

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08101

研究課題名(和文) 食塩感受性高血圧モデルにおけるSGLT2阻害の心不全進展抑制効果の検討

研究課題名(英文) The effect of sodium-glucose co-transporter 2 inhibition on heart failure prevention in Dahl salt-sensitive rats.

研究代表者

土肥 薫 (DOHI, KAORU)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50422837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Dahl食塩感受性高血圧ラットを低食塩群(n=10)、高食塩群(n=10)、高食塩+SGLT2阻害薬(ipragliflozin)群(n=10)、高食塩+ARB(losartan)群(n=10)、高食塩+SGLT2阻害薬+ARB(n=10)群に振り分けた。併用投与群でのみ食塩感受性が改善した。併用投与群では単独治療に比べ腎硬化スコアの有意な改善を示し、心筋肥大ならびに線維化も改善所見が得られた。AT1R、NHE3およびNKCC2の蛋白発現がSGLT2阻害薬単独投与では低下しない一方で、併用療法では両者とも有意に抑制され、AT1R発現抑制作用に関してはARB単独投与よりもさらに優れていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の大規模臨床研究では糖尿病患者のみならず非糖尿病患者におけるSGLT2阻害薬の心不全抑制効果・腎保護効果が証明されているが、これらの研究ではRAA系阻害薬併用率は80%を超えており、併用療法での心・腎組織への作用機序解明が急がれる。本研究ではDahl食塩感受性高血圧ラットを用いてSGLT2阻害薬とARBの併用が食塩感受性亢進状態に抑制的に作用することを証明するとともに、心・腎障害抑制の分子機序の一端解明した。本研究の成果は今後の心不全診療、腎不全診療の発展に寄与するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Dahl salt-sensitive (DSS) hypertensive rats were treated orally for 8-weeks with normal salt diet (0.3% NaCl), high salt diet (8% NaCl), high salt diet with SGLT2 inhibitor (ipragliflozin 0.04%), high salt diet with ARB (losartan 0.05%), or high salt diet with combination treatment. Only the combination treatment lower blood pressure and improved salt-sensitivity. The combination treatment significantly ameliorated glomerulosclerosis, and reduced cardiomyocyte hypertrophy and perivascular fibrosis. Angiotensin II type 1 receptor (AT1R) protein expression level in the kidney was remarkably suppressed in the combination treatment group compared to the other high salt diet groups. The protein expression level of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 were significantly decreased with losartan alone and combination with ipragliflozin.

研究分野：心不全

キーワード：循環器

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高血圧症とそれに続発する左室拡張不全、心不全の病態には食塩感受性亢進が強く関与する。食塩感受性亢進の機序として、糸球体濾過機能低下と尿細管におけるナトリウム再吸収亢進が重要である。特に糖尿病患者では、糸球体から過剰にグルコースが濾過されるため、近位尿細管の sodium-glucose cotransporter (SGLT)でのグルコース・Na⁺再吸収が亢進し、結果として血管内の Na⁺量増加と緻密斑への NaCl 到達量減少が同時に起こり、常に輸入細動脈が拡張し輸出細動脈が収縮した状態となるため、糸球体血圧の自己調節能が破綻する。このような病態に陥ると、糸球体血圧は全身血圧に依存するようになり、食塩感受性亢進状態となる。

代表者らは、非糖尿病でも恒常的に SGLT を介してグルコースと Na⁺が再吸収されていることに着目し、SGLT2 阻害薬による食塩感受性改善効果と心腎保護効果を検討することとした。また、SGLT2 阻害薬を用いた心血管イベント抑制効果をみた大規模臨床試験において利尿剤やアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬/アンジオテン受容体拮抗薬(ARB)が広く用いられていることから、薬理相互作用機序の観点からサイアザイド系利尿剤や ARB、また SGLT2 阻害薬との併用について比較検討を行うこととした。

2. 研究の目的

代表者らは、SGLT2 阻害の食塩感受性改善作用に着目し、非糖尿病患者に対しても SGLT2 阻害薬が食塩感受性改善効果を発揮すると推測した。SGLT2 阻害作用は、近位尿細管におけるナトリウム再吸収を抑制するため、尿細管-糸球体フィードバック機構や RAA 系および交感神経系の正常化作用を介して、降圧および心肥大抑制をもたらすのみならず、心肥大期からの心不全への発症・進展をも抑制すると予測し、サイアザイド系利尿薬や ARB 併用下および非併用下の Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用いて世界に先駆けて検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) SGLT2 阻害薬の用量依存的 Na 利尿効果の検証 : Dahl 食塩感受性高血圧ラットを離乳期から生後 5 週齢まで 0.3%の低食塩摂取をさせ、6 週齢から低食塩摂取継続群(n=3)、8%の高食塩摂取群(n=3)、高食塩摂取 + SGLT2 阻害薬低用量 (ipragliflozin 0.008%w/w) 群(n=3)、高食塩摂取 + SGLT2 阻害薬高用量 (ipragliflozin 0.04%w/w) 群(n=3)に割り付け、薬剤は 6 週齢から 9 週齢まで投与する。ラットは、6 週齢から 1 週間毎に血圧と体重を測定し、代謝ケージを用いて尿収集を行う。最終週では全群で血液検査を行う。

(2) SGLT2 阻害薬の降圧および腎障害・心肥大抑制効果の検証 : Dahl 食塩感受性高血圧ラットを離乳期から生後 5 週齢まで 0.3%の低食塩摂取をさせ、6 週齢から低食塩摂取継続群(n=5)、8%の高食塩摂取群(n=5)、高食塩摂取 + SGLT2 阻害薬 (ipragliflozin 0.04%w/w) 群(n=5)、高食塩摂取 + サイアザイド系利尿薬 (hydrochlorothiazide 0.15%w/w) 群(n=5)に割り付け、薬剤は 6 週齢から 14 週齢までの 8 週間投与する。ラットは、6 週齢から 2 週間毎に血圧と体重を測定し、心エコー図検査で心形態・機能を経時的に観察すると同時に、代謝ケージを用いて尿収集を行う。最終週である第 14 週齢に全群で血液検査、神経体液性因子の検討を行う。なお、評価項目は下記の通りである。血液検査項目 : 一般生化学、血糖値、浸透圧、レニン活性、アンジオテンシン II、アルドステロン、ANP、BNP、カテコラミン 3 分画

尿検査項目：アルブミン、電解質、クロール、尿素窒素、クレアチニン、尿糖、浸透圧

心筋組織：左室心筋重量測定後、心筋をホルマリン固定する。更にパラフィン包埋後に3 μ mの切片を作成し、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を行い心筋細胞肥大や線維化の程度を光学顕微鏡（倍率40倍）で測定する。腎組織は左腎重量測定後にホルマリン固定する。更にパラフィン包埋後に3 μ mの切片を作成し、過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色、マッソントリクローム染色を行う。

（3）SGLT2阻害薬のARB投与下における腎障害・心肥大抑制効果の検証：Dahl食塩感受性高血圧ラットを、6週齢から低食塩摂取継続群（n=10）、8%の高食塩摂取群（n=10）、高食塩摂取+SGLT2阻害薬（ipragliflozin 0.04%w/w）群（n=10）、高食塩摂取+ARB（losartan 0.05%w/w）群（n=10）、高食塩摂取+SGLT2阻害薬+ARB（n=10）群に割り付ける。薬剤は6週齢から14週齢までの8週間投与する。ラットは、6週齢から2週間毎に血圧と体重を測定し、心エコー図検査で心形態・機能を経時的に観察すると同時に、代謝ケージを用いて尿収集を行う。最終週である第14週齢に全群で血液検査、神経体液性因子、心行動態・心筋組織、腎組織の検討を行い、（2）と同様に各種パラメータの評価を行う。さらに、腎組織におけるアンジオテンシンIIタイプ1受容体（AT₁R）、タイプ2受容体（AT₂R）、ミネラルコルチコイド受容体（MR）、SGLT2、Na⁺/H⁺交換輸送体（NHE）3、Na-K-Cl共輸送体（NKCC）2、上皮性ナトリウムチャネル（ENaC）の蛋白発現をウエスタンブロット法で評価し、蛍光免疫染色法によって局在性の検討を行う。

4. 研究成果

（1）尿量、飲水量は高塩食群で低塩食群にくらべて有意に増加したが、高塩食+SGLT2阻害薬低用量群で高塩食群より増加し、さらに高用量群でさらに増加した。尿糖排泄量にSGLT2阻害薬の低用量群と高用量群との間に有意な差は認められなかったが、尿中ナトリウム排泄量は高塩食+SGLT2阻害薬高用量群で有意に低塩食群、高塩食群、高塩食群+SGLT2阻害薬低用量群と比較して多かった（ 37.3 ± 1.0 vs 1.8 ± 0.3 ; 26.3 ± 5.4 ; 25.3 ± 4.9 mmol/day, $p < 0.05$ ）。よって、3週間のSGLT2阻害薬の投与では、用量依存的にNa⁺排泄量が増加することがわかった。

（2）尿量、飲水量は高塩食群で低塩食群にくらべて投与後2週～8週にかけて有意に増加し、サイアザイド系利尿剤の投与とは有意な差は認めなかった。しかしながら、SGLT2阻害薬投与群では、有意に高塩食群とサイアザイド系利尿剤にくらべて増加していた。収縮期血圧については、4週から高塩食群で低塩食群にくらべて有意に上昇し、8週時点でも顕著に差を認めた（ 237.7 ± 23.2 vs 124.3 ± 2.2 mmHg, $p < 0.001$ ）。しかしながら、高塩食+SGLT2阻害薬群において血圧低下効果は認めず、高塩食群との差を認めなかった（ 234.8 ± 35.2 mmHg, $p = 0.91$ ）。一方で、高塩食群+サイアザイド系利尿剤については、有意な血圧低下効果を示し、高塩食群およびSGLT2阻害薬群と差を有した（ 155.0 ± 21.7 , $p < 0.05$ vs 高塩食群, 高塩食+SGLT2阻害薬群）。尿中ナトリウム排泄量においては、高塩食+SGLT2阻害薬群が低塩食群にくらべて有意に増加しており（ 30.3 ± 5.1 vs 1.7 ± 0.2 mmol/day, $p < 0.001$ ）、高塩食群、高塩食群+サイアザイド系利尿剤にくらべて増加傾向であったが有意な差は認めなかった（vs 18.3 ± 8.3 ; 24.1 ± 1.5 mmol/day, $p = 0.15$ ）。これは、SGLT2阻害薬によるNa⁺排泄量増加は体血圧上昇に伴うもので、食塩感受性改善効果に起因していないことが示唆された。クレアチニンクリアランスは高塩食+サイアザイド系利尿剤で高塩食群、高塩食+SGLT2阻害薬と比べ有意に改善していた（ 4.0 ± 0.4 vs 1.3 ± 0.7 ; 2.0 ± 0.9 mL/min, $p < 0.05$ ）。心重量（両心重量を個体脛骨長で補正）については、高塩食群で有意に低塩食群（ 0.23 ± 0.01 g/cm）にくらべて増加していたが、高塩食群+サイアザイド系利尿剤群で有意に高塩食群および高塩食+SGLT2阻害薬群で減少していた（ 0.25 ± 0.03 vs $0.27 \pm$

0.01; $0.27 \pm 0.01 \text{g/cm}$, $p < 0.05$), つまり高食塩 + サイアザイド系利尿剤群では、心肥大抑制効果を示したことになる。この結果から、血圧降下には食塩感受性の改善を伴ったナトリウム排泄量増加が重要であり、腎障害や心肥大抑制効果につながるものと考えられた。しかしながら、SGLT2 阻害薬単独投与ではこのような作用には乏しく、この原因を検索し臨床エビデンスとの乖離に対する説明がさらに必要であると考え、研究を進めた。

(3) 尿量、飲水量ともに高食塩群で低食塩群に比べ増加したが、高食塩 + SGLT2 阻害薬および高食塩 + SGLT2 阻害薬 + ARB 投与群では更に増加した。血圧は、低食塩群にくらべて高食塩群、高食塩 + SGLT2 阻害薬投与群、高食塩 + ARB 投与群で有意に上昇したが、高食塩 + SGLT2 阻害薬 + ARB 投与群では、血圧上昇は抑制された(図1)。さらに、尿中ナトリウム排泄量を比較すると、高食塩 + SGLT2 阻害薬 + ARB 投与群で、高食塩群、高食塩 + SGLT2 阻害薬群、高食塩 + ARB 群にくらべて有意に増加していた(41.7 ± 4.2 vs 21.3 ± 9.1 ; 28.3 ± 9.1 ; $28.0 \pm 6.6 \text{ mmol/day}$, $p < 0.05$)。血圧降下にもかかわらず尿中ナトリウム排泄量の増加していることから、SGLT2 阻害薬 + ARB 併用投与群において、食感受性改善効果が得られていることを示す重要な結果であった(図2)。

さらに、クレアチンクリアランスは、高食塩群、高食塩 + SGLT2 阻害薬、高食塩 + ARB 群では、低食塩群($2.6 \pm 0.8 \text{ mL/min}$)に比べて悪化していたが、高食塩 + SGLT2 阻害薬 + ARB 投与群においては有意に改善していた(3.3 ± 0.9 vs 1.1 ± 0.5 ; 1.7 ± 0.6 ; $1.9 \pm 0.8 \text{ mL/min}$, $p < 0.05$)。組織学的評価において、高食塩 + ARB 投与群で腎糸球体硬化スコアの有意な改善を示したが、高食塩 + SGLT2 阻害薬 + ARB 投与群においては更なる改善効果をしめした(図3A)。一方、心重量(両心重量を個体脛骨長で補正)については、高食塩投与によって低食塩群($0.23 \pm 0.02 \text{g/cm}$)と比較して増加が認められたが、高食塩 + SGLT2 阻害薬 + ARB 投与群では、それぞれの群と比較して心重量が改善していた(0.24 ± 0.01 vs 0.29 ± 0.02 ; 0.28 ± 0.02 ; $0.29 \pm 0.02 \text{g/cm}$, $p < 0.05$)。さらに、心筋サイズの抑制(図3B)、心筋間質ならびに血管周囲の線維化(図3C)いずれにおいても高食塩 + SGLT2 阻害薬 + ARB 投与群で、無治療群または単独薬剤投与群に比べて改善所見を得た。

続いて、分子機序の検討では、ウエスタンブロット法における腎の AT_1R , NHE3 および NKCC2 の蛋白発現が SGLT2 阻害薬単独投与では低下しない一方で、併用療法では両者とも有意に抑制されており、 AT_1R 発現抑制作用に関しては ARB 単独投与よりもさらに優れていた(図4)。NHE3 は近位尿細管管腔側における Na^+ 依存性酸塩基輸送機構の中心的役割を果たし AT_1R 刺激により

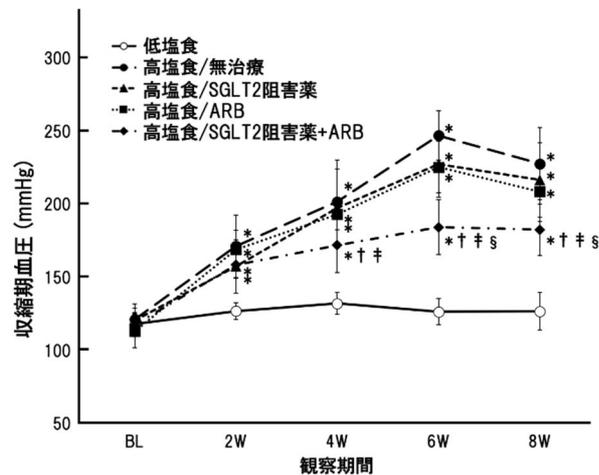


図1. 収縮期血圧の推移。One-way ANOVA, post-hoc test (Holm法)。* $p < 0.05$ vs 低塩食, † $p < 0.05$ vs 高塩食/無治療, ‡ $p < 0.05$ vs 高塩食/SGLT2阻害薬, § $p < 0.05$ vs 高塩食/ARB. BL: ベースライン. 各群 $n=9-10$.

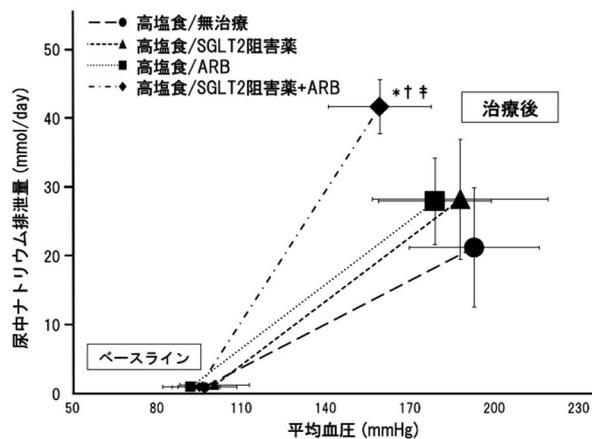
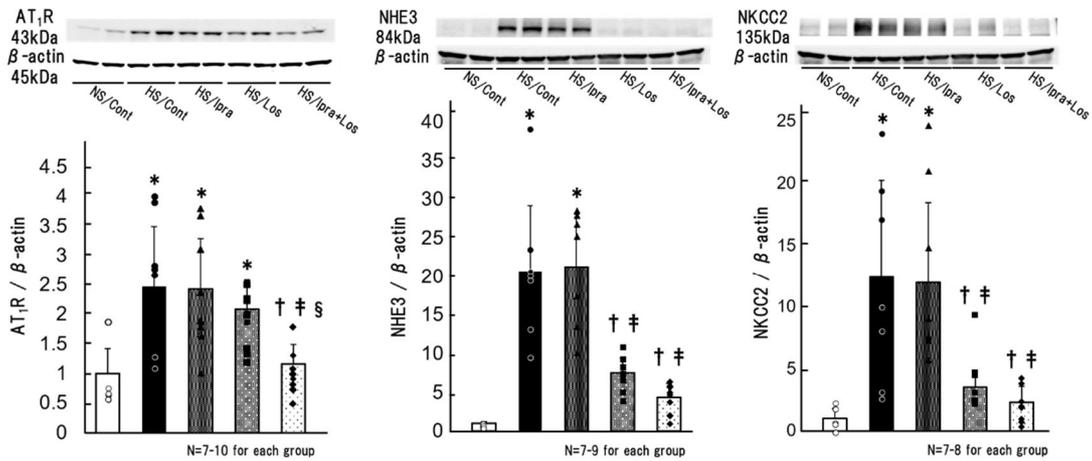
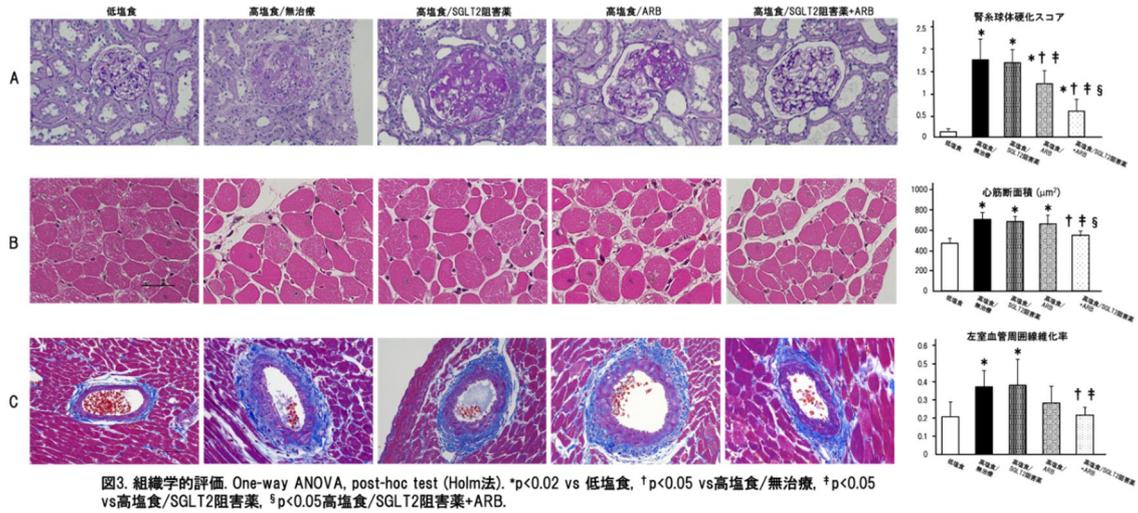


図2. 圧利尿曲線。一般化線形モデル。*interaction $p=0.02$ vs 高塩食/無治療, † $p=0.01$ vs 高塩食/SGLT2阻害薬, ‡ $p=0.08$ vs 高塩食/ARB. 各群 $n=9-10$.

活性化されNa⁺再吸収を亢進させることから、AT₁R-NHE3 経路の制御機構が、SGLT2 阻害薬とARB併用による食塩感受性改善の中心機序であることが示唆された。



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	伊藤 正明 (Ito Masaaki) (00223181)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	岡本 隆二 (Okamoto Ryuji) (60378346)	三重大学・医学部附属病院・教授 (14101)	
研究分担者	片山 鑑 (Katayama Kan) (90742247)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	

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