

博士論文

SGLT2 阻害薬の心不全改善機序に関する検討

田嶋 美裕

## 目次

1. 略語一覽	3
2. 要旨	5
3. 序文	6
4. 方法	13
5. 結果	24
6. 考察	34
7. 結論	40
8. 引用文献	41
9. 利益相反	51
10. 謝辞	51

## 1. 略語一覽

AGE: advanced glycation end products

$\beta$  MHC:  $\beta$  myosin heavy chain

BNP: brain natriuretic peptide

cGMP: cyclic guanosine monophosphate

CTGF: connective tissue growth factor

EDPVR: end diastolic pressure volume ratio

ERK: extracellular signal-regulated kinase

ESPVR: end systolic pressure volume ratio

FS: fractional shortening

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HF: high fat diet

HFpEF: heart failure with preserved ejection fraction

HFrEF: heart failure with reduced ejection fraction

IVS: intraventricular septum

LVDd: left ventricular end-diastolic diameter

LVDs: left ventricular end-systolic diameter

LVEF: left ventricular ejection fraction

LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure

LVEDV: left ventricular end-diastolic volume

LVEBP: left ventricular end-systolic pressure

LVM: left ventricular mass

MACE: major adverse cardiovascular events

NC: normal chow

NO: nitric oxide

PKG: protein kinase G

PV loop: pressure-volume loop

PW: posterior wall

SERCA2A: sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

SGLT2: sodium glucose cotransporter 2

TAC: transverse aortic banding

TGF  $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$

TMF: transmitral flow

WGA: wheat germ agglutinin

## 2. 要旨

**【背景・目的】** SGLT2 阻害薬は投与早期から糖尿病患者の心不全を抑制する。本研究は SGLT2 阻害薬トホグリフロジン（Tofo）の心不全改善機序の解明を目的とした。

**【方法】** C57BL/6J 雄マウスに高脂肪食投与後、横行大動脈縮窄手術（TAC）により心圧負荷モデルを作成した。4 週間 Tofo 投与後に心機能・形態の評価、分子生物学的・組織学的解析を行った。

**【結果】** Tofo 非投与群では心圧負荷後に左室収縮能・拡張能低下、心臓重量増加、collagen I 発現増加、心筋間質線維化、心筋細胞肥大がみられたが、Tofo 投与群ではこれらが有意に改善した。

**【結論】** トホグリフロジンは、高脂肪食負荷マウスで心圧負荷による左室収縮能・拡張能低下、左室スティフネス増大、心筋線維化を改善した。

### 3. 序文

高齢化のすすむ本邦では、心不全と糖尿病はともに増加傾向にあり、大きな社会問題となっている。糖尿病患者では、健常者に比べて慢性心不全発症リスクが2～5倍増大し<sup>1</sup>、さらに心不全発症後の予後も不良となる<sup>2</sup>。したがって、糖尿病において心不全の発症機序やその治療法を明らかにすることは、糖尿病患者の予後改善のために重要である。

#### 3-1. 糖尿病性心筋症の病態

糖尿病では、1型または2型の病型により、病態の異なる心筋症をきたすと考えられている<sup>3</sup>。1型糖尿病患者では、微小血管の希薄化、終末糖化産物

(advanced glycation end products; AGE)の蓄積、自己免疫、高血糖、脂肪毒性などによって心筋細胞のアポトーシスが起こり、左室収縮障害を主体とする拡張型/HFrEF（駆出率の低下した心不全：heart failure with reduced ejection fraction）タイプの心不全を発症する。一方、糖尿病患者の約90%を占める2型糖尿病患者では、高血糖、脂肪毒性、AGEの蓄積、高インスリン血症などによって心筋細胞の肥大、心臓間質の線維化が起こり、左室拡張障害を主体とする拘束型/HFpEF（駆出率の保たれた心不全：heart failure with preserved ejection fraction）タイプの心不全を発症する。2型糖尿病では、酸化ストレス

などにより血管内皮細胞での一酸化窒素（NO）産生が低下し、隣り合う心筋細胞への NO 供給が減少する。これにより環状グアノシンーリン酸（cGMP）の産生が低下し、cGMP 依存性プロテインキナーゼ（PKG）活性が低下する。この NO-cGMP-PKG シグナル経路の異常が、2 型糖尿病における心肥大や間質の線維化、また心筋細胞において分子ばねとして働くサルコメアタンパクであるタイチンのリン酸化障害およびそれによる心筋細胞の硬化に関与していると考えられている<sup>4</sup>。

### 3-2. 糖尿病患者における心血管イベントの予防

これまで行われた UKPDS 33 試験<sup>5</sup>、ACCORD 試験<sup>6</sup>、VADT 試験<sup>7</sup>などの大規模臨床研究では、糖尿病治療薬による厳格な血糖コントロール（強化療法）により細小血管障害は抑制されたが、心不全を含む心血管イベントを抑制する短期的な効果は示されなかった（各試験の追跡期間中央値は、それぞれ 10.0 年、3.7 年、5.6 年）。UKPDS の 10 年後の観察研究である UKPDS 80 では、強化療法群は従来治療群に比べて細小血管障害だけでなく大血管障害も抑制されていたことから、初期の厳格な血糖コントロールは糖尿病患者の長期的な予後を改善するといえる（追跡期間中央値 16.8 年）<sup>8</sup>。一方で、近年登場した SGLT2 阻害薬には、3-4 に後述の通り、投与早期から心血管イベントを抑

制する効果が報告され、大きな注目を集めている。

### 3-3. SGLT2 阻害薬

腎臓の近位尿細管の S1・S2 セグメント（糸球体側）には、ナトリウム・グルコース共輸送体（sodium glucose cotransporter 2; SGLT2）というタンパクが存在し、近位尿細管におけるグルコース再吸収の約 90%を担っている。近位尿細管の S3 セグメント（ヘンレのループ側）には SGLT1 が存在し、残りの 10%のグルコース再吸収を行っている。SGLT1 と SGLT2 は、近位尿細管内皮細胞の頂端膜（尿細管腔側）上に存在し、糸球体で濾過された原尿からグルコースとナトリウムをそれぞれ 1：2、1：1 の比で共輸送して細胞内に取り込む。SGLT2 は SGLT1 と比較して 2 倍量のグルコース取り込み能を有する一方で、グルコースとの親和性は SGLT1 のほうが SGLT2 よりも高いことから、SGLT1 は低濃度グルコース環境下での再吸収に、SGLT2 は高濃度グルコース環境下での再吸収に適している。近位尿細管内皮細胞へ取り込まれたグルコースは、基底側膜上（血管側）に存在する GLUT2 により受動輸送され、血液中へ取り込まれる<sup>9</sup>。

SGLT2 阻害薬は、腎臓近位尿細管の SGLT2 を阻害することで、インスリン非依存性に腎臓から尿中にグルコースを排泄する血糖降下薬である（図 1）。現



在、SGLT2 阻害薬として SGLT1 と SGLT2 の選択性の異なる 6 剤が使用可能となっている（表 1）。

表 1 SGLT2 阻害薬の SGLT1/SGLT2 選択性

一般名	商品名	SGLT1 : SGLT2 選択性
トホグリフロジン	デベルザ／アプルウェイ	1 : 2,900
ルセオグリフロジン	ルセフィ	1 : 1,600
エンパグリフロジン	ジャディアンス	1 : 1,100
イブラグリフロジン	スーグラ	1 : 860
ダバグリフロジン	フォシーガ	1 : 610
カナグリフロジン	カナグル	1 : 290

（文献 10 より引用改変）

#### 3-4. SGLT2 阻害薬の心不全抑制効果について

SGLT2 阻害薬は、もともと血糖降下を目的として開発された薬剤である。

上市された糖尿病の新薬は心血管リスクを評価することが義務となっており、このために施行された EMPA-REG OUTCOME 試験において、エンパグリフロジン群ではプラセボ群と比較して心血管死が 38%減少、全死亡が 32%減

少、心不全入院が 35%減少することが示され（観察中央期間 3.1 年）、その心保護効果に注目が集まるようになった<sup>11</sup>。エンパグリフロジン以外の SGLT2 阻害薬については、CANVAS/CANVAS-R 試験ではカナグリフロジンはプラセボと比較して全死亡を有意に抑制しなかったが、心血管死＋非致死的心筋梗塞＋非致死の脳卒中を 14%減少、心不全入院を 33%減少させることが示された（追跡期間中央値 2.4 年）<sup>12</sup>。DECLARE TIMI58 試験では、ダパグリフロジンはプラセボと比較して心血管死＋非致死性心筋梗塞＋非致死性虚血性脳卒中の複合からなる主要心血管イベント（major adverse cardiovascular events; MACE）を有意に抑制しなかったが、心血管死＋心不全入院を 17%減少した（追跡期間中央値 4.2 年）<sup>13</sup>。また大規模リアルワールドエビデンスとして、CVD REAL 2 試験により SGLT2 阻害薬（使用薬剤の割合は、ダパグリフロジンが 75%、エンパグリフロジン 9%、イプラグリフロジンが 8%、カナグリフロジンが 4%、トホグリフロジンが 3%、ルセオグリフロジンが 1%）が全死亡を 49%減少、心不全入院を 36%減少、心筋梗塞を 19%減少、脳卒中を 32%減少することが報告された<sup>14</sup>。これらの臨床試験により、複数の SGLT2 阻害薬において類似した心血管イベント抑制効果が示されたことから、SGLT2 阻害薬の心血管イベント抑制効果は各薬剤固有のものではなく、SGLT2 阻害薬に共通するクラスエフェクトであると考えられる。

ナトリウム・グルコース共輸送体には、SGLT1、SGLT2、SGLT3 の3つのサブタイプが存在する。各サブタイプの発現臓器は、SGLT1 は主に消化管、心臓、肺、肝臓や腎臓近位尿細管、SGLT2 は主に腎臓近位尿細管、SGLT3 は主に悪性腫瘍や小腸の神経細胞と考えられている<sup>15</sup>。心臓には SGLT2 がほとんど発現していないことから<sup>16</sup>、SGLT2 阻害薬が開発された当初は、心臓には直接的な作用を及ぼさないと考えられていた。

臨床試験の結果、エンパグリフロジンが94週間の投与期間でHbA1cを0.4%しか低下させていないことや<sup>11</sup>、投与開始後の比較的早期から心血管イベントの抑制効果がみられることから、SGLT2 阻害薬は血糖降下による動脈硬化予防以外の影響により心血管イベント抑制効果をもたらすのではないかと推測されており、現在その作用機序に関する研究が進められている。仮説のひとつとして、SGLT2 阻害薬により腎臓の近位尿細管からグルコースの排泄とともにナトリウムも排泄されることから、利尿作用により心臓の後負荷を軽減する可能性が指摘されている。また、脈拍低下をもたらすことから心臓の交感神経活性を抑制する効果も示唆されている。そのほか、心臓のエネルギー代謝基質を脂肪酸からより代謝効率の良いケトン体に変化させることで心不全改善効果をもたらすという儉約基質仮説も提唱されている<sup>17</sup>。その他にも、肝臓、膵臓、骨格筋、脂肪組織など様々な臓器に作用している可能性が報告されている

が、心不全改善における SGLT2 阻害薬の作用機序に関しては明確な結論は得られていない。

本研究では、耐糖能異常および肥満を呈する高脂肪食負荷マウスを用いて、SGLT2 阻害薬が心不全を改善する機序を明らかにすることを目的とした。

## 4. 方法

本研究で行ったすべての動物実験は、東京大学動物実験倫理委員会による承認を得ており（承認番号：医-P14-035）、東京大学の動物実験ガイドラインに遵守している。

### 4-1. 動物

本研究の方法の概要を図 2 に示す。6 週齢の C57BL/6J 雄マウス（日本クレア株式会社、東京、日本）を使用し、6 週齢から通常食投与（normal chow; NC）群、高脂肪食投与（high fat; HF）群に分けた。NC 群には CE-2（粗脂肪含有量 4.6%）、HF 群には、High Fat Diet 32（HFD32）（粗脂肪含量 32%、総エネルギー中の脂肪由来のカロリー比[Fat kcal%]が約 60%）（日本クレア株式会社、東京、日本）を自由に摂食させた（図 2）。

### 4-2. 横行大動脈縮窄手術（transverse aortic constriction; TAC）による心圧負荷モデルの作成

心肥大や心不全の研究では、マウスに横行大動脈縮窄手術（TAC）を施行した心圧負荷モデルが広く用いられている<sup>18</sup>。TAC 手術による心圧負荷モデルマウスでは、初期に左室壁肥厚を呈し、引き続いて左室拡大、左室収縮能・拡張能の

低下が進行することが知られている<sup>19</sup>。本研究では、10 週齢時に HF 群を TAC 群と sham 群の 2 群にランダムに分けた。心圧負荷モデルである TAC 群には、まずマウスを 2%イソフルランにて麻酔導入後、イミダゾール派生薬であるエトミデート（TK-E0897）（東京化成工業株式会社、東京、日本）を 35%プロピレングリコールを溶媒として 2 mg/mL に調整したものを、体重 1 g あたり 0.01 mL の割合で腹腔内注射した。麻酔深度が十分に到達し痛み刺激への反応が消失したのち、マウス挿管チューブ（21 G 注射針にアクリルチューブを取り付け、先端を鈍に処理したもの）およびマウス喉頭展開用ブレードを用いて気管挿管を行った。挿管後、挿管チューブを実験動物用人工呼吸器 SN-480-7（シナノ製作所、東京、日本）に接続し、酸素、2%イソフルランをそれぞれ 1 L/min、0.1 L/min の流速で使用し、維持麻酔とした。マウスを仰臥位で固定し、胸骨左縁の第 2、第 3 肋間を胸骨近傍で切断した。内胸動脈を損傷させないように注意しながら、第 2 肋間の高さで露出される胸腺を正中で剥離し、深部にある大動脈弓を露出した。右腕頭動脈、左総頸動脈分岐の間の位置で、横行大動脈の下へ 7-0 PDS 糸をくぐらせ、この糸で大動脈およびそれと並行に並べた 26 G 注射針をまとめて二重結紮した。結紮後、すぐに 26 G 注射針を抜き取り、一時的に遮断された動脈血流を回復させるとともに、結紮部位での横行大動脈狭窄により心臓に圧負荷がかかる状態とした（図 3）。肋間筋を 7-0 PDS 糸にて 1 針、皮膚を

6-0 絹糸にて 3 針縫合して閉創し、麻酔を終了して室内気にて換気を行い、自発呼吸が再開したのち抜管した。抜管後、42°Cのホットプレート上で保温を行い、マウスの体動が正常にみられることを確認し、手技を終了した。Sham 群では、TAC 手術と同様にエトミデート腹腔内注射による麻酔、挿管および横行大動脈の剥離を行い、大動脈の結紮はせず、閉創する処置を行った。

#### 4-3. トホグリフロジン投与

11 週齢時（手術施行 1 週後）に、各群を SGLT2 阻害薬トホグリフロジン（興和、東京、日本）を投与する群（Tofo 群）と非投与群（veh 群）にさらに分けた。Tofo 群には、通常食または高脂肪食に 0.01%混餌として投与した。トホグリフロジン投与量は既報を参考に決定した<sup>20-23</sup>。この群分けにより、11 週齢時に NC-sham-veh 群、NC-sham-Tofo 群、HF-sham-veh 群、HF-sham-Tofo 群、HF-TAC-veh 群、HF-TAC-Tofo 群の 6 群とした（各群 n = 5–7）。

また薬剤投与前（11 週齢時）および投与 4 週後（15 週齢時）に、一晩絶食後、翌朝にメスで尾静脈に切創をつくり、簡易血糖測定器を用いて空腹時血糖値を測定した。また同時に空腹時の体重を測定した。

#### 4-4. 経胸壁心エコー検査

マウスの経時的な心機能評価として、Vevo2100 (FUJIFILM VisualSonics, Inc., トロント、カナダ) を用い経胸壁心エコー検査を施行した。左室収縮能を評価する際は、覚醒下にて心拍数が 600–700 回/分を維持するよう、できる限り低刺激にて検査を行った。B モードで左室短軸面を描出後、心基部からわずかに心尖部側へ移行し、左室径が最大となる断面で M モード表示に切り替え、中隔壁厚 (IVS)、後壁厚 (PW)、拡張末期径 (LVDd)、収縮末期径 (LVDs) を計測し、それらから左室内径短縮率 ( $FS=100 \times [LVDd-LVDs]/LVDd$ ) を算出した<sup>24</sup>。

左室拡張能の指標として、僧帽弁口血流速波形 (TMF) の拡張早期波である E 波、および心房収縮期波である A 波の比 (E/A 比) を用いた。一般的に、TAC 手術後にみられる E/A 比の上昇は左室のスティフネス増大の所見と考えられている。心拍数 500 回/分以上では E 波と A 波が重なり分離できず左室拡張能の評価が困難であることから、酸素、2%イソフルランをそれぞれ 1 L/min、0.1–0.2 L/min の流速で使用し、マウスの心拍数が 400–500 bpm を維持するように麻酔した状態で、左室拡張能の評価を行った。B モードで四腔断面像を描出後、僧帽弁先端にカーソルを合わせ、パルスドプラ法にて TMF を表示し、E 波高、A 波高を計測し、さらにそこから E/A 比を算出した。

なお、TAC 施行後は 1 週目より左室収縮能の低下 (FS 低下)、拡張能の低下 (E/A 比上昇) が確認されたが、マウス個体毎に左室収縮能低下の程度に差が



あったため、HF-TAC 施行群では TAC 施行 1 週後の心エコー評価時に FS が 40%未満に低下していた個体に限定して、以降の解析を行った。

#### 4-5. 左室圧-容量曲線 (Pressure-Volume loop) 解析

マウスの心機能および血行動態を評価するため、心臓超音波検査に加えて、カテーテルによる圧-容量曲線 (PV loop) の解析を行った。まず、2%イソフルランにて麻酔導入後、300 mg/ $\mu$ L のウレタンと 2 mg/mL のエトミデートを 1:1 に混合した麻酔液を、マウス体重 1 g あたり 0.006 mL の割合で腹腔内注射した。麻酔深度が十分に到達し、痛み刺激への反応が消失したことを確認したのち、マウスを仰臥位に固定した。マウスの顎部から胸郭外頭側まで、頸部を正中切開し、甲状腺を露出させ、甲状腺および気管支前面の筋層を正中で左右に鈍的に剥離し、主気管支を露出した。甲状軟骨のやや尾側において主気管支前面を切開し、21 G 注射針にシリコンチューブを取り付けたマウス用挿管チューブを気管支切開口より挿入後、実験動物用人工呼吸器に接続し、1 L/min の酸素+0.1 L/min の 2%イソフルランを投与した。チューブ挿入の深さを調整して両肺が十分に換気されていることを確認したのち、100 mg/mL の臭化パンクロニウム (QJ-P1918-10MG) (アルドリッチジャパンインク、東京、日本) を 0.2 mL 腹腔内注射し、筋弛緩させた。次に、マウス頸部の皮膚をさらに左外側へ切開し、胸鎖

乳突筋を鈍的に内側へ偏位させて左内頸静脈を剖出し、30 G 注射針を静脈内へ留置させ、中心静脈ラインを確保した。10%アルブミン溶液を  $8\mu\text{L}/\text{min}$  の流速で持続静注しながら、胸骨柄端より出血に留意しつつ電気メスを用いて左胸腔を開き、心臓の左室前面を露出させた。左室心尖部に、26 G 注射針で小孔を作成したのち、小動物用マイクロカテーテル Millar Mikro-Tip® catheter SPR-839 (Millar, Inc., ハーグ、オランダ) を挿入した (図 4)。PowerLab 血圧システム (ADInstruments Japan, 愛知、日本) にて左室の PV loop をリアルタイムで表示しながら、カテーテル先端が十分に左室内腔に挿入され、大動脈弁、僧帽弁、左室壁に接触しないように先端位置を調整して、左室内圧および容量の計測を開始した。まず、呼吸器を止めた状態で血行動態のベースラインを記録した。次に、マウスの下大静脈を先端が鈍な撮子で約 3 秒間挟んで一時的に狭窄させ、静脈灌流量の変化に対する PV loop の変化を記録した。これによって得られた PV loop の変化から、左室収縮能の指標である左室駆出率 (LVEF)、圧補正後の左室圧最大増加率 (ratio of maximum  $dP/dt$  per instantaneous pressure;  $dP/dt_{\text{max}}/IP$ )、左室収縮末期圧容量比 (end systolic pressure volume ratio; ESPVR)、左室拡張能の指標である左室圧最小増加率 ( $dP/dt_{\text{min}}$ )、等容弛緩期の左室圧曲線の減衰時定数 ( $\tau$ )、左室スティフネスの指標である左室拡張末期圧 (LVEDP)、左室拡張末期圧容量比 (end diastolic pressure volume ratio;

EDPVR)、左室前負荷の指標である左室拡張末期容積 (LVEDV)、左室後負荷の指標である左室収縮末期圧 (LVESP) を算出した。その後、アルブミン溶液の代わりに飽和食塩水を中心静脈ラインに接続し、 $30-50\mu\text{L}$  のごく少量の飽和食塩水を投与することにより、左室内圧の変化をきたさずに左室容量のみ増加させ、PV loop の変化を記録した。このときの圧、容量の数値を、カテーテルのコンダクタンス値を実際の容量の値へ補正するために使用した。最後に、マウスを左側臥位へ体位変換し、腹部を右外側へ切開し、腹部大動脈を剖出した。小動物血流測定用カテーテルシステム TS420 血管用血流モジュールおよび Nanoprobe V-Series (Nipro-Transonic Japan Inc.、埼玉、日本) を用いて、腹部大動脈の実際の血流量を測定し、左室容量の補正のために使用した。これらの測定データを Lab Chart (ADInstruments Japan, 愛知、日本) を用いて解析した。

すべての計測が終了したのち、マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、速やかに心臓、肝臓、肺、腎臓を採取した。各臓器はリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS) 内で洗浄して血液を除去したのち、表面や内腔の液体成分を十分に拭き取り、各臓器の重量および右脛骨長を測定した。心臓は中部レベルで短軸断に切断し、心基部側を組織学的解析に、心尖部側を分子生物学的解析に用いた。

#### 4-6. リアルタイム定量的 PCR (real-time quantitative PCR; RT qPCR)

下記手順によりリアルタイム PCR を行い、心臓の mRNA 発現量を解析した。

まず、TRIzol® reagent (コスモ・バイオ、東京、日本) を用いて心臓検体 (心尖部寄り側壁側) の mRNA を抽出したのち、ReverTra Ace® qPCR RT Kit (東洋紡、東京、日本) を用いて相補的 DNA (complementary DNA; cDNA) を作成した。作成した cDNA、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (東洋紡、東京、日本)、および各遺伝子のプライマーを用いて、リアルタイム PCR システム QuantStudio5 (Thermo Fisher scientific、マサチューセッツ、アメリカ) により PCR 反応の解析を行った。NC-sham 群と HF-sham 群とで GAPDH の mRNA 発現量が同等であることを確認のうえ、GAPDH をハウスキーピング遺伝子とし、NC-sham-veh 群の GAPDH 発現量を基準として、 $\Delta\Delta C_t$  法により各遺伝子の相対的な発現量を算出した。今回使用したプライマーの塩基配列を表 2 に示す。各タンパクと遺伝子の対応は以下の通りである：GAPDH – *Gapdh*、BNP – *Bnp*、 $\beta$  MHC – *Myh7*、CTGF – *Ctgf*、Collagen I – *Col1a1*、TGF  $\beta$  1 – *Tgfb1*、SERCA2A – *Atp2A2*、Phospholamban – *Pln*。

表 2 qPCR に使用したプライマー

プライマー	塩基配列 (5'→3')
Mouse <i>Gapdh</i> forward	CATGGCCTTCCGTGTTTCCTA
Mouse <i>Gapdh</i> reverse	CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT
Mouse <i>Bnp</i> forward	AAGTCCTAGCCAGTCTCCAGA
Mouse <i>Bnp</i> reverse	GAGCTGTCTCTGGGCCATTTC
Mouse <i>Myh7</i> forward	ATGTGCCGGACCTTGGAAG
Mouse <i>Myh7</i> reverse	CCTCGGGTTAGCTGAGAGATCA
Mouse <i>Ctgf</i> forward	AGCCTCAAACCTCCAAACACC
Mouse <i>Ctgf</i> reverse	CAACAGGGATTTGACCAC
Mouse <i>Col1a1</i> forward	TGCCGTGACCTCAAGATGTG
Mouse <i>Col1a1</i> reverse	CACAAGCGTGCTGTAGGTGA
Mouse <i>Tgfb1</i> forward	CAACAATTCCTGGCGTTACCTTGG
Mouse <i>Tgfb1</i> reverse	GAAAGCCCTGTATTCCGTCTCCTT
Mouse <i>Atp2A2</i> forward	CTGTGGAGACCCTTGTTGT
Mouse <i>Atp2A2</i> reverse	CAGAGCACAGATGGTGGCTA
Mouse <i>Pln</i> forward	ATGACGACGATTCAAATCTCTTGG
Mouse <i>Pln</i> reverse	TGGGTTTGCAAAGTTAGGCATAA

#### 4-7. 組織学的解析

高脂肪食、心圧負荷、トホグリフロジン投与による心臓への組織学的な影響を調べるため、Picrosirius-red 染色による線維化の評価を行った。短軸面で切断した心基部の心臓検体をパラフィン包埋し、4  $\mu$  m の厚さで切片を作成した。切片を脱パラフィン処理後、シリウスレッド液（武藤化学、東京、日本）により膠原線維を赤色に、ファストグリーンにより心筋全体を緑色に染色した。線維化の定量評価のため、ImageJ のプラグインである colour deconvolution を用いて、膠原線維である赤成分と心筋全体である緑成分を分離し、それぞれの面積を計測し、さらに線維化部分の比率を算出した。この際、心臓の弁組織、心外膜など、心筋組織以外の線維化部分は除外した。

高脂肪食、心圧負荷、トホグリフロジン投与が心筋細胞の肥大に与える影響を評価するため、コムギ胚芽凝集素（wheat germ agglutinin; WGA）により細胞膜を染色し、心筋細胞の大きさを測定した。プレパラートを脱パラフィン処理したのち、2% ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin; BSA）溶液により、室温で 60 分ブロッキングした。その後、細胞膜を緑色に染色する WGA 溶液 20  $\mu$  L（WGA 原液を 0.1% PBS 溶液で 100 倍希釈したもの）を各検体の上に滴下し、遮光して室温で 2 時間静置した。核を青色に染色する Hoechst 溶液 20  $\mu$  L

(Hoechst 原液を 0.1% PBS 溶液で 6000 倍希釈したもの) を各検体の上に滴下し、室温で 10 分静置した。最後にプレパラートの封入を行い、蛍光顕微鏡 FSX-100 (オリンパス、東京、日本) で撮影した。撮影した画像を用いて、ImageJ により 1 検体あたり約 50 個の心筋細胞の面積を計測し、平均値を算出した。

#### 4-8. 統計処理

本研究では、SPSS ver.20 (日本 IBM、東京、日本) による統計解析を行った。各測定値は平均値±標準偏差で表した。量的変数については ANOVA 解析により p 値を求め、 $p<0.05$  を有意とみなした。

## 5. 結果

### 5-1. 体重と空腹時血糖

TAC 施行 1 週後に心エコー検査を行った 8 匹中 4 匹のマウスで FS が 40%未満に低下し、残り 4 匹の FS は 40%以上であった。今回の研究では心機能低下例におけるトホグリフロジンの効果に注目しており、FS 40%未満に低下していたマウスについてのみ、以降の解析を行った。

薬剤投与前（TAC 施行 1 週後）および投与 4 週後（TAC 施行 5 週後）の体重を各群で比較した（図 5）。薬剤投与前、6 群間で体重の有意な差はなかった。薬剤投与 4 週後、高脂肪食負荷群ではトホグリフロジン投与の有無によらず、体重が有意に増加していた（NC-sham-veh vs. HF-sham-veh,  $p=0.002$  ; NC-sham-veh vs. HF-sham-Tofo,  $p=0.03$ ）。

次に薬剤投与前および投与 4 週後の空腹時血糖値を各群で比較した（図 6）。薬剤投与前は、高脂肪食負荷により空腹時血糖値が有意に上昇した（NC-sham-veh vs. HF-sham-veh,  $p=0.04$ ; NC-sham-veh vs. HF-sham-Tofo,  $p=0.02$ ）。薬剤投与 4 週後、高脂肪食負荷群では空腹時血糖値の上昇が持続したが（NC-sham-veh vs. HF-sham-veh,  $p=0.001$ ）、トホグリフロジン投与により空腹時血糖値が低下する傾向がみられた（NC-sham-veh vs. HF-sham-Tofo, n.s.; HF-sham-veh vs. HF-sham-Tofo,  $p=0.05$ ）。



以上より、sham 群では高脂肪食により体重が有意に増加すること、トホグリフロジン投与は体重に影響与えなかったが、トホグリフロジンは空腹時血糖値の上昇を改善させることが分かった。

## 5-2. 心エコーによる左室収縮能・拡張能、左室肥大の評価

高脂肪食およびトホグリフロジン投与による心機能への影響を調べるため、心エコー検査を行った (図 7)。

左室収縮能の指標である FS は (図 8)、高脂肪食負荷のみでは、トホグリフロジン投与の有無によらず薬剤投与前・投与 4 週後に変化はなかった。心圧負荷を加えた高脂肪食群では (図 8)。心圧負荷により、薬剤投与前の FS は HF-TAC-veh 群では  $30 \pm 3\%$ 、HF-TAC-Tofo 群では  $34 \pm 1\%$  と、sham 群に比べて有意に低下していた。心圧負荷 5 週後、トホグリフロジン非投与の高脂肪食群では FS が  $18 \pm 6\%$  とさらに低下が進行したが、トホグリフロジン群では FS は  $31 \pm 11\%$  と横ばいであり、トホグリフロジン非投与群に比べて FS の低下が抑えられた (HF-TAC-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $p=0.04$ )。

左室拡張能の指標である E/A を評価した (図 9)。高脂肪食負荷のみでは、トホグリフロジン投与の有無によらず有意な変化はなかった (図 10)。心圧負荷 1 週後には、E/A 比が有意に上昇した (HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.0002$ ;

HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $p=0.006$ )。心圧負荷 5 週後、トホグリフロジン非投与群では E/A 比の上昇が持続したが、トホグリフロジン投与群では E/A 比の上昇が有意に改善した (HF-TAC-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $8.0 \pm 0.8$  vs.  $2.8 \pm 1.2$ ,  $p<0.0001$ ; NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.; HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.)。

心肥大の指標である左室壁厚 (IVS と PW の平均値) は、高脂肪食負荷のみでは変化しなかった (図 11)。高脂肪食負荷下で心圧負荷を加えると、トホグリフロジン投与の有無によらず薬剤投与 4 週後には壁厚が増大していた (HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.05$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $p=0.002$ )。なお、トホグリフロジン投与の有無による壁厚の差はなかった (HF-TAC-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.)。

上記の心エコーの結果をまとめると、心圧負荷後にみられる左室収縮能および拡張能の低下はトホグリフロジン投与により改善したが、左室壁の肥厚はトホグリフロジン投与により変化しなかった。

### 5-3. PV loop 解析による左室収縮能・拡張能の評価

高脂肪食およびトホグリフロジン投与が心機能に与える影響を調べるため、薬剤投与 4 週後 (15 週齢、TAC 施行 5 週後) に、PV loop 解析によって左室収

縮能および拡張能を評価した。

左室収縮能の指標である左室駆出率 (LVEF) は (図 12)、高脂肪食負荷のみでは変化しなかった。高脂肪食負荷下で心圧負荷を加えると LVEF が有意に低下したが (図 12)。高脂肪食負荷下で心圧負荷を加えると LVEF が有意に低下したが (HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $81 \pm 12\%$  vs.  $50 \pm 3\%$ ,  $p=0.01$ )、トホグリフロジン投与により LVEF の低下は認めなかった (HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.)。しかし、左室収縮能の他の指標である圧補正  $dP/dt \text{ max}$  ( $dP/dt \text{ max/IP}$ )、ESPVR は、6 群間で有意な差はなかった (図 13、図 14)。

また左室拡張能の指標である  $dP/dt \text{ min}$ 、 $\tau$  についても、6 群間で有意な差はなかった (図 15、図 16)。

左室スティフネスの指標である左室拡張末期圧 (LVEDP) は (図 17)、高脂肪食負荷のみでは通常食群と比較して有意な変化はなかった。(図 17)。高脂肪食負荷下で心圧負荷を加えると LVEDP が有意に上昇したが (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p<0.0001$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p<0.0001$ )、その上昇はトホグリフロジン投与により有意に改善した (HF-TAC-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $16.0 \pm 3.7 \text{ mmHg}$  vs.  $8.9 \pm 2.3 \text{ mmHg}$ ,  $p=0.01$ ; NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.; HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.)。

もう一つの左室スティフネスの指標である EDPVR については、6 群間で有意

な差はなかった (図 18)。

左室前負荷の指標である左室拡張末期容積 (LVEDV) は (図 19)、高脂肪食負荷下で心圧負荷を加えると増加する傾向にあり (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.07$ ; NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $p=0.06$ )、トホグリフロジン投与の有無による変化はなかった (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh, n.s.) (図 19)。

左室後負荷の指標である左室収縮末期圧 (LVESP) は (図 20)、高脂肪食負荷下で心圧負荷を加えると上昇し (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p<0.0001$ ; NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $p<0.0001$ )、トホグリフロジン投与の有無による変化はなかった (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh, n.s.) (図 20)。

PV loop 解析の以上の結果から、高脂肪食投与のみでは左室収縮能や拡張能に有意な変化はみられず、高脂肪食負荷下で心圧負荷を加えることで LVEF 低下、LVEDV 増大、LVEDP 上昇、LVESP 上昇がみられた。トホグリフロジン投与は、このうち LVEDP 上昇、すなわち左室スティフネス増大を有意に改善させたが、左室前負荷や後負荷には影響を与えない可能性が示唆された。

#### 5-4. 各臓器重量

高脂肪食およびトホグリフロジン投与が主要な臓器に与える影響を調べるため、PV loop 解析直後に心臓、肝臓、腎臓、肺を採取し、各重量を測定した。

心臓重量は（図 21）、高脂肪食負荷のみでは有意な変化はなかった。（図 21）。心圧負荷により sham 群に比べて心臓重量が約 2.2 倍に増加した（NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p<0.0001$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p<0.0001$ ）。心圧負荷下にトホグリフロジン投与した高脂肪食群でも sham 群に比べて心臓重量が約 1.7 倍に増大したが（NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $p<0.0001$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $p<0.0001$ ）、その程度はトホグリフロジン投与により約 0.8 倍に抑制された（HF-TAC-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $267 \pm 29$  mg vs.  $211 \pm 24$  mg,  $p=0.001$ ）。

肝臓重量は、6 群間で有意な差はなかった（図 22）。一方で、高脂肪食投与群では肉眼的に脂肪肝が観察され、組織学的にも HE 染色で脂肪滴の増加を認め、高脂肪食にを認めたが、トホグリフロジン投与により脂肪肝および脂肪滴増加が改善した（図 23）。

腎臓重量については、6 群間で有意な差はなかった（図 24）。

肺重量については（図 25）、高脂肪食投与のみでは有意な変化はなかった。（図 25）。高脂肪食負荷下では心圧負荷により肺重量が有意に増加し（NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.003$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.0004$ ）、肺うっ血が示唆された。心圧負荷にトホグリフロジン投与した群では肺重量の有意な増加はなく、非投与群に比べて肺重量が減少する傾向がみられた（HF-TAC-veh

vs. HF-TAC-Tofo,  $337 \pm 129$  mg vs.  $211 \pm 24$  mg,  $p=0.07$ ; NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.; HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.)。

以上の結果をまとめると、高脂肪食投与に伴う肝臓への脂肪蓄積がトホグリフロジン投与により改善すること、また心圧負荷後に心肥大や肺うっ血がみられたが、トホグリフロジン投与によりそれらが改善する可能性が示唆された。

#### 5-5. mRNA 発現の定量評価

高脂肪食およびトホグリフロジン投与が心筋の主要な遺伝子の発現に与える影響を調べるため、各個体の心筋における遺伝子の mRNA 発現量を RT-qPCR により測定した。NC-sham-ve 群の各遺伝子の mRNA 発現量を 1 とし、各個体の遺伝子の mRNA 発現量の相対値を計算した。

心不全マーカーである BNP の mRNA 発現量は (図 26)、トホグリフロジン投与の有無によらず高脂肪食負荷のみでは有意な増加は認めなかった。(図 26)。心圧負荷により BNP の mRNA 発現量が有意に増加したが (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.004$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.01$ )、心圧負荷後にトホグリフロジン投与した群では BNP の mRNA 発現量の有意な増加を認めなかった。

心肥大マーカーである  $\beta$  MHC の mRNA 発現量は (図 27)、トホグリフロジ

ン投与の有無によらず高脂肪食負荷のみでは有意な増加は認めなかった。(図 27)。心圧負荷により  $\beta$  MHC の mRNA 発現量が有意に増加したが (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.02$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.009$ )、心圧負荷後にトホグリフロジン投与した群では  $\beta$  MHC の mRNA 発現量の有意な増加は認めなかった。

線維化マーカーである CTGF の mRNA 発現量は (図 28)、トホグリフロジン投与の有無によらず高脂肪食負荷のみでは有意な増加は認めなかった。(図 28)。心圧負荷により CTGF の mRNA 発現量が有意に増加したが (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.003$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.04$ )、心圧負荷後にトホグリフロジン投与した群では CTGF の mRNA 発現量の有意な増加は認めなかった。

CTGF と同様に線維化のマーカーである collagen I の mRNA 発現量は (図 29)、トホグリフロジン投与の有無によらず高脂肪食負荷のみでは有意な増加は認めなかった。(図 29)。心圧負荷により collagen I の mRNA 発現量が有意に増加したが (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p<0.0001$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.0002$ )、心圧負荷後にトホグリフロジン投与した群では collagen I の mRNA 発現量が有意に減少した (HF-TAC-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $p=0.04$ ; NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo; n.s.; HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.)。

炎症マーカーである  $\text{TGF}\beta 1$  の mRNA 発現量は (図 30)、トホグリフロジン投与の有無によらず高脂肪食負荷のみでは有意な増加は認めなかった。(図 30)。心圧負荷により  $\text{TGF}\beta 1$  の mRNA 発現量が増加したが (NC-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.005$ ; HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.08$ )、心圧負荷後にトホグリフロジン投与した群では  $\text{TGF}\beta 1$  の mRNA 発現量の有意な増加は認めなかった。

心筋小胞体のカルシウム輸送に関わる SERCA2A および phospholamban の mRNA 発現量は、いずれも 6 群間で有意な差はなかった (図 31、図 32)。

上記の mRNA 発現量の結果をまとめると、心圧負荷により心不全マーカー (BNP)、心肥大マーカー ( $\beta \text{MHC}$ )、線維化マーカー (CTGF、collagen I)、炎症マーカー ( $\text{TGF}\beta 1$ ) の mRNA 発現が増加すること、心圧負荷後にトホグリフロジン投与するとこれらの遺伝子は有意に増加せず、さらに線維化マーカーである collagen I の mRNA 発現増加を抑制することが分かった。

#### 5-6. 線維化の定量評価

高脂肪食およびトホグリフロジン投与が心筋の線維化に与える影響を調べるため、心臓中部レベルでの短軸断の標本において心筋の線維化部分を Picrosirius-red 染色し、全体の心筋面積に対する線維化面積の割合を算出した



(図 33、図 34)。トホグリフロジン投与の有無によらず高脂肪食負荷のみでは線維化面積の有意な増加は認めなかった。心圧負荷により高脂肪食負荷下で心圧負荷を加えた群では sham 群に比べて線維化面積が約 4.2 倍に増加したが (HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p<0.0001$ )、トホグリフロジン投与により線維化面積が約 0.4 倍に抑制された (HF-TAC-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $2.9 \pm 1.0\%$  vs.  $1.2 \pm 0.2\%$ ,  $p=0.002$ ; NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.; HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.)。

#### 5-7. 心筋細胞の大きさの定量評価

高脂肪食およびトホグリフロジン投与が心筋細胞の肥大に与える影響を調べるため、細胞膜を WGA 染色した心臓標本で、各心筋細胞短軸面で心筋細胞の面積を測定した (図 35)。トホグリフロジン投与の有無によらず高脂肪食負荷のみでは心筋細胞面積の有意な増加は認めなかった。心圧負荷を加えた群では sham 群に比べて心筋細胞面積が約 1.7 倍に増加したが (HF-sham-veh vs. HF-TAC-veh,  $p=0.0002$ )、トホグリフロジン投与により心筋細胞面積が約 0.7 倍に抑制された (HF-TAC-veh vs. HF-TAC-Tofo,  $387 \pm 71 \mu\text{m}^2$  vs.  $277 \pm 4 \mu\text{m}^2$ ,  $p=0.04$ ; NC-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.; HF-sham-veh vs. HF-TAC-Tofo, n.s.)。

## 6. 考察

本研究結果より、高脂肪食負荷マウスにおいて TAC での心圧負荷により誘発される左室収縮能・拡張能の低下および左室スティフネスの増大が、TAC 施行 1 週間からの 4 週間のトホグリフロジン投与により改善することが示された。さらに、心圧負荷によって生じる心筋間質の線維化や心筋細胞の肥大といった左室リモデリングも、トホグリフロジン投与により有意に改善することが組織学的解析および分子生物学的解析により示された。

### 6-1. SGLT2 阻害薬の心臓への効果について

これまで SGLT2 阻害薬が心臓へ与える影響に関する研究結果として、エンパグリフロジンに関しては遺伝的糖尿病マウスの左室拡張能低下・心筋細胞肥大・心筋間質線維化・心筋マクロファージ浸潤の改善<sup>25-27</sup>、野生型マウスにおける TAC 施行後の左室収縮能低下の改善<sup>28</sup>、遺伝的糖尿病ラットにおける心筋梗塞後のミトコンドリアの大きさと数の正常化<sup>29</sup>、ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおける微小血管障害の改善<sup>30</sup>、細胞質内のナトリウム濃度・カルシウム濃度の低下およびミトコンドリア内のカルシウム濃度の上昇<sup>31</sup>、などが報告されている。またダパグリフロジンに関しては高脂肪食誘発肥満ラットにおける心筋虚血再灌流障害の改善、遺伝的糖尿病マウスにおける炎症抑制および左室収縮

能・線維化・心肥大の改善<sup>32-34</sup>、野生型ラットにおける心筋梗塞後の心筋線維化の改善<sup>35</sup>、TAC での心圧負荷マウスにおける心肥大・心筋間質線維化・血管周囲線維化・心筋細胞アポトーシスの抑制および p38・JNK・FoxO1 のリン酸化の抑制<sup>36</sup>、などが報告されている。臨床研究では、エンパグリフロジンに関しては若年 1 型糖尿病患者の動脈スティフネスの低下<sup>37</sup>、ダパグリフロジンに関しては慢性心不全合併糖尿病患者の左室拡張能の改善と左房容積係数・左室心筋重量係数の低下<sup>38</sup>、などが報告されている。本研究でも既報の結果に矛盾せず、高脂肪食誘発肥満マウスにおいて心圧負荷により誘発された左室収縮能・拡張能の低下、心筋間質の線維化、心筋細胞の肥大が、トホグリフロジン投与により改善することが示された。

さらに本研究では、トホグリフロジンが分子レベルでも  $\beta$  MHC、CTGF、collagen I などの病的な心筋肥大や線維化を促進するタンパクの遺伝子発現に関与していることが示唆されたが、SERCA2A や phospholamban といった心筋小胞体のカルシウム輸送に関与するタンパクの遺伝子発現には影響を与えていなかった。また in vivo での PV loop 解析においても、ESPVR や dP/dt min/IP などの心筋小胞体のカルシウム輸送により制御される左室収縮力の指標は SGLT2 阻害薬の投与による影響を受けていなかった。この結果は、SGLT2 阻害薬の心臓への分子的作用機序を解明するうえで有用な手がかりになると考

えられる。SERCA2A は心筋小胞体にカルシウムを能動輸送するタンパクであり、phospholamban は SERCA2A を不活性化することで SERCA2A の活性を制御している<sup>39</sup>。不全心では、SERCA2A を介した心筋小胞体へのカルシウム取り込みが低下しており、それにより心臓の収縮力が低下することが知られている<sup>40</sup>。本研究の結果から、トホグリフロジンは心筋のカルシウム輸送を介した収縮力にはあまり影響しない一方で、心筋間質の線維化による心筋スティフネスの増大およびそれに伴う左室拡張障害の改善に特に有効であることが示された。心筋のばねタンパクであるタイチンは、ERK や PKG などのシグナル伝達経路を介してリン酸化を受けたり、アイソフォーム変化したりすることで、心筋細胞の硬さ（スティフネス）を規定している<sup>41</sup>。今後、SGLT2 阻害薬が左室拡張能を改善させる機序を解明するため、タイチンのリン酸化やアイソフォームに与える影響も調べる必要がある。

なお、高血糖の改善が必ずしも心機能や心臓リモデリングの改善につながるわけではないことは数々の臨床研究で示されており、本研究でもトホグリフロジンが心臓に与える作用と空腹時血糖値との明らかな関連はみられなかったことから、SGLT2 阻害薬の心臓への作用は耐糖能の改善のみによるものではないといえる。

## 6-2. 他臓器との連関について

SGLT2 阻害薬は、もともと腎臓の近位尿細管の SGLT2 を阻害し、グルコースを尿中へ排泄する薬剤として開発されたが、臨床的に肝臓、膵臓、心臓、血管、骨格筋、脂肪組織など全身の様々な臓器にも作用をもたらすことが分かってきた。腎臓に対しては、尿中グルコース排泄の増加およびそれによる HbA1c 低下、尿中尿酸排泄増加、eGFR の正常化、腎不全の予防、尿細管-糸球体フィードバックによる糸球体内圧低下と過剰濾過抑制、肝臓に対しては脂肪酸燃焼の増加、ケトン体産生の増加、糖新生の増加、膵臓に対しては  $\beta$  細胞機能の改善、 $\alpha$  細胞のグルカゴン分泌の増加、心血管系に対しては心臓周囲脂肪減少による収縮能改善と炎症・線維化の抑制、拡張能の改善、心血管イベント・心不全の抑制、心室性不整脈の抑制、動脈スティフネスの低下、骨格筋に対してはインスリン感受性の改善、GLUT4 トランスロケーションの増加、脂肪組織に対しては内臓脂肪の減少、自律神経系に対しては交感神経系活性の低下などが報告されている<sup>42,43</sup>。分子生物学的にも、カナグリフロジンは肝臓での AMPK を活性化させることで肝臓脂肪含有量を低下させることが報告されている<sup>44</sup>。本研究では、高脂肪食負荷マウスにおいてトホグリフロジン投与による脂肪肝や肝臓内脂肪蓄積の改善が観察されており、トホグリフロジンの肝臓への作用が心臓への作用にも何らかの影響を与えている可能性が考えられる。今後、多臓器におけるマイクロ RNA

アレイ解析によって、心臓と他臓器との連関をさらに調べることを検討している。

### 6-3. 本研究の限界

本研究にはいくつかの限界があると考ええる。1つ目は各群のサンプル数が少ないことである。そのため統計学的有意差が得られなかった可能性がある。各群の充分量のサンプル数が得られなかった原因として、TAC手術後の生存率が低かったこと、また生存した個体間でも心圧負荷後の心機能低下にばらつきが生じたこと、心エコーやPV loop 手技中に死亡した個体があったことが挙げられる。また、心エコーやPV loop の手技中の死亡により、各実験（体重・空腹時血糖測定、心エコー、PV loop 解析、インスリン濃度測定、qPCR、組織学的解析）で解析可能な各群のサンプル数に違いが生じた。今後、サンプル数を増やし本研究結果の統計学的信頼性を高めたい。2つ目は、マウス個体間でトホグリフロジン投与量のばらつきがあったことである。今回トホグリフロジンを混餌として投与したが、TAC 施行後の活動量低下とともに摂食量が減少した個体が存在し、これらのマウスには同量のトホグリフロジンが投与されていなかったと考えられる。これによりトホグリフロジン投与後の心臓への影響にばらつきがみられた可能性がある。多くの動物実験ではSGLT2 阻害薬は混餌として投与されてい

るが、今後は強制経口栄養（oral gavage）の方法も検討すべきと考える。3つ目として、血圧の影響がある。臨床的に SGLT2 阻害薬は降圧効果も有することが知られているが、今回の心不全モデルでは大動脈の近位部を縮窄していることで必然的に体血圧が低下した状態となっており、トホグリフロジンの体血圧への影響を評価できていない。HFpEF を呈する遺伝的糖尿病マウスの ob/ob マウス、db/db マウスも用いて<sup>45</sup>、血圧も含めた全身への影響を調べることも必要と考える。

## 7. 結論

SGLT2 阻害薬トホグリフロジンは、心圧負荷を加えた高脂肪食負荷マウスにおいて、心筋線維化による左室スティフネスの増大およびそれに伴う左室拡張能低下を改善させた。



## 8. 引用文献

1. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol.* 1974 Jul;34(1):29-34.
2. Bertoni AG, Hundley WG, Massing MW, Bonds DE, Burke GL, Goff DC Jr. Heart failure prevalence, incidence, and mortality in the elderly with diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Mar;27(3):699-703.
3. Seferović PM, Paulus WJ. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J.* 2015 Jul 14;36(27):1718-27, 1727a-1727c.
4. Hopf AE, Andresen C, Kötter S, Isić M, Ulrich K, Sahin S, Bongardt S, Röhl W, Drove F, Scheerer N, Vandekerckhove L, De Keulenaer GW, Hamdani N, Linke WA, Krüger M. Diabetes-Induced Cardiomyocyte Passive Stiffening Is Caused by Impaired Insulin-Dependent Titin Modification and Can Be Modulated by Neuregulin-1. *Circ Res.* 2018 Jul 20;123(3):342-355.
5. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998 Sep 12;352(9131):837-53.

6. Miller ME, Williamson JD, Gerstein HC, Byington RP, Cushman WC, Ginsberg HN, Ambrosius WT, Lovato L, Applegate WB; ACCORD Investigators. Effects of randomization to intensive glucose control on adverse events, cardiovascular disease, and mortality in older versus younger adults in the ACCORD Trial. *Diabetes Care*. 2014;37(3):634-43.
7. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD; VADT Investigators. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009 Jan 8;360(2):129-39.
8. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Oct 9;359(15):1577-89.
9. Ghezzi C, Loo DDF, Wright EM. Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. *Diabetologia*. 2018 Oct;61(10):2087-2097.
10. Suzuki M, Honda K, Fukazawa M, Ozawa K, Hagita H, Kawai T, Takeda M, Yata T, Kawai M, Fukuzawa T, Kobayashi T, Sato T, Kawabe Y, Ikeda S. Tofogliflozin, a potent and highly specific sodium/glucose cotransporter 2

inhibitor, improves glycemic control in diabetic rats and mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 Jun;341(3):692-701.

11. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Inzucchi SE; EMPA-REG OUTCOME Investigators. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2015 Nov 26;373(22):2117-28.

12. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondou N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews DR; CANVAS Program Collaborative Group. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2017 Aug 17;377(7):644-657.

13. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Silverman MG, Zelniker TA, Kuder JF, Murphy SA, Bhatt DL, Leiter LA, McGuire DK, Wilding JPH, Ruff CT, Gause-Nilsson IAM, Fredriksson M, Johansson PA, Langkilde AM, Sabatine MS; DECLARE-TIMI 58 Investigators. Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2018 Nov 10. [Epub ahead of print]

14. Kosiborod M, Lam CSP, Kohsaka S, Kim DJ, Karasik A, Shaw J, Tangri N, Goh SY, Thuresson M, Chen H, Surmont F, Hammar N, Fenici P; CVD-REAL

Investigators and Study Group. Cardiovascular Events Associated With SGLT-2 Inhibitors Versus Other Glucose-Lowering Drugs: The CVD-REAL 2 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Jun 12;71(23):2628-2639.

15. Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2004 Sep-Oct;28(5):364-71.

16. von Lewinski D, Rainer PP, Gasser R, Huber MS, Khafaga M, Wilhelm B, Haas T, Mächler H, Rössl U, Pieske B. Glucose-transporter-mediated positive inotropic effects in human myocardium of diabetic and nondiabetic patients. *Metabolism*. 2010 Jul;59(7):1020-8.

17. Mudaliar S, Alloju S, Henry RR. Can a Shift in Fuel Energetics Explain the Beneficial Cardiorenal Outcomes in the EMPA-REG OUTCOME Study? A Unifying Hypothesis. *Diabetes Care*. 2016 Jul;39(7):1115-22.

18. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhelper ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 15;88(18):8277-81.

19. Hampton C, Rosa R, Campbell B, Kennan R, Gichuru L, Ping X, Shen X, Small

K, Madwed J, Lynch JJ. Early echocardiographic predictors of outcomes in the mouse transverse aortic constriction heart failure model. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2017 Mar - Apr;84:93-101.

20. Obata A, Kubota N, Kubota T, Iwamoto M, Sato H, Sakurai Y, Takamoto I, Katsuyama H, Suzuki Y, Fukazawa M, Ikeda S, Iwayama K, Tokuyama K, Ueki K, Kadowaki T. Tofogliflozin Improves Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Accelerates Lipolysis in Adipose Tissue in Male Mice. *Endocrinology*. 2016 Mar;157(3):1029-42.

21. Ishibashi Y, Matsui T, Yamagishi SI. Tofogliflozin, a selective inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2, suppresses renal damage in KKAY/Ta mice, obese and type 2 diabetic animals. *Diab Vasc Dis Res*. 2016 Nov;13(6):438-441.

22. Sawada Y, Izumida Y, Takeuchi Y, Aita Y, Wada N, Li E, Murayama Y, Piao X, Shikama A, Masuda Y, Nishi-Tatsumi M, Kubota M, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sugano Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yagyu H, Kawakami Y, Kadowaki T, Shimano H, Yahagi N. Effect of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibition on weight loss is partly mediated by liver-brain-adipose neurocircuitry. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 4;493(1):40-45.

23. Ito S, Hosaka T, Yano W, Itou T, Yasumura M, Shimizu Y, Kobayashi H, Nakagawa T, Inoue K, Tanabe S, Kondo T, Ishida H. Metabolic effects of Tofogliflozin are efficiently enhanced with appropriate dietary carbohydrate ratio and are distinct from carbohydrate restriction. *Physiol Rep*. 2018 Mar;6(5). doi: 10.14814/phy2.13642.
24. Gao S, Ho D, Vatner DE, Vatner SF. Echocardiography in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2011 Mar 1;1:71-83.
25. Habibi J, Aroor AR, Sowers JR, Jia G, Hayden MR, Garro M, Barron B, Mayoux E, Rector RS, Whaley-Connell A, DeMarco VG. Sodium glucose transporter 2 (SGLT2) inhibition with empagliflozin improves cardiac diastolic function in a female rodent model of diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 Jan 13;16(1):9.
26. Hammoudi N, Jeong D, Singh R, Farhat A, Komajda M, Mayoux E, Hajjar R, Lebeche D. Empagliflozin Improves Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Genetic Model of Type 2 Diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017 Jun;31(3):233-246.
27. Lin B, Koibuchi N, Hasegawa Y, Sueta D, Toyama K, Uekawa K, Ma M, Nakagawa T, Kusaka H, Kim-Mitsuyama S. Glycemic control with empagliflozin,

a novel selective SGLT2 inhibitor, ameliorates cardiovascular injury and cognitive dysfunction in obese and type 2 diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Oct 26;13:148.

28. Byrne NJ, Parajuli N, Levasseur JL, Boisvenue J, Beker DL, Masson G, Fedak PWM, Verma S, Dyck JRB. Empagliflozin Prevents Worsening of Cardiac Function in an Experimental Model of Pressure Overload-Induced Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci*. 2017 Aug 4;2(4):347-354.

29. Mizuno M, Kuno A, Yano T, Miki T, Oshima H, Sato T, Nakata K, Kimura Y, Tanno M, Miura T. Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts. *Physiol Rep*. 2018 Jun;6(12):e13741.

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

31. Baartscheer A, Schumacher CA, Wüst RC, Fiolet JW, Stienen GJ, Coronel R, Zuurbier CJ. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na<sup>+</sup> through inhibition of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia*. 2017 Mar;60(3):568-573.

32. Tanajak P, Sa-Nguanmoo P, Sivasinprasasn S, Thummasorn S, Siri-Angkul N, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardioprotection of dapagliflozin and vildagliptin in rats with cardiac ischemia-reperfusion injury. *J Endocrinol*. 2018 Feb;236(2):69-84.
33. Ye Y, Bajaj M, Yang HC, Perez-Polo JR, Birnbaum Y. SGLT-2 Inhibition with Dapagliflozin Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Cardiomyopathy in Mice with Type 2 Diabetes. Further Augmentation of the Effects with Saxagliptin, a DPP4 Inhibitor. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2017 Apr;31(2):119-132.
34. Joubert M, Jagu B, Moutaigne D, Marechal X, Tesse A, Ayer A, Dollet L, Le May C, Toumaniantz G, Manrique A, Charpentier F, Staels B, Magré J, Cariou B, Prieur X. The Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Dapagliflozin Prevents Cardiomyopathy in a Diabetic Lipodystrophic Mouse Model. *Diabetes*. 2017 Apr;66(4):1030-1040.
35. Lee TM, Chang NC, Lin SZ. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic Biol Med*. 2017 Mar;104:298-310.
36. Shi L, Zhu D, Wang S, Jiang A, Li F. Dapagliflozin Attenuates Cardiac



Remodeling in Mice Model of Cardiac Pressure Overload. *Am J Hypertens*. 2019 Jan 25. doi: 10.1093/ajh/hpz016. [Epub ahead of print]

37. Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Har R, Fagan N, Johansen OE, Woerle HJ, von Eynatten M, Broedl UC. The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Jan 29;13:28.

38. Soga F, Tanaka H, Tatsumi K, Mochizuki Y, Sano H, Toki H, Matsumoto K, Shite J, Takaoka H, Doi T, Hirata KI. Impact of dapagliflozin on left ventricular diastolic function of patients with type 2 diabetic mellitus with chronic heart failure. *Cardiovasc Diabetol*. 2018 Oct 8;17(1):132.

39. Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG. Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Dec;77:160-7.

40. Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circ Res*. 2012 Jun 8;110(12):1646-60.

41. Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res*. 2014 Mar 14;114(6):1052-68.

42. Heerspink HJ, Perkins BA, Fitchett DH, Husain M, Cherney DZ. Sodium

Glucose Cotransporter 2 Inhibitors in the Treatment of Diabetes Mellitus: Cardiovascular and Kidney Effects, Potential Mechanisms, and Clinical Applications. *Circulation*. 2016 Sep 6;134(10):752-72.

43. Perreault L. EMPA-REG OUTCOME: The Endocrinologist's Point of View. *Am J Med*. 2017 Jun;130(6S):S51-S56.

44. Hawley SA, Ford RJ, Smith BK, Gowans GJ, Mancini SJ, Pitt RD, Day EA, Salt IP, Steinberg GR, Hardie DG. The Na<sup>+</sup>/Glucose Cotransporter Inhibitor Canagliflozin Activates AMPK by Inhibiting Mitochondrial Function and Increasing Cellular AMP Levels. *Diabetes*. 2016 Sep;65(9):2784-94.

45. Conceição G1, Heinonen I2,3, Lourenço AP1,4, Duncker DJ2, Falcão-Pires I5. Animal models of heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J*. 2016 Apr;24(4):275-86.

## 9. 利益相反

本研究は、三島海雲記念財団による平成 29 年度学術研究助成金の支援を受けて行われました。また本研究で用いたトホグリフロジンの原末は、興和 s 株式会社から提供を受けました。

## 10. 謝辞

本研究を進めるにあたり、取り組むべき課題と、それを解決するために多くのご支援をいただいた東京大学医学系研究科循環器内科教授 小室一成先生に、深く感謝申し上げます。また、研究計画や実験手技、結果の解析などを含めて、研究課題の進行において全般的なご指導をいただいた東京大学医学系研究科循環器内科講師 瀧本英樹先生に、深く感謝申し上げます。そのほか、高脂肪食負荷マウスの実験計画についてご指導をいただいた東京大学医学系研究科ユビキタス予防医学講座特任助教 上田和孝先生に、感謝申し上げます。最後に、4 年間の研究生活を支えてくれた家族に、この場を借りて感謝の意を示させていただきます。

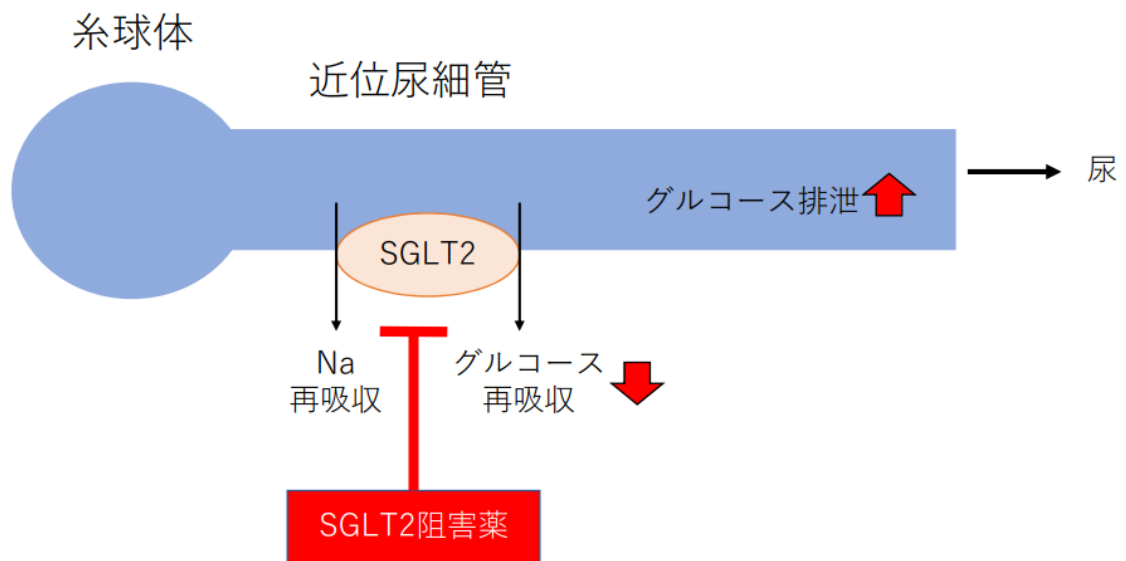


図1 SGLT2 阻害薬の作用機序

腎臓の近位尿細管 S1・S2 セグメントの内皮細胞には、管腔側に SGLT2 が存在し、尿中のナトリウムおよびグルコースを再吸収する。腎臓でのグルコース再吸収の約 90%は、SGLT2 が担っている。SGLT2 阻害薬は尿中へのグルコース排泄を増加させることで血糖値を下げる。

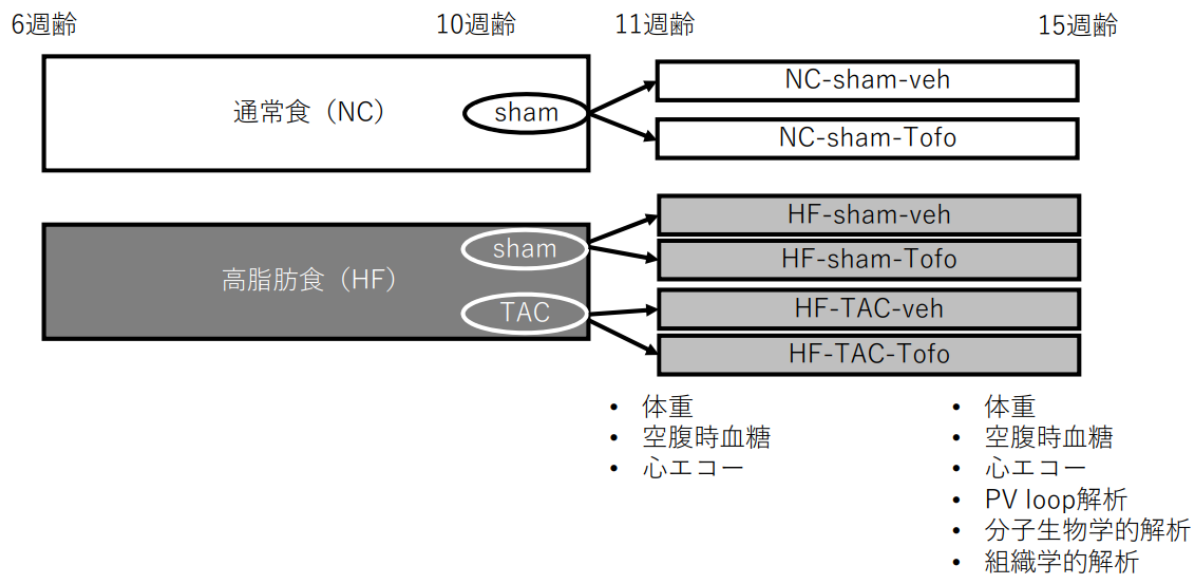


図2 方法の概要

C57BL/6J 雄マウスを通常食 (NC) 群、高脂肪食 (HF) 群に分け、HF 群には 6 週齢より高脂肪食を開始した。10 週齢時に HF 群を横行大動脈縮窄手術 (TAC) 群と sham 手術群に分けた。TAC 施行 1 週間後 (11 週齢時)、心エコー検査を行い、左室内径短縮率 (FS) が 40% 以上に保たれていたマウスのみを以降の解析に用いた。11 週齢に NC-sham 群、HF-sham 群、HF-TAC 群をトホグリフロジン非投与群 (veh 群) と投与群 (Tofo 群) に分けた。11・15 週齢時に体重・空腹時血糖の測定および心エコーでの心機能・形態の評価を行い、15 週齢時に PV loop 解析、分子生物学的解析、組織学的解析を行った。

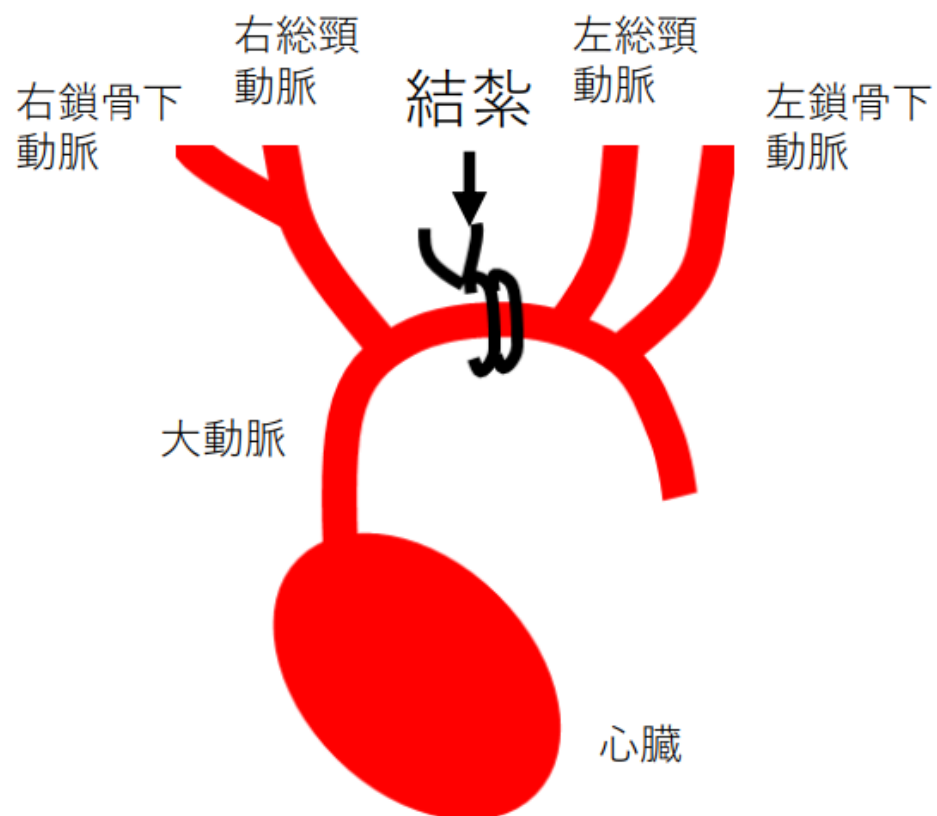


図3 横行大動脈縮窄（TAC）手術

マウスの横行大動脈を縮窄し、心圧負荷モデルを作成した（TAC手術）。

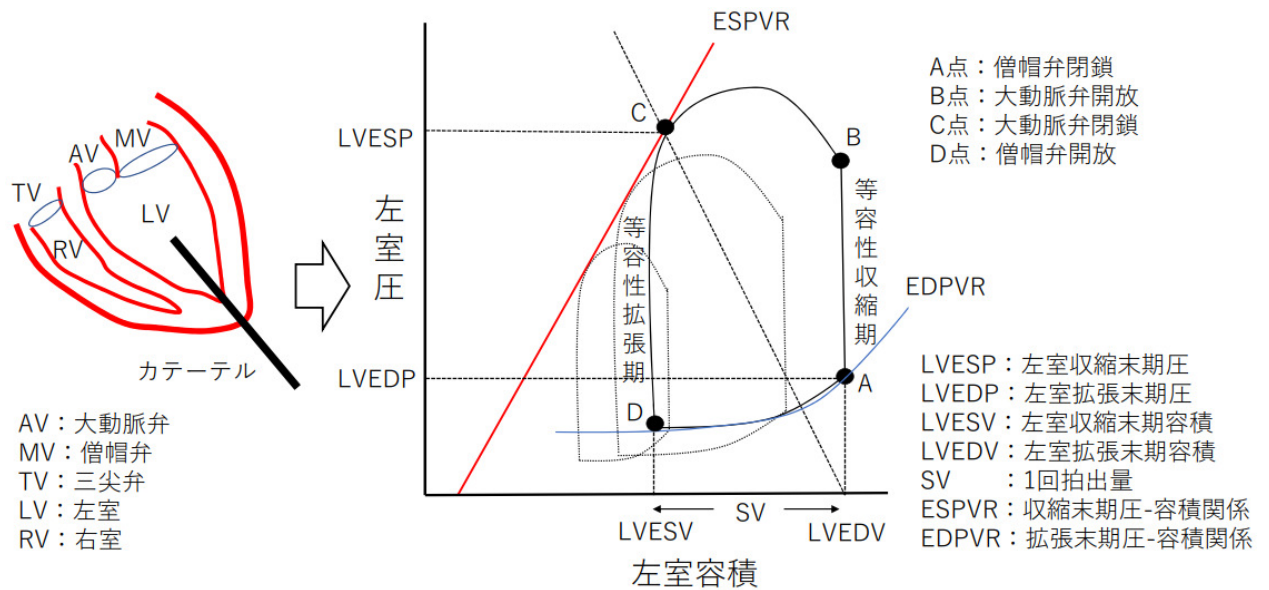


図4 左室圧-容量曲線 (Pressure-Volume loop; PV loop) 解析

イソフルラン麻酔下でマウスを開胸し、心臓の左室前面を露出させ、左室心尖部からカテーテルを挿入した (左図)。血压システムで左室容積を横軸、左室内圧を縦軸にプロットしたループ (PV loop) をリアルタイムで表示し (右図)、マウスの心機能および血行動態を評価した。

PV loop は反時計回りに1周することで心周期を表し、A点 (僧帽弁閉鎖) - B点 (大動脈弁開放) が等容性収縮期、C点 (大動脈弁閉鎖) - D点 (僧帽弁開放) が等容性拡張期である。一直線となる収縮末期圧-容積関係 (end systolic pressure-volume relationship: ESPVR) の傾きは前後負荷との関係の少ない収縮能の指標、指数関数で近似される拡張末期圧-容積関係 (end diastolic pressure-volume relationship: EDPVR) は左室スティフネスの指標となる。





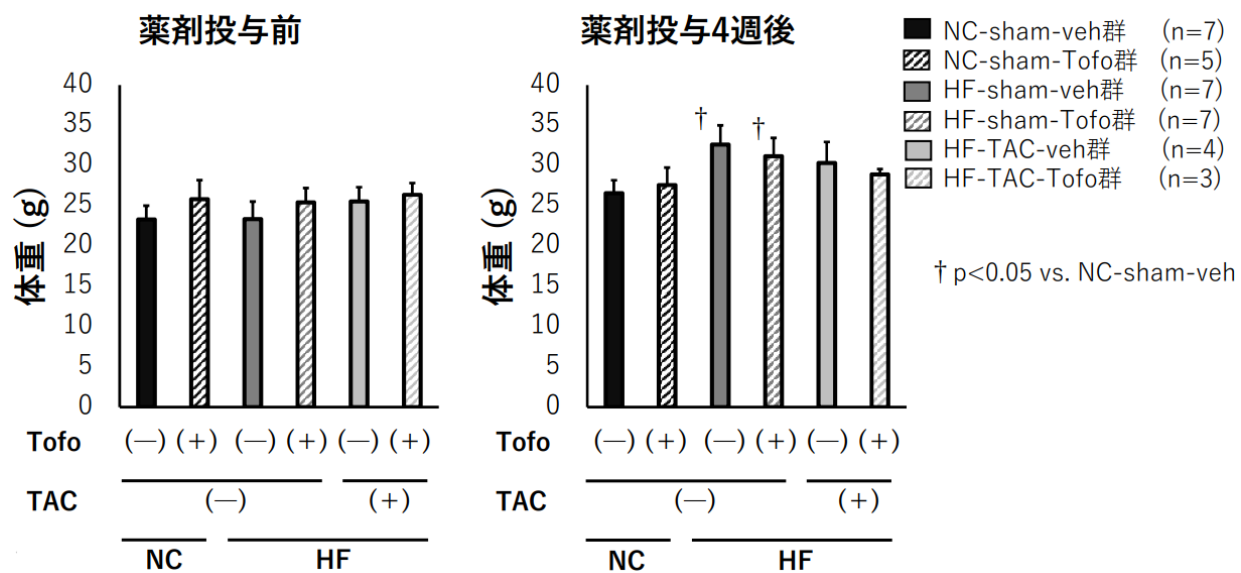


図5 体重の変化

薬剤投与前の体重は、6群間で有意な差はなかった（左図）。薬剤投与4週後は、sham群において高脂肪食負荷により有意な体重増加を認めた（右図）。

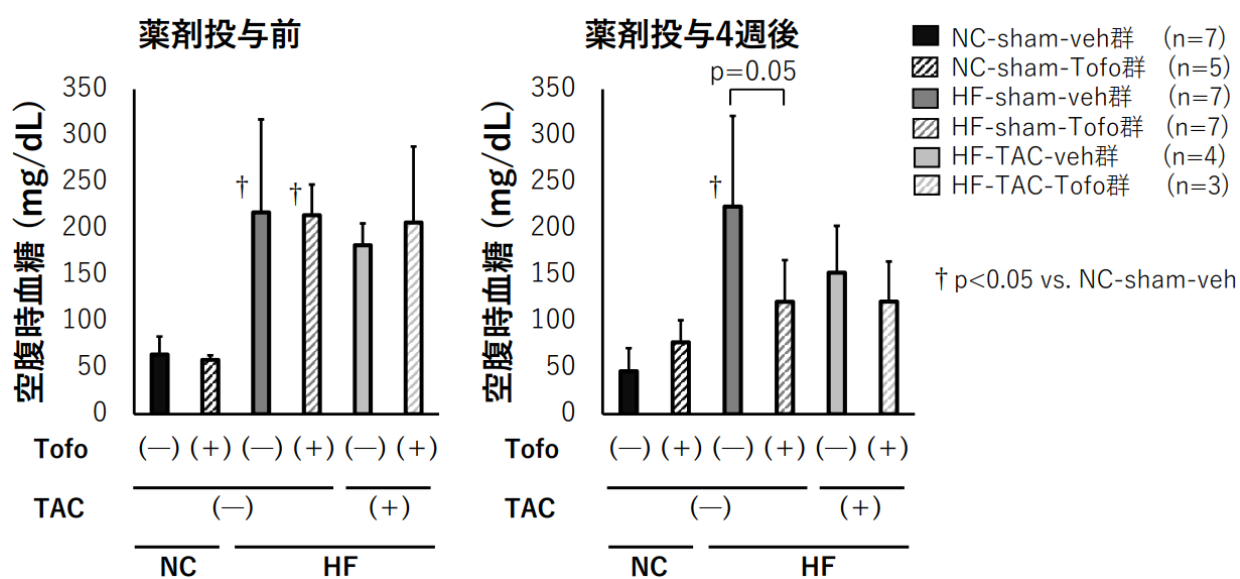


図6 空腹時血糖の変化

薬剤投与前の空腹時血糖値は、高脂肪食負荷により有意に上昇した（左図）。薬剤投与4週後も、トホグリフロジン非投与群では空腹時血糖値の上昇が続いていたが、トホグリフロジン投与により空腹時血糖の上昇が改善した（右図）。

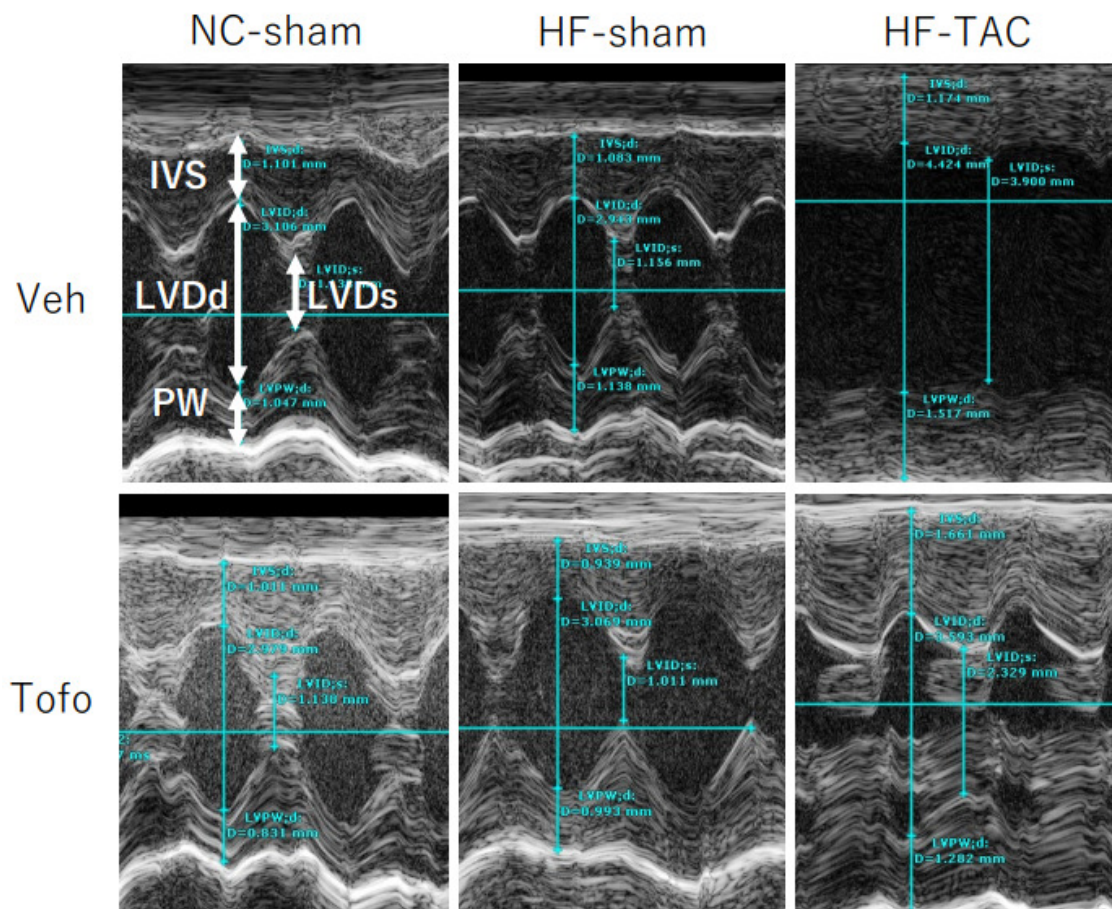


図7 15週齢時の心エコー所見（Mモード）

薬剤投与4週後（15週齢時、TAC施行5週後）の心エコー検査のMモード像で、左室の収縮能および形態を評価した。高脂肪食負荷下での心負荷により、左室拡大、左室肥大、左室内径短縮率（FS）の低下がみられた（右上段）。心負荷後のトホグリフロジン投与により左室拡大とFS低下が改善した（右下段）。

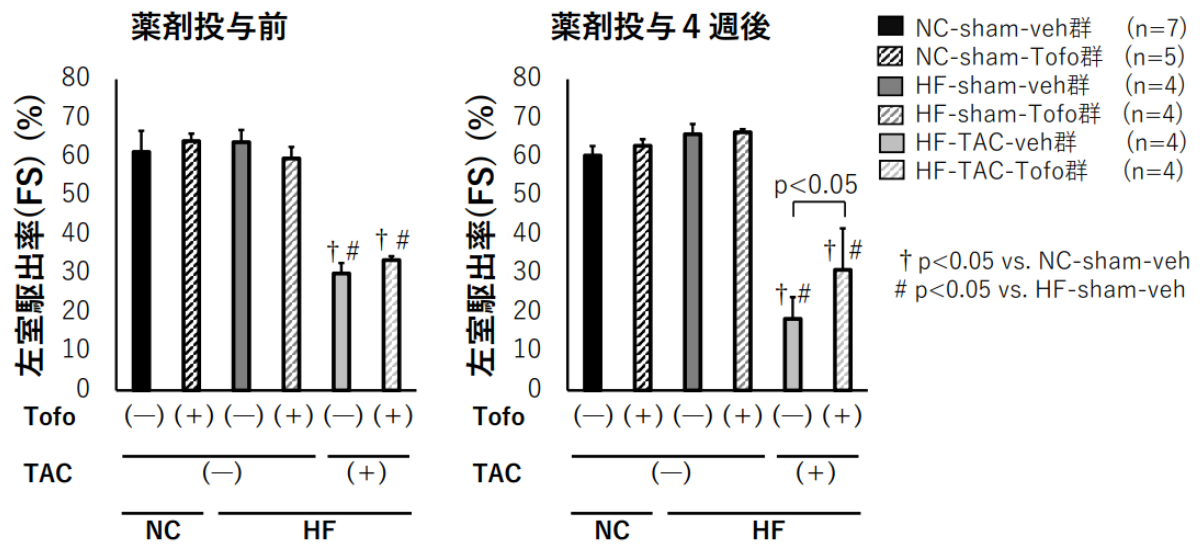


図 8 左室内径短縮率 (FS) の変化

左室収縮能の指標として FS を、薬剤投与前および投与 4 週後に各群で比較した。高脂肪食負荷下での心圧負荷により、薬剤投与前の FS が有意に低下した。このうちトホグリフロジン非投与群では薬剤投与 4 週後に FS 低下がさらに進行したが、トホグリフロジン投与群では薬剤投与 4 週後の FS は横ばいであり、トホグリフロジン非投与群に比べて FS の低下が抑えられていた。

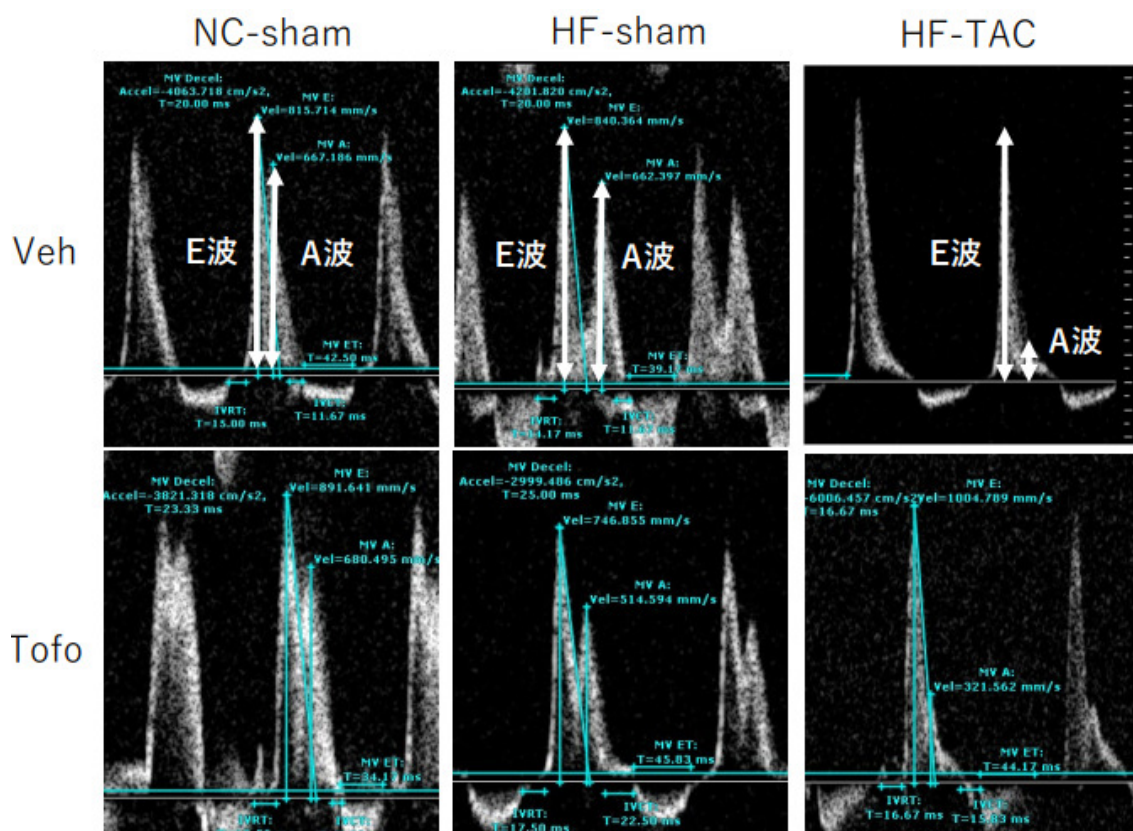


図9 15週齢時の心エコー所見（パルスドプラ法）

薬剤投与4週後（15週齢時、TAC施行5週後）の心エコー検査のパルスドプラ法で、各個体の僧帽弁口血流速波形（TMF）パターンを計測した。高脂肪食負荷下での心圧負荷により、E波上昇、A波低下、E/A比上昇がみられた（右上段）。心圧負荷後のトホグリフロジン投与により、E波上昇、A波低下、E/A比上昇が改善した（右下段）。

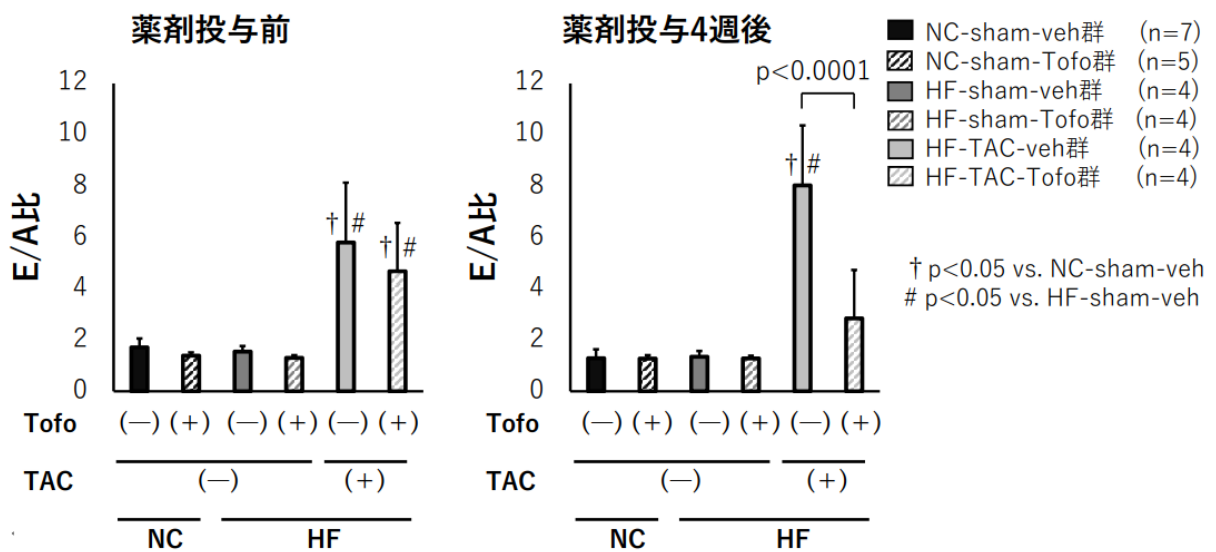


図 10 E/A 比の変化

左室拡張能の指標である E/A 比を、薬剤投与前（左図）および投与 4 週後（右図）に各群で比較した。高脂肪食負荷下での心圧負荷により、薬剤投与前に E/A 比が有意に上昇したが、心圧負荷のトホグリフロジン投与によりその上昇が改善した。

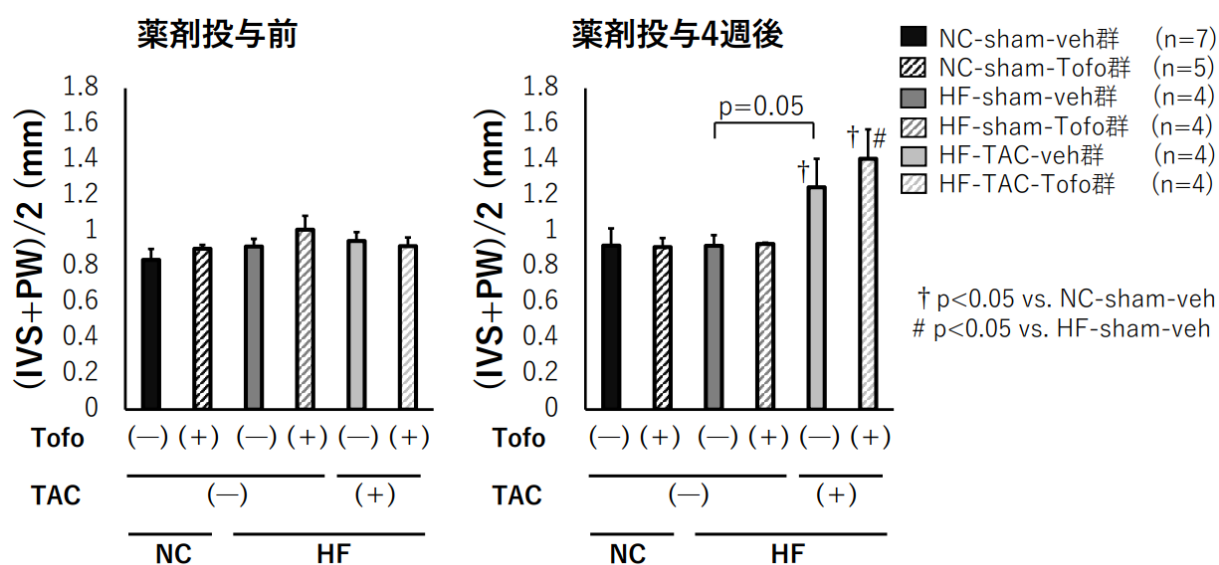


図 11 左室壁厚の変化

心肥大の指標である左室壁厚（IVS と PW の平均値）を、薬剤投与前（左図）および投与 4 週後（右図）に各群で比較した。薬剤投与 4 週後、高脂肪食負荷下での心圧負荷により、トホグリフロジン投与の有無によらず壁厚が増大した。なお、トホグリフロジン投与の有無による壁厚の差はなかった。



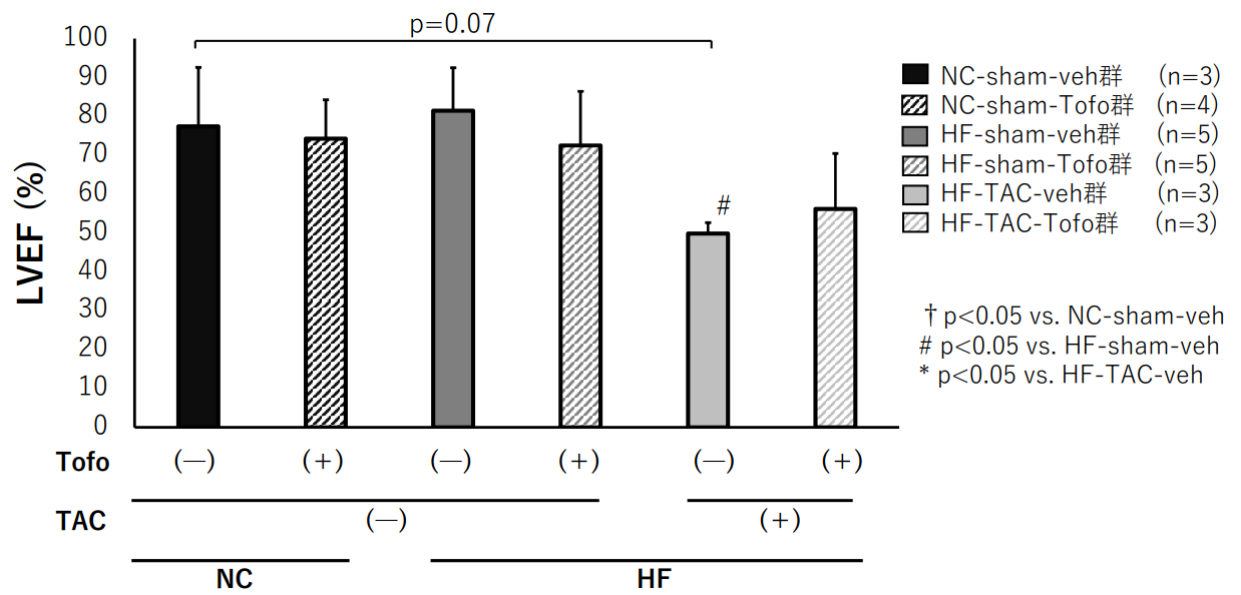


図 12 PV loop 解析での左室駆出率 (LVEF)

左室収縮能の指標である LVEF は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に低下したが、心圧負荷後にトホグリフロジン投与した群では有意な変化はなかった。



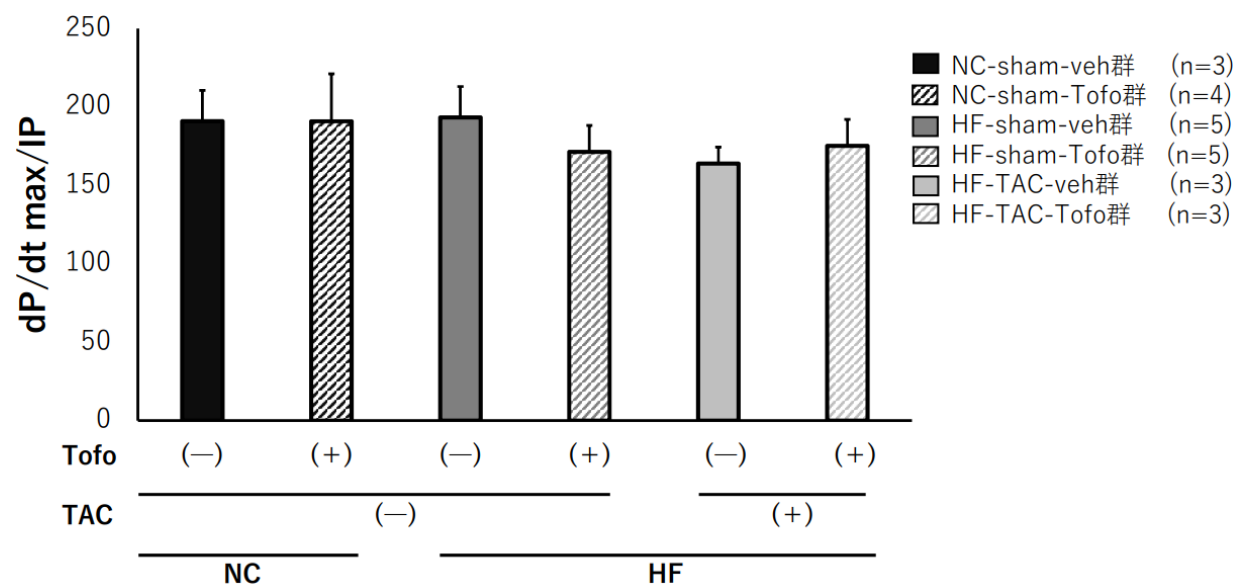


図 13 PV loop 解析での圧補正後の左室圧最大増加率 (dP/dt max/IP)

左室収縮能の指標である dP/dt max/IP は、6 群間で有意な差はなかった。

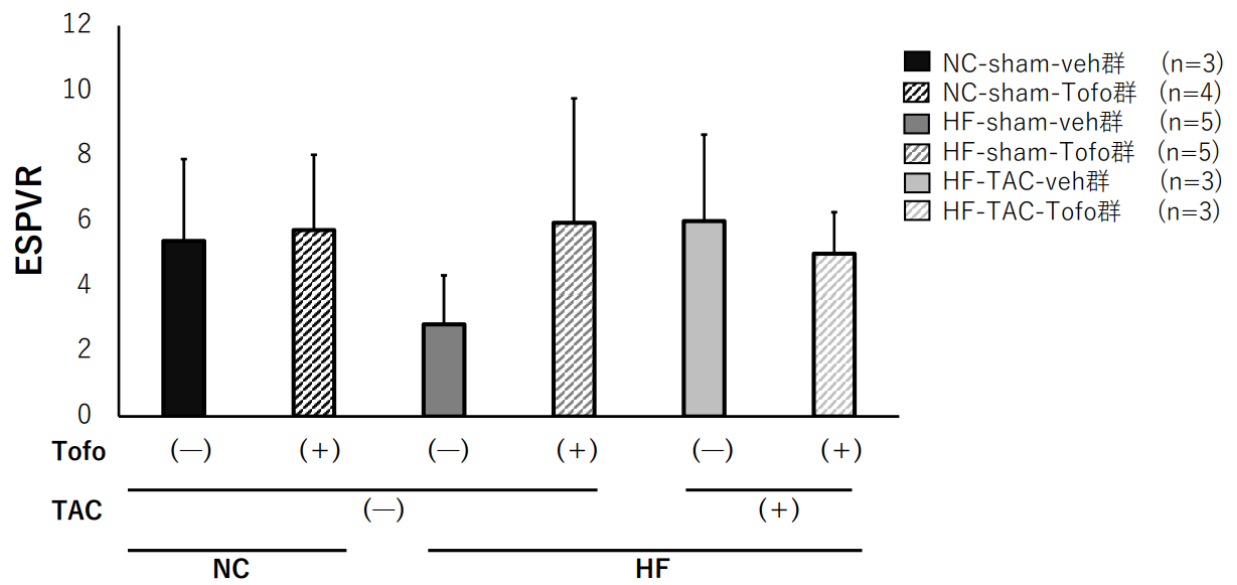


図 14 PV loop 解析での左室収縮末期圧容量比 (ESPVR)

左室収縮能の指標である ESPVR は、6 群間で有意な差はなかった。

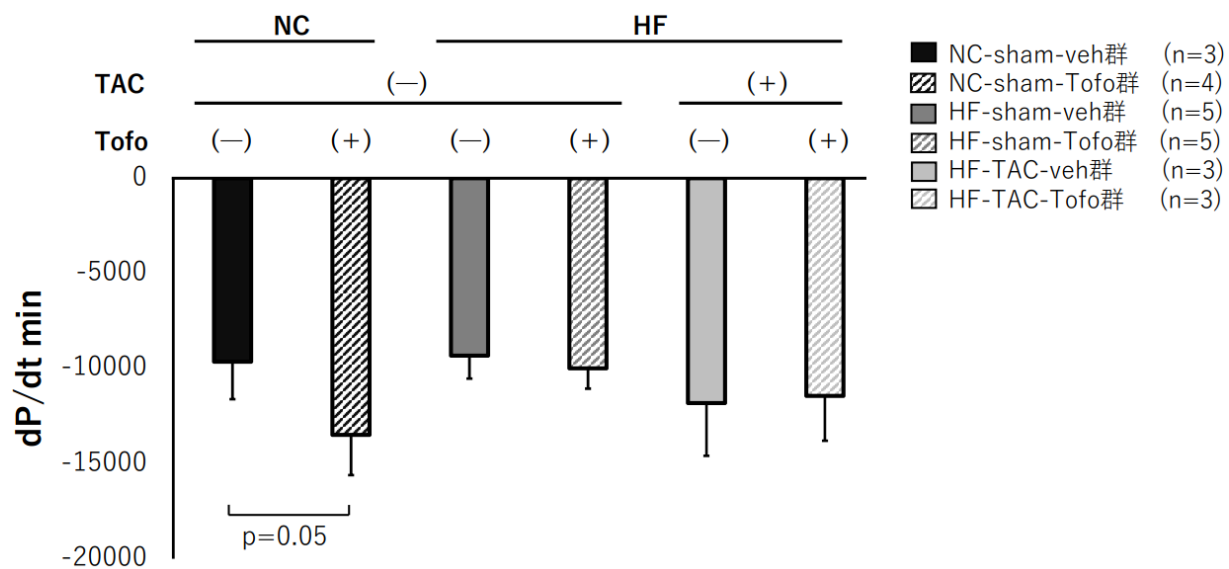


図 15 PV loop 解析での左室圧最小増加率 (dP/dt min)

左室拡張能の指標である dP/dt min は、6 群間で有意な差はなかった。

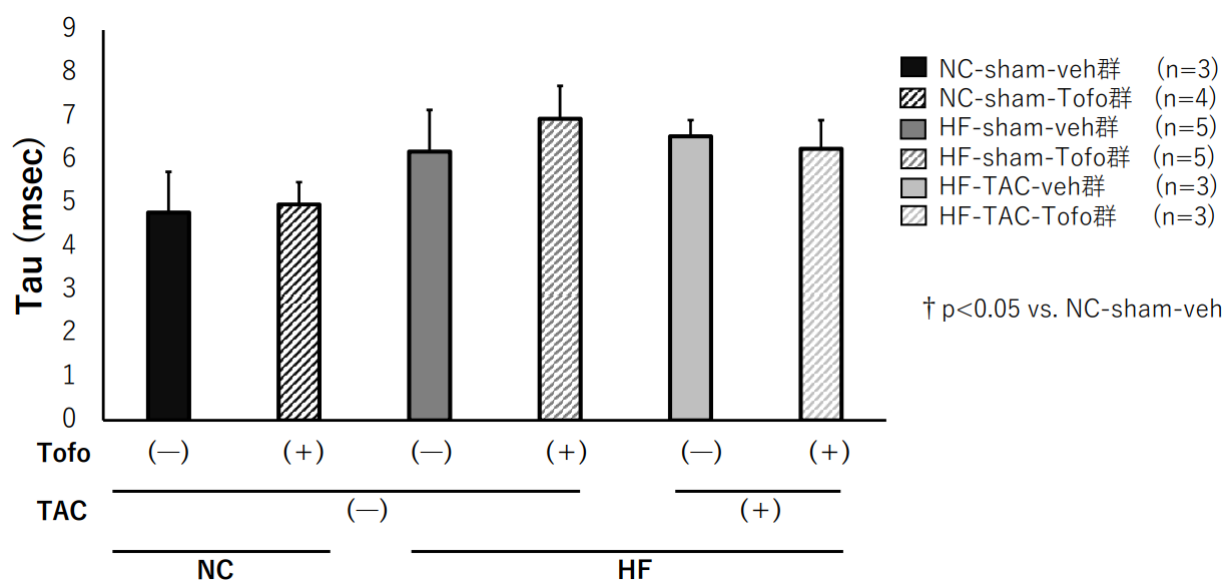


図 16 PV loop 解析での等容弛緩期の左室圧曲線の減衰時定数 (tau)

左室拡張能の指標である tau は、6 群間で有意な差はなかった。

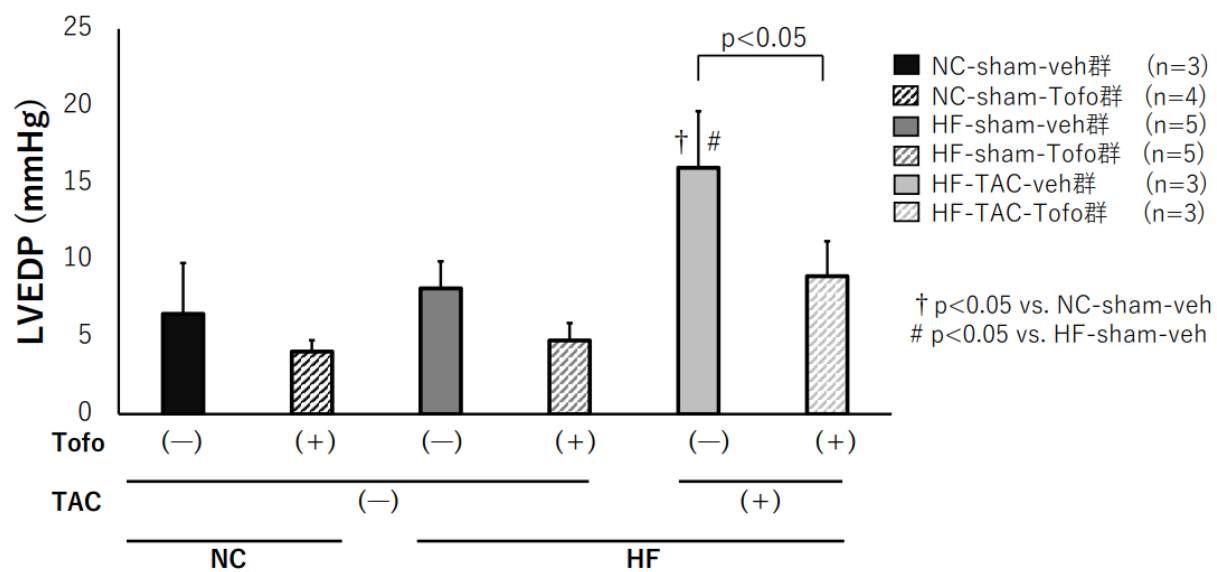


図 17 PV loop 解析での左室拡張末期圧 (LVEDP)

左室スティフネスの指標である LVEDP は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に上昇したが、トホグリフロジン投与によりその上昇が有意に改善した。

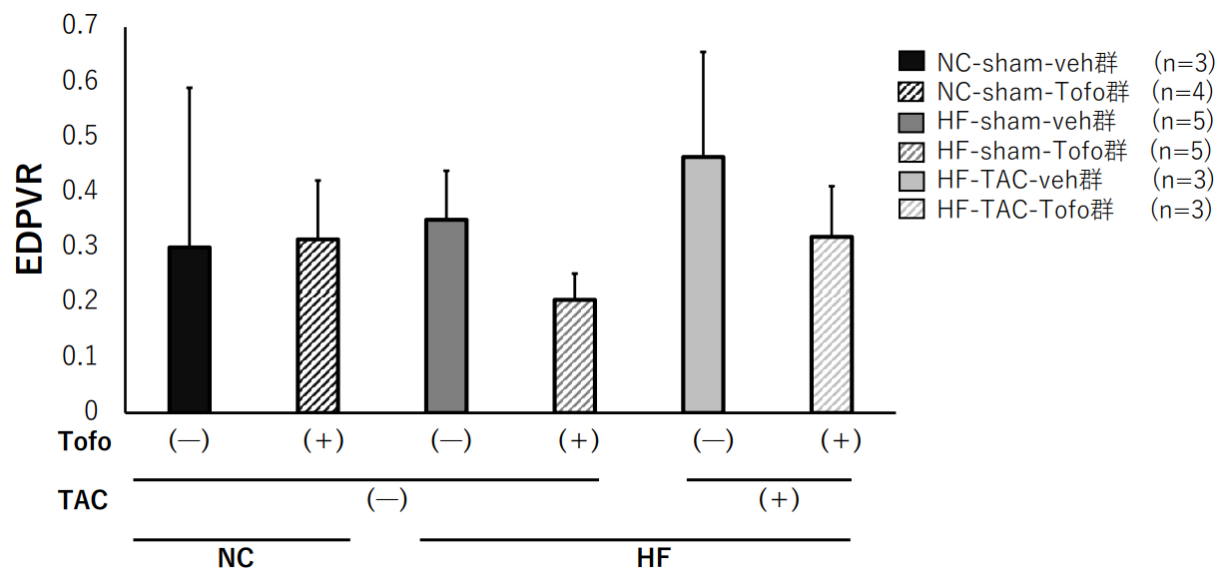


図 18 PV loop 解析での左室拡張末期圧容量比 (EDPVR)

左室拡張能の指標である EDPVR は、6 群間で有意な差はなかった。

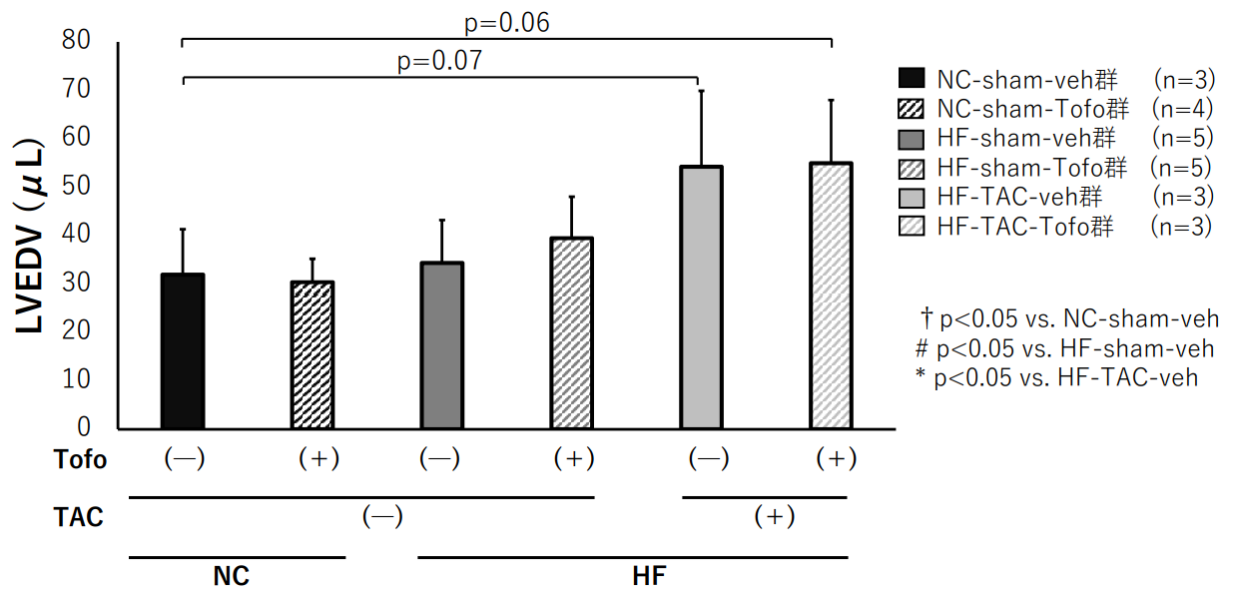


図 19 PV loop 解析での左室拡張末期容積 (LVEDV)

左室前負荷の指標である LVEDV は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により、ト  
 ホグリフロジン投与の有無によらず増加する傾向にあった。

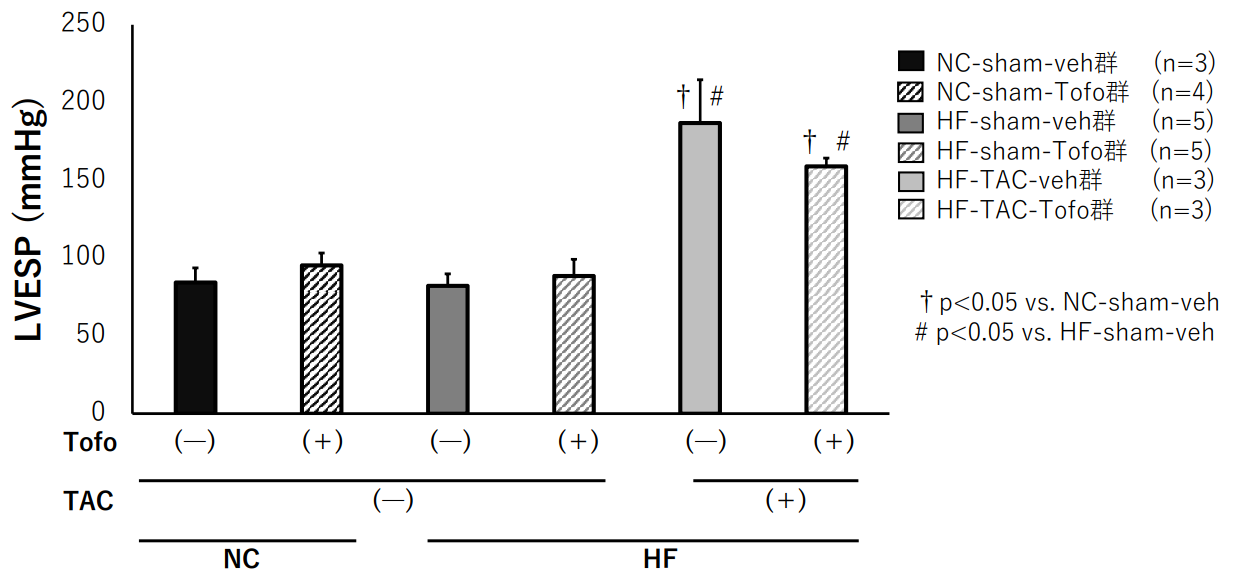


図 20 PV loop 解析での左室収縮末期圧 (LVEDP)

左室後負荷の指標である LVEDP は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により、ト  
ホグリフロジン投与の有無によらず上昇した。



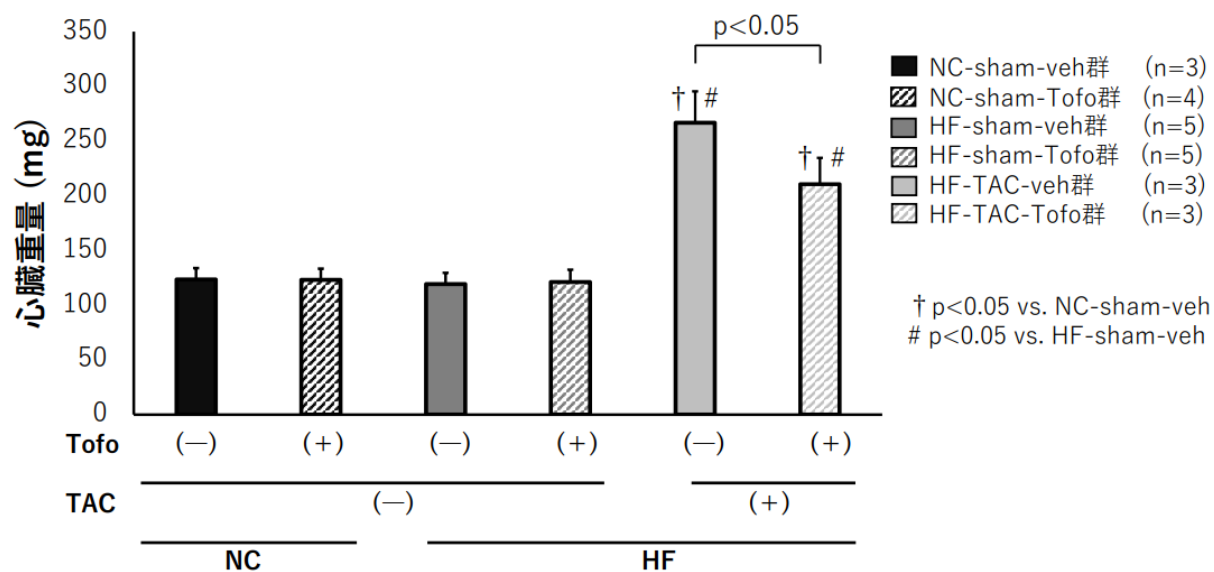


図 21 心臓重量

心臓重量は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により sham 群に比べて心臓重量が約 2.2 倍に増加したが、心圧負荷後にトホグリフロジン投与により心臓重量が約 0.8 倍に減少した。

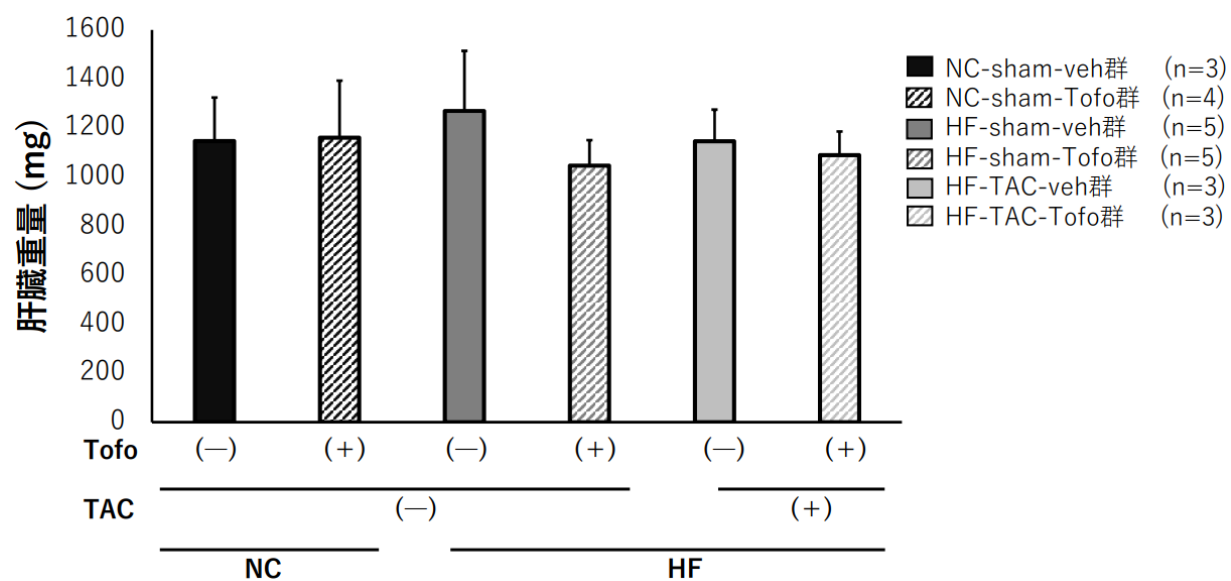


図 22 肝臓重量

肝臓重量は、6 群間で有意な差はなかった。

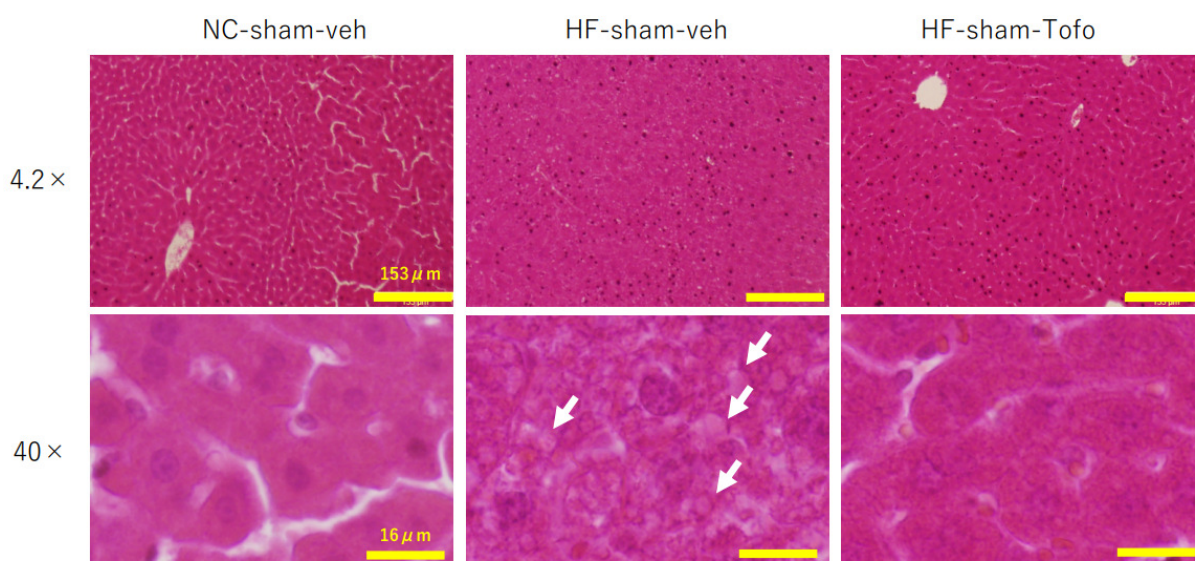


図 23 肝臓病理所見

HE 染色した肝臓標本の弱拡大像（4.2 倍、上段）、強拡大像（40 倍、下段）を示す。高脂肪食投与により脂肪滴（矢印）の増加がみられたが（中央下段）、トホグリフロジン投与により脂肪滴増加が改善した（右下段）。

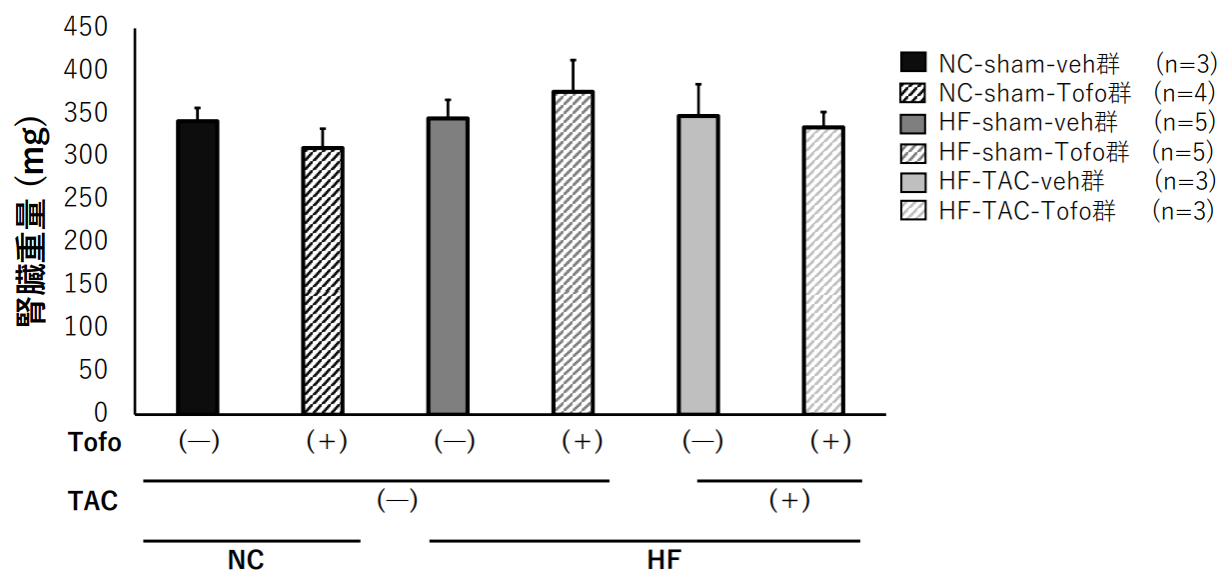


図 24 腎臓重量

腎臓重量は、6 群間で有意な差はなかった。

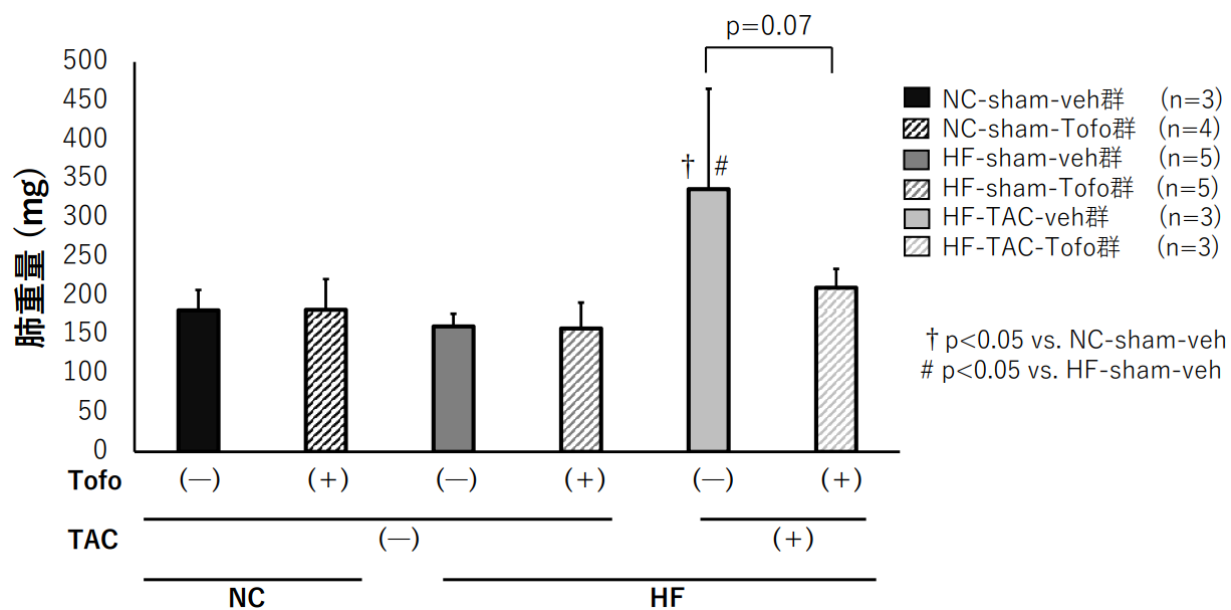


図 25 肺重量

肺重量は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に増加し、肺うっ血が示唆された。心圧負荷後のトホグリフロジン投与により肺重量が減少する傾向がみられた。

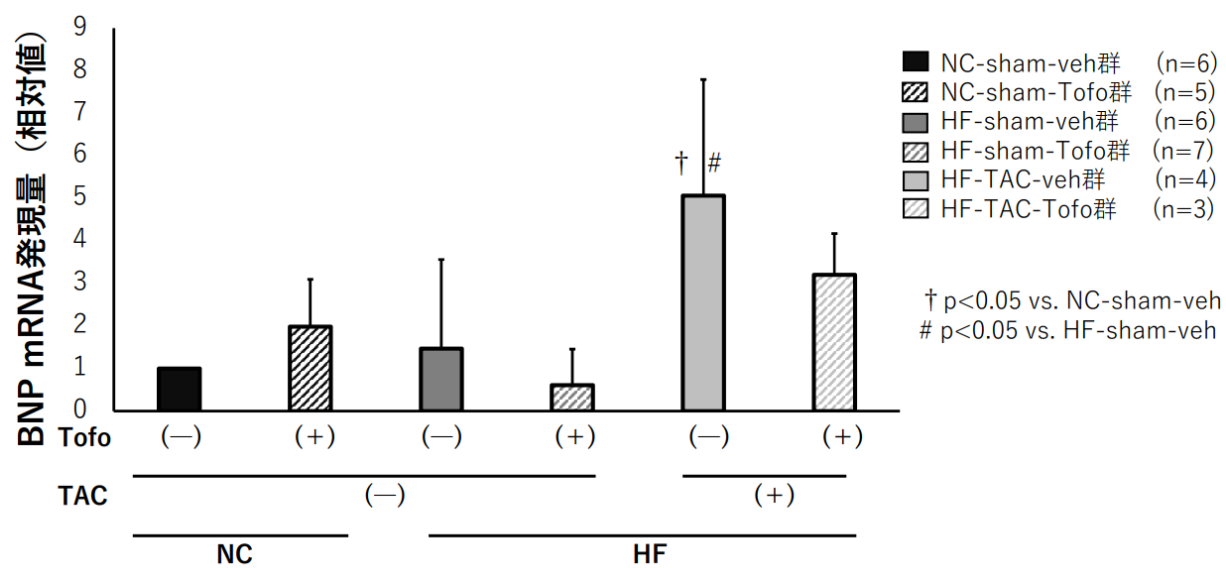


図 26 BNP の mRNA 発現量

心不全マーカーである BNP の mRNA 発現量は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に増加したが、心圧負荷後のトホグリフロジン投与により BNP の mRNA 発現量の有意な増加は認めなかった。

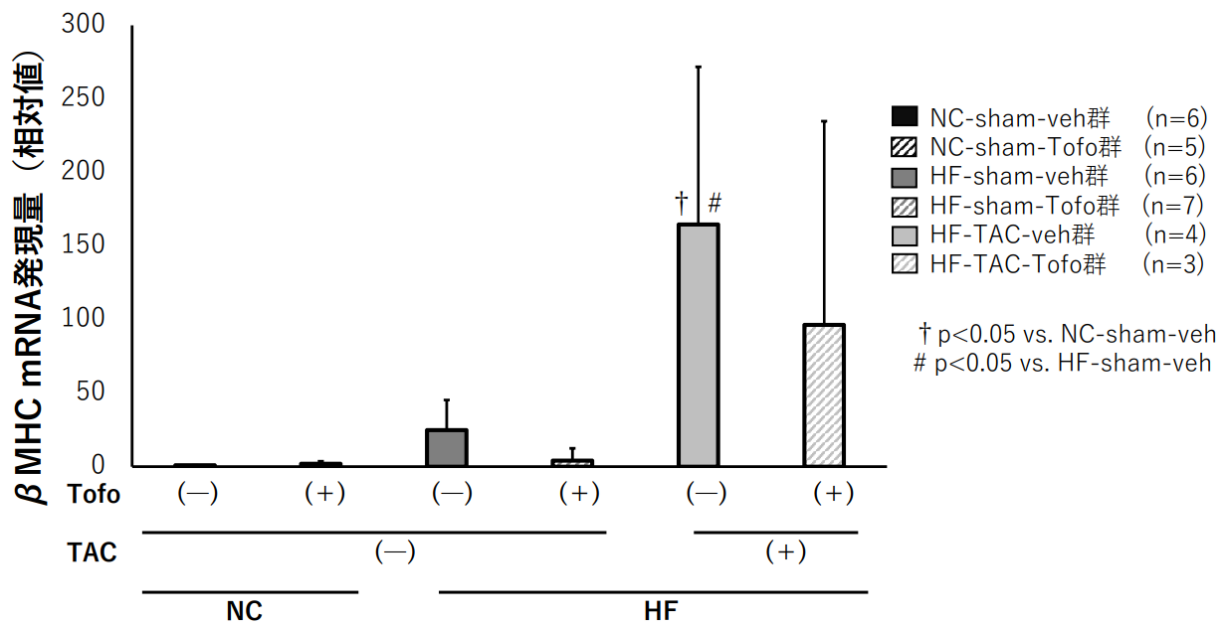


図 27  $\beta$  MHC の mRNA 発現量

心肥大マーカーである  $\beta$  MHC の mRNA 発現量は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に増加したが、心圧負荷後のトホグリフロジン投与により  $\beta$  MHC の mRNA 発現量の有意な増加は認めなかった。

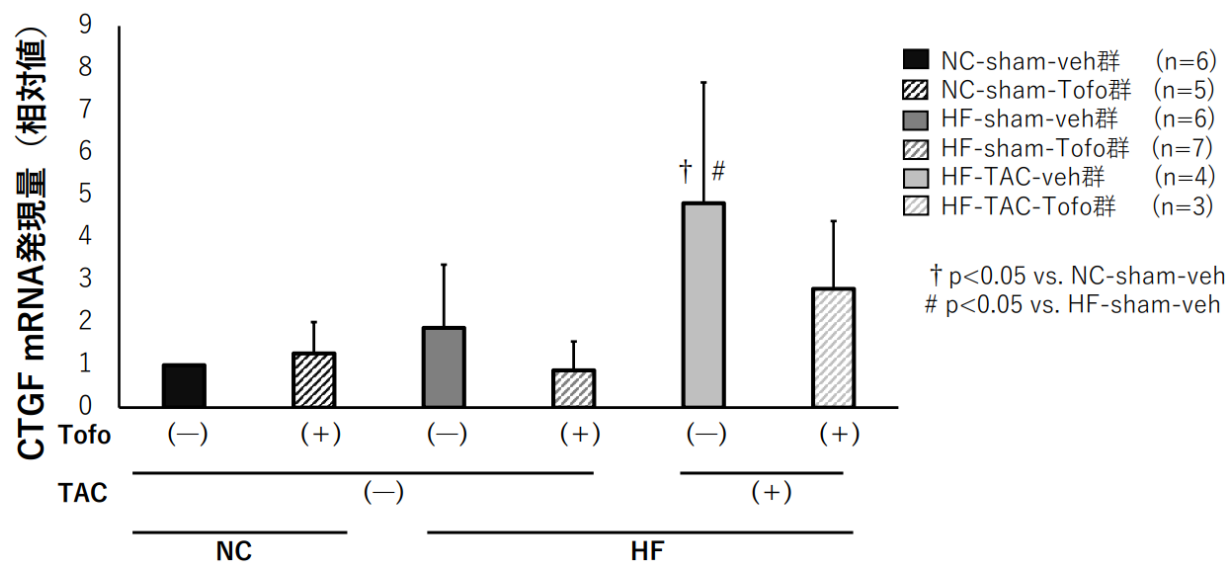


図 28 CTGF の mRNA 発現量

線維化マーカーである CTGF の mRNA 発現量は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に増加したが、心圧負荷後のトホグリフロジン投与により CTGF の mRNA 発現量の有意な増加は認めなかった。



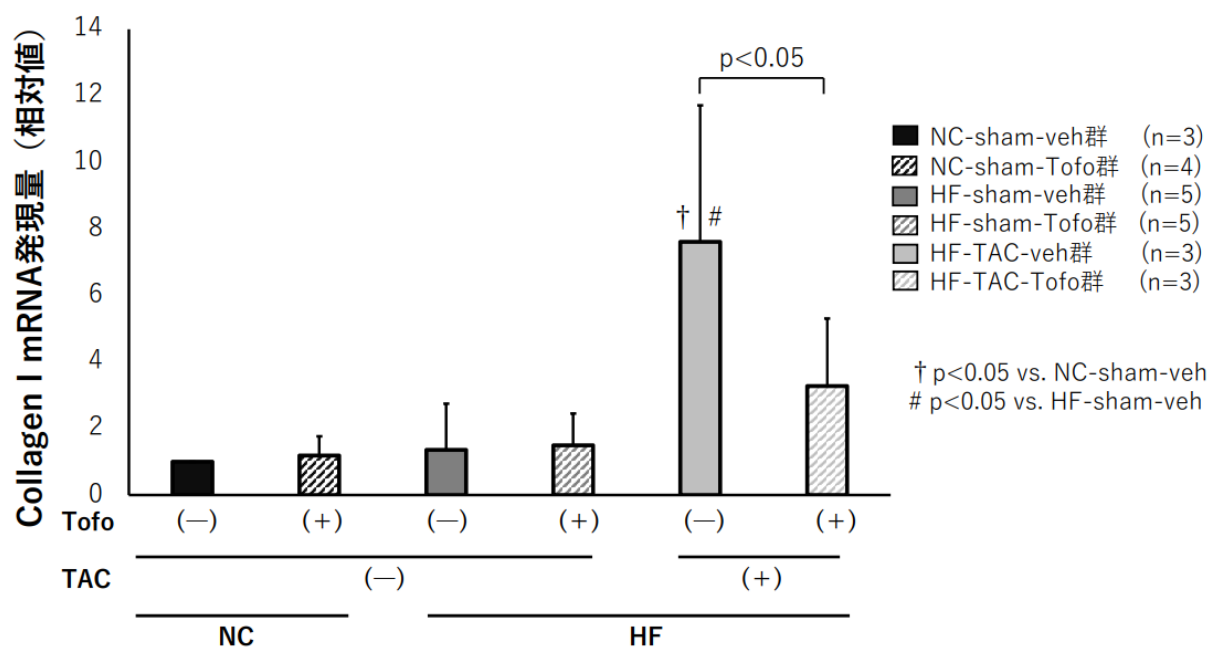


図 29 Collagen I の mRNA 発現量

線維化マーカーである collagen I の mRNA 発現量は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に増加したが、心圧負荷後のトホグリフロジン投与により有意に減少していた。

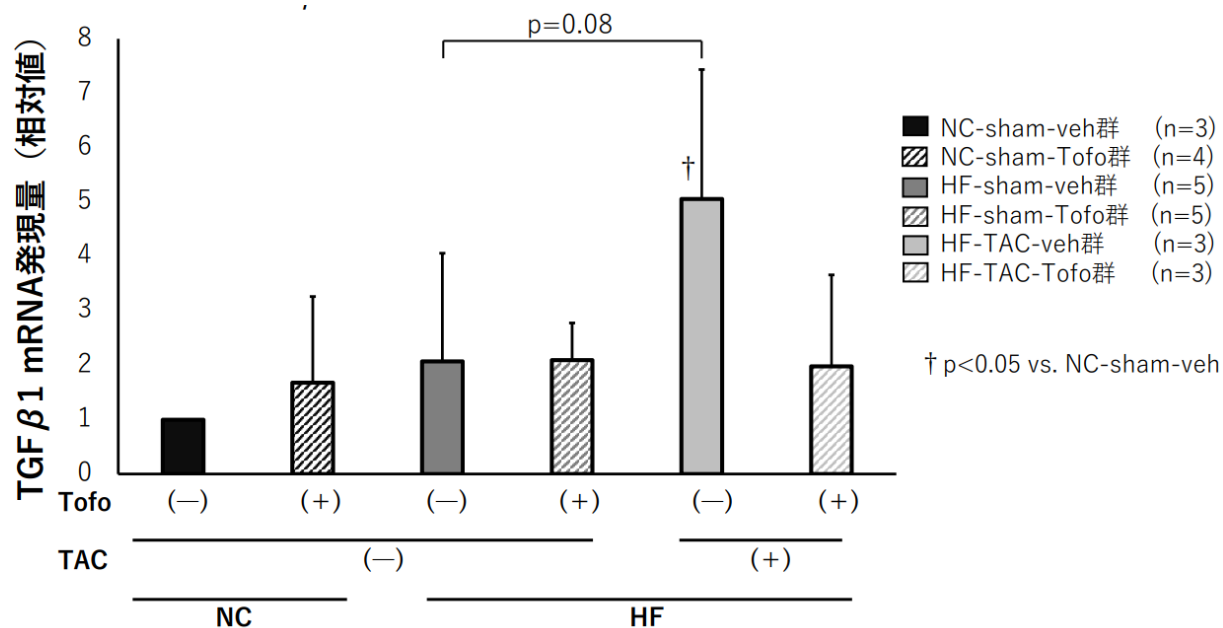


図 30 TGFβ1 の mRNA 発現量

炎症マーカーである TGFβ1 の mRNA 発現量は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により増加したが、心圧負荷後のトホグリフロジン投与により TGFβ1 の mRNA 発現量の有意な増加は認めなかった。

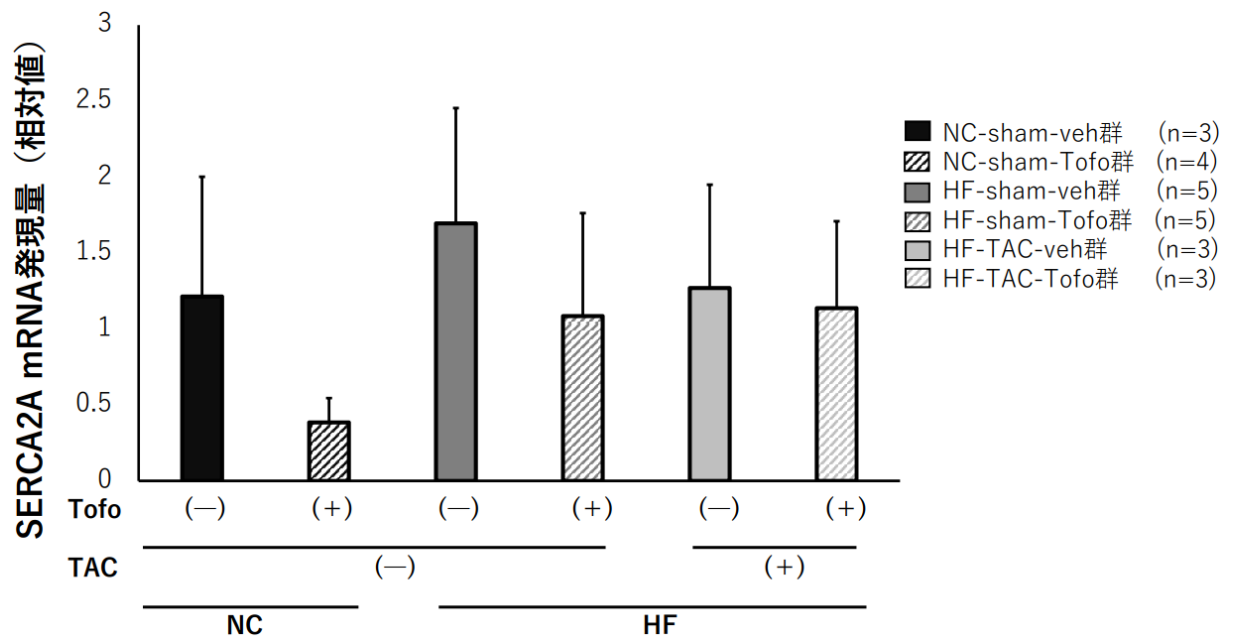


図 31 SERCA2A の mRNA 発現量

心筋小胞体のカルシウム輸送に関わる SERCA2A の mRNA 発現量は、6 群間で有意な差はなかった。

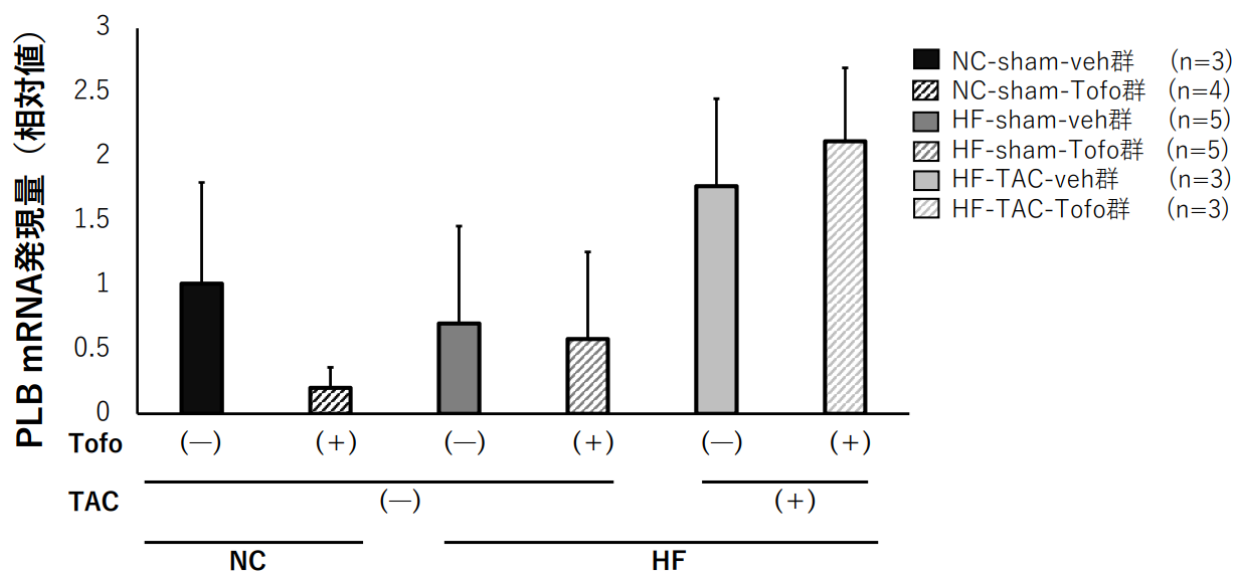


図 32 Phospholamban の mRNA 発現量

心筋小胞体のカルシウム輸送に関わる phospholamban (PLN) の mRNA 発現量

は、6 群間で有意な差はなかった。

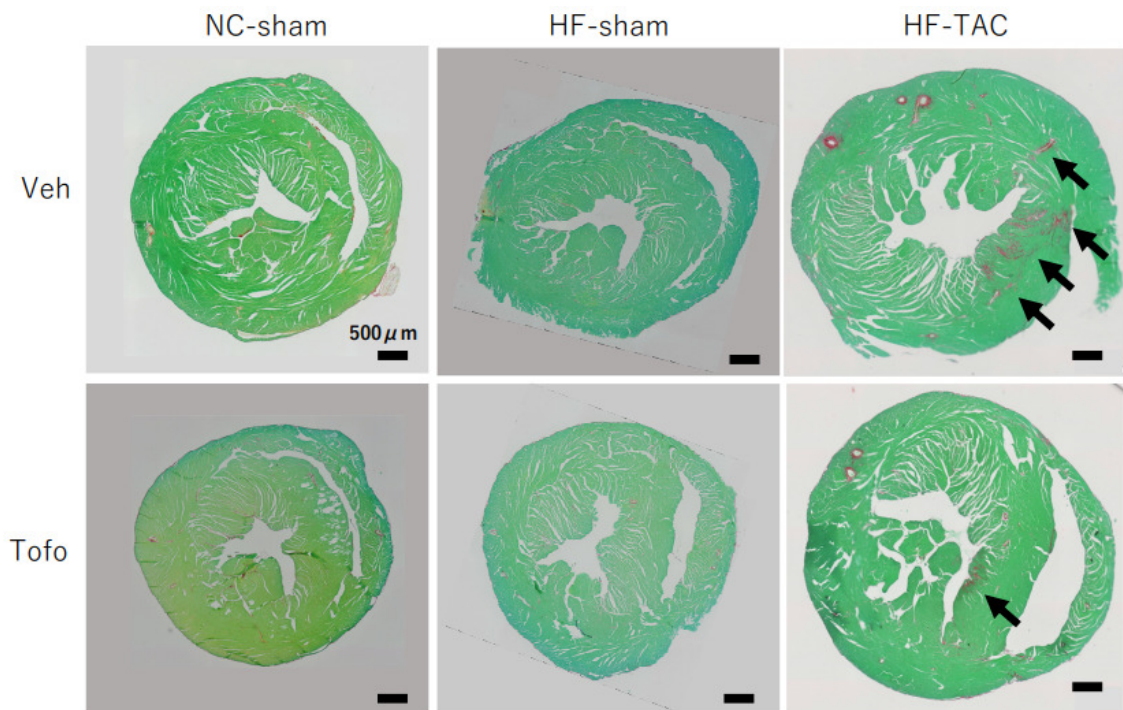


図 33 Picrosirius-red 染色による心筋間質の線維化の評価

心臓中部レベルでの短軸断の標本において心筋の線維化部分を Picrosirius-red にて赤く染色した。高脂肪食負荷下での心圧負荷により線維化（矢印）が増加していたが、心圧負荷後のトホグリフロジン投与により線維化が改善していた。

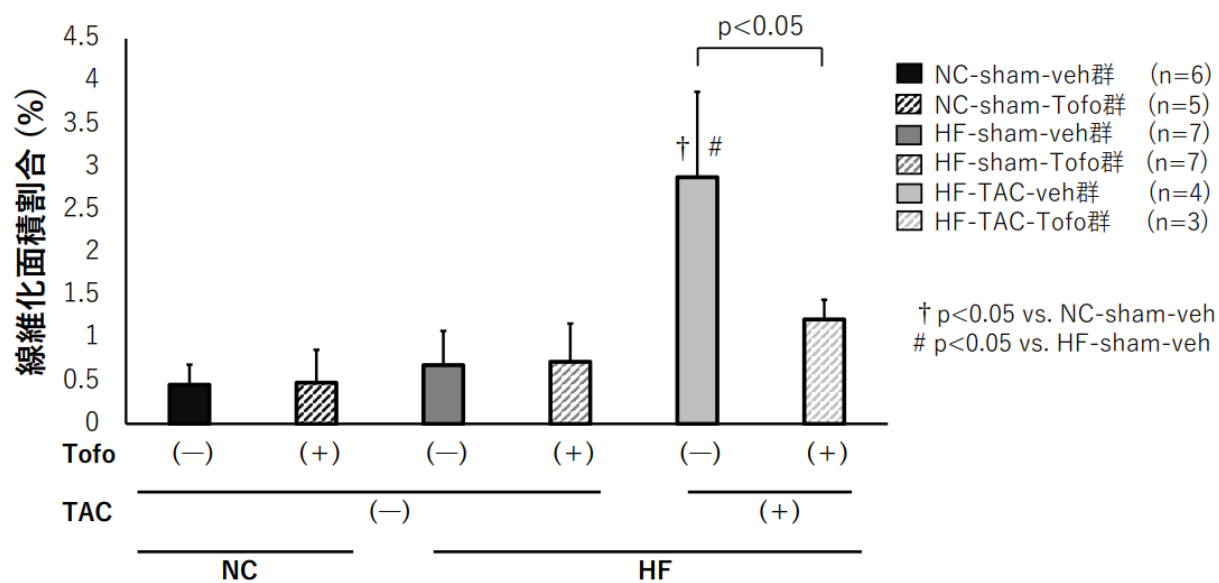


図 34 心筋の線維化の定量評価

全体の心筋面積に対する線維化面積の割合は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に増加したが、心圧負荷後のトホグリフロジン投与により線維化面積が約 0.4 倍に低下していた。

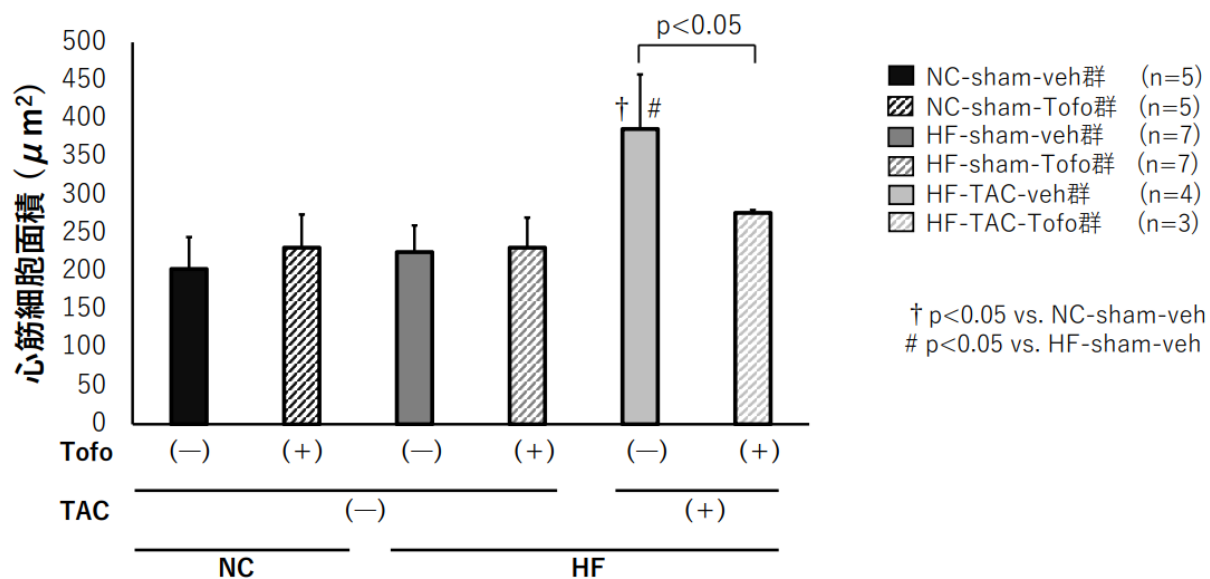


図 35 心筋細胞面積の評価

心筋細胞面積は、高脂肪食負荷下での心圧負荷により有意に増大したが、心圧負荷後のトホグリフロジン投与により心筋細胞面積が約 0.7 倍に低下した。