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erond, N., Shaw, W., Law, G., Desai, M., Matthews, D.R., *et al.* (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 377, 644-657.

Perkovic, V., Jardine, M.J., Neal, B., Bompoint, S., Heerspink, H.J.L., Charytan, D.M., Edwards, R., Agarwal, R., Bakris, G., Bull, S., *et al.* (2019). Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med* 380, 2295-2306.

Philippaert, K., Kalyanamoorthy, S., Fatehi, M., Long, W., Soni, S., Byrne, N.J., Barr, A., Singh, J., Wong, J., Palechuk, T., *et al.* (2021). Cardiac Late Sodium Channel Current Is a Molecular Target for the Sodium/Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Empagliflozin. *Circulation* 143, 2188-2204.

Popescu, I., Yin, G., Velmurugan, S., Erickson, J.R., Despa, F., and Despa, S. (2019). Lower sarcoplasmic reticulum Ca(2+) threshold for triggering afterdepolarizations in diabetic rat hearts. *Heart Rhythm* 16, 765-772.

Russo, I., and Frangogiannis, N.G. (2016). Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol* 90, 84-93.

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A.A., Ogurtsova, K., *et al.* (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract* 157, 107843.

Sato, D., Uchinoumi, H., and Bers, D.M. (2021). Increasing SERCA function promotes initiation of calcium sparks and breakup of calcium waves. *J Physiol* 599, 3267-3278.

Schweitzer, M.K., Wilting, F., Sedej, S., Dreizehnter, L., Dupper, N.J., Tian, Q., Moretti, A., My, I., Kwon, O., Priori, S.G., *et al.* (2017). Suppression of Arrhythmia by Enhancing

Mitochondrial Ca(2+) Uptake in Catecholaminergic Ventricular Tachycardia Models. *JACC Basic Transl Sci* 2, 737-747.

Tenma, T., Mitsuyama, H., Watanabe, M., Kakutani, N., Otsuka, Y., Mizukami, K., Kamada, R., Takahashi, M., Takada, S., Sabe, H., *et al.* (2018). Small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel activation deteriorates hypoxic ventricular arrhythmias via CaMKII in cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315, H262-H272.

Trum, M., Riechel, J., Lebek, S., Pabel, S., Sossalla, S.T., Hirt, S., Arzt, M., Maier, L.S., and Wagner, S. (2020). Empagliflozin inhibits Na(+) /H(+) exchanger activity in human atrial cardiomyocytes. *ESC Heart Fail.*

Umapathi, P., Mesubi, O.O., Banerjee, P.S., Abrol, N., Wang, Q., Luczak, E.D., Wu, Y., Granger, J.M., Wei, A.C., Reyes Gaido, O.E., *et al.* (2021). Excessive O-GlcNAcylation Causes Heart Failure and Sudden Death. *Circulation* 143, 1687-1703.

Uthman, L., Baartscheer, A., Bleijlevens, B., Schumacher, C.A., Fiolet, J.W.T., Koeman, A., Jancev, M., Hollmann, M.W., Weber, N.C., Coronel, R., *et al.* (2018). Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na(+)/H(+) exchanger, lowering of cytosolic Na(+) and vasodilation. *Diabetologia* 61, 722-726.

van der Werf, C., Kannankeril, P.J., Sacher, F., Krahn, A.D., Viskin, S., Leenhardt, A., Shimizu, W., Sumitomo, N., Fish, F.A., Bhuiyan, Z.A., *et al.* (2011). Flecainide therapy reduces exercise-induced ventricular arrhythmias in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Am Coll Cardiol* 57, 2244-2254.

Vatner, S.F. (1978). Effects of anesthesia on cardiovascular control mechanisms. *Environ Health Perspect* 26, 193-206.

Vatner, S.F., and Braunwald, E. (1975). Cardiovascular Control Mechanisms in the Conscious State. *New England Journal of Medicine* 293, 970-976.

Wiviott, S.D., Raz, I., Bonaca, M.P., Mosenzon, O., Kato, E.T., Cahn, A., Silverman, M.G., Zelniker, T.A., Kuder, J.F., Murphy, S.A., *et al.* (2019). Dapagliflozin and Cardiovascular

Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 380, 347-357.

Yancy, C.W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D.E., Jr., Drazner, M.H., Fonarow, G.C., Geraci, S.A., Horwich, T., Januzzi, J.L., *et al.* (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 62, e147-239.

Yano, M., Ono, K., Ohkusa, T., Suetsugu, M., Kohno, M., Hisaoka, T., Kobayashi, S., Hisamatsu, Y., Yamamoto, T., Kohno, M., *et al.* (2000). Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation* 102, 2131-2136.

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., *et al.* (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 373, 2117-2128.