

主 論 文

Inhibitory Effects of Tofogliflozin on Cardiac Hypertrophy in Dahl Salt-sensitive and Salt-resistant Rats Fed a High-fat Diet

(高脂肪食を与えた食塩感受性および食塩非感受性ラットにおけるトホグリフロジンの心肥大抑制効果)

【緒言】

ナトリウム・グルコース共輸送体 2 (SGLT2) 阻害剤は SGLT2 を阻害することで腎近位尿細管での糖の再吸収を抑制し血糖降下作用を得る糖尿病治療薬である。SGLT2 阻害薬は、心血管疾患リスクの高い 2 型糖尿病患者の心血管死亡および心不全入院を有意に減少させることが大規模臨床試験 (EMPA-REG 研究、CANVAS 研究) において示されている。SGLT2 阻害薬は耐糖能障害、高血圧、高尿酸血症および脂質異常症などを改善することが示されているが、心血管イベントおよび心不全の発症を抑制する機序は依然として不明である。

Dahl 食塩感受性ラットは、インスリン抵抗性を誘発する高塩濃度および高脂肪食を摂取すると、高血圧および心不全を発症する。SGLT2 阻害剤が心肥大を予防し、心臓代謝を変化させることができるかと仮説を立て、Dahl 食塩非感受性 (DR) および Dahl 食塩感受性 (DS) ラットに高脂肪・高塩分食を負荷し、心肥大と代謝に対するトホグリフロジンの効果を調べた。

【材料と方法】

動物実験

6 週齢のオスの DR ラット (14 匹) と DS ラット (26 匹) を用いて、6 週齢から 15 週齢まで 29.4%脂肪食と 8%塩分食を与えた。それぞれのラットを以下の通りトホグリフロジン (TOFO) 投与群と非投与群の 4 群に分けて飼育した: DR ラット非投与群 (7 匹)、DR ラット TOFO 投与群 (7 匹)、DS ラット非投与群 (13 匹)、DS ラット TOFO 投与群 (13 匹)。開始時、9、12、15 週齢期に収縮期血圧を測定し、15 週齢時点で体重測定、採尿、採血をおこなった後に心臓を摘出し心重量を測定した。

血液および尿サンプルの収集、測定

採取した尿を用いて尿中グルコースおよび電解質を測定した。また、血液検体を用いて血漿グルコース、インスリン、血清総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸を測定した。

組織学的検討

摘出した左室心筋組織に対してヘマトキシリン・エオジン染色、およびマッソン・トリクローム染色で染色をおこない、心筋細胞径および血管周囲線維化を測定した。

定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現解析

摘出した心臓の左室心筋組織から RNA を抽出して PCR を行い、以下の項目について mRNA 発現の測定をおこなった:ナトリウム利尿ペプチド A (Nppa)、ナトリウム利尿ペプチド B (Nppb)、インターロイキン-6 (IL6)、トランスフォーミング増殖因子 β -1 (Tgfb1)、 α -ミオシン重鎖 6 (Myh6)、コラーゲンタイプ IV アルファ-1 鎖 (Col4a1)、3-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ 1 (Bdh1)、3-オキソ酸 CoA トランスフェラーゼ 1 (Oxct1)、アセチル・コエンザイム A アセチルトランスフェラーゼ 1 (Acat1)。

メタボローム解析

左室心筋組織 (DS ラットの TOFO 投与群・非投与群からそれぞれ 3 匹ずつ) を用いて解糖系の代謝産物、ATP およびケトン体の 3-ヒドロキシ酪酸 (3HBA) を測定した。

統計分析

統計分析は SPSS バージョン 24 (IBM) を用いて行った。データは全て平均値±標準偏差で表しており、Student-t 検定を行った。3 つ以上のグループについては One-way analysis of variance 検定を用いたのちに Tukey 検定にて解析を行った。P 値が 0.05 以下を統計学的有意とした。

【結果】

トホグリフロジンの収縮期血圧および心臓重量に及ぼす影響

収縮期血圧はベースライン時に DS ラットのコントロール群と TOFO 投与群に差はなく、15 週齢期には DS ラットにおいては TOFO 投与群で有意に低かった ($180 \pm 1 \text{ mmHg}$ 対 $184 \pm 1 \text{ mmHg}$, $P < 0.01$)。TOFO 投与群では、DR と DS いずれのラットでも収縮期血圧の上昇を抑える傾向をみとめた。心臓重量および心臓重量・体重比 (HW / BW) は、いずれのラットにおいても TOFO 投与群で有意に低かった。

トホグリフロジンの、血清および尿の生化学的パラメーターへの影響

DR と DS いずれのラットでも TOFO 投与群で尿中グルコース濃度が有意に増加した。DS ラットでは TOFO 投与群で血漿グルコースが低下し、DR ラットにおいては TOFO 投与群で尿中ナトリウム濃度および血漿インスリンが低下した。DR と DS いずれのラットでも、尿アルブミン濃度、血清クレアチニン、トリグリセリド、遊離脂肪酸および総コレステロールは変化しなかった。

トホグリフロジンの心肥大および血管周囲線維化への抑制効果

DR と DS いずれのラットでもトホグリフロジンの投与により心筋細胞径、血管周囲線維化の面積は有意に減少していた。

トホグリフロジン投与による心不全、線維化に関連する遺伝子の発現抑制。

トホグリフロジン投与により、DR と DS いずれのラットにおいてもナトリウム利尿に関連する遺伝子の mRNA 発現が抑制された。線維化に関連した遺伝子である Tgfb1 と Col4a1 の mRNA

発現は DS ラットにおいて TOFO 投与群で抑制され、心筋組織を構成するミオシン重鎖に関連した Myh6 の mRNA 発現は増加していた。

トホグリフロジンが心筋組織でのケトン代謝に与える影響

トホグリフロジンの投与により、DS ラットにおいてケトン体 (3HBA)、およびアデノシン三リン酸 (ATP) が減少した。また、DR と DS いずれのラットにおいても Bdh1 の mRNA 発現が抑制された。DS ラットでは Oxt1 の mRNA 発現も抑制された。

【考察】

我々はこの研究において、SGLT2 阻害剤であるトホグリフロジンの投与により、高脂肪・高塩分食の摂取によって惹起される心肥大が改善されることを示した。また、心肥大、炎症、線維症およびケトン代謝に関連する遺伝子の発現を抑制しており、心筋組織でのエネルギー代謝を変化させる可能性を示した。

SGLT2 阻害剤は、血圧低下、ナトリウム利尿の促進、血糖コントロールの改善、体重減少、腎保護効果および尿酸排泄効果などの様々な効果を有することが報告されている。今回の実験でトホグリフロジンは、DS と DR いずれのラットにおいても心重量を減少させ、心筋組織の線維化を抑制していた。DS ラットでは収縮期血圧の上昇を有意に抑制しているが、DR ラットでも治療期間全体にわたって収縮期血圧の上昇を抑制しており、血圧上昇の抑制効果が心肥大と線維化を改善した機序の一つとして考えられる。

SGLT2 阻害剤はヒトおよび動物において血液中のケトン体濃度を増加させることが報告されている。心筋組織でのケトン代謝について、Aubert らは肥大心筋や不全心筋においてはケトンの利用率が増加することを報告しており、Bedi らは不全心ではケトン代謝に関連した遺伝子の mRNA 発現が増加すると報告している。また、Uchihashi らは、心筋特異的に Bdh1 を過剰発現させた動物モデルにおいて、ケトン体代謝の増加、酸化ストレスの減少、心臓リモデリングの改善を認めたと報告している。一方、今回の実験ではトホグリフロジンの投与により心筋組織内のケトン濃度は低下し、ケトン代謝に関連する一部の遺伝子の mRNA 発現は低下していた。心筋細胞のエネルギー源である ATP は増加していることから心筋組織の代謝は改善したものと考えられた。SGLT2 は心筋組織に存在しておらず SGLT2 阻害薬が心筋組織へ直接作用する可能性は低いことを考慮すると、トホグリフロジンが心肥大を改善し、結果的に心筋組織のケトン代謝が減少したと推測される。

研究の限界

第一に尿中および血清中のケトンレベルが測定されておらず、循環血液中のケトンが心筋組織の代謝に及ぼす影響についての検討が不十分であった。第二にメタボローム解析に関して、用いた検体数が少なく統計学的な有意差が得られなかった。

【結論】

トホグリフロジンは、心筋組織におけるケトンの利用を減少させるとともに心肥大および線維化を改善した。