学位論文

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**）

2023 年 3 月

北海道大学

小泉　拓也

学位論文

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**）

2023 年 3 月

北海道大学

小泉　拓也

目次

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。

Takuya Koizumi, Masaya Watanabe, Takashi Yokota, Jiro Koya, Kotaro Nishino, Daishiro Tatsuta, Hiroyuki Natsui, Takahide Kadosaka, Taro Koya, Motoki Nakao, Hikaru Hagiwara, Rui Kamada, Taro Temma, and Toshihisa Anzai.
Empagliflozin Suppresses Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Mitigates the Inducibility of Atrial Fibrillation in Diabetic Rats.
Frontiers in Cardiovascular Medicine.

本研究の一部は以下の学会・研究会において発表した。

1) Takuya Koizumi, Masaya Watanabe, Takashi Yokota, Hiroyuki Natsui, Takahide Kadosaka, Taro Koya, Motoki Nakao, Hikaru Hagiwara, Rui Kamada, Taro Temma and Toshihisa Anzai
Suppression of Mitochondrial Oxidative Stress and Atrial Fibrillation Inducibility by SGLT2 Inhibitors in Diabetic Rats
第 86 回 日本循環器学会学術集会、2022 年 3 月 13 日、Web 開催

2) Takuya Koizumi, Masaya Watanabe, Takashi Yokota, Jiro Koya, Daishiro Tatsuta, Kotaro Nishino, Hiroyuki Natsui, Takahide Kadosaka, Taro Koya, Motoki Nakao, Hikaru Hagiwara, Taro Temma and Toshihisa Anzai
Empagliflozin Suppresses Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Mitigates the Inducibility of Atrial Fibrillation in Diabetic Rats
第 68 回 日本不整脈心電学会学術大会、2022 年 6 月 10 日、横浜

1. 要旨

【背景と目的】

心房細動は最も罹患率が高い不整脈で、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（sodium-glucose cotransporter, 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 阻害薬がニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸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 (empagliflozin, EMPA) 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】

Sprague-Dawley ラットにストレプトゾトシン (streptozotocin, 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とした。治療介入 (糖尿病 + EMPA) 群として、糖尿病群に EMPA 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定量的PCR (polymerase chain reaction) 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 (AMP-activated protein kinase, 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 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator, 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タンパク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】

糖尿病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、糖尿病 +EMPA 群でそれらは改善した。同様に線維化シグナルは、糖尿病群で過剰な発現を認めたが、糖尿病 +EMPA 群で抑制された。さらに糖尿病群では、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。糖尿病 +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 のタンパク質発現は 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 (mitochondrial transcription factor A, TFAM) のタンパク質発現は、対照群と比較して糖尿病群で有意に低下し、糖尿病 +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 1、ミトフシン 2、およびオプティックアトロフィー1 のタンパク質発現は、糖尿病群で有意に増加し、一方でミトコンドリアの分裂に関するダイナミン関連タンパク 1 のタンパク質発現は糖尿病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タンパク質発現の変化は、糖尿病 +EMPA 群では増加した。

【考察】

本研究では、EMPA 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。糖尿病群では線維化面積比が増加し伝導遅延が生じたが、EMPA 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。糖尿病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、EMPA 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、EMPA によって改善した。これらの結果から、EMPA 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、EMPA の AMPK への作用についてさらに調査した。AMPK のタンパク質発現は 3 群で差はなかったが、AMPK 活性と、PGC-1α および TFAM のタンパク質発現は、対照群と比較して糖尿病群で有意に低下した。一方で、糖尿病 + EMPA 群ではいずれも増加し、EMPA 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、EMPA 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 EMPA 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。

2. 略語表

ADP: adenosine diphosphate
AMP: adenosine monophosphate
ANOVA: analysis of variance
ATP: adenosine triphosphate
C: mitochondrial complex
DNA: deoxyribonucleic acid
DRP: dynamin-related protein
EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid
EMPA: empagliflozin
FAD: flavin adenine dinucleotide
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HRP: horseradish peroxidase
IL: interleukin
MDA: malondialdehyde
Mfn: mitofusin
NAD: nicotinamide adenine dinucleotide
NF-κB: nuclear factor κB
NOX: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
OPA: optic atrophy
PCR: polymerase chain reaction
PGC: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator
RCR: respiratory control ratio
RNA: ribonucleic acid
SGLT: sodium-glucose cotransporter
SOD: superoxide dismutase
STZ: streptozotocin
TBS: tris-buffered saline
TFAM: mitochondrial transcription factor A
TGF: transforming growth factor
TNF: tumor necrosis factor

3. 緒言

心房細動は、世界的に最も罹患率が高い不整脈であり、脳梗塞をはじめとする塞栓症や心筋梗塞、心不全などの心血管有害事象と合併することが多く、生命予後を増悪させる。わが国でも心房細動の有病率は増加傾向にあり、近年の高齢化によってさらに有病率が増加し、今後 50 年間で 2.5 倍になると予想されている (Go et al., 2001)。また、糖尿病は心房細動発症の独立した危険因子であるが、先進国では糖尿病の罹病率が急速に上昇しており、心房細動の発症を抑制する糖尿病治療法の開発に期待が集まっている。しかしながら、血糖コントロール自体が心房細動発症を抑制するという大規模なデータは報告されていない（Benjamin et al., 1994, Wang et al., 2019)。

糖尿病による心房細動発症の機序は、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。糖尿病による心房の線維化進行には、最終糖化産物の増加、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コラーゲンを中心とした細胞外基質の産生増加、蓄積が関与している。近年、インスリン非依存的に作用する糖尿病治療薬であるナトリウム・グルコース共輸送体（sodium-glucose cotransporter, SGLT) 2 阻害薬が、2 型糖尿病患者において心血管有害事象や心房細動の発症を抑制することが報告されている（Zinman et al., 2015, Neal et al., 2017, Zelniker et al., 2020)。糖尿病モデル動物実験では、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には見られない線維化抑制と心房細動抑制効果が、SGLT2 阻害薬で確認されており、血糖降下作用以外の機序を介して心房リモデリングを抑制することが推察される。

糖尿病では、内因性の抗酸化能力を超える過剰な活性酸素種が、主にミトコンドリアの電子伝達系で産生され、その酸化ストレスによって核内因子 (nuclear factor: NF)-κB やトランスフォーミング増殖因子（transforming growth factor, TGF)-β などの増殖因子を介して線維化を亢進させる。過剰な活性酸素種の産生もしくは、活性酸素種の除去が不足し、細胞内の活性酸素種が増加することによって酸化ストレスが生じ、脂質、タンパク質および DNA (deoxyribonucleic acid）に損傷を与える (Cross et al., 1987)。ミトコンドリアは生体内の約 95 %の酸素を消費し、活性酸素種のほとんどはミトコンドリアで産生されているため、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、生体にとって重要な影響をもたらす。実際、過去の研究では、心房細動モデル動物において活性酸素種の減少が心房細動の誘発性を低下させることが報告されている（Shiroshita-Takeshita et al., 2004, Zhang et al., 2021)。また、糖尿病モデル動物を使った実験では、SGLT2 阻害薬は、

心室筋のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸オキシダーゼ(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX)の活性を抑制し、過剰な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するという報告や(Li et al., 2019)、心房筋のミトコンドリアの呼吸能を改善するという報告がされている(Shao et al., 2019)。しかしながら、SGLT2 阻害薬の心房への効果は十分に検討されておらず、ミトコンドリア由来の活性酸素種の過剰な産生の抑制、および心房細動の抑制効果については報告されていない。以上の背景より、本研究では、2 型糖尿病モデルラットにおいて、「SGLT2 阻害薬はミトコンドリア機能障害の改善を介して、ミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生と酸化ストレスを抑制し、心房の線維化を抑制することで心房細動の発症を抑制する」という仮説を立てた(図 1)。本研究は、2 型糖尿病ラットを用いて、SGLT2 阻害薬であるエンパグリフロジン (empagliflozin, EMPA) の長期間投与による、ミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生の減少、心房の線維化、および心房細動発症の抑制効果について検討することを目的とした。

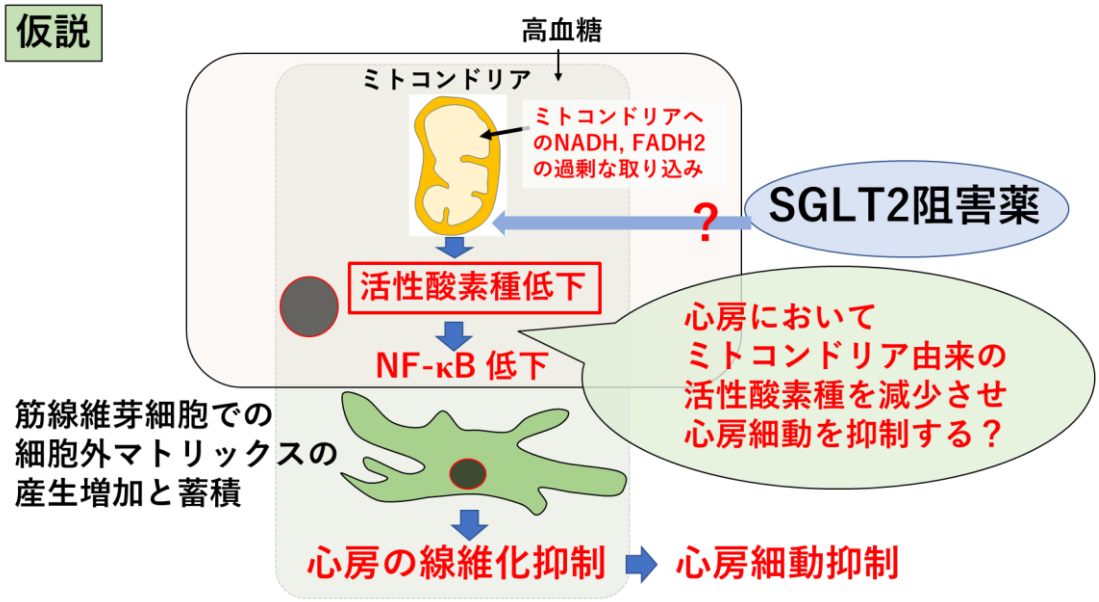


図 1. 本研究の仮説を示す図

SGLT2 阻害薬がミトコンドリア機能障害を改善し、過剰なミトコンドリア由来の活性酸素種と酸化ストレスを抑制することで、NF-κB を介して
心房の線維化、心房細動の発症を抑制させる。

NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; FAD, flavin adenine dinucleotide

4. 実験方法

本研究の全実験は、国立大学法人北海道大学の動物実験に関する規定を尊守して、動物実験計画申請システムにて承認されている「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) として行った。動物実験は、医学研究科東南研究棟 ES4-201、203 室にて行った。

4.1. 実験動物

雄性 8~23 週齢の Sprague-Dawley ラットを使用した。

4.2. 2 型糖尿病モデルラットの作製

図 2 に糖尿病モデルラット作製の概要を示す。本実験では、2 型糖尿病モデル動物として、8 週齢の Sprague-Dawley ラット（雄性）に高脂肪飼料と低用量ストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) を投与し糖尿病を誘発した。このモデルは、初期に高血糖によるインスリン抵抗性を誘発し、その後に低インスリン血症を併発させるため、ヒトの 2 型糖尿病を模倣しており、糖尿病合併症や糖尿病治療薬の研究に適していると報告されている (Shao et al., 2019, Gheibi et al., 2017)。ラットは室温 (25℃) で、12 時間明暗サイクルで飼育し、最初の 1 週間はすべてのラットに通常飼料を与え、環境適応期間とした。その後、対照群 (n＝24)、糖尿病群 (糖尿病群: n=24)、治療介入群 [糖尿病 + EMPA (empagliflozin) 群: n=24) の 3 群に無作為に分別した。1 週目以降は、糖尿病群と糖尿病 ＋EMPA 群には高脂肪飼料 (60 kcal% 脂肪、20 kcal% 炭水化物、20 kcal% タンパク質、D12492 ; Research Diets、New Brunswick、NJ、USA) を 4 週間与えた。対照群には全実験期間を通して通常飼料を与えた。実験第 5 週目に、ラットを 12 時間絶食させた後、糖尿病群と糖尿病 ＋EMPA 群に pH 4.5 のクエン酸緩衝液に溶解した STZ (25 mg/kg) を腹腔内投与し、対照群には同量のクエン酸緩衝液のみ腹腔内投与した。STZ 投与 1 週後の随時血糖値が 300 mg/dl を超えたラットを糖尿病と診断した。血糖値が診断基準を満たさないラットは、再度 12 時間の絶食後に同量の STZ を腹腔内投与し、1 週後の随時血糖値が 300 mg/dl を超えたラットを糖尿病として実験に使用し、診断基準を満たさないラットは本実験から除外した。糖尿病診断後、糖尿病群には 8 週間高脂肪飼料を与え、糖尿病 ＋EMPA 群には 8 週間 EMPA を混じた高脂肪飼料を与えた。EMPA の投与量は、先行文献に準じて 30 mg/kg/日を用いた (Zhou and Wu, 2017, Shao et al., 2019)。血糖値は、尾静脈より採血し Glutest Every (三和化学研究所、名古屋) で測定した。飼育開始 14 週目に下記の実験を行った。

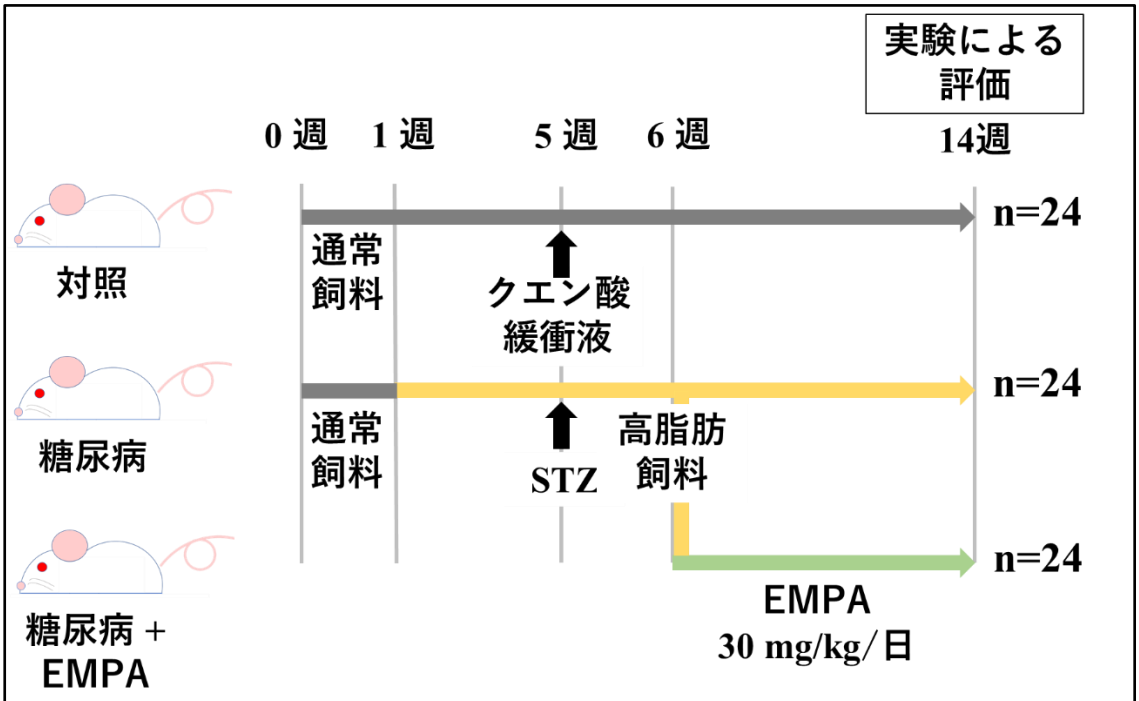


図 2. 糖尿病モデルラット作製

対照群には実験を通して通常飼料を与え、5 週目にクエン酸緩衝液を腹腔内投与した。糖尿病群には 1 週目から高脂肪飼料を与え、5 週目に STZ を投与し、6 週目に血糖値が 300 mg/dl を超えるラットを糖尿病とした。糖尿病 ＋EMPA 群には EMPA を 8 週間投与した。すべてのラットに対して 14 週目に
各実験を行った。

4.3. 心エコー

心エコー法は、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、麻酔薬を用いた 。メデトミジン（0.15 mg/kg；共立製薬、東京)、ミダゾラム（2 mg/kg；アステラス製薬、東京)、ブトルファノール(2.5 mg/kg；Meiji Seika ファルマ、東京)の 3 種混合液を腹腔内に投与し鎮静を得た後（Takahashi et al., 2021)、検査台に臥位で四肢をテープで固定し、前胸壁を除毛した。超音波診断装置（APLIO 300 TUS-A300、東芝、東京) および 12 MHz リニアプローブを用いて、 乳頭筋レベルで胸骨傍長軸像と短軸像の最適な像を描出した。心エコーパラメーターとして、心拍数、左心房径、左室拡張末期径、左室収縮末期径、心室中隔壁厚、左室後壁壁厚、左室内径短縮率を計測した（図 3)。

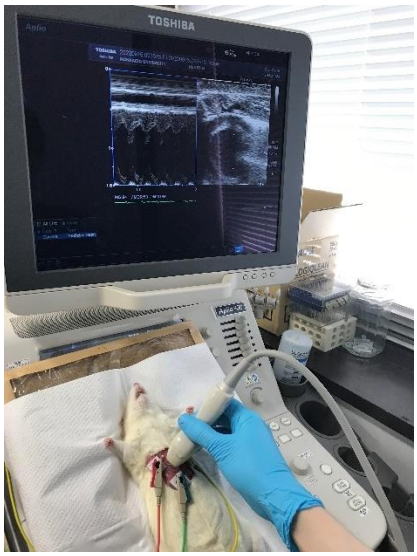
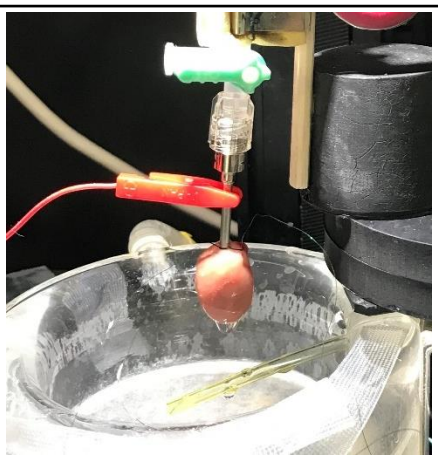


図 3. 心エコー検査
ラットを検査台へ固定し心電図電極をつけ、心エコー検査を行った。

4.4. 不整脈誘発性、伝導時間、有効不応期の評価

4.4.1. ランゲンドルフ灌流心

4.3 と同様の方法で鎮静を得た後、抗凝固を目的に塩酸ヘパリン（3.2 mg/kg）を腹腔内投与した。その後、胸骨上部から剣状突起下まで縦切開し、さらに腹部に横切開を加えた。剣状突起を牽引しながら横隔膜の腹側（前面）に切開を加え、横隔膜と胸骨および肋骨を切離した。次に、左右両側の肋骨を可能な限り背側で離断し前胸郭を反転させ、心臓を露出させた。胸腺組織を剥離し上行大動脈を大動脈弓部まで露出させた後、下大静脈を離断した。その後、可及的に上行大動脈を大動脈弓部直前で離断し、肺動脈、上大静脈、肺静脈も可能な限り心臓側で離断した。離断した大動脈をピンセットで把持しながらランゲンドルフ装置に接続、3-0 絹糸で固定するとともに 37℃に保温した Tyrode's 液による逆行性灌流を開始した。Tyrode's 液は 100 %酸素で飽和した (Watanabe et al., 2012, Tenma et al., 2018, Kamada et al., 2019)。冠血流を維持するために、持続的圧モニタリングを行い、拡張期血圧が 80 mmHg を維持するようにランゲンドルフ灌流圧を調節した。灌流心は 37℃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（図 4 左図)。



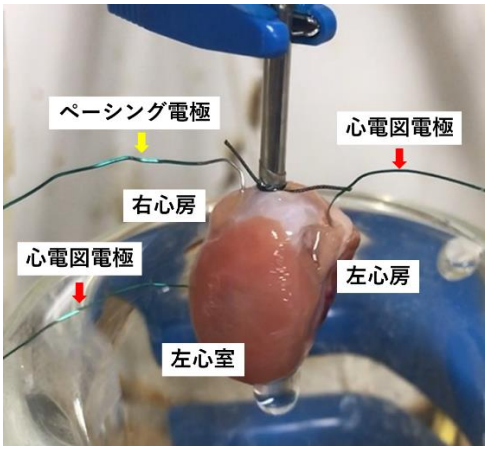


図 4. ランゲンドルフ潅流心

心臓を摘出し、離断した大動脈をランゲンドルフ装置に接続し、3-0 絹糸で固定した（左図)。心電図電極を左心房と左心室（赤矢印）に、ペーシング電極を右心房（黄矢印）に装着した（右図)。

4.4.2. 心房性不整脈誘発性の評価

ランゲンドルフ潅流心を用いて心房性頻脈性不整脈の誘発性を評価した。心電図電極を左心房と左心室へ、ペーシング電極を右心房へ装着し (図 4 右図)、PowerLab 4/26 (AD Instruments、Dunedin、New Zeeland) を用いて測定した。心房性不整脈の誘発は、右心房の電極から 50 msec、40 msec、30 msec の周期で 3 秒間の連続刺激を行い、30 秒の間欠期を置き、それぞれ 5 回繰り返した。心房性頻脈性不整脈は 1 秒以上持続する頻脈と定義した (Watanabe et al., 2012)。

4.4.3. 心房の伝導時間の評価

心房の伝導時間の評価は、右心房刺激を行い、左心房までの伝導時間を心房間伝導時間として評価した (図 5)。右心房刺激は 150 msec および 200 msec の周期でそれぞれ測定した。

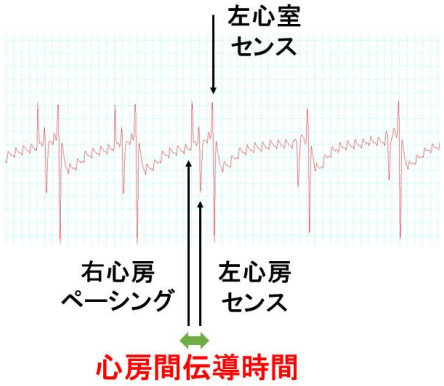


図 5. 心房間伝導時間

心房間伝導時間 (緑矢印) は右心房ペーシングから左心房センスまでの時間と定義した。

4.4.4. 有効不応期の評価

有効不応期を期外刺激法で測定した。右心房から 150 msec、200 msec の周期で連続刺激（S1）を 8 回行った後、期外刺激（S2）を与えた。S1-S2 間隔を 2 msec ずつ減少させ、心筋興奮が得られる最長の S1-S2 間隔を有効不応期と定義し、測定した。

4.5. 組織学的評価

ラットを解剖後、心臓を取り出し、右心房を分離して、10％中性緩衝ホルマリン溶液に 24 時間保存し、組織を固定した。4 μm に切り出し、ヘマトキシリン染色とマッソントリクローム染色を行った (図 6)。

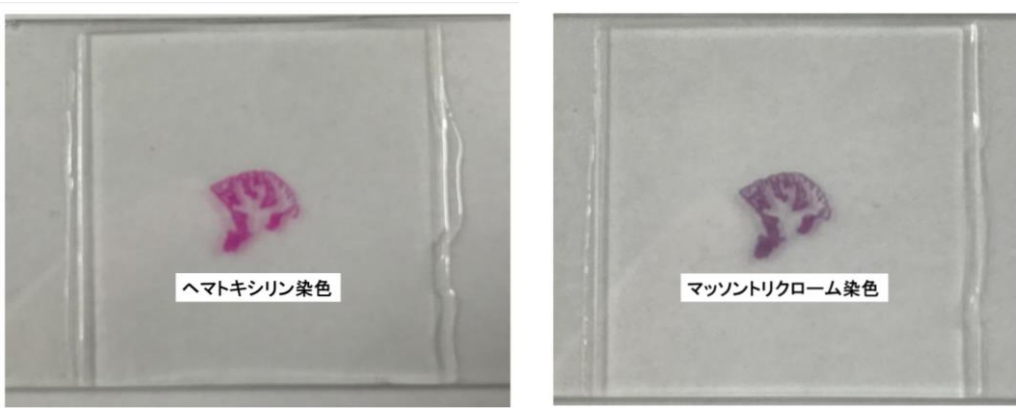


図 6. ヘマトキシリン染色とマッソントリクローム染色

ホルマリン溶液で固定した右心房を 4 μm に切り出し、 ヘマトキシリン染色（左図）とマッソントリクローム染色（右図）を行った。

4.5.1. ヘマトキシリン染色による心筋細胞断面積の評価

心筋細胞の断面積は、デジタル顕微鏡で拡大観察の上、写真撮影を行い (倍率×200)、1 検体あたり平均 30 個の心筋細胞の断面積を測定した (図 7 左図)。核が中央に位置し、正円形に観察される心筋細胞を選択し、BZ-X Analyzer software (KEYENCE、Osaka、Japan) でトレースし、心筋細胞断面積を測定し、平均値を算出した。

4.5.2. マッソントリクローム染色による心房の線維化の評価

心房間質の線維化は、4.5.1 と同様にデジタル顕微鏡で拡大観察の上、3 視野をランダムに選択し写真撮影を行った (倍率×200、図 7 右図)。BZ-X Analyzer software で線維化部分を抽出し、線維化が占める領域を線維化率として測定し、平均値を算出した。

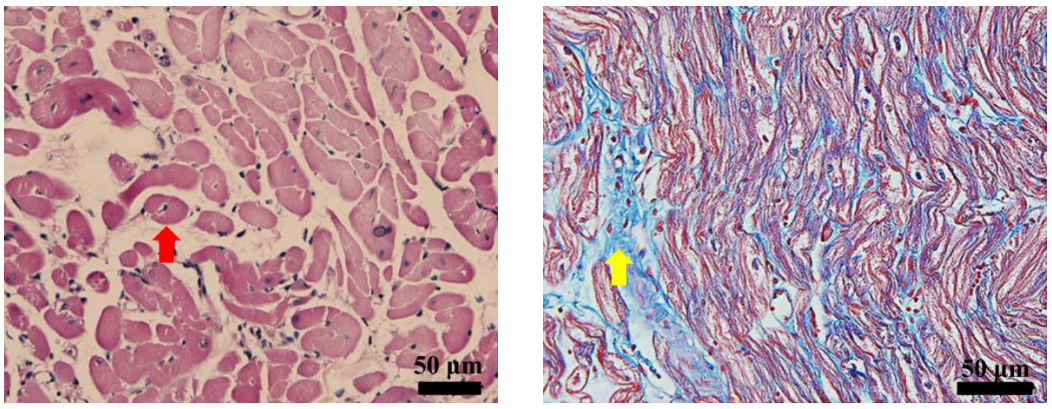


図 7. ヘマトキシリン染色とマッソントリクローム染色

ヘマトキシリン染色の心筋細胞断面積 (左図、赤矢印) の測定と、マッソントリクローム染色の心房間質の線維化 (右図、黄矢印) 領域の測定を行った。

4.6. ミトコンドリア呼吸能と活性酸素種の評価

4.6.1. 心房組織の細胞膜透過処理

ラットを解剖後、心房を取り出して、直ちに氷冷した組織保存溶液 [in mmol/l；2.77 CaK_2 EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid)、7.23 K_2EGTA、20 taurine、6.56 $MgCl_2・6H_2O$、5.77 Na_2ATP、15 Na_2phosphocreatine、20 imidazole、0.5 dithiothreitol、and 50 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid hydrate; pH 7.1] に漬けた。組織保存溶液内で周辺組織を可及的に除去した。組織保存溶液内で 18 ゲージの注射針を用いて心筋線維をほぐした。界面活性剤であるサポニン (50 μg/ml) を含む組織保存溶液内で 30 分間振蕩し、細胞膜透過処理を行った (図 8 上段左図)。ミトコンドリア呼吸能測定用緩衝液 [in mmol/l；110 D-sucrose、60 K-lactobionate、0.5 EGTA、0.1 % bovine serum albumin、3 $MgCL_2$、20 taurine、10 KH_2PO_4、and 20 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid；pH 7.1] で 10 分間洗浄した (Christiansen et al., 2015, Jespersen et al., 2017)。心筋 (2~3 mg) をミトコンドリア呼吸能測定用緩衝液でみたされた、高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置である Oxygraph-2k (Oroboros Instruments、Innsbruck、Austria) のチャンバー内に投入し、ミトコンドリア呼吸能と活性酸素種を測定した。

4.6.2. ミトコンドリア呼吸能の評価

ミトコンドリア呼吸能は、上述の細胞膜透過処理後の心房筋線維組織 (2~3 mg) を用いて、Oxygraph-2k を使用し、37℃の環境下で測定した (図 8 上段右図)。2 ml のチャンバー内を、2 ml のミトコンドリア呼吸能測定用緩衝液で満たし、蓋をして空気を追い出した。以下のプロトコルに従って基質を順番に加え、その時の酸素消費量を測定した (図 8 下図)。Datlab software (Oroboros Instruments) を用いて、酸素消費量を計算した。その際に、組織重量当たりの補正を行った。ミトコンドリアの呼吸状態を示す state 3 (ADP 依存呼吸) と state 2 (ADP 非依存呼吸) の酸素消費速度の比で定義される呼吸能 (respiratory control ratio, RCR) を計算した (Christiansen et al., 2015, Jespersen et al., 2017)。

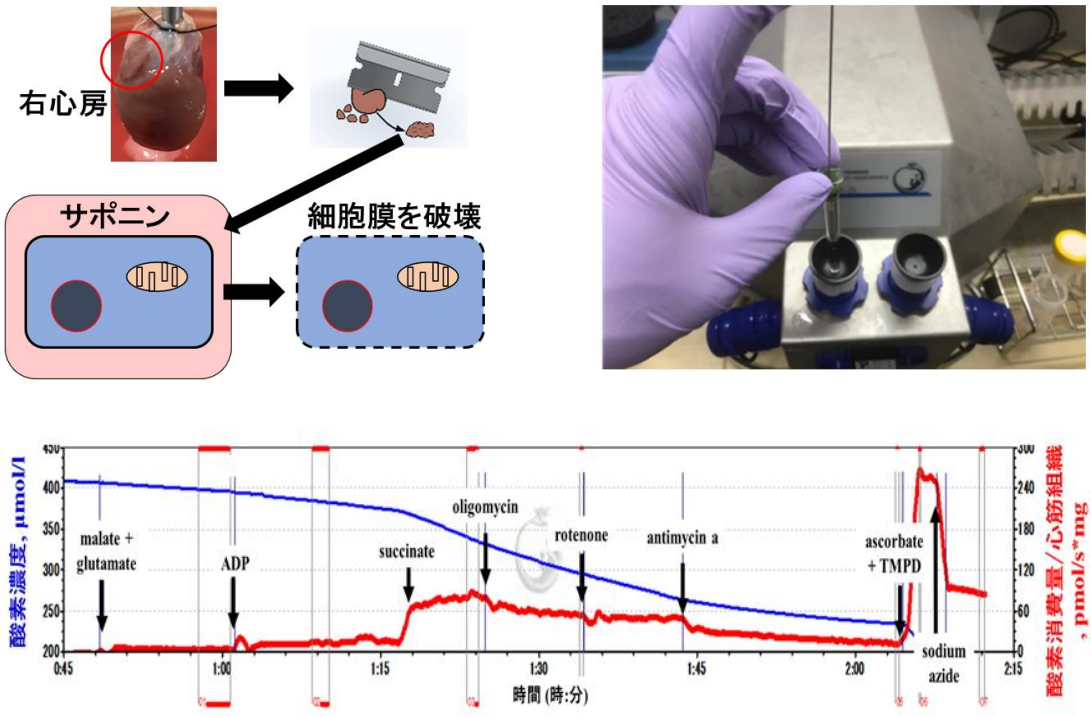


図 8. 細胞膜透過処理とミトコンドリア呼吸能の評価

右心房を細かく刻みサポニンにつけて細胞膜透過処理を行った (上段左図)。細胞膜透過処理を行ったサンプルを Oxygraph-2k へ添加し (上段右図)、プロトコルに従って各基質を添加して、酸素消費量 (赤線) を経時的に測定した (下図)。malate, リンゴ酸 ; glutamate, グルタミン酸 ; succinate, コハク酸 ; oligomycin, オリゴマイシン ; rotenone, ロテノン ; antimycin a, アンチマイシン ; ascorbate, アスコルビン酸 ; TMPD, N,N,N',N'-tetramethyl-p- phenylendiamine

プロトコル

1) ミトコンドリア複合体 (mitochondrial complex, C) I に関連する基質であるグルタミン酸 glutamate 10 mmol/l とリンゴ酸 malate 2 mmol/l を加えた。
2) ADP 依存的な呼吸を観察するため、ADP 5 mmol/l を加えた。
3) C II に関連する基質であるコハク酸 succinate 10 mmol/l を加えた。
4) ADP 非依存的な呼吸を観察するため、C V の阻害薬であるオリゴマイシン oligomycin 2 µg/ml を加えた。
5) C II 単独の呼吸を観察するため、C I の阻害薬であるロテノン rotenone 0.5 µmol/l を加えた。

6) C III の阻害薬であるアンチマイシン antimycin a 2.5 μmol/l を加え、ミトコンドリアに関係する呼吸を停止させた。
7) C IV の基質であるアスコルビン酸 ascorbate 2 mmol/l と N,N,N',N'-tetramethyl-p- phenylendiamine (TMPD) 0.5 mmol/l を加えた時の呼吸能を測定した。
8) 次に、TMPD の酸化の影響を避けるため、シトクロム C オキシダーゼの阻害薬であるアジ化ナトリウム sodium azide 10 mmol/l を加えた時の呼吸能を測定し、その差分を計算した。

4.6.3. ミトコンドリア由来の活性酸素種の評価

ミトコンドリア由来の活性酸素種は、上述した細胞膜透過処理後の心房筋線維組織 (2~3 mg) を用いて、スーパーオキサイドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) を添加し、スーパーオキサイドを過酸化水素 (H_2O_2) に変換することで測定した。心筋線維組織をチャンバーに投入する前に SOD 5U/ml、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 1U/ml、および Amplex UltraRed (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) 10 μmol/l をチャンバーへ加えた。H_2O_2 は、HRP によって触媒され、Amplex UltraRed と 1 対 1 で化学反応し、蛍光化合物であるレゾルフィンを生成する。励起波長と蛍光波長はそれぞれ、525 nm と 587 nm である。上述のプロトコルに従って実験を行い、レゾルフィンの蛍光は、ミトコンドリアの呼吸能とともに、経時的に測定した。H_2O_2 の生成速度は、各基質との干渉による影響を避けるため、各基質添加の前後に H_2O_2 0.1μmol/l を滴下することによって補正した。H_2O_2 の生成速度は、心筋の湿重量で補正した (Jang et al., 2018)。

4.7. 酸化ストレスの評価

心房組織における酸化ストレスを評価するために、右心房組織を用いて、酸化ストレスマーカーである SOD とマロンジアルデヒド (malondialdehyde, MDA) を評価した。SOD は SOD assay kit-WST (同仁化学研究所、熊本) で、MDA は lipid peroxidation product using an MDA assay kit (Abcam、Cambridge、MA、USA) でそれぞれ測定した。

4.7.1. スーパーオキサイドジスムターゼ活性の評価

ラットを解剖後、心房を取り出して、液体窒素で凍結しマイナス 80℃で保存した。凍結保存した心房組織 (5~6mg) を氷上で解凍し、ショ糖緩衝液 [0.25 mol/l ショ糖、10 mmol/l トリス塩酸緩衝液 pH7.4、1 mmol/l EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)] へ加え、ホモジナイズした。ホモジナイズした組織を遠心分離し (10000 g、

15 分、4℃) 上清をマイナス 80℃で冷凍保存し測定サンプルとした。冷凍保存したサンプルを氷上で解凍し、希釈バッファーで希釈した。CELLSTAR 96 ウェルマイクロプレートへ 1 倍希釈サンプル、1/5 倍希釈サンプル、$1/5^2$ 希釈サンプル、$1/5^3$ 希釈サンプル、$1/5^4$ 希釈サンプル、$1/5^5$ 希釈サンプル、$1/5^6$ 希釈サンプルをそれぞれ 20 µl、water-soluble tetrazolium working solution をそれぞれ 200 µl、Enzyme working solution をそれぞれ 20 µl 加えた。その後、37℃で 20 分間インキュベートし、マイクロプレートリーダー (Multiskan、Thermo Fisher Scientific) で 450nm の吸光度を測定し、SOD 活性を算出した (図 9)。

図 9. マイクロプレートリーダーによる吸光度測定
96 マイクロウェルプレートで調整したサンプルの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

4.7.2. マロンジアルデヒド濃度の評価

4.7.1 と同様に、ラットを解剖後、心房を取り出して、液体窒素で凍結しマイナス 80℃で保存した。凍結保存した心房組織 (5~6 mg) を氷上で解凍し、氷冷した 20 mmol/l リン酸緩衝液 pH7.4 へ加え、ホモジナイズした。ホモジナイズした組織を遠心分離し (3000 *g*、10 分、4℃) 上清をマイナス 80℃で冷凍保存し測定サンプルとした。冷凍保存したサンプルを氷上で解凍した。付属の MDA 溶液を希釈バッファーで下記の表 1 のように希釈した。140 µl のサンプルと、付属の Reagent R1 を 455 µl 、105 µl の濃塩酸を各マイクロチューブに加え混合し、45℃で 60 分間インキュベートした。その後、遠心分離し (15000 *g*、10 分間、4℃) 各サンプル

の上清を取得した。150 µl の上清を付属の 96 ウェルマイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーで 586 nm の吸光度を測定した。各 MDA 溶液濃度の吸光度から標準曲線を作成し、各サンプルの吸光度から MDA 濃度を算出した。

表 1. MDA 溶液濃度

	MDA 溶液濃度 µmol/l	希釈バッファー µl	MDA 溶液 µl
標準 0	0	200	-
標準 1	0.5	195	5
標準 2	1.0	190	10
標準 3	2.5	175	25
標準 4	5.0	150	50
標準 5	10.0	100	100
標準 6	15.0	50	150
標準 7	20.0	-	200

4.8. クエン酸シンターゼ活性の評価

4.7.1 と同様にラットを解剖後、心房を取り出して、液体窒素で凍結しマイナス 80℃で保存した。凍結保存した心房組織 (6 mg) を氷上で解凍し、100 µl の氷冷した citrate synthase Assay buffer へ加え、ホモジナイズした。10 分後、遠心分離し (10000 *g*、5 分間、4℃) 上清をマイナス 80℃で冷凍保存し測定サンプルとした。冷凍保存したサンプルを氷上で解凍し、40 µl のサンプルを 96 ウェルマイクロプレートへそれぞれ加え、citrate synthase Assay buffer で総量 50 µl とした。各ウェルへ混合溶液 (citrate synthase Assay buffer 43 µl、CS Developer 5 µl、citrate synthase Substrate Mix 2 µl) 50 µl を加え、総量 100 µl とした。25℃で 40 分間、マイクロプレートリーダーのカイネティックモードで 412 nm の吸光度を測定し、クエン酸シンターゼ活性を算出した。

4.9. 免疫ブロット法

摘出した心臓から迅速に右心房を切除し、液体窒素で凍結しマイナス 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。

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、Danvers、MA、USA) を蒸留水で 10 倍希釈し、 99.5 %エタノール (和光純薬、大阪) で希釈した 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (Sigma-Aldrich、Saint Louis、MO、USA) およびセリンプロテーゼ、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、IN、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、ニッピ、東京) 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 (15000 *g*、10 分、4℃)、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、マイナス 80℃で冷凍保存した。

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) 96 ウェルマイクロプレート (Greiner Bio-One、Kremsmuenster、Austria) に BCA™ Protein Assay Reagent A と BCA™ Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific、Rockford、IL、USA) を 50 対 1 の割合で混合した working reagent を作製し、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) マイクロプレートリーダー (Multiskan、Thermo Fisher Scientific) 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回帰直線を算出し、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。

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成した。ボルテックスミキサーで溶液を攪拌した。

2) MULTI HEATER TYPE MH-36 (和科盛商会、東京) 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撹拌した。

電気泳動

1) 電気泳動槽 (Criterion セル、Bio-Rad Laboratories、Richmond、CA、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。電気泳動用のポリアクリルアミドゲルは Any kD™ ミニプロティアン TGX™ プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories) 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。

ウェスタンブロッティング

セミドライ式ブロッティングで転写した。

1) ポリアクリルアミドゲルを PVDF (poly vinylidene 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。

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 NF-κB 抗体 (#3034 ; 1:1000 希釈; Cell Signaling)、抗リン酸化 (phosphorylated, p) NF-κB 抗体 (#3037 ; 1:1000 希釈; Cell Signaling)、抗 AMPK 抗体 (#2532 ; 1:1000 希釈; Cell Signaling)、抗 pAMPK 抗体 (#2535 ; 1:1000 希釈; Cell Signaling)、抗 PGC (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator)-1α 抗体 (#4259 ; 1:1000 希釈; Cell Signaling)、抗ミトコンドリア転写因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 抗体 (#sc-23588 ; 1:1000 希釈; Santa Cruz Biotechnology、Dallas、TX)、抗ミトフシン (mitofusin, Mfn)1 抗体 (#ab126575 ; 1:1000 希釈; Abcam、Cambridge、UK)、抗 Mfn2 抗体 (#ab56889 ; 1:1000 希釈; Abcam)、抗オプティックアトロフィー (optic

atrophy, OPA)1 抗体 (#ab42364；1:1000 希釈; Abcam)、抗ダイナミン関連タンパク (dynamin-related protein, Drp)1 抗体 (#ab184247；1:1000 希釈; Abcam)を用い、 2 次抗体には、HRP 標識抗ウサギ免疫グロブリン次抗体 (#ab97051；1:5000 希釈; Abcam）を用いた。内部コントロールとして抗 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 抗体 (#2118；1:5000 希釈; Cell Signaling) を用いて目的タンパク質の発現量を標準化した。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 3 %スキムミルクを用いた。

1) 1×TBS (tris-buffered saline)[*1] で振蕩しながら洗浄 (10 分間 ×3 回) した。
2) 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。
3) 1×TBS で振蕩しながら洗浄 (10 分間×3 回) した。
4) 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。
5) 1×TBS で振蕩しながら洗浄 (10 分間×3 回) した。

[*1]1×TBS の組成 : 20×トリス緩衝生理食塩水 [0.4 mol/l Tris/HCl (pH 7.6)、3 mol/l NaCl] を純水で 20 倍に希釈し、0.1 %となるように polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween20®、和光純薬) を加えた。

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、MD、USA) を用いて集積光濃度を定量して解析した。

4.10. Realtime PCR (polymerase chain reaction) 法

組織からの RNA (ribonucleic acid) 抽出

QuickGene RNA Tissue kit S を用いて抽出を行った。

1) 摘出した心臓から、すばやく右心房を摘出し、RNAlater (Thermo Fisher Scientific) に 4℃の冷蔵庫内で一晩浸し、その後液体窒素で凍結しマイナス 80℃で保存した。
2) 凍結保存した組織を氷上で解凍した。解凍した組織を、メルカプトエタノール入りの lysis buffer 500 µl の入ったチューブに移した。ボールミル型ホモジ

ナイザーでホモジナイズを行うため各チューブにはあらかじめ直径 5 mm のジルコニアボールを 5 個入れた。

3) 組織はトミー精工製 Micro Smash MS-100 を用い、毎分 3800 *rpm*、300 秒で 4 回 (氷上で各インターバルは 20 秒) ホモジナイズした。
4) 組織破片を分離除去するため ≥ 17000 *g* で 3 分間、室温で遠心した。その後、上清 350 µl を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。
5) Solubilization buffer を 175 µl 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行った。
6) 特級エタノール (> 99.5 %、和光純薬) を 175 µl 添加し、再び最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行い、遠心分離器で数秒間スピンダウンしてマイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集した。
7) 抽出液完成後、調整した抽出液を全量、QuickGene-810 (富士フイルム、東京) のカートリッジへ添加し、RNA 抽出を開始した。
8) 数分後に RNase-Free DNase set (キアゲン、東京) を添加して DNase 処理を行った後に機械を再始動させ、RNA 抽出を再開し total RNA を回収した。
9) Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer、Thermo Scientific) を用いて、RNA 量を測定し、抽出した RNA は次ステップの使用までマイナス 80℃で凍結保存した。

逆転写反応

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用した。

1) 抽出した RNA を RNase フリーの滅菌水で溶解し、100 ng/µl の溶液となるように調整した。
2) 下記の試薬を調整して、2×reverse transcription master mix を作成した。

コンポーネント	µl / well
10×Reverse Transcription Buffer	2.0
25×Deoxynucleotide Mix (100 mmol)	0.8
10×Reverse Transcription Random Primers	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
RNase Inhibitor	1.0
Nuclease-free H_2O	3.2
Total per reaction	10.0

3) 2×reverse transcription master mix 10 µl および RNA サンプル 10 µl (1000 ng) を各ウェルに添加した。
4) 逆転写反応は、以下のサーマルサイクラーの設定で行った。
25℃ (10 分) → 37℃ (120 分) → 85℃ (5 分) → 4℃ (∞)
5) 合成した cDNA は使用時までマイナス 20℃で保存した。

Real-time PCR

目的の cDNA を増幅させるため、Taqman™ アッセイによる定量的 (quantitative, q) PCR を行った。

1) qPCR マスターミックスを下記の試薬で調整した。

コンポーネント	µl / well
Taqman Universal Master Mix (2×)	12.5
Taqman Gene Expression Assay (20×)	1.25
Control Assays (GAPDH)	1.25
Nuclease-free H_2O	5.0
Total per reaction	20.0

2) 調整したマスターミックスを 20 µl ずつ PCR ウェルに分注した。
3) 蒸留水を用いて希釈した各サンプルの cDNA 溶液を、20 µl ずつ PCR ウェルに添加し、2 回ピペッティングを行い混合した。
4) 下記の反応条件で Real-time PCR を行った。

Step 1	50℃、2 分
Step 2	95℃、10 分
Step 3 (50 サイクル)	95℃、15 秒 60℃、1 分

内在性コントロールとして GAPDH を用いて、蛍光標識された PCR 産物の増幅曲線状の閾値線を基にサイクル数 (cycle threshold, CT) を求め、ΔCT 法を用いて遺伝子発現を定量化した。

4.11. 統計学的検討

得られた数値は平均値 ± 標準誤差で示した。2 群間の平均値の差の検定は、F 検定により等分散性を確認し、Student's *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) もしくは Kruskal-Wallis test を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Tukey 法もしくは Dunn's 法を用いた。対応のない要因を 2 つ含む検定に関しては、必要に応じて two-way ANOVA を施行し、有意差が認められた場合は事後検定として Sidak 法を用いた。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 7 (GraphPad Software、CA、USA) を使用した。検定において、帰無仮説下での確率を p として、$p < 0.05$ を統計学的有意と定義した。

5. 実験結果

5.1. 動物特性、心エコーデータ

図 10 に対照群、糖尿病群、糖尿病 ＋EMPA 群からなる 3 群の血糖値と体重の推移を時間経過で示す。血糖値は、5 週目まで 3 群間で有意な差はなかったが、STZ 投与後の 6 週目から、対照群より糖尿病群と糖尿病 ＋EMPA 群で高値となった。しかし、EMPA による治療後の血糖値は、10 週目と 14 週目には、糖尿病群より糖尿病 ＋EMPA 群で有意に低下した。体重については、実験期間を通して、3 群間で有意な差は見られなかった。

次に、表 2 に 14 週目の血糖値、インスリン値、体重、心エコーデータの結果を示す。インスリン値は、対照群と比べて、糖尿病群と糖尿病 ＋EMPA 群で有意に低下していた。心エコーを施行時の、心拍数は 3 群間で有意な差はなかった。左房内径、左室拡張末期径、左室収縮末期径、および左室内径短縮率も 3 群間で有意な差は認めなかった。また対照群と比較して、糖尿病群では心室中隔壁厚と心室後壁厚が拡大しており、左室の肥大を認めたが、一方で糖尿病 ＋EMPA 群では左室後壁厚が縮小しており、EMPA によって心室壁の肥大が改善する結果であった。

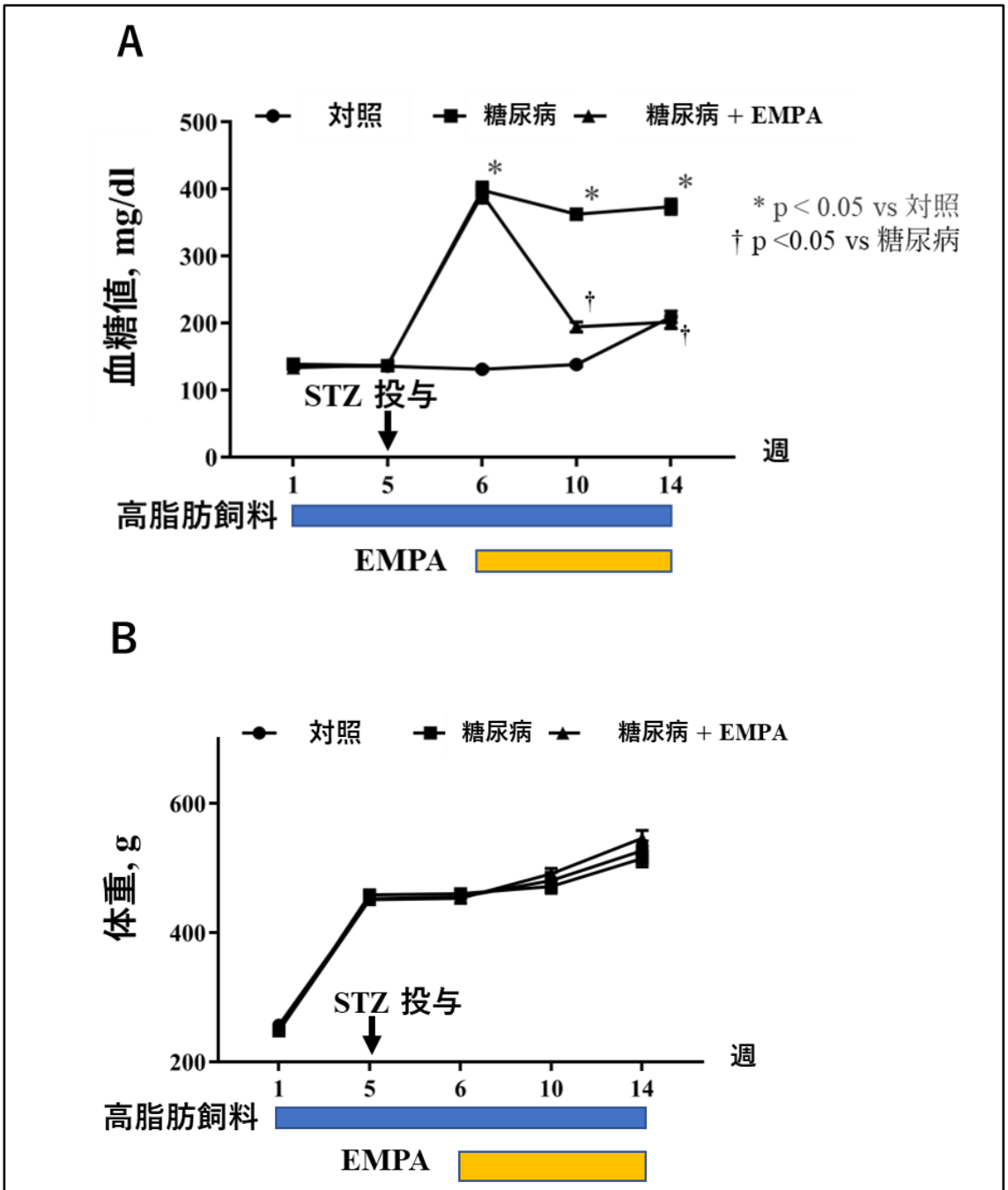


図 10. 血糖値 (A) と体重 (B) の時間経過

血糖値と体重の経時的な変化を示している。

データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病。

表 2. 動物特性と心エコーデータ

データは平均値 ± 標準誤差。 *p < 0.05: vs. 対照、†p < 0.05: vs. 糖尿病

	対照 n=24	糖尿病 n=24	糖尿病 + EMPA n=24
血糖値, mg/dl	209 ± 8	374 ± 11 *	201 ± 10 †
インスリン, ng/ml	0.38 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.01
体重, g	527 ± 15	515 ± 13	546 ± 12
左房内径, mm	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.1
心室中隔壁厚, mm	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1 *	1.4 ± 0.1
左室後壁厚, mm	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1 *	1.5 ± 0.1 †
左室拡張末期径, mm	7.9 ± 0.1	7.8 ± 0.2	8.0 ± 0.2
左室収縮末期径, mm	5.1 ± 0.1	4.8 ± 0.2	5.0 ± 0.1
左室内径短縮率, %	35.8 ± 0.9	38.4 ± 1.7	38.6 ± 0.9
心拍数, bpm	278 ± 10	267 ± 10	274 ± 7

5.2. ランゲンドルフ潅流心における電気生理学検査

5.2.1. ランゲンドルフ潅流心における心房性不整脈の評価

EMPA が心房性不整脈の誘発性に与える影響を評価するため、対照群、糖尿病群と糖尿病 ＋EMPA 群の 3 群において、ランゲンドルフ潅流心における心房性不整脈の誘発性を評価した。図 11 A は各群の代表的な心電図である。対照群の不整脈誘発率は 12.5 %であったが、糖尿病群では 75 %と有意に心房性不整脈の誘発率が増加し (対照、n = 8 vs. 糖尿病、n = 8、p = 0.041)、EMPA の投与によって不整脈の誘発率は 12.5 %と抑制された (糖尿病 ＋EMPA、n = 8 vs. 糖尿病、p = 0.041) (図 11 B)。また、心房性不整脈の持続時間は、糖尿病群において有意に増加し、EMPA の投与によって短縮する結果となった [0.3 ± 0.1 s (対照、n = 8) vs. 64.4 ± 22.9 s (糖尿病、n = 8)、p = 0.007 ; 0.4 ± 0.1 s (糖尿病 ＋EMPA、n = 8) vs. 糖尿病、p = 0.007] (図 11 C)。

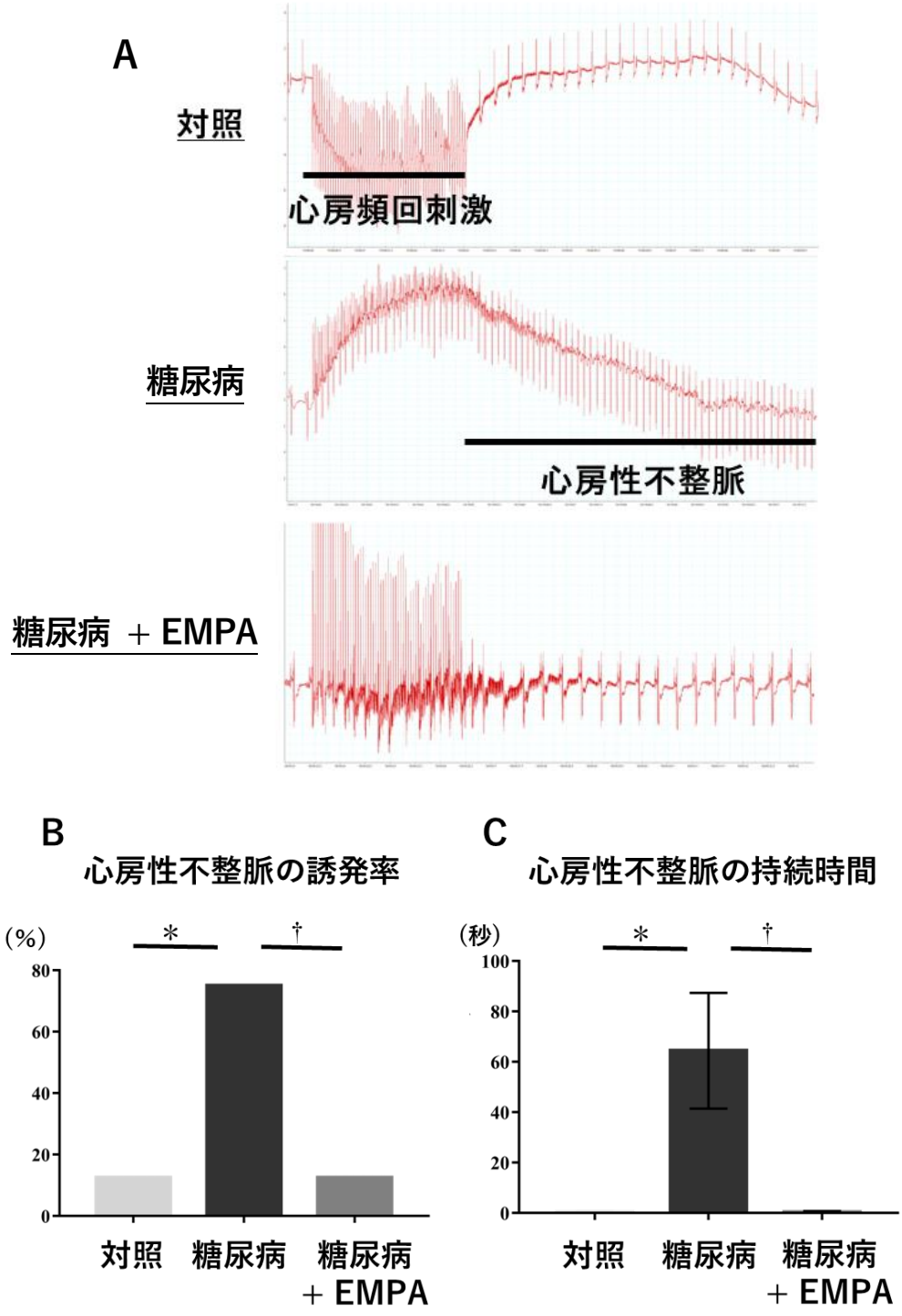


図 11. ランゲンドルフ潅流心での心房頻回刺激による不整脈誘発の評価

ランゲンドルフ潅流心で連続頻回刺激による不整脈の誘発性を評価し、対照群、糖尿病群および糖尿病 ＋EMPA 群の 3 群を比較した。代表的な心電図 (A)。心房性不整脈誘発率のグラフ (B)。心房性不整脈持続時間のグラフ (C)。データは平均値 ± 標準誤差。*$p < 0.05$ vs. 対照、†$p < 0.05$ vs. 糖尿病。

5.2.2. ランゲンドルフ潅流心における心房の伝導時間の評価

5.2.1 と同様にランゲンドルフ潅流心における心房の伝導時間を評価した。4.4.3 で定義した心房間伝導時間を測定した。ペーシング周期 150 ms (図 12 A)とペーシング周期 200 ms (図 12 B) でそれぞれ測定したが、対照群と比較して、糖尿病群では心房間伝導時間が遅延していた [21.5 ± 0.6, 21.1 ± 0.4 ms (ペーシング周期 150 ms, 200 ms) (対照、n = 8) vs. 25.9 ± 0.9, 24.8 ± 1.0 ms (糖尿病、n = 8)、p = 0.001, 0.005]。一方で、EMPA の投与によって、心房間伝導時間の遅延は改善した [21.5 ± 0.7, 20.1 ± 0.6 ms (ペーシング周期 150 ms, 200 ms) (糖尿病 + EMPA、n = 8) vs. 糖尿病、p = 0.001, 0.001]。

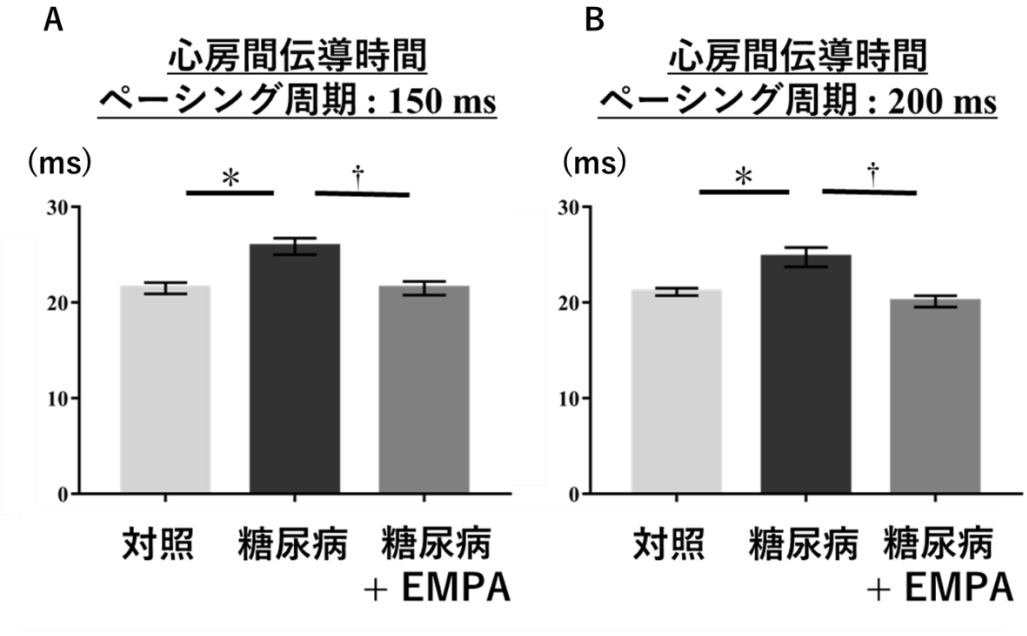


図 12. ランゲンドルフ潅流心における心房の伝導時間の評価

ランゲンドルフ潅流心で、心房の伝導時間を評価した。ペーシング周期 150 ms (A)、ペーシング周期 200 ms (B) でそれぞれ心房間伝導時間を測定した。データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病。

5.2.3. ランゲンドルフ潅流心における有効不応期の評価

次に、ランゲンドルフ潅流心における有効不応期を測定した。5.2.2 と同様に、ペーシング周期 150 ms (図 13 A) とペーシング周期 200 ms (図 13 B) でそれぞれ測定したが、3 群間に有意な差は認めなかった。

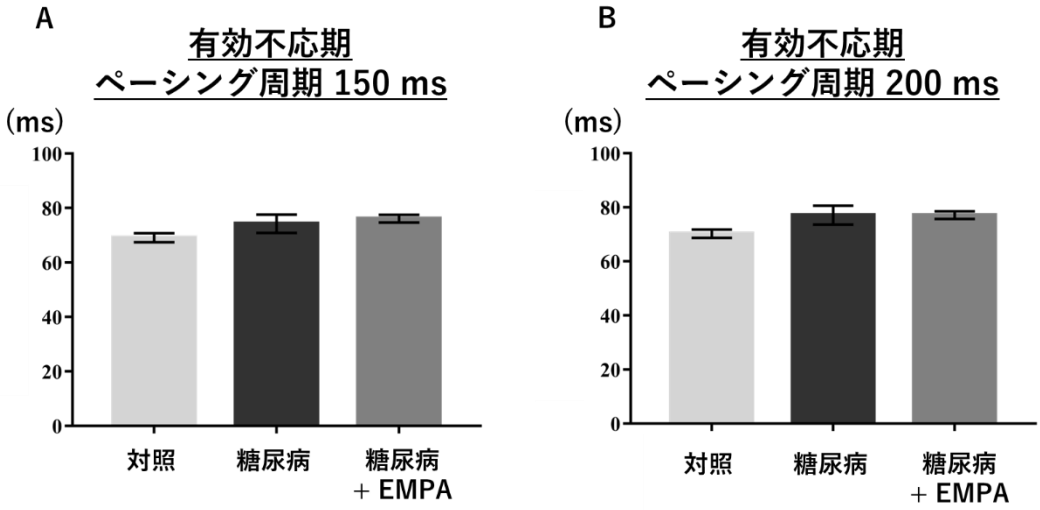


図 13. ランゲンドルフ潅流心における有効不応期の評価

ランゲンドルフ潅流心で、有効不応期を評価し、ペーシング周期 150 ms (A)、ペーシング周期 200 ms (B) でそれぞれ有効不応期を測定した。

データは平均値 ± 標準誤差。

5.3. 組織学的評価

5.3.1. ヘマトキシリン染色による心筋細胞断面積の評価

心筋細胞の断面積を評価するため、心房組織を用いてヘマトキシリン染色を行った (図 14 A、B)。対照群と比較して、糖尿病群の心筋細胞断面積は有意に増加していた [96.5 ± 9.7 μm^2 (対照、n = 8) vs. 141.6 ± 9.3 μm^2 (糖尿病、n = 8)、p = 0.003]。しかし、EMPA の投与によって、心筋細胞の断面積は改善した [108.0 ± 5.3 μm^2 (糖尿病 ＋EMPA、n = 8) vs. 糖尿病、p = 0.026]。

5.3.2. マッソントリクローム染色による心房の線維化の評価

続いて、心房の線維化を評価するためにマッソントリクローム染色を行った (図 15 A)。線維化が心房を占める領域を解析し、3 群で比較した (図 15 B)。対照群と比較して、糖尿病群の心房の線維化は有意に増加していた [4.2 ± 0.4 % (対照、n = 8) vs. 9.9 ± 0.7 % (糖尿病、n = 8)、p < 0.001]。一方で、EMPA の投与によって、心房の線維化は減少していた [5.8 ± 0.5 % (糖尿病 ＋EMPA、n = 8) vs. 糖尿病、p < 0.001]。

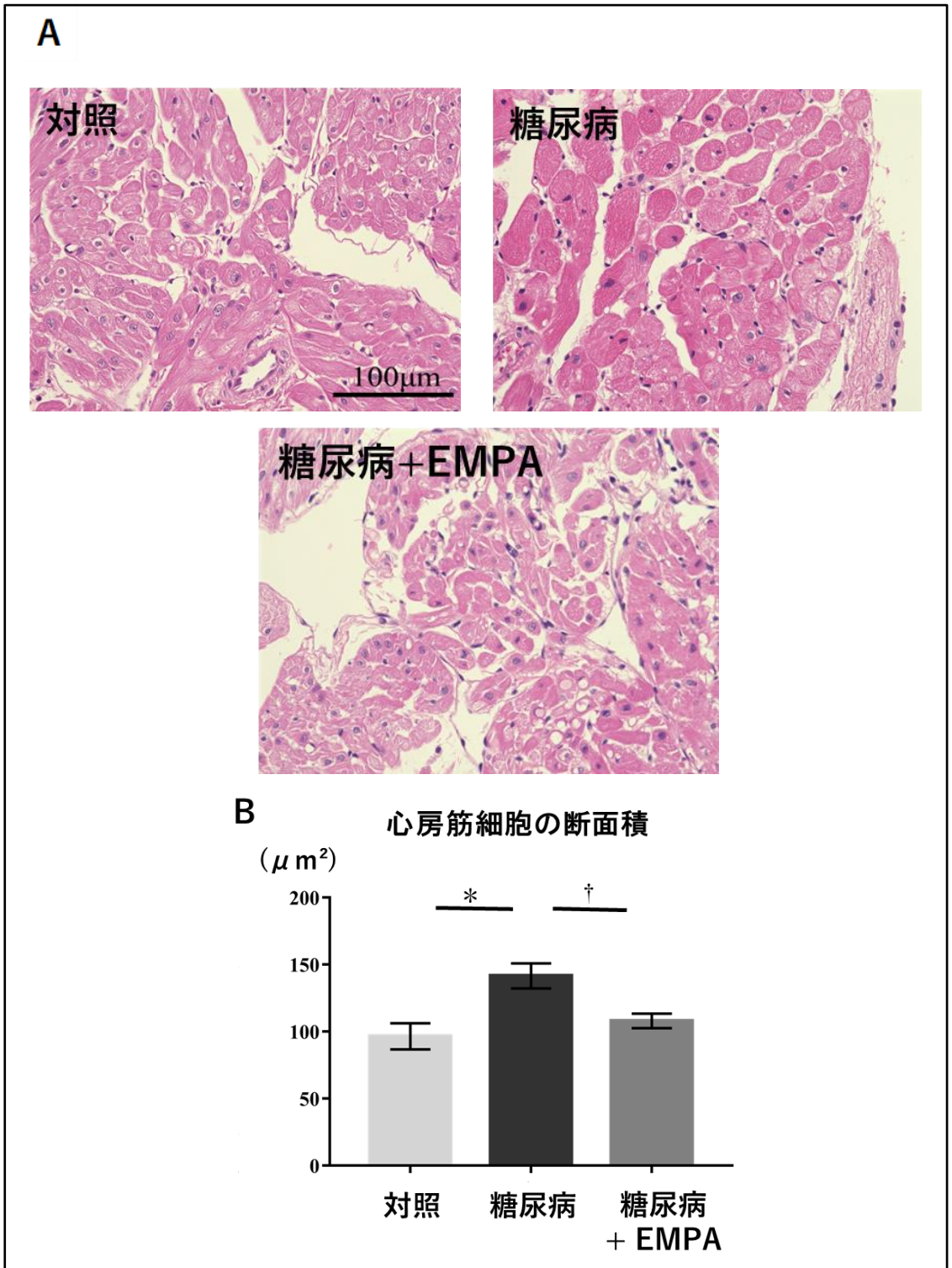


図 14. ヘマトキシリン染色と心房筋細胞の断面積

各群のヘマトキシリン染色の代表図を示す (A)。ヘマトキシリン染色で得られた心房筋細胞の断面積を 3 群で比較した (B)。

データは平均値 ± 標準誤差。*$p < 0.05$ vs. 対照、†$p < 0.05$ vs. 糖尿病。

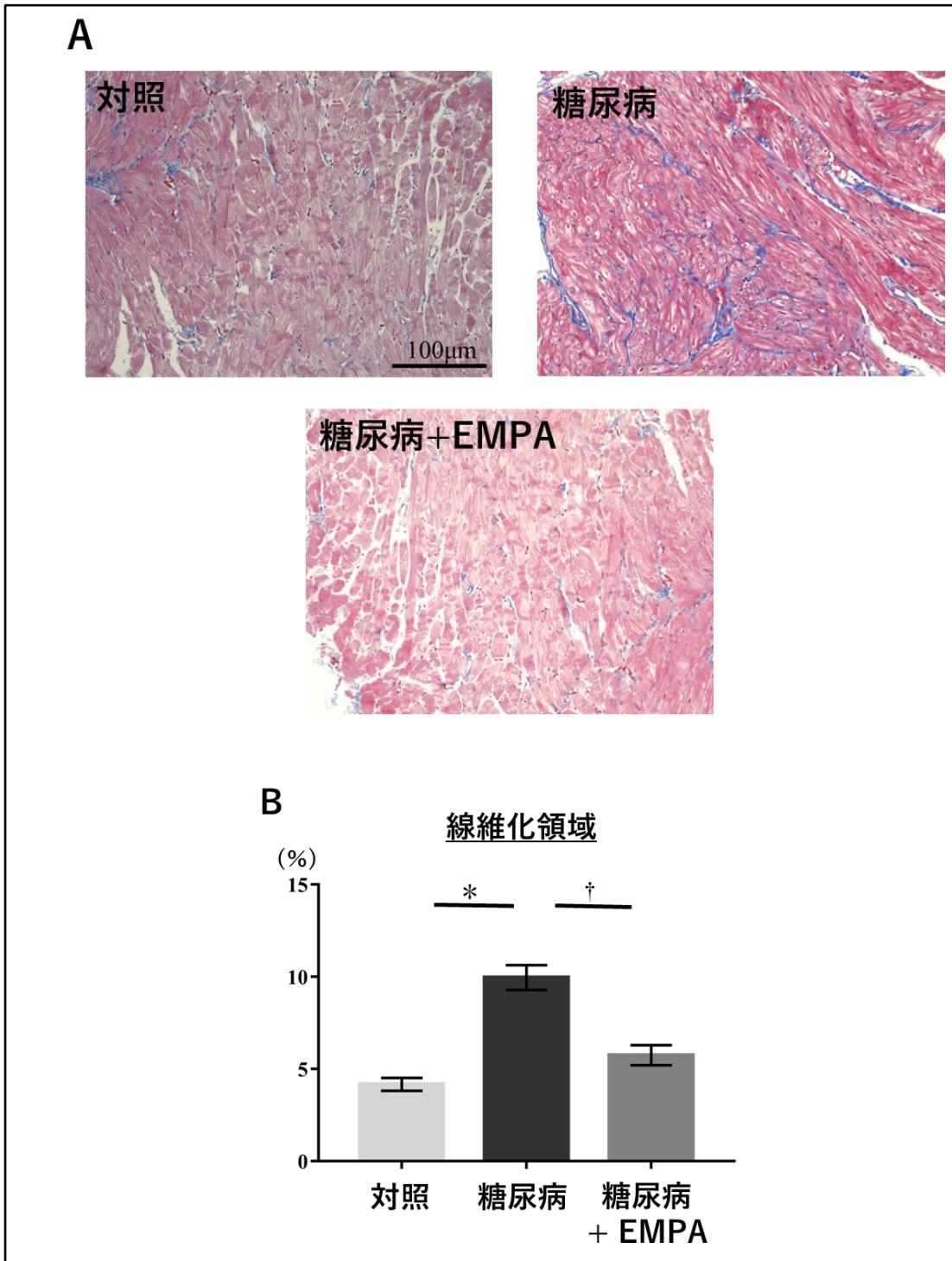


図 15. マッソントリクローム染色による心房の線維化の評価

各群のマッソントリクローム染色の代表図を示す (A)。心房組織に対して線維化領域が占める割合を解析し、3 群で比較した (B)。

データは平均値 ± 標準誤差。*$p < 0.05$ vs. 対照、†$p < 0.05$ vs. 糖尿病。

5.4. 線維化シグナルの評価

次に、糖尿病における線維化に影響を及ぼす線維化シグナルと炎症シグナルについて評価するため、心房組織を用いてウェスタンブロッティングと qPCR を行った。まずウェスタンブロッティングによって、NF-κB とリン酸化 (phosphorylated: p) NF-κB のタンパク質発現量を測定し、その比を評価した (図 16)。p NF-κB/ NF-κB は、対照群と比較して糖尿病群で有意に増加していた [1.0 ± 0.1 (対照、n = 6) vs. 2.7 ± 0.6 (糖尿病、n = 6)、p = 0.001] が、EMPA の投与によって低下した [1.2 ± 0.1 (糖尿病 + EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.020]。次に qPCR によって、TGF-β、I 型コラーゲン、III 型コラーゲン、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α、インターロイキン (interleukin, IL)-1β、および IL-6 を評価した (図 17)。上記の mRNA の発現はそれぞれ、対照群と比較して糖尿病群で有意に増加した。一方で EMPA の投与によって、I 型コラーゲン、III 型コラーゲン、TNF-α、IL-1β、および IL-6 の mRNA の発現は有意に抑制された。

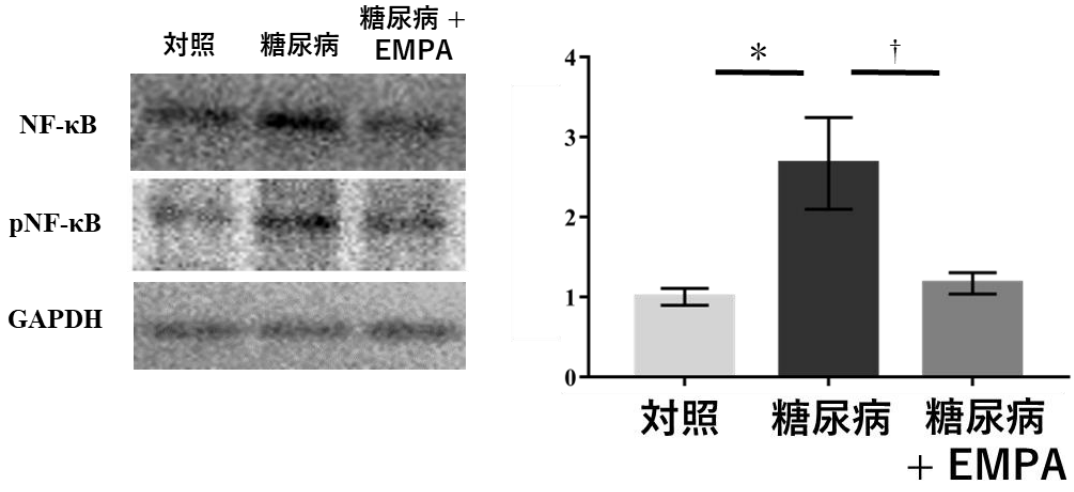


図 16. p NF-κB/ NF-κB のタンパク質発現の評価

ウェスタンブロッティングで、3 群の心房筋ライセートの p NF-κB/ NF-κB のタンパク質発現を評価した。代表的なブロットを示す (左図)。対照群の p NF-κB/ NF-κB の値を 1 として規格化したときのデータを示している (右図)。

データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病。

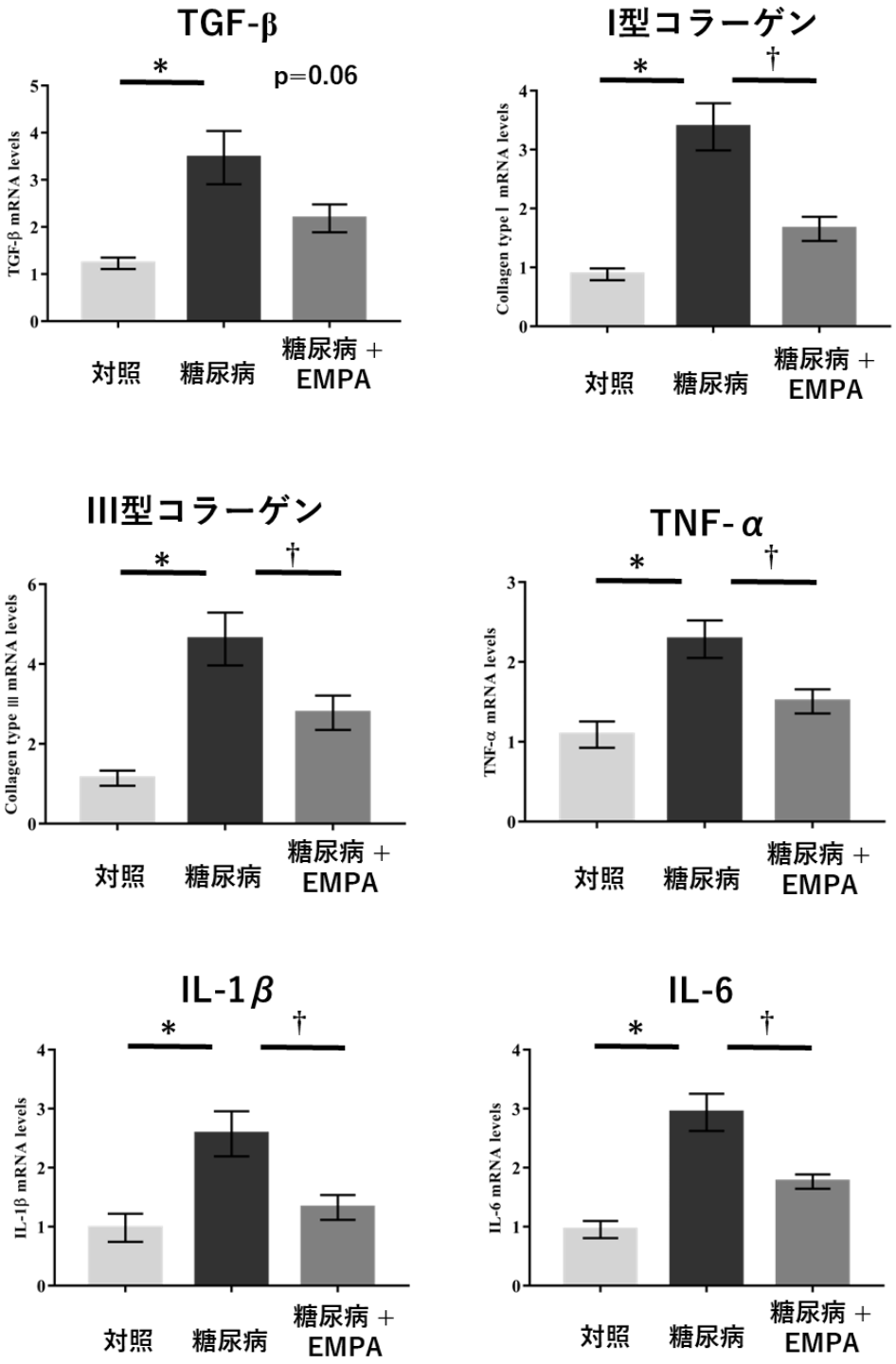


図 17. 線維化シグナル関連因子の mRNA 発現の評価

qPCR によって、TGF-β、I 型コラーゲン、III 型コラーゲン、TNF-α、IL-1β、および IL-6 の mRNA 発現量を比較した。対照群の mRNA の値を 1 として規格化したときのデータを示している (各群 n = 8)。

データは平均値 ± 標準誤差。*$p < 0.05$ vs. 対照、†$p < 0.05$ vs. 糖尿病。

5.5. ミトコンドリア呼吸能と活性酸素種の評価

ミトコンドリアは電子伝達系での酸化的リン酸化によって、ATP 産生を担っている。また、ミトコンドリアの ATP 産生能はミトコンドリア呼吸能と強く正の相関関係を示すことが報告されている (Lark et al., 2016)。このため EMPA によるミトコンドリア呼吸能とミトコンドリア由来の活性酸素種の産生への影響を Oxygraph-2k で評価した。

5.5.1. ミトコンドリア呼吸能の評価

ミトコンドリア呼吸能は、心房筋を用いて、Oxygraph-2k で酸素消費速度を測定した。各呼吸状態におけるミトコンドリアの酸素消費速度を示す (図 18 A)。各呼吸状態におけるミトコンドリアの酸素消費速度は、3 群間で有意な差を認めなかった。しかし、RCR は、C I と C I+II でともに、対照群と比較して、糖尿病群で有意に低下していた [3.7, 1.7 (C I, C I+II) (対照、n = 8) vs. 1.8, 1.4 (糖尿病、n = 8)、p = 0.006, 0.008] (図 18 B)。また、C I に関連する RCR は、EMPA の投与によって、有意に改善した [2.9 (糖尿病 + EMPA、n = 8) vs. 糖尿病、p = 0.034] (図 18 Ba)。

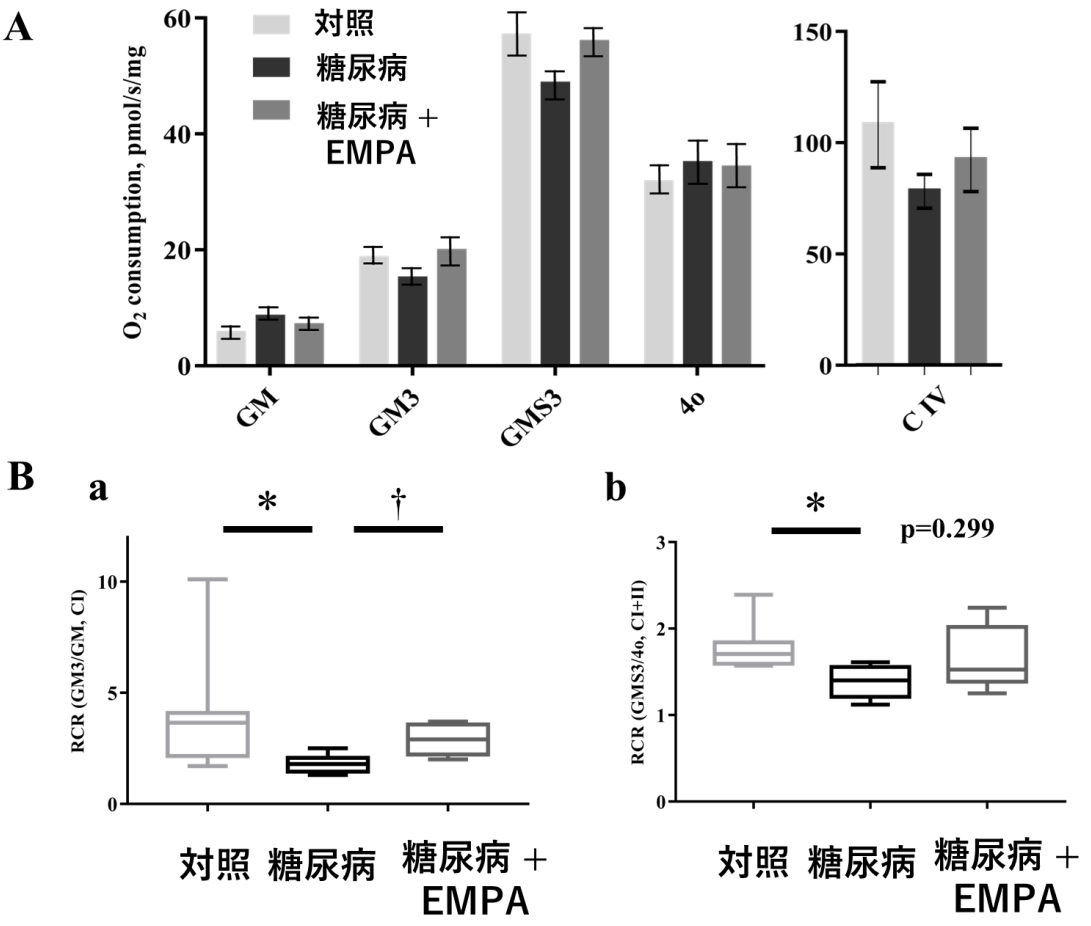


図 18. Oxygraph-2k によるミトコンドリア呼吸能の評価

ミトコンドリアの各呼吸状態の酸素消費速度 (O_2 consumption) を測定した (A)。C I に関連する RCR を Ba に、C I+II に関連する RCR を Bb に示す。

A：データは平均値 ± 標準誤差。

B：データは上から順に最大値、第 3 四分位、中央値、第 1 四分位、最小値を示している。*$p < 0.05$ vs. 対照、†$p < 0.05$ vs. 糖尿病。

GM (グルタミン酸、リンゴ酸), state 2 での酸素消費速度;

GM3 (グルタミン酸、リンゴ酸), state 3 での酸素消費速度;

GMS3 (グルタミン酸、リンゴ酸、コハク酸), state 3 での酸素消費速度;

4o (state 4 O_2 consumption、オリゴマイシン), state 4 での酸素消費速度;

C (mitochondria complex) IV, ミトコンドリア複合体 IV

5.5.2. ミトコンドリア由来の活性酸素種の評価

次に 5.5.1 と同様に Oxygraph-2k を用いて、EMPA がミトコンドリア由来の活性酸素種の産生に与える影響について評価した (図 19)。対照群と比較して、糖尿病群の活性酸素種の産生量は、C I 関連 [0.15 ± 0.01 pmol/s/mg (対照、n = 8) vs. 0.23 ± 0.01 pmol/s/mg (糖尿病、n = 8)、p = 0.001] と C I+II 関連 [0.15 ± 0.01 pmol/s/mg (対照、n = 8) vs. 0.23 ± 0.01 pmol/s/mg (糖尿病、n = 8)、p = 0.002] において、ともに有意に増加した。一方で、EMPA の投与によって、C I 関連の活性酸素種の産生量 [0.16 ± 0.01 (糖尿病 + EMPA、n = 8) vs. 糖尿病、p = 0.003] と、C I+II 関連の活性酸素種の産生量 [0.15 ± 0.01 (糖尿病 + EMPA、n = 8) vs. 糖尿病、p = 0.001] は、ともに有意に低下した。

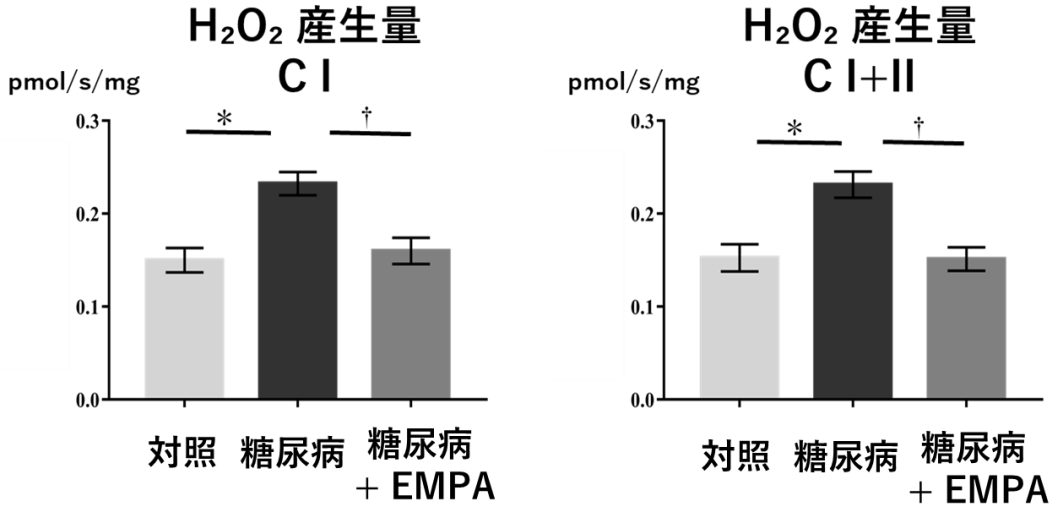


図 19. Oxygraph-2k によるミトコンドリア由来の活性酸素種産生の評価
ミトコンドリア由来の活性酸素種産生量を測定した。C I と II に関連する基質を添加することで、C I に関連する H_2O_2 (活性酸素種の一種) の産生量 (左図) と C I+II に関連する H_2O_2 の産生量 (右図) を評価した。
データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病。

5.6. 酸化ストレスの評価

5.6.1. スーパーオキサイドジスムターゼ活性の評価

次に、心房組織における酸化ストレスを評価するために、心房組織を用いて、酸化ストレスマーカーである SOD 活性を測定した (図 20)。SOD 活性は、対照群と比較して、糖尿病群で有意に低下した [4650 ± 1055 U/g (対照、n = 6) vs. 568 ± 102 U/g (糖尿病、n = 6)、p = 0.004]。また、EMPA の投与によって、SOD 活性は有意に改善した [2708 ± 559 (糖尿病 + EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.024]。

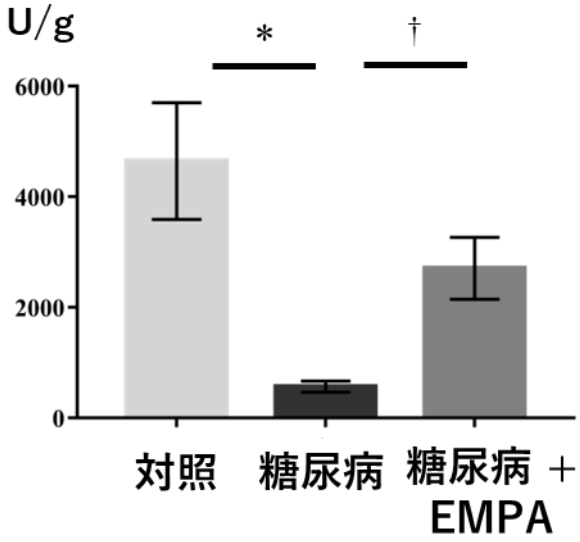


図 20. SOD 活性の評価

心房組織を用いて、酸化ストレスマーカーである SOD 活性を測定し、3 群の心房の酸化ストレスを評価した。データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病

5.6.2. マロンジアルデヒド濃度の評価

5.6.1.と同様に心房の酸化ストレスを評価するために、心房組織を用いて、酸化ストレスマーカーである MDA 濃度を測定した (図 21)。MDA 濃度は、対照群と比較して、糖尿病群で有意に増加し [2.2 ± 0.1 µmol/l (対照、n = 8) vs. 5.6 ± 0.3 µmol/l (糖尿病、n = 8)、p < 0.001]、EMPA の投与によって有意に減少した [2.8 ± 0.1 µmol/l (糖尿病 + EMPA、n = 8) vs. 糖尿病、p < 0.001]。

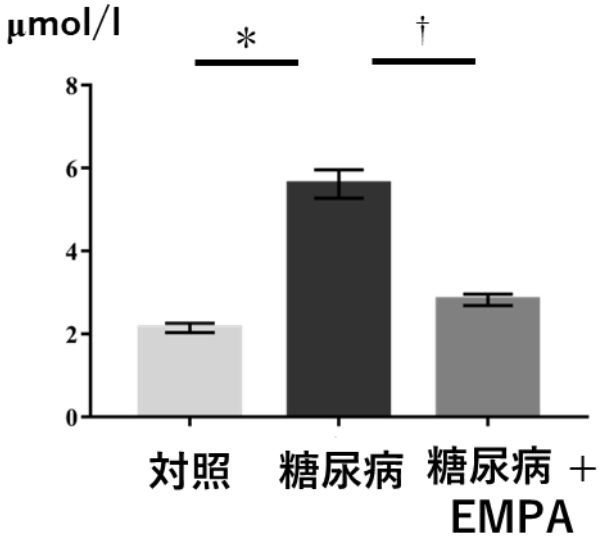


図 21. MDA 濃度の評価

心房組織を用いて、酸化ストレスマーカーである MDA 濃度を測定し、3 群の心房の酸化ストレスを評価した。データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病

5.7. クエン酸シンターゼ活性の評価

クエン酸シンターゼは、ミトコンドリアマトリックスに存在しているため、損傷のないミトコンドリアの量的マーカーであると言われている (Wei et al., 2020)。ミトコンドリアの量的評価を行うため、3 群の心房組織を用いて、クエン酸シンターゼ活性を測定した (図 22)。対照群と比較して、糖尿病群のクエン酸シンターゼ活性は有意に低下していた [4.1 ± 0.3 U/g (対照、n = 6) vs. 2.3 ± 0.2 U/g (糖尿病、n = 6)、p = 0.009] が、EMPA の投与によって、有意に改善した [3.6 ± 0.5 (糖尿病 + EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.044]。

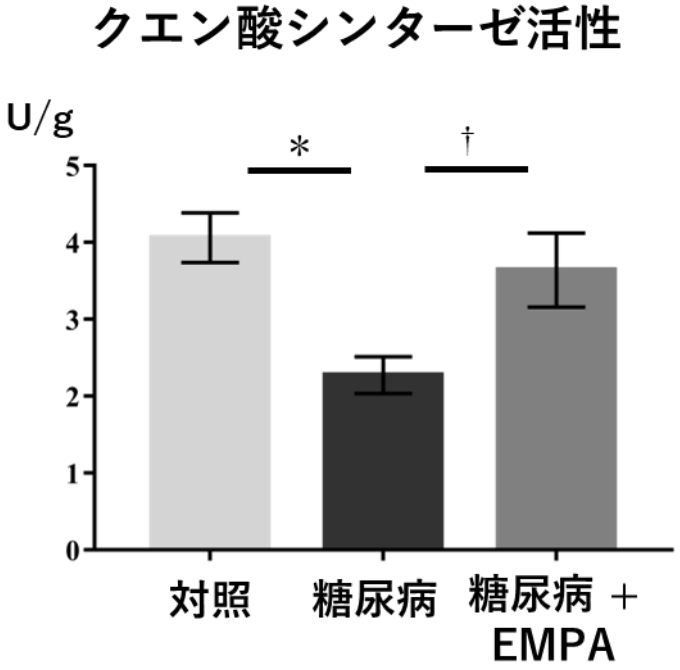


図 22. クエン酸シンターゼ活性の評価

心房組織を用いて、ミトコンドリアの量的マーカーである
クエン酸シンターゼ活性を測定した。
データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病

5.8. AMPK シグナルとミトコンドリアのダイナミクスに関連するタンパク質発現の評価

5.5、5.6 から、EMPA がミトコンドリア呼吸能を改善し、ミトコンドリア由来の活性酸素種の産生を抑制し、酸化ストレスを抑制する結果を得られた。次に、EMPA のミトコンドリアへの作用機序の一つとして考えられる、AMPK シグナルとミトコンドリアのダイナミクスに関連するタンパク質発現について評価した。

5.8.1. AMPK シグナルの評価

AMPK シグナルについて、AMPK は活性化 (リン酸化) することで、PGC-1α、および TFAM を介して、ミトコンドリアの生合成やミトコンドリアの抗酸化防御に作用すると報告されている (Rabinovitch et al., 2017)。このため、EMPA が、AMPK シグナルに及ぼす影響について、ウェスタンブロッティングを用いて、それぞれのタンパク質発現を評価した。まず、AMPK のタンパク質発現は、3 群間で有意な差を認めなかった [1.0 ± 0.1 (対照、n = 6) vs. 0.7 ± 0.1 (糖尿病、n = 6)、0.9 ± 0.1 (糖尿病 + EMPA、n = 6)、p = 0.233] (図 23)。次に、AMPK 活性の評価を行うため、リン酸化 AMPK (pAMPK) と AMPK の量比 (pAMPK/AMPK) を定量した。対照群と比較して、糖尿病群では、pAMPK/AMPK は有意に低下した [1.0 ± 0.1 (対照、n = 6) vs. 0.4 ± 0.1 (糖尿病、n = 6)、p = 0.004]。一方で、EMPA の投与によって、pAMPK/AMPK は有意に増加した [0.9 ± 0.1 (糖尿病 + EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.005] (図 23)。

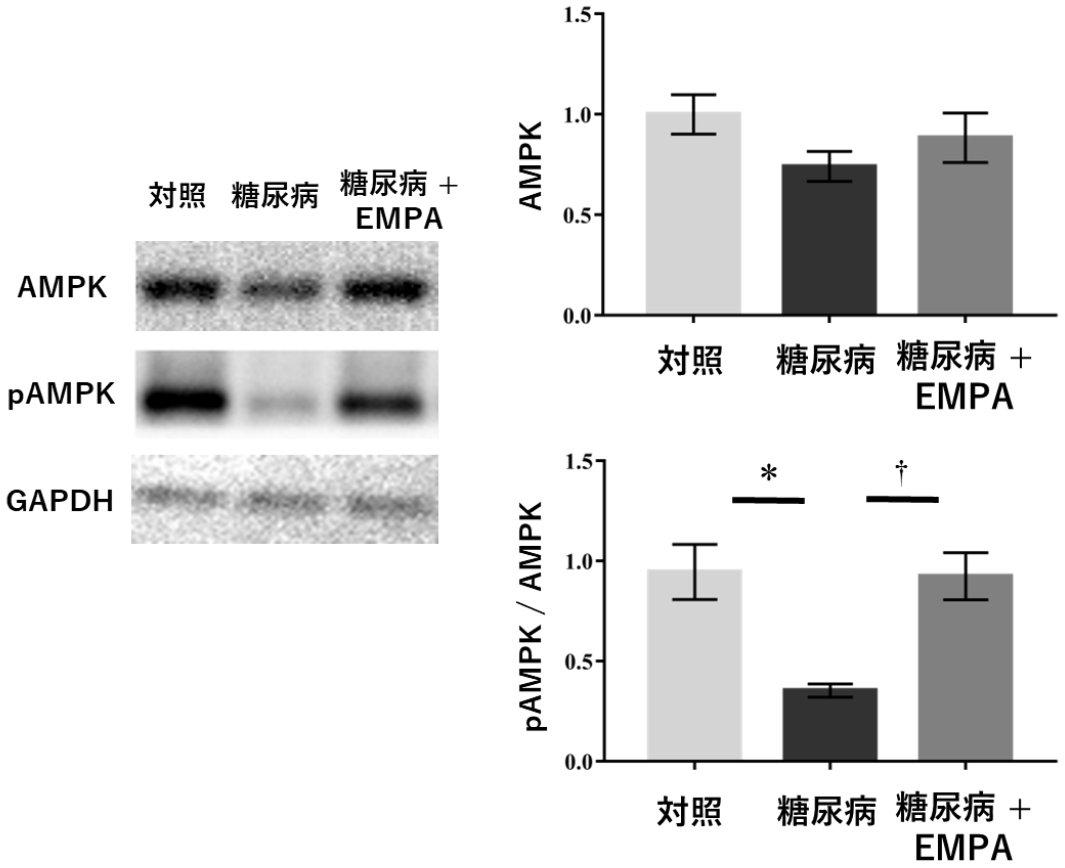


図 23. AMPK のタンパク質発現と活性の評価

ウェスタンブロッティングで、AMPK の 3 群の心房筋ライセートのタンパク質発現と活性を評価した。代表的なブロットを示す (左図)。対照群の AMPK (右上図) と pAMPK/AMPK の値 (右下図) 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。*$p < 0.05$ vs. 対照、†$p < 0.05$ vs. 糖尿病。

次に、AMPK シグナルの下流に存在する PGC-1α と TFAM のタンパク質発現を評価した。PGC-1α のタンパク質発現は、対照群と比較して糖尿病群で有意に低下したが [1.0 ± 0.2 (対照、n = 6) vs. 0.3 ± 0.1 (糖尿病、n = 6)、p = 0.003]、EMPA の投与によって、有意に増加した [0.7 ± 0.1 (糖尿病 ＋EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.042] (図 24 A、B)。同様に TFAM のタンパク質発現は、対象群と比較して、糖尿病群で有意に低下していた [1.0 ± 0.1 (対照、n = 6) vs. 0.3 ± 0.1 (糖尿病、n = 6)、p = 0.001]。また EMPA の投与によって、TFAM のタンパク質発現は有意に増加した [0.9 ± 0.1 (糖尿病 ＋EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.006] (図 24 C、D)。

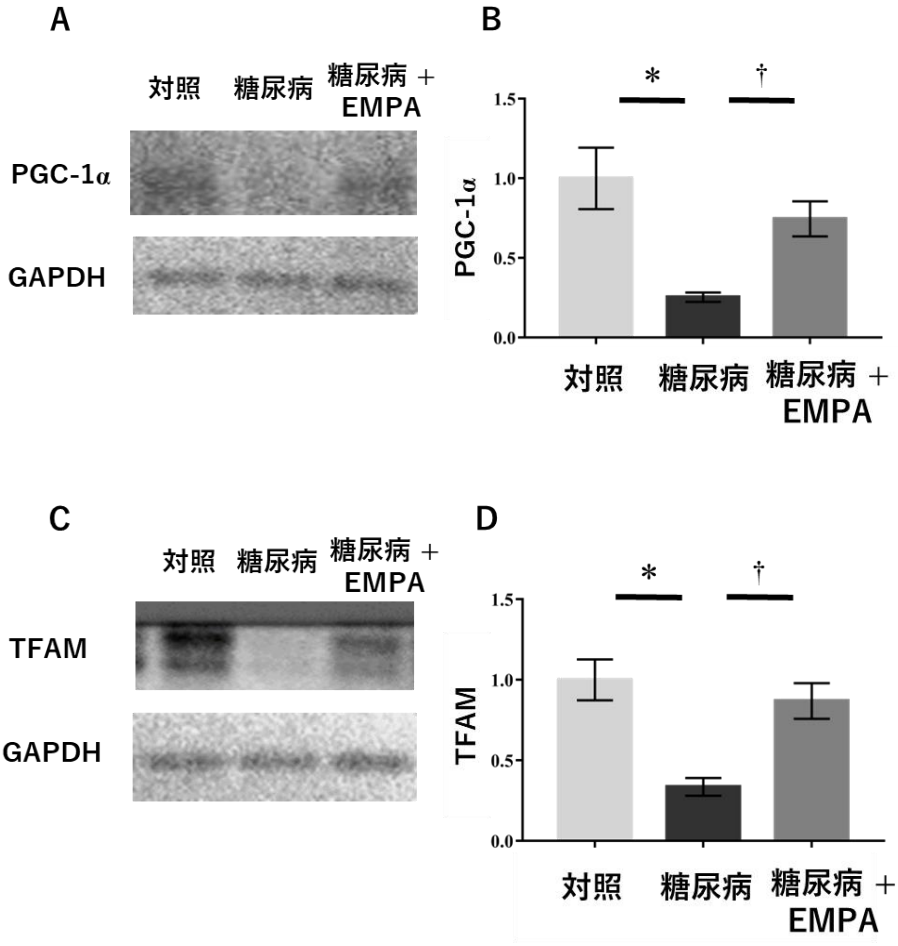


図 24. PGC-1α、TFAM のタンパク質発現の評価

ウェスタンブロッティングで、3 群の心房筋ライセートの PGC-1α と TFAM のタンパク質発現を評価した。代表的なブロットを示す (A、C)。対照群の PGC-1α と TFAM の値を 1 として規格化したときのデータを示している (B、D)。データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病。

5.8.2. ミトコンドリアのダイナミクスに関連するタンパク質発現の評価

次に、EMPA が、ミトコンドリアのダイナミクスに与える影響について評価した。AMPK は活性化することで、ミトコンドリアの融合や分裂などのダイナミクスに影響を与えることが報告されている (Bode et al., 2021, Toyama et al., 2016)。EMPA は、AMPK を介して、ミトコンドリアのダイナミクスに影響を与えると考えられる。このため、ミトコンドリアの融合に関連する Mfn1、Mfn2、および OPA1 と、ミトコンドリアの分裂に関連する Drp1 のタンパク質発現を、ウェスタンブロッティングを用いて、それぞれ測定した。まず、Mfn1 のタンパク質発現は、対照群と比較して、糖尿病群で有意に低下し [1.0 ± 0.1 (対照、n = 6) vs. 0.4 ± 0.1 (糖尿病、n = 6)、p = 0.001]、EMPA の投与によって、回復した [0.9 ± 0.2 (糖尿病 ＋EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.001] (図 25 A、B)。Mfn2 のタンパク質発現も同様に、対照群と比較して、糖尿病群で有意に低下し [1.0 ± 0.1 (対照、n = 6) vs. 0.5 ± 0.1 (糖尿病、n = 6)、p = 0.006]、EMPA の投与によって、回復した [0.8 ± 0.1 (糖尿病 ＋EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.040] (図 25 C、D)。また、OPA1 のタンパク質発現も、対照群と比較して、糖尿病群で有意に低下し [1.0 ± 0.2 (対照、n = 6) vs. 0.3 ± 0.1 (糖尿病、n = 6)、p = 0.012]、EMPA の投与によって、回復した [0.8 ± 0.1 (糖尿病 ＋EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.045] (図 25 E、F)。

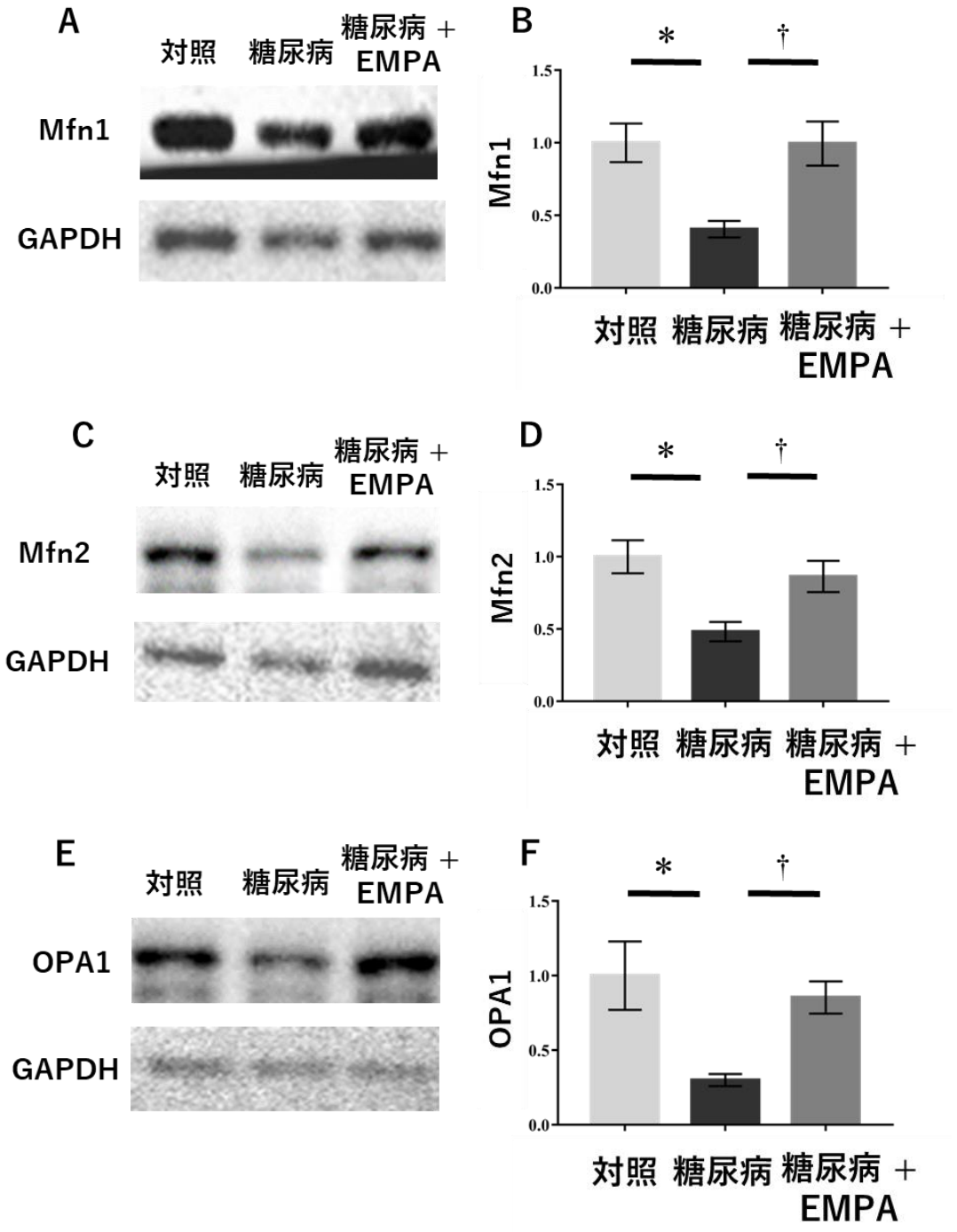


図 25. Mfn1、Mfn2、OPA1 のタンパク質発現の評価

ウェスタンブロッティングで、3 群の心房筋ライセートの Mfn1、Mfn2、および OPA1 のタンパク質発現を評価した。代表的なブロットを示す (A、C、E)。対照群の Mfn1、Mfn2 と OPA1 の値を 1 として規格化したときのデータを示している (B、D、F)。

データは平均値 ± 標準誤差。*$p < 0.05$ vs. 対照、†$p < 0.05$ vs. 糖尿病。

最後に、Drp1 のタンパク質発現の測定結果について示す (図 26)。Drp1 のタンパク質発現は、対照群と比較して、糖尿病群で有意に増加していた [1.0 ± 0.2 (対照、n = 6) vs. 2.2 ± 0.2 (糖尿病、n = 6)、p = 0.001]。一方で、EMPA の投与によって、Drp1 のタンパク質発現は有意に低下した [0.9 ± 0.1 (糖尿病 ＋EMPA、n = 6) vs. 糖尿病、p = 0.001]。

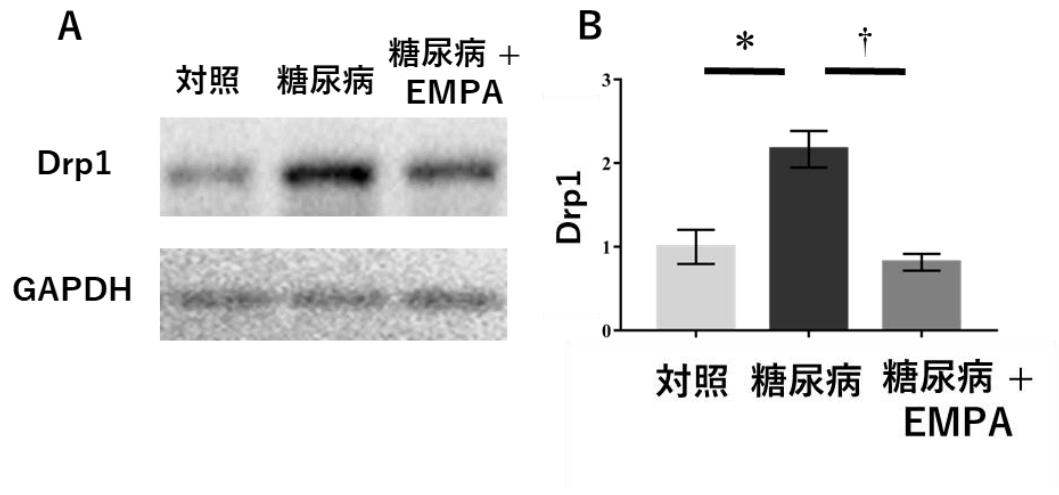


図 26. Drp1 のタンパク質発現の評価

ウェスタンブロッティングで、3 群の心房筋ライセートの Drp1 のタンパク質発現を評価した。代表的なブロットを示す (A)。対照群の Drp1 の値を 1 として規格化したときのデータを示している (B)。

データは平均値 ± 標準誤差。*p < 0.05 vs. 対照、†p < 0.05 vs. 糖尿病。

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) EMPA は、2 型糖尿病モデルラットにおいて、心房の伝導遅延を改善し、心房性不整脈の誘発性を低下させた。
2) EMPA は、2 型糖尿病モデルラットにおいて、線維化シグナルと炎症シグナルの過剰なアップレギュレーションを抑制し、心房の線維化を抑制した。
3) EMPA は、2 型糖尿病モデルラットにおいて、ミトコンドリアの呼吸能を改善し、ミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生を抑制し、また、心房組織における酸化ストレスを抑制した。
4) EMPA は、2 型糖尿病ラットにおいて、ミトコンドリアの生合成、融合や分裂に関連するタンパク質の発現を正常化させた。

6.1. 2 型糖尿病における心房のリモデリング

2 型糖尿病は、心房細動発症の独立した危険因子であることが知られている (Benjamin et al., 1994, Huxley et al., 2011)。2 型糖尿病における心房細動発症の原因としては、構造的、電気的、および自律神経系のリモデリングが関与している (Karam et al., 2017, Wang et al., 2019)。また、高血糖は心房を含む多臓器において、酸化ストレスを増強し、この過剰な酸化ストレスと炎症が、糖尿病における不整脈誘発性の心房リモデリングの重要なメディエーターであることが報告されている (Karam et al., 2017)。酸化ストレスは、NF-κB を活性化し TGF-β および TNF-α の発現を促進し、心房の線維化を促進する。本研究では、2 型糖尿病モデルラットにおいて、心房の構造的リモデリングの特徴である線維化が促進していることを確認し、心房における伝導の遅延につながり、心房細動の誘発性と持続性の増悪をもたらすことを確認した。さらに、ミトコンドリア由来の酸化ストレスと炎症シグナル伝達が、糖尿病モデルラットの心房において、増強されていることを確認した。したがって、ミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種、酸化ストレス、および心房の炎症を標的とした治療は、2 型糖尿病患者の心房細動発症の予防に貢献する可能性があることを示唆している。

6.2. 酸化ストレスにおけるミトコンドリアの役割

酸化ストレスは、生体の抗酸化防御機構を越える過剰な活性酸素種の産生によって生じ、タンパク質、脂質、および DNA に損傷を及ぼすことがわかっている。膨大なエネルギーが必要な心筋細胞においては、ミトコンドリアがエネルギー代謝で中心的な役割を果たしており、心筋細胞の体積のうち約 3 割を占める (Barth et al., 1992, Kim et al., 1994)。また、NOX や一酸化窒素合成酵素と並んで、ミトコンドリアは生体における活性酸素種の主な産生源である (Murphy, 2009, Teshima et al., 2014, Xie et al., 2015)。本研究では、2 型糖尿病モデルラットにおいて、ミトコンドリアの呼吸機能障害とミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生を確認し、心房組織での酸化ストレスの増強を確認した。また、以前の研究では、ミトコンドリア機能障害が心房リモデリングに関連しており、心臓手術後心房細動の発症につながることが報告されている (Shingu et al., 2018)。近年の研究では、ミトコンドリアの酸化ストレスが、筋小胞体からのカルシウムイオンの漏出と、線維化促進性および炎症性サイトカインの放出を伴うリアノジン受容体の機能障害を介して、心房細動の発症を促進する可能性があることが示唆されている (Fu et al., 2015, Xie et al., 2015)。このように、ミトコンドリアとその酸化ストレスは、心房細動発症において重要な役割を果たしている。また、糖尿病においても、酸化ストレスと炎症が心房細動の中心的なメディエーターとして関与している (Van Wagoner, 2008, Gutierrez and Van Wagoner, 2015, da Silva, 2017)。したがって、ミトコンドリアの機能障害と酸化ストレスは密接に関連しており、ミトコンドリアの機能障害を標的とする治療戦略は、心房細動の新しい治療法としての可能性を秘めている。

6.3. SGLT2 阻害薬の心房リモデリングおよび心房細動発症の抑制効果

本来 2 型糖尿病を治療するために開発された SGLT2 阻害薬であるが、2 型糖尿病患者の心臓血管死および心不全による入院を減少させるなど、その心保護作用について示されている (Zinman et al., 2015)。近年の研究では、SGLT2 阻害薬が 2 型糖尿病患者の心房細動発症リスクを軽減することも示唆されている (Li et al., 2020, Zelniker et al., 2020)。一方で、過去の無作為化比較試験では集中的な血糖コントロールは、心房細動の新規発症に影響を与えなかったということが報告されている (Fatemi et al., 2014)。さらに、SGLT2 阻害薬の心保護作用は、非糖尿病患者におい

ても実証されている (McMurray et al., 2019, Packer et al., 2020)。これらの報告は、SGLT2 阻害薬が、血糖降下作用だけでなく、血糖降下作用以外の作用機序を介して、患者の転帰を改善することを示唆している。現在、SGLT2 阻害薬が心保護作用をもたらす作用機序について、いくつかの報告がなされている。SGLT2 阻害薬による酸化ストレスの抑制は、異常なナトリウムイオンおよびカルシウムイオンレベルの均衡をとり、ミトコンドリア機能を保護することにより、心臓リモデリングを抑制していると考えられている (Peng et al., 2020)。また、EMPA が糖尿病マウスの心室においては、NOX 活性を低下させることにより心筋の酸化ストレスを改善したと報告されている (Li et al., 2019)。さらに、EMPA が糖尿病ラットの心房において、ミトコンドリアの呼吸能を改善することで、心房リモデリングを改善したことが報告されている (Shao et al., 2019)。しかしながら、心房におけるミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生とその酸化ストレスに対する EMPA の効果は、これまで検討されていなかった。本研究では、EMPA がミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生と、その酸化ストレスを抑制させることを明らかにした。また、2 型糖尿病モデルラットの心房において、ミトコンドリアの酸化的リン酸化能力、つまり呼吸能の改善や、心房性不整脈を抑制させる事が示された。

6.4. AMPK とミトコンドリア、および心房細動の関連と SGLT2 阻害薬が AMPK に及ぼす影響

AMPK は、細胞のエネルギー代謝のホメオスタシスにおいて、中心的な制御因子である。重要なことに、AMPK は内因性の心保護シグナルの伝達を厳密に制御する (Wang et al., 2017, Liu et al., 2019)。また、低血糖、低酸素や虚血など、ATP の細胞への供給を枯渇させるようなストレス環境への対応が必要になると、AMPK が活性化される。AMPK の活性化は、ミトコンドリアのホメオスタシスに関与するタンパク質や抗酸化遺伝子の発現障害を軽減し (Rabinovitch et al., 2017, Liu et al., 2018)、ミトコンドリアの生合成の増強やミトコンドリア由来の活性酸素種産生の抑制に影響を与える (Bode et al., 2021)。さらに、AMPK 活性は、ミトコンドリア分裂因子のリン酸化を介して、ミトコンドリアのダイナミクスのホメオスタシスに影響を及ぼす (Toyama et al., 2016, Bode et al., 2021)。糖尿病では、AMPK 活性が障害されていることが報告されており、糖尿病の心臓合併症において、AMPK シグ

ナルの伝達は、潜在的な治療の候補と考えられている (Joshi et al., 2019)。さらに、AMPK 活性は、糖尿病患者と非糖尿病患者の心房細動の病因に関係しており、心房リモデリングを軽減し、心房細動の発症を抑制することが報告されている (Bode et al., 2021)。

本研究では、EMPA が AMPK 活性と、そのシグナルの下流の PGC-1α と TFAM のタンパク質発現を増強し、ミトコンドリアの生合成と呼吸機能、および活性酸素種の過剰な産生を改善することを明らかにした。さらに、EMPA は、Drp1 の過剰なアップレギュレーションと、ミトコンドリア融合タンパク質である Mfn1、Mfn2、そして OPA1 の枯渇を適切に修正した。したがって、EMPA が AMPK 活性の改善を介して、ミトコンドリアのダイナミクスに影響を与える可能性があることを示唆している。以前の報告では、EMPA が、AMPK の活性化を介して、ミトコンドリアの過剰な分裂を阻害し、糖尿病性心筋微小血管障害を改善することが報告されており (Zhou et al., 2018)、さらには、非糖尿病モデル動物において、AMPK の活性化を介して、心筋エネルギーを増強することにより心臓リモデリング、および心不全を改善したと報告されている (Santos-Gallego et al., 2019)。興味深いことに、SGLT2 阻害薬であるイプラグリフロジンは、血糖値とは無関係に AMPK 活性を改善したことが報告されている (Lee et al., 2021)。したがって、SGLT2 阻害薬による AMPK 活性の改善は、血糖降下作用に依存しない SGLT2 阻害薬の作用機序と推察される。EMPA による AMPK 活性改善の機序としては、AMP/ATP 比の増加と、AMPK シグナルの上流活性化因子である肝臓キナーゼ B1 の活性化が考えられる (Zhou et al., 2018, Lu et al., 2020)。本研究の結果は、これらの研究の結果と一致しており、EMPA による AMPK を介したミトコンドリア機能の改善が、心房リモデリングの阻害機序において、重要な役割を果たすことを示唆している。本研究の結果と過去の報告をもとに、2 型糖尿病の心房リモデリングの予防における、EMPA の心保護作用として考えられる機序を提示する (図 27)。

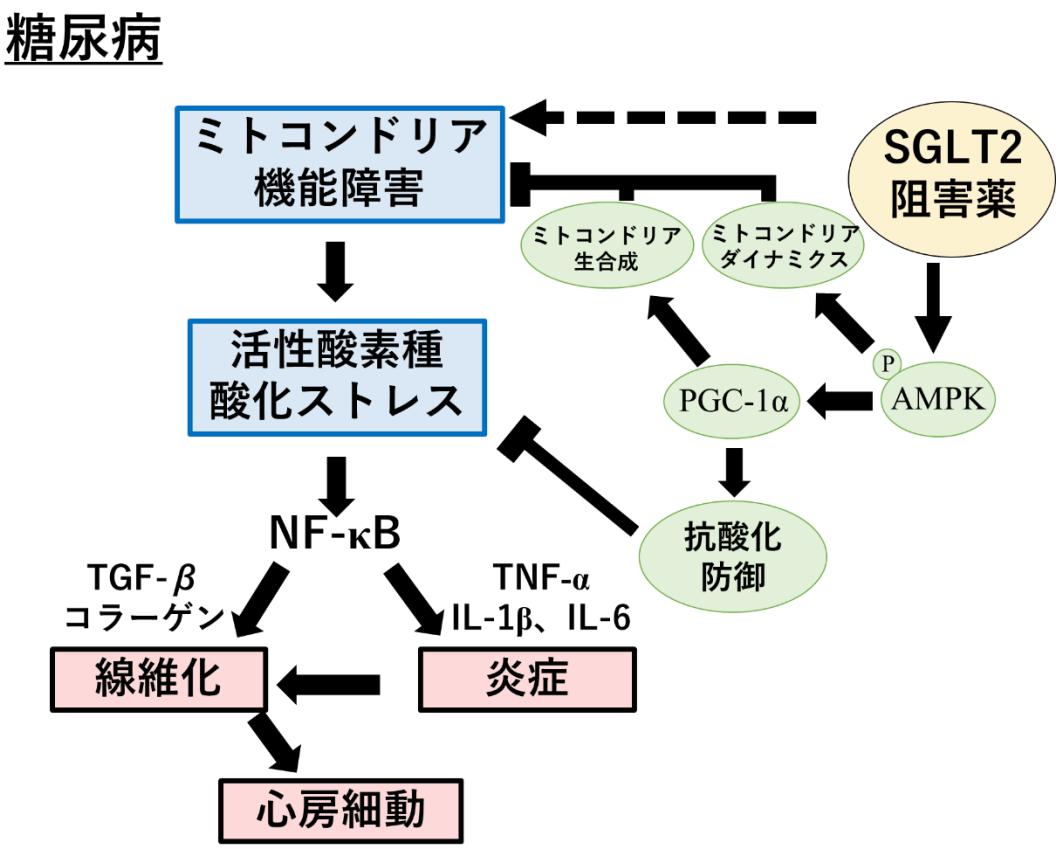


図 27. 糖尿病における SGLT2 阻害薬の作用機序

2 型糖尿病の心房における、ミトコンドリア機能障害を介した、SGLT2 阻害薬の心房リモデリングと心房細動の抑制機序を示した。

6.5. 本研究の限界

第一に、本研究で使用した EMPA の用量は、SGLT2 阻害効果を確実にするために、臨床で人間に使用される用量よりも多いものであった。第二に、本研究は、ラットモデルを用いているため、研究結果を人間に直接一般化することはできない。第三に、ミトコンドリアの生合成とダイナミクス以外の SGLT2 阻害薬の作用機序を調査することができなかった。ただし、近年の報告では、SGLT2 阻害薬がナトリウムイオンとカルシウムイオンの異常なホメオスタシスを修正し、ミトコンドリアのカルシウム過負荷を改善させることが期待されている (Bode et al., 2021)。第四に、本研究では麻酔薬として、メデトミジン (0.15 mg/kg)、ミダゾラム (2 mg/kg)、およびブトルファノール (2.5 mg/kg) を使用した。しかし、ミダゾラムと

ブトルファノールは、C I～C III、そしてアポトーシスに対して阻害効果があると報告されている (La Monaca and Fodale, 2012, Huang et al., 2018)。これらの麻酔薬は、すべての実験グループの各ラットに同じ用量で投与したが、ラットの心房ミトコンドリアの機能に対する、麻酔薬の影響を完全には除外することができない。最後に、SGLT2 阻害薬による心房リモデリングへの作用機序について、本実験モデルでは、血糖降下作用の影響を除外することができない。このため、血糖降下作用に依存しない SGLT2 阻害薬の心保護作用の機序を調査するために、さらなる検討が必要である。

7. 総括及び結論

① 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. 2 型糖尿病モデルラットにおいて、対象群と比較して、心房リモデリングが進行し、心房性不整脈の誘発性が増加した。

2. 2 型糖尿病モデルラットにおいて、ミトコンドリア呼吸能の低下、およびミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の産生があり、酸化ストレスが増加した。

3. 2 型糖尿病モデルラットにおいて、AMPK 活性の低下があり、AMPK シグナルがダウンレギュレーションしていた。

4. 上記 1.2.3 はいずれも、SGLT2 阻害薬である EMPA によって、改善した。

② 本研究の意義

糖尿病は心房細動の危険因子であるにも関わらず、これまで SGLT2 阻害薬による心房のリモデリングへの効果や心房細動の抑制効果については十分に検討されていない。また、糖尿病における、活性酸素種と酸化ストレスの主な産生源であるミトコンドリア由来の過剰な活性酸素種の SGLT2 阻害薬による抑制効果については、報告がなされていなかった。上記の本研究における結果より、SGLT2 阻害薬である EMPA は心房において、ミトコンドリア機能を改善し、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ことで、心房の酸化ストレスを抑制することが明らかになった。過剰な酸化ストレスは心房のリモデリングの根底にある原因であるため、この過剰な酸化ストレスの抑制は、心房のリモデリング、および心房細動の発症の予防につながったと考えられる。また、EMPA がミトコンドリア機能を改善する機序の一つとして、糖尿病において低下している AMPK 活性を回復させることで、ミトコンドリアの生合成とダイナミクスを改善することが示唆された。これらの知見から、SGLT2 阻害薬が 2 型糖尿病患者における心房細動の発症を抑制する可能性が示唆された。

③ 今後の展開

現在、心房細動の発症を抑制する糖尿病治療の発展が望まれており、SGLT2 阻害薬は、糖尿病治療薬としてだけでなく、心房細動抑制効果を有する治療薬として期待される。また、SGLT2 阻害薬は糖尿病の有無に関わらず、心血管死などの心血

管イベントを抑制するなど、心保護作用を有すると報告されている。このため、非糖尿病患者においても、SGLT2 阻害薬が心房細動を抑制することが期待され、今後、非糖尿病心房細動モデルでの検討や、他の糖尿病治療薬との直接比較での検討などが必要である。

④ 今後の課題

今後の課題としては、SGLT2 阻害薬の作用機序は、未だ不明な点が多い。また、血糖降下作用とは独立した作用機序を解明するためにも、さらなる検討が望まれる。

8. 謝辞

本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。

併せて、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、華岡青洲記念病院循環器内科心臓内科　鎌田塁先生、市立釧路総合病院心臓血管内科　萩原光先生、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　甲谷太郎特任助教、並びに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　中尾元基特任助教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　門坂崇秀医員、夏井宏征医員、甲谷次郎医員、西野広太郎医員、立田大志郎医員、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、ミトコンドリアの活性酸素種の産生、呼吸能の測定で、貴重な御指導・御助言を頂き、データ解析と論文の作成において多大に御助力頂きました北海道大学病院医療・ヘルスサイエンス研究開発機構　横田卓特任講師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

9. 利益相反

本研究において使用したエンパグリフロジンは、Boehringer Ingelheim 社によって供給された。ただし、Boehringer Ingelheim 社は、本実験のデータの収集、分析および解釈において関与していない。

10. 引用文献

Barth, E., Stammler, G., Speiser, B. & Schaper, J. (1992). Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. J. Mol. Cell. Cardiol, *24*, 669-681.

Benjamin, E. J., Levy, D., Vaziri, S. M., D'agostino, R. B., Belanger, A. J. & Wolf, P. A. (1994). Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. JAMA, *271*, 840-844.

Bode, D., Semmler, L., Oeing, C. U., Alogna, A., Schiattarella, G. G., Burkert, M. P., Heinzel, F. R. & Hohendanner, F. (2021). Implications of SGLT Inhibition on Redox Signalling in Atrial Fibrillation. Int. J. Mol. Sci, *22*, 5937.

Christiansen, L. B., Dela, F., Koch, J., Hansen, C. N., Leifsson, P. S. & Yokota, T. (2015). Impaired cardiac mitochondrial oxidative phosphorylation and enhanced mitochondrial oxidative stress in feline hypertrophic cardiomyopathy. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol, *308*, H1237-1247.

Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., Mccord, J. M. & Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. Ann. Intern. Med, *107*, 526-545.

Da Silva, R. M. (2017). Influence of Inflammation and Atherosclerosis in Atrial Fibrillation. Curr. Atheroscler. Rep, *19*, 2.

Fatemi, O., Yuriditsky, E., Tsioufis, C., Tsachris, D., Morgan, T., Basile, J., Bigger, T., Cushman, W., Goff, D., Soliman, E. Z., et al. (2014). Impact of intensive glycemic control on the incidence of atrial fibrillation and associated cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (from the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study). Am. J. Cardiol, *114*, 1217-1222.

Fu, H., Li, G., Liu, C., Li, J., Wang, X., Cheng, L. & Liu, T. (2015). Probucol prevents atrial remodeling by inhibiting oxidative stress and TNF-alpha/NF-kappaB/TGF-beta signal transduction pathway in alloxan-induced diabetic rabbits. J. Cardiovasc. Electrophysiol, *26*,

211-222.

Gheibi, S., Kashfi, K. & Ghasemi, A. (2017). A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. Biomed. Pharmacother, *95*, 605-613.

Go, A. S., Hylek, E. M., Phillips, K. A., Chang, Y., Henault, L. E., Selby, J. V. & Singer, D. E. (2001). Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. JAMA, *285*, 2370-2375.

Gutierrez, A. & Van Wagoner, D. R. (2015). Oxidant and Inflammatory Mechanisms and Targeted Therapy in Atrial Fibrillation: An Update. J. Cardiovasc. Pharmacol, *66*, 523-529.

Huang, L. H., Li, J., Gu, J. P., Qu, M. X., Yu, J. & Wang, Z. Y. (2018). Butorphanol attenuates myocardial ischemia reperfusion injury through inhibiting mitochondria-mediated apoptosis in mice. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci, *22*, 1819-1824.

Huxley, R. R., Filion, K. B., Konety, S. & Alonso, A. (2011). Meta-analysis of cohort and case-control studies of type 2 diabetes mellitus and risk of atrial fibrillation. Am. J. Cardiol, *108*, 56-62.

Jang, D. H., Khatri, U. G., Shortal, B. P., Kelly, M., Hardy, K., Lambert, D. S. & Eckmann, D. M. (2018). Alterations in mitochondrial respiration and reactive oxygen species in patients poisoned with carbon monoxide treated with hyperbaric oxygen. Intensive Care Med. Exp, *6*, 4.

Jespersen, N. R., Yokota, T., Stottrup, N. B., Bergdahl, A., Paelestik, K. B., Povlsen, J. A., Dela, F. & Botker, H. E. (2017). Pre-ischaemic mitochondrial substrate constraint by inhibition of malate-aspartate shuttle preserves mitochondrial function after ischaemia-reperfusion. J. Physiol, *595*, 3765-3780.

Joshi, T., Singh, A. K., Haratipour, P., Sah, A. N., Pandey, A. K., Naseri, R., Juyal, V. & Farzaei, M. H. (2019). Targeting AMPK signaling pathway by natural products for treatment of diabetes mellitus and its complications. J. Cell. Physiol, *234*, 17212-17231.

Kamada, R., Yokoshiki, H., Mitsuyama, H., Watanabe, M., Mizukami, K., Tenma, T., Takahashi, M., Takada, S. & Anzai, T. (2019). Arrhythmogenic beta-adrenergic signaling in cardiac hypertrophy: The role of small-conductance calcium-activated potassium channels via activation of CaMKII. Eur. J. Pharmacol, *844*, 110-117.

Karam, B. S., Chavez-Moreno, A., Koh, W., Akar, J. G. & Akar, F. G. (2017). Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. Cardiovasc. Diabetol, *16*, 120.

Kim, H. D., Kim, C. H., Rah, B. J., Chung, H. I. & Shim, T. S. (1994). Quantitative study on the relation between structural and functional properties of the hearts from three different mammals. Anat. Rec, *238*, 199-206.

La Monaca, E. & Fodale, V. (2012). Effects of anesthetics on mitochondrial signaling and function. Curr. Drug Saf, *7*, 126-139.

Lark, D. S., Torres, M. J., Lin, C. T., Ryan, T. E., Anderson, E. J. & Neufer, P. D. (2016). Direct real-time quantification of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in permeabilized skeletal muscle myofibers. Am. J. Physiol. Cell. Physiol, *311*, C239-245.

Lee, J. Y., Lee, M., Lee, J. Y., Bae, J., Shin, E., Lee, Y. H., Lee, B. W., Kang, E. S. & Cha, B. S. (2021). Ipragliflozin, an SGLT2 Inhibitor, Ameliorates High-Fat Diet-Induced Metabolic Changes by Upregulating Energy Expenditure through Activation of the AMPK/ SIRT1 Pathway. Diabetes Metab. J, *45*, 921-932.

Li, C., Zhang, J., Xue, M., Li, X., Han, F., Liu, X., Xu, L., Lu, Y., Cheng, Y., Li, T., et al. (2019). SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. Cardiovasc. Diabetol, *18*, 15.

Li, W. J., Chen, X. Q., Xu, L. L., Li, Y. Q. & Luo, B. H. (2020). SGLT2 inhibitors and atrial fibrillation in type 2 diabetes: a systematic review with meta-analysis of 16 randomized controlled trials. Cardiovasc. Diabetol, *19*, 130.

Liu, D., Ma, Z., Di, S., Yang, Y., Yang, J., Xu, L., Reiter, R. J., Qiao, S. & Yuan, J. (2018). AMPK/PGC1alpha activation by melatonin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity via alleviating mitochondrial oxidative damage and apoptosis. Free Radic. Biol. Med, *129*, 59-72.

Liu, D., Xu, L., Zhang, X., Shi, C., Qiao, S., Ma, Z. & Yuan, J. (2019). Snapshot: Implications for mTOR in Aging-related Ischemia/Reperfusion Injury. Aging Dis, *10*, 116-133.

Lu, Q., Liu, J., Li, X., Sun, X., Zhang, J., Ren, D., Tong, N. & Li, J. (2020). Empagliflozin attenuates ischemia and reperfusion injury through LKB1/AMPK signaling pathway. Mol. Cell. Endocrinol, *501*, 110642.

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.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J, *417*, 1-13.

Neal, B., Perkovic, V. & Matthews, D. R. (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. N. Engl. J. Med, *377*, 2099.

Packer, M., Anker, S. D., Butler, J., Filippatos, G., Pocock, S. J., Carson, P., Januzzi, J., Verma, S., Tsutsui, H., Brueckmann, M., et al. (2020). Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. N. Engl. J. Med, *383*, 1413-1424.

Peng, X., Li, L., Zhang, M., Zhao, Q., Wu, K., Bai, R., Ruan, Y. & Liu, N. (2020). Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors Potentially Prevent Atrial Fibrillation by Ameliorating Ion Handling and Mitochondrial Dysfunction. Front. Physiol, *11*, 912.

Rabinovitch, R. C., Samborska, B., Faubert, B., Ma, E. H., Gravel, S. P., Andrzejewski, S., Raissi, T. C., Pause, A., St-Pierre, J. & Jones, R. G. (2017). AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Cell. Rep, *21*, 1-9.

Santos-Gallego, C. G., Requena-Ibanez, J. A., San Antonio, R., Ishikawa, K., Watanabe, S., Picatoste, B., Flores, E., Garcia-Ropero, A., Sanz, J., Hajjar, R. J., et al. (2019). Empagliflozin Ameliorates Adverse Left Ventricular Remodeling in Nondiabetic Heart Failure by Enhancing Myocardial Energetics. J. Am. Coll. Cardiol, *73*, 1931-1944.

Shao, Q., Meng, L., Lee, S., Tse, G., Gong, M., Zhang, Z., Zhao, J., Zhao, Y., Li, G. & Liu, T. (2019). Empagliflozin, a sodium glucose co-transporter-2 inhibitor, alleviates atrial remodeling and improves mitochondrial function in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. Cardiovasc. Diabetol, *18*, 165.

Shingu, Y., Yokota, T., Takada, S., Niwano, H., Ooka, T., Katoh, H., Tachibana, T., Kubota, S. & Matsui, Y. (2018). Decreased gene expression of fatty acid binding protein 3 in the atrium of patients with new onset of atrial fibrillation in cardiac perioperative phase. J. Cardiol, *71*, 65-70.

Shiroshita-Takeshita, A., Schram, G., Lavoie, J. & Nattel, S. (2004). Effect of simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial-tachycardia remodeling in dogs. Circulation, *110*, 2313-2319.

Takahashi, M., Yokoshiki, H., Mitsuyama, H., Watanabe, M., Temma, T., Kamada, R., Hagiwara, H., Takahashi, Y. & Anzai, T. (2021). SK channel blockade prevents hypoxia-induced ventricular arrhythmias through inhibition of Ca(2+)/voltage uncoupling in hypertrophied hearts. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol, *320*, H1456-H1469.

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.

Teshima, Y., Takahashi, N., Nishio, S., Saito, S., Kondo, H., Fukui, A., Aoki, K., Yufu, K., Nakagawa, M. & Saikawa, T. (2014). Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase. Circ. J, *78*, 300-306.

Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Jr., Loson, O. C., Hellberg, K., Young, N. P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D. C., et al. (2016). Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. Science, *351*, 275-281.

Van Wagoner, D. R. (2008). Oxidative stress and inflammation in atrial fibrillation: role in pathogenesis and potential as a therapeutic target. J. Cardiovasc. Pharmacol, *52*, 306-313.

Wang, A., Green, J. B., Halperin, J. L. & Piccini, J. P., Sr. (2019). Atrial Fibrillation and Diabetes Mellitus: JACC Review Topic of the Week. J. Am. Coll. Cardiol, *74*, 1107-1115.

Wang, S., Wang, Y., Zhang, Z., Liu, Q. & Gu, J. (2017). Cardioprotective effects of fibroblast growth factor 21 against doxorubicin-induced toxicity via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway. Cell. Death Dis, *8*, e3018.

Watanabe, M., Yokoshiki, H., Mitsuyama, H., Mizukami, K., Ono, T. & Tsutsui, H. (2012). Conduction and refractory disorders in the diabetic atrium. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol, *303*, H86-95.

Wei, P., Liu, Q., Xue, W. & Wang, J. (2020). A Colorimetric Assay of Citrate Synthase Activity in Drosophila Melanogaster. J. Vis. Exp, *16*.

Xie, W., Santulli, G., Reiken, S. R., Yuan, Q., Osborne, B. W., Chen, B. X. & Marks, A. R. (2015). Mitochondrial oxidative stress promotes atrial fibrillation. Sci. Rep, *5*, 11427.

Zelniker, T. A., Bonaca, M. P., Furtado, R. H. M., Mosenzon, O., Kuder, J. F., Murphy, S. A., Bhatt, D. L., Leiter, L. A., Mcguire, D. K., Wilding, J. P. H., et al. (2020). Effect of Dapagliflozin on Atrial Fibrillation in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus: Insights From the DECLARE-TIMI 58 Trial. Circulation, *141*, 1227-1234.

Zhang, Z., Zhang, X., Meng, L., Gong, M., Li, J., Shi, W., Qiu, J., Yang, Y., Zhao, J., Suo, Y., et al. (2021). Pioglitazone Inhibits Diabetes-Induced Atrial Mitochondrial Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Biogenesis, Dynamics, and Function Through the PPAR-gamma/PGC-1alpha Signaling Pathway. Front. Pharmacol, *12*, 658362.

Zhou, H., Wang, S., Zhu, P., Hu, S., Chen, Y. & Ren, J. (2018). Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury via AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission. Redox Biol, *15*, 335-346.

Zhou, Y. & Wu, W. (2017). The Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Empagliflozin, Protects against Diabetic Cardiomyopathy by Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. Cell. Physiol. Biochem, *41*, 2503-2512.

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.