

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07103

研究課題名(和文) SGLT2阻害薬の腎心関連因子を介した心保護作用の解明

研究課題名(英文) The cardioprotective effects of SGLT2 inhibitors via renal-heart related factors

研究代表者

杉 佳紀 (Sugi, Keiki)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：70792977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心不全患者の予後は5年生存率で50%台と悪い。その中で、腎臓で作用する糖尿病治療薬であるSGLT(sodium/glucose cotransporter)2阻害薬が、糖尿病合併心不全に対して心保護作用を発揮することが報告された(N Engl J Med. 2015)。腎臓の近位尿細管でのSGLT2阻害により、なぜ離れた心臓で臓器保護効果が現れるのかという問いに答えるため研究を開始し正常と糖尿病の尿細管モデルを使用した。細胞のキャラクターを確認するためPCR、digital PCRなども行ったが肝心のSGLT2阻害薬の発現が尿細管上皮細胞で一切認められず実験は頓挫した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SGLT2阻害薬は最近になり、非糖尿病の心不全患者にも死亡率や再入院率を低下させることが報告(N Engl J Med. 381:1995-2008. 2019)され始めており心臓、腎臓の両方に対しては良い効果があることは間違いがないが実際の機序は未だにわかっていない。この研究の目的は、腎心関連の機序の解明であったが残念ながら尿細管上皮細胞にSGLT2交抗体の発現が認められず研究を進めることが困難であった。

研究成果の概要(英文)：The prognosis for heart failure patients is worse, with a 5-year survival rate in the 50% range. In this context, it was reported that SGLT (sodium/glucose cotransporter) 2 inhibitors, a diabetes drug that acts in the kidney, exert cardioprotective effects in diabetes-complicated heart failure (N Engl J Med. 2015). To answer the question of why SGLT2 inhibition in the proximal tubules of the kidney produces organ-protective effects in the remote heart, research was initiated and normal and diabetic tubular models were used. PCR and digital PCR were performed to confirm the cellular characteristics, but the experiment was unsuccessful because no expression of the key SGLT2 inhibitor was observed.

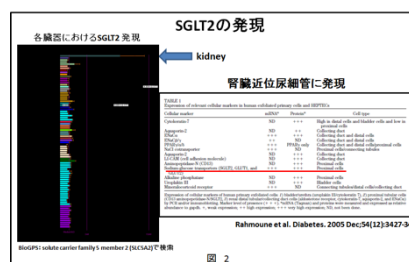
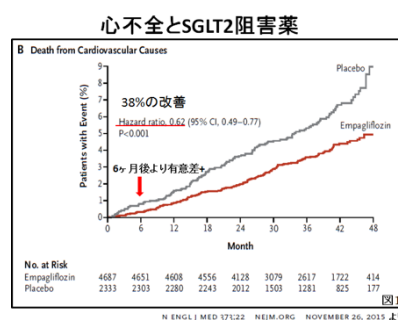
研究分野：循環器領域

キーワード：慢性心不全 2型糖尿病 SGLT2阻害薬 腎心関連

1. 研究開始当初の背景

(1) 循環器疾患加療は今世紀急速に発達したが、心不全加療は立ち遅れている。5年生存率は未だに50%台であり、拡張期心不全(Heart Failure with Preserved Ejection Fraction:HFpEF)に至っては有効性を示した臨床試験は存在しない。このような中、腎臓で作用する糖尿病治療薬であるSGLT(sodium/glucose cotransporter)2阻害薬が、糖尿病合併心不全に対して心臓保護作用を発揮することが近年注目されている。しかしSGLT2は心臓での発現がなく、SGLT2阻害薬の主要な心保護作用は未だ不明である。そこで我々はSGLT2阻害効果の腎心連関に焦点を当てて血中エクソソームに着目した腎心関連によるSGLT2阻害薬の心保護作用機序の解明とDNAメチル化異常に着目したSGLT2阻害薬による腎心関連発現機構の解明について研究を遂行する。

(2) 2015年に発表された2型糖尿病に合併した心不全に対するSGLT2阻害薬の1つであるエンパグリフロジンを用いた臨床大規模試験EMPA-REG OUTCOME試験(*N Engl J Med.* 26;373(22):2117-2128, 2015)は、全世界の循環器医を驚愕させる結果を示した。この試験は、世界42カ国7,000人以上の心血管疾患既往歴を有する2型糖尿病の患者を対象として、心不全の標準治療に加えてエンパグリフロジン投与(10mgまたは25mg、1日1回)またはプラセボ投与を上乘せした、無作為化二重盲検プラセボ対照試験である。結果としてエンパグリフロジンは心血管死、非致死的心筋梗塞、非致死の脳卒中のリスクをプラセボと比較して14%有意に低下させ、また心血管死のリスクも38%低下させた。その後もCVD-REAL試験(*Circulation.* 18;136(3):249-259, 2017)やCANVAS試験(*N Engl J Med.* 17;377(7):644-657, 2017)などエンパグリフロジン以外のSGLT2阻害薬を用いた臨床大規模試験でも、SGLT2阻害薬の2型糖尿病合併心不全に対する良好な効果が示された。従って、SGLT2阻害薬は“Class effect”として心臓保護効果を持つことはほぼ証明されたものと考えられている。しかし、極めて興味深いことにSGLT2阻害薬の2型糖尿病の合併に伴う心不全改善の分子生物学的、薬理学的メカニズムの詳細は不明のままである。利尿効果、糖毒性改善効果、交感神経抑制効果、ケトン体生成効果、内臓脂肪減少などに起因するという報告もあるがどれも決め手に欠ける。もしこれらに起因するならば他の薬剤でも有効性が示されるべきであるがその報告はない。SGLTは細胞内外のナトリウムイオンの濃度差を駆動力として糖を尿細管腔から細胞内へと取り込む能動輸送を行う。SGLT2は特にグルコース輸送能が高く、腎臓の近位尿細管曲部(S1 segment)にのみ発現し、心臓には発現を認めない(*Diabetes.* 54(12):3427-34, 2005)(図2)。従って心不全改善効果は心臓への直接作用ではなく、近位尿細管でSGLT2阻害による糖再吸収抑制の結果生じたことになる。更にこの効果は6ヶ月という極めて短期間から有意差を持って生じており、この様な早い効果出現はSGLT2阻害薬による代謝変化を介した改善では時系列上説明がつかない。従って、近位尿細管でのSGLT2阻害により、なぜそこから離れた心臓において臓器保護効果が現れるのかという点が重要な問いとなる。



2. 研究の目的

本研究では、近位尿細管でのSGLT2阻害により、なぜそこから離れた心臓で臓器保護効果が現れるのかという問いに答えるため、近位尿細管でのSGLT2阻害により腎心連関因子(gene modulation)が活性化し、それが血流を介して心臓での保護作用に関わっているという仮説を提起して研究を行う。SGLT2阻害薬は心不全研究領域におけるhottest spotであることは間違いない。これまでSGLT2阻害薬の心不全改善効果の要因として、利尿効果、糖毒性改善効果、交感神経抑制効果、ケトン体生成効果などの関与の報告が散見されるが、いずれも決め手に欠ける。そこで我々は、近位尿細管細胞の機能に着目し、近位尿細管細胞でのみ発現して心臓では発現していないSGLT2の選択的抑制による心不全改善効果は、SGLT2阻害による遺伝子やmicroRNA(miRNA)発現変動、そしてDNAメチル化障害改善を中心とした尿細管細胞機能の変化の結果に生じる腎心連関によるものだ

という独自の仮説を立てて研究を進める。仮に有意な結論が得られない場合でも、SGLT2 阻害薬の心不全改善効果はそれ以外に起因することが判明する。

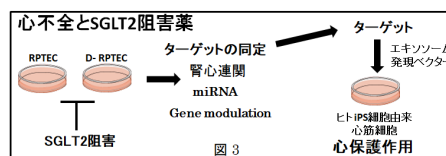
3. 研究の方法

In vitro 実験として2種類のヒト近位尿細管細胞（正常型、2型糖尿病型）を用いる。糖尿病型との比較を確認したいため RPTEC-Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells（腎臓近位尿細管上皮細胞）D-RPTEC-Diseased Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells - Diabetes Type II（2型糖尿病 腎臓近位尿細管上皮細胞）を Lonza Japan より購入する。ただし RPTEC が近位尿細管上皮細胞の性質を維持していることを確認するため、他社のヒト腎臓近位尿細管上皮細胞も購入し比較検討する。全ての実験は細胞増殖一継代 2-3 回までの細胞で行う。細胞が 80% confluence に達した段階で細胞と培養液を回収し、培養液よりエクソソームを単離し、miRNA を含む全 RNA を抽出することを基本操作とする。培養液からのエクソソーム単離は、実際の研究法として最大のボトルネックと考えられる。これまでのショ糖密度勾配液方法では時間を要し（約 20 時間）歩留まりも悪いため、抗体ビーズ法や sec 法（qEV）を用いてこの研究に最適な抽出法を選択する。miRNA については、small-RNA seq を用いエクソソーム miRNA プロファイリングを行う。また、回収した細胞においても miRNA を含む全 RNA を抽出する。この全 RNA から cDNA を合成し、定量的 PCR (qPCR) にて SGLT2 遺伝子発現を定量化する予定である。同時に RNA-seq 法と small-RNA seq を用いて RPTEC と D-RPTEC 間での遺伝子と miRNA についての発現解析を行い、2 種の細胞間で有意な発現量の差異を呈する遺伝子と miRNA を同定する。これらの解析で、RPTEC に対して D-RPTEC ではどのような変化を有し、また環境変化がどのような変化をもたらすかを以下の実験項目で検討する。

- (1) 2 種類のヒト近位尿細管細胞（正常、2 型糖尿病）を用いて RNA を抽出後 cDNA 化し、SGLT2 の発現の差異、両細胞間で有意な発現差異を認める遺伝子を同定する。正常ヒト近位尿細管細胞を複数のメーカーより購入し、Lonza Japan の RPTEC が正常ヒト近位尿細管細胞として問題がないか検証確認する。
- (2) 両細胞の培養液よりエクソソームを単離し、そこから miRNA を含む全 RNA を抽出し、small-RNA seq を用いて miRNA を計測するシステムを構築する。
- (3) (1)、(2) の実験にて両細胞の特性確認後、両細胞の培養液糖濃度滴定並びに SGLT2 阻害薬（大正製薬株式会社から供与）を添加し、糖濃度滴定並びに薬剤添加前後のエクソソームの変化を検討する。
- (4) 近位尿細管細胞の gene modulation とエクソソーム miRNA の検討結果より、gene modulation の結果、有意な変化を示したと考えられる miRNA とそのターゲット遺伝子候補を探索し、これまでの心不全との関連を miRBase を用いて検索する。
- (5) ターゲットとなる miRNA もしくは遺伝子候補が同定され次第、ヒト iPS 細胞由来真菌細胞を用いて、エクソソームを含む培養液やターゲット発現ベクターによる遺伝子導入法を用いて、腎心関連因子による真菌細胞の gene modulation による心保護作用を観察する（図 3）。

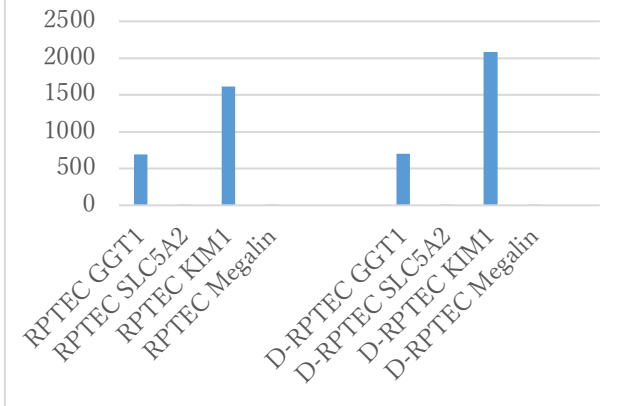
4. 研究成果

まず初めに RPTEC と D-RPTEC を Lonza Japan から購入し、専用の培養液を用いて細胞が 80% confluence に達した段階で PCR を施行した。尿細管上皮のマーカー（CD13、GGT1）、SGLT2 抗体の発現（SLC5A2）、糖尿病型の病型尿細管細胞も含まれるため尿細管障害マーカー（KIM1、Megalin）を測定した。PCR では CD13 や GGT1 は有意差なく上昇していたが、肝心の SGLT2 交代の発現が認められなかった。尿細管障害マーカーである KIM1 は D-RPTEC で有意に上昇を認めた。尿細管上皮細胞のキャラクターとしては RPTEC、D-RPTEC とともに上皮細胞と障害マーカーは予想通りの結果であったが SGLT2 抗体の発現は認められなかった。当初の予定とは異なる結果であり SGLT2 抗体の発現が認められなかったため、digital-PCR を行い定量化するとともに、RNA 量を増量し再度計測することにした。しかし、何度も RNA 量を増量し計測したが尿細管マーカーは差異なく発現を認める一方で、肝心の SGLT2 抗体の発現は一切認められなかった。（図 4）Lonza Japan にも確認し異なる株である D-RPTEC の再購入も検討したが同様の結果になる可能性が高く断念した。そもそも研究の目的である SGLT2 抗体の発現が尿細管細胞から認められず研究はなかなか進むことができず途中で断念する形となった。



まず初めに RPTEC と D-RPTEC を Lonza Japan から購入し、専用の培養液を用いて細胞が 80% confluence に達した段階で PCR を施行した。尿細管上皮のマーカー（CD13、GGT1）、SGLT2 抗体の発現（SLC5A2）、糖尿病型の病型尿細管細胞も含まれるため尿細管障害マーカー（KIM1、Megalin）を測定した。PCR では CD13 や GGT1 は有意差なく上昇していたが、肝心の SGLT2 交代の発現が認められなかった。尿細管障害マーカーである KIM1 は D-RPTEC で有意に上昇を認めた。尿細管上皮細胞のキャラクターとしては RPTEC、D-RPTEC とともに上皮細胞と障害マーカーは予想通りの結果であったが SGLT2 抗体の発現は認められなかった。当初の予定とは異なる結果であり SGLT2 抗体の発現が認められなかったため、digital-PCR を行い定量化するとともに、RNA 量を増量し再度計測することにした。しかし、何度も RNA 量を増量し計測したが尿細管マーカーは差異なく発現を認める一方で、肝心の SGLT2 抗体の発現は一切認められなかった。（図 4）Lonza Japan にも確認し異なる株である D-RPTEC の再購入も検討したが同様の結果になる可能性が高く断念した。そもそも研究の目的である SGLT2 抗体の発現が尿細管細胞から認められず研究はなかなか進むことができず途中で断念する形となった。

図4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水野 洋介 (Mizuno Yosuke) (30406532)	埼玉医科大学・医学部・准教授 (32409)	
研究分担者	山田 良大 (Yamada Yoshihiro) (40792982)	埼玉医科大学・医学部・講師 (32409)	
研究分担者	中埜 信太郎 (Nakano Shintaro) (60307387)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究分担者	千本松 孝明 (Senbonmatsu Takaaki) (70216563)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関