

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590326

研究課題名(和文)心室性不整脈の発生におけるSGLT1の活性化の関与

研究課題名(英文)Relationship between SGLT1 and ventricular arrhythmia

研究代表者

弘瀬 雅教 (HIROSE, MASAMICHI)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：40273081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究から、急性虚血で誘発される心室性頻脈性不整脈の発生にSGLT1は、細胞内カルシウム過負荷とそれに伴う興奮は伝導速度の低下に関与している可能性が示唆された。さらに慢性的心臓圧負荷によって心筋のSGLT1遺伝子およびタンパク発現が増加していることが証明され、SGLT1遺伝子欠損マウスでは、この慢性的心臓圧負荷で誘発された心筋リモデリング(心筋肥大、左心室筋組織の線維化の増大)、心不全(左室短縮率の低下)および心室性頻脈性不整脈の発症抑制される可能性が示唆された。本研究から、新規抗不整脈薬開発および心不全治療薬としてのSGLT1阻害薬の可能性について新しい知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：First, we demonstrated that SGLT1 prevents VT through the inhibition of calcium overload and the improvement of impulse conduction slowing during ischemia. Second, we demonstrated that SGLT1 gene and protein expression was increased chronic pressure overload-induced cardiomyopathy. Moreover, SGLT1 participated in cardiac remodeling such as cardiac hypertrophy, the increased cardiac fibrosis, heart failure observed by the reduction of left ventricular fractional shortening, and ventricular tachyarrhythmia induction in chronic. pressure overload-induced cardiomyopathy. The results suggest that SGLT1 plays important roles in the induction of ischemia-induced VT in acute global ischemia guinea pig model, and cardiac remodeling, and heart failure in pressure overload-induced cardiomyopathy. This study provides new information regarding the possibility of the development of a new anti-arrhythmic and ant-heart failure drugs.

研究分野：循環薬理学

キーワード：SGLT1 心不全 高血圧症 急性虚血

## 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や心不全の進展に伴い発生する心室頻拍は、患者の死亡率を増加させることが知られており、これらの心室頻拍の治療法の確立は非常に重要である。狭心症や心筋梗塞など虚血性心疾患や心不全では、心筋が相対的虚血状態になり、正常では  $\beta$  酸化によって ATP を産生している心筋が、糖を利用して ATP を産生するようになる。これまで、心筋への糖の取り込みはグルコース輸送機構 (GLUT) によって行われていると考えられていたが、最近、ナトリウム—グルコース共輸送機構 1 (sodium-glucose cotransporter, SGLT 1) が心筋に存在している事が報告された。その後の研究から、心筋梗塞モデルマウスや虚血性心筋症や糖尿病性心筋症患者では、心臓での SGLT1 の遺伝子発現が増加している事が報告されている。また、病態モデル動物では、GLUT を介する心筋への糖の取り込みが変化していない一方で、SGLT1 を介する糖の取り込みが増強している事がわかっている。この点で SGLT1 は心臓の病態生理において大変重要である事が考えられる。しかし、この SGLT1 の活性化が虚血再還流および心不全に伴い発生する心室性頻脈性不整脈に対して直接関与しているかどうかについてわかっていない。この SGLT1 の発現増加は、心筋の糖取り込みを増加させて、ATP 産生を助けるという意味では心筋保護的に働くと考えられるが、心筋梗塞時などミトコンドリアの電子伝達系の機能が抑制されている状況では、解糖系で産生された ATP は、加水分解されるとき  $H^+$  を産生し細胞内アシドーシスを惹起する。加えて、SGLT1 の増加と活性化は、細胞内  $Na^+$  を増加させ、 $Na^+-Ca^{2+}$  交換機構の活性化を介した細胞内への  $Ca^{2+}$  の流入が増して、細胞内カルシウム過負荷を引き起こすことが推測され、これらが心室性頻脈性不整脈を発生させる

可能性がある。SGLT1 が、虚血心筋に対して保護的に働くか、または不整脈の発生等病態の悪化に関与しているか、どちらにしても、この共輸送機構の虚血心筋に対する作用を解明する事は、新しい治療法開発の一助となる事が、強く期待される。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的の一つは、急性虚血時の心筋障害および心室性頻脈性不整脈の発生に、SGLT1 の活性化が直接関与しているかについて検討すること (研究 1)。

(2) 慢性的な心臓圧負荷によって心筋の SGLT1 遺伝子発現およびタンパク量が変化するかを、またその機序にアデノシン—リン酸-活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化が関与しているかを検討すること。(研究 2)

(3) 慢性的な心臓圧負荷による心筋リモデリング、心不全および心室性頻脈性不整脈の発生に対する SGLT1 の関与について検討すること (研究 3)。

## 3. 研究の方法

(1) **研究 1**: 雄のモルモット (600-650 g) から心臓を摘出してランゲンドルフ心を作成。左心室内には左心房よりバルーンカテーテルを挿入して左心室圧を測定した。また、左心室前壁の心外膜側に双極電極を装着し、心室性頻脈性不整脈の誘発をおこなった。実験は、SGLT1 の阻害薬であるフロリジン投与群と非投与群において、20-30 分の虚血時に電気生理学的パラメータ (心室筋の活動電位幅と興奮波伝導速度)、心室性頻脈性不整脈の発生および左心室拡張期圧の測定をおこない、急性虚血時の心筋障害および心室性不整脈発生への SGLT1 の関与を検討した。

(2) **研究2**: 10週齢のC57BL/6野生型(WT)マウスを用いて大動脈球部を狭窄させた(TAC)慢性心臓圧負荷心不全マウスを作成し、6週後心臓を摘出してリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(Real time RT-PCR)法による心室筋 SGLT1 および AMPK 遺伝子の発現量を測定。また Western blot 法による心室筋の SGLT1 およびリン酸化 AMPK (p-AMPK) タンパクの発現量を検討した。

(3) **研究3**: 10週齢のC57BL/6WTマウスと SGLT1 の遺伝子欠損(SGLT1-KO)マウスを用い、大動脈球部を狭窄させた(TAC)慢性心臓圧負荷心不全マウスを作成し、2,4,6週後に心臓超音波を施行して心不全の発生について検討した。また食道にペーシングカテーテルを挿入し、左心室壁の高頻度刺激をおこない心室性頻脈性不整脈の誘発実験をおこなった。実験終了後、心臓を摘出して Real time RT-PCR 法による各種遺伝子発現量および組織染色法による心室筋線維化について検討した。さらに、WT および SGLT1-KO マウス新生児培養心筋を用い、phenylephrine 投与による心筋肥大に対する SGLT1 の作用について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 急性虚血による心室筋の電気生理学的パラメータ変化および心室性頻脈性不整脈発生と SGLT1

初めに虚血時の左心室前壁心外膜側活動電位の変化について検討した。フロリジン非投与群・投与群に関わらず、20分の虚血において虚血前と比較して活動電位幅の短縮を認めた。また、活動電位幅の平均値は上記2群間で有意な差はなかった。次に、虚血時の左心室前壁心外膜側の興奮波伝導速度の変化について検討した。結果、虚血前の興奮波伝導速度に2群間で差はなかつ

た。虚血後、フロリジン非投与群では時間の経過とともに著名な興奮波伝導速度の低下を認めしたが、フロリジン投与群では非投与群と比較して興奮波伝導速度の低下が有意に改善した(図1)。さらに、電気的早期刺激による心室性頻脈性不整脈の誘発試験では、フロリジン非投与群で虚血20分に8例中7例で不整脈の発生が見られたのに対し、フロリジン投与群では、8例中1例も不整脈は誘発されなかった。これらの結果から、心室筋の SGLT1 は、虚血時の興奮波伝導速度の低下による心室性頻脈性不整脈発生に関与していることが示唆された。

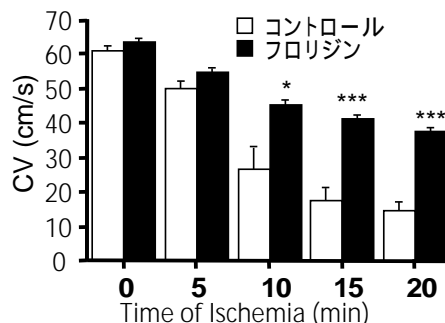


図1. 虚血時の左心室興奮波伝導速度

##### (2) 虚血時の細胞内カルシウム過負荷と SGLT1 の関係

虚血誘発心室性不整脈の発生には、細胞内カルシウム過負荷が関与していることが解ってきている。そこで、虚血時のカルシウム過負荷に対する SGLT1 の関与について、虚血時の左室拡張期圧の上昇から検討した。カルシウム過負荷は、ischemic contracture の原因であることが示唆されており、左室拡張期圧の上昇から ischemic contracture の発生を推測してカルシウム過負荷の度合いを評価した。フロリジン非投与群では、虚血15分後より左室拡張期圧の上昇が認められた。一方、フロリジン投与群では、30分の虚血中、左室拡張期圧の上昇を認めなかった。これらの結果から、虚血時には SGLT1 の活性化を介した細胞内カルシウムの過負荷が引き起こされ、興奮波伝導速度を低下させて心室性頻脈性不整

脈を発生させる可能性が示唆された。

### (3) 慢性的心臓圧負荷と SGLT1 発現量

TAC 施行 6 週後の WT マウスから抽出した心臓の Real time RT-PCR では、TAC 施行マウス心筋では TAC 非施行マウス心筋と比較して SGLT1 の遺伝子発現量が有意に増加していた。また、p-AMPK と SGLT1 タンパクの発現量の定量において、TAC 施行マウス心筋では TAC 非施行マウス心筋と比較して p-AMPK および SGLT1 の増加が認められた。加えて AMPK の活性化因子を投与したマウスでは、非投与マウスと比較して SGLT1 遺伝子の発現量が増加していた。以上の結果から、TAC 施行による慢性的心臓圧負荷による SGLT1 発現量増加は、AMPK の活性化を介して引き起こされていることが示唆された。

### (4) 安静的心臓圧負荷による心筋リモデリングおよび心室性頻脈性不整脈と SGLT1

WTマウスとSGLT1-KOマウスにTACを施行し、TAC施行6週後に心臓超音波をおこなったところ、WTマウスと比較してSGLT1-KOマウスで左室短縮率の低下が抑制された(図2, 上段)。TAC施行6週後に施行した体表心電図において、心室性期外収縮発生は、WTマウスとSGLT1-KOマウスで差がなかった。次に食道にペーシングカテーテルを挿入し、左心室後壁の心外膜側の高頻度刺激をおこなって心室性頻脈性不整脈の誘発実験を行なったところ、TAC施行SGLT1-KOマウスでTAC施行WTマウスと比較して心室性頻脈性不整脈の発生頻度が低い傾向が認められた。抽出心室筋標本を用いたReal time RT-PCRでは、TAC施行WTマウスではTAC非施行WTマウスと比較してSGLT1の発現量が増加していた。一方、SGLT1-KOマウスの心臓では、TAC施行・非施行に関係なくSGLT1の遺伝子発現は認め

られなかった。これらの結果は、慢性的心臓圧負荷によって誘発させる心不全には、SGLT1の発現が重要であり、また心不全誘発心室性不整脈へのSGLT1の関与が疑われるものであった。さらに、TAC施行6週後に測定した心臓/体重比は、TAC施行WTマウスと比較してTAC施行SGLT1-KOマウスで有意に抑制されていた(図2, 下段)。また、心室筋細胞径は、WTマウスのTAC施行群と比較してSGLT1-KOマウスのTAC施行群で小さい傾向があった。心室筋組織の線維化とCTGFの遺伝子発現は、TAC施行WTマウスと比較してTAC施行SGLT1-KOマウスで有意に抑制されていた。この結果は、慢性的心臓圧負荷による心筋リモデリングの発生に、SGLT1が関与していることを示している。

最後に、抽出心室筋標本を用いておこなったGLUTの遺伝子発現量の測定では、TAC非施行WTマウスと比較してTAC施行WTマウスでは、GLUT1およびGLUT8の遺伝子発現が増強している一方で、SGLT1-KOマウスでは、TAC施行・非施行に関わらず、TAC非施行WTマウスと比較してGLUT1とGLUT4の遺伝子発現の増加が認められた。このことは、SGLT1の発現が抑制されている状況では、インスリン感受性GLUTの発現が増加していることが示唆される。

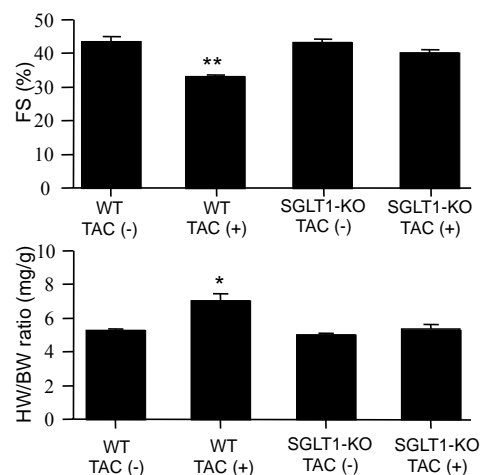


図2. 左室短縮率(FS)と心臓/体重比

## (5) 新生児培養心筋における心筋細胞の肥大とSGLT1

WTおよびSGLT1-KOマウスから得られた新生児培養心筋を用いたphenylephrine投与実験では、WTマウス心筋細胞と比較してSGLT1-KOマウス心筋細胞で心筋肥大が抑制されていた。

## (6)まとめ

今回の研究から、急性虚血で誘発される心室性頻脈性不整脈の発生にSGLT1が関与している可能性が示唆された。さらに慢性的心臓圧負荷によって誘発させる心筋リモデリング、心不全および心室性頻脈性不整脈の発症にSGLT1の発現が関与している可能性が示唆された。本研究から、新規抗不整脈薬開発および心不全治療薬としてのSGLT1阻害薬の可能性について新しい知見が得られた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Hirose M, Shibazaki T, Nakada T, Kashihara T, Yano S, Okamoto T, Isaji M, Matsushita N, Taira E, Yamada M Phlorizin prevents electrically-induced ventricular tachyarrhythmia during ischemia in Langendorff-perfused guinea-pig hearts. Biol Pharm Bull. 査読あり 2014; 37: 1168-1176.

[学会発表](計 1件)

Hirose M, Matsushita N, Matsuda S, Metoki R, Sanbe A, Morino Y, Koepsell H, Taira E. SGLT1 participates in cardiac remodeling in pressure-overload-induced cardiacmyopathy.

第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 平成27年3月24日

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
○出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
弘瀬 雅教 (HIROSE MASAMICHI)  
岩手医科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 40273081

(2)研究分担者  
なし( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
三部 篤 (SANBE ATSUSHI)

研究者番号: 30425706