

筑波大学

博士（医学）学位論文

Sodium Glucose Co-Transporter 2  
Inhibitors Improve Renal Congestion and  
Left Ventricular Fibrosis in Rats with  
Hypertensive Heart Failure

(高血圧性心不全モデルラットにおける, SGLT2  
阻害薬による腎うっ血と左室線維化の改善)

2 0 2 2

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

中務 智文

原典論文

この学位論文は, Sodium Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors Improve Renal Congestion and Left Ventricular Fibrosis in Rats with Hypertensive Heart Failure, Tomofumi Nakatsukasa, Tomoko Ishizu, Masumi Ouchi, Nobuyuki Murakoshi, Kimi Sato, Masayoshi Yamamoto, Kunio Kawanishi, Yoshihiro Seo, Masaki Ieda. Circulation Journal (I.F 3.350), 2022, DOI 10.1253/circj.CJ-22-0105  
を原典とする.

## 目次

略語.....	1
第1章 背景.....	3
1-1 心不全.....	3
1-2 心腎連関.....	3
1-3 腎静脈灌流異常.....	4
1-4 腎うっ血に対する治療.....	5
第2章 目的.....	8
第3章 実験方法.....	9
3-1 使用動物.....	9
3-2 高血圧性心不全モデルラットの経時的観察.....	9
3-3 血圧測定.....	10
3-4 心エコー図法.....	11
3-5 採尿方法.....	12
3-6 臓器重量測定.....	13
3-7 腎間質圧ならびに微小循環血流評価.....	13
3-7-1 中心静脈圧測定および腎髄質内圧測定.....	13
3-7-2 腎造影超音波法による腎微小循環血流評価.....	14
3-8 病理組織検査.....	15
3-8-1 左室心筋線維化率の解析.....	16
3-8-2 左室心筋断面積, 左室心筋細胞幅の解析.....	16
3-8-3 尿細管円柱の解析.....	17
3-8-4 糸球体評価.....	17
3-9 mRNA 発現.....	18
3-10 統計解析.....	18

第4章 結果	20
4-1 高血圧性心不全モデルラットの経時的観察	20
4-1-2 血行動態評価	20
4-2 血液及び尿検査	20
4-3 心エコー図検査	21
4-4 中心静脈圧と腎間質循環評価	22
4-5 病理	23
4-5-1 腎臓病理	23
4-5-2 心臓病理	24
4-6 左室における RNA 発現	24
第5章 考察	26
5-1 利尿薬による腎うっ血改善	26
5-2 腎循環改善と左室リモデリング	29
5-3 本研究の限界	31
第6章 結論	33
第7章 図表	34
引用論文	53
要約図	65
謝辞	66

## 略語

CVP: ventral venous pressure

DSS: Dahl salt sensitive

eGFR: estimated glomerular filtration rate

FSGS: focal segmental glomerulosclerosis

GS: global sclerosis

HE: hematoxylin eosin

HS: high salt diet

IL-6: interleukin-6

IVSTd: diastolic intraventricular septum thickness

L-FABP: Liver-type fatty acid-binding protein

Loop-d: loop diuretic

LS: low salt diet

LVDd: left ventricular diastolic diameter

LVDs: left ventricular systolic diameter

LVEF: left ventricular ejection fraction

LV-GLS: left ventricular global longitudinal strain

LV mass: left ventricular mass

MT: Masson's trichrome

PAS: Periodic Acid-Schiff

PWTd: diastolic posterior wall thickness

RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosterone system

RMP: renal medullary pressure:

ROI: region of interest

SGLT: sodium glucose co-transporter

SGLT2-i: sodium glucose co-transporter 2 inhibitor

TNF- $\alpha$  : tumor necrotic factor alpha

TTP: time to peak intensity

## 第1章 背景

### 1-1 心不全

心不全は心臓のポンプ機能が低下し、全身臓器の血液需要を十分に満たすことができなくなり、心臓の前方にある他臓器への血液供給が不十分になる前方障害や、静脈圧上昇によって臓器への血液うっ滞が生じる後方障害を引き起こす。それによって、呼吸困難や全身浮腫をはじめとした症状の増悪と寛解を繰り返し、徐々に重症化していく過程で多臓器不全が生じ、最終的に死に至る疾患である。心不全の患者数は年々増加傾向にあり今後も増加していくことが予想されている<sup>1)</sup>。心不全は進行性かつ根治が期待できない疾患であり、心不全患者の院内死亡率は 8%<sup>2)</sup>、1 年死亡率 7.3%<sup>3)</sup>、1 年以内の再入院率は 35%<sup>4)</sup>と予後は悪く、心不全死だけではなく心不全再入院を含めた予後の改善が大きな医療課題である。

### 1-2 心腎連関

心不全の予後を調査したメタアナライシスにおいて、腎機能障害が全死亡に関連する強力な予後規定因子であり<sup>5)</sup>、さらに推算糸球体濾過量 (estimated glomerular filtration rate: eGFR) が低いほど心不全の生命予後が悪いことが示された<sup>6-8)</sup>。さらに、経時的な eGFR 低下もまた、全死亡、心血管死亡や心不全入院を増加させることから<sup>9,10)</sup>、腎保護的な観点が心不全予後改善に寄与するこ



とが考えられている。一方で、心不全によって生じる低心拍出、交感神経活性や組織低酸素などが腎機能障害を進行させる。腎臓には心拍出量の 20~25%の血液が供給され、臓器重量あたりの血流は他の主要臓器の数倍にも及び、また心臓と腎臓は交感神経、抗利尿ホルモンなどといった複数の経路で心臓と腎臓は互いに影響し合っていることから、心腎連関として注目されるようになった<sup>11,12)</sup>。

心機能低下症例では、心不全に起因する腎機能障害の進行は、従来は心拍出量の低下による腎灌流血液量低下が主要因であると考えられていたが、それ以上に中心静脈圧 (central venous pressure: CVP)の持続的な上昇であることが、2009年に報告された<sup>13,14)</sup>。すわなち、心不全による前方障害に加えて、後方障害が心腎連関において重要視されるようになった。

### 1-3 腎静脈灌流異常

循環生理学的には、心不全による後方障害は CVP 上昇をもって評価され、臓器うっ血は臓器静脈圧上昇で評価される。ラットモデルを用いた研究において、CVP 上昇に伴い、腎髄質間質圧(renal medullary pressure: RMP)が上昇し、さらに腎間質微小循環が増悪することが報告された<sup>15,16)</sup>。つまり、心不全では、CVP 上昇による腎静脈圧上昇の結果、腎間質圧が上昇し、腎髄質灌流の低下を招き、尿量が減少し、尿細管におけるナトリウム再吸収が増加する<sup>17-20)</sup>。ナトリウム再吸収増加によりナトリウム排泄量が減少することから、体液貯留を招き、心臓に

は容量負荷となり、結果として心不全の後方障害の病態のさらなる悪化をきたす<sup>21)</sup>。さらに組織学的には、腎間質圧上昇の程度と腎間質の線維化に正の相関があることが示唆された<sup>16)</sup>。特に、心不全では交感神経活性が上昇しており、このような状態では静脈コンプライアンスが低下することで静脈圧が上昇しやすいことが指摘されている<sup>22)</sup>。このように、うっ血性心不全では中心静脈圧が上昇する条件が揃っている。以上より、うっ血性心不全における腎静脈圧上昇は心不全の治療標的であると考えられたが、これまで臨床的な腎うっ血評価方法がなかった。2016年にIidaらは、腎循環の後方障害の評価法として、腎葉間静脈血流の超音波パルス波ドプラ法が、CVP上昇に伴って連続性、二相性、单相性パターンと波形が変化することを報告した<sup>23)</sup>。さらに、連続性、二相性、单相性となるに従って心不全入院が増加することを報告した。その後、腎葉間静脈パターンを連続性に保つことが、再入院を減らすことを報告し<sup>24)</sup>、CVPを十分に下げた上で、腎静脈うっ滞を解除することがうっ血性心不全治療において極めて重要であることがわかった。

#### 1-4 腎うっ血に対する治療

腎うっ血改善に対しては、中心静脈圧を下げることが必須条件であり、それには利尿薬が治療の中心的役割を担っている。その中でも、ループ利尿薬が多く使

用されており、この薬剤はヘンレループの太い上行脚において Na-K-2Cl 共輸送体を阻害することで血管内を中心とした強力な利尿効果を発揮する。しかし、ループ利尿薬であるフロセミドは組織間質の十分な除水効果には乏しく<sup>24-26)</sup>、間質浮腫改善を急性期に達成しようとする、血管内脱水から結果としてクレアチニン値が上昇する急性腎障害に陥ることがある。うっ血性心不全治療中にクレアチニン値が上昇したとしても、うっ血を十分に除去できた場合にはうっ血性心不全の予後改善につながるが<sup>27)</sup>、過度な血管内脱水により不可逆的な腎機能障害を招くことがあり、このことも心不全予後悪化に繋がるというジレンマがある。

ナトリウムグルコース共輸送体である sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2)阻害薬のもつ利尿作用は、ループ利尿薬とは異なり、主に間質水分を血液量よりも多く減少させることが示唆されている<sup>26,28)</sup>。SGLT2 阻害薬は、近位尿細管においてナトリウムとグルコース再吸収を阻害することで血糖値を下げることから、糖尿病治療薬として使用されてきた。さらに、2型糖尿病合併心不全患者の予後及び腎予後にも関与していることが多く報告されているが、非糖尿病性患者においても同様に予後が改善することが報告され、注目されている<sup>29-38)</sup>。このような、SGLT2 阻害薬によってもたらされる腎保護作用は、腎間質浮腫を軽減させ、その結果として腎微小循環が改善することが一つの要因となっ

ているのではないかと考えた。さらに、これらの機序による腎うっ血の改善が心保護を介して心不全予後改善につながっているのではないかと考え、本研究を行うに至った。

## 第2章 目的

本研究は、うっ血性心不全により生じた中心静脈圧上昇に起因する腎間質圧上昇、腎微小循環障害が SGLT2 阻害薬によって改善するか、また、これらによって定義された腎循環への治療介入がどのような心臓保護作用をもたらすかを調査した。

## 第3章 実験方法

### 3-1 使用動物

Dahl salt sensitive (DSS) ラットは1962年にLouis K. DahlらによってSprague-Dawley系ラットコロニーから食塩感受性高血圧を呈したラットを掛け合わせることで確立した食塩感受性高血圧モデルラットである。食塩に対する高血圧上昇の程度は、塩分量と高食塩食開始時期に依存することが知られており、摂取する塩分量が多いほど、食塩負荷開始が早いほどより高血圧となる。8%食塩食投与を6週齢から開始すると、収縮期血圧200mmHg以上となると共に左室肥大、心筋肥大、線維化が顕著になることで左室拡張不全心となり、最終的には心不全死に至る<sup>39)</sup>。このような特性から、DSSラットは高血圧から心不全に至る一連の病態が観察可能であるため、高血圧性心不全モデルラットとして様々な研究に用いられてきた<sup>40-42)</sup>。臨床的にも高血圧は心不全の頻度の高い原因である。そこで、本研究では、DSSラットをうっ血性心不全モデルとして使用した。

### 3-2 高血圧性心不全モデルラットの経時的観察

実験には食塩感受性高血圧性心不全モデルラット Dahl-Iwai S (DIS/EiS, 日本エルエルシー株式会社, 浜松, 静岡, 日本)を使用し、筑波大学生命科学動物資

源センター管理下で飼育を行った。DSS ラット 32 匹を 4 週齢で搬入した。全てのラットは、6 週齢まで 0.3%低食塩食を投与した。6 週齢の時点で、8 匹はコントロール群として引き続き 0.3%低食塩食を継続し(LS 群)、残りの 24 匹は高血圧性心不全モデルのために、8.0%高食塩食に飼料を変更した。11 週齢から 8 匹は無治療群として 8.0%高食塩食を継続(HS 群)、別の 8 匹は SGLT2 阻害薬 (カナグリフロジン 10mg/kg/day) 含有 8.0%高食塩食(SGLT2-i 群)、残りの 8 匹はループ利尿薬 (フロセミド 20mg/kg/day) 含有 8.0%高食塩食 (Loop-d 群)に切り替えた (図 1)。

体重は毎週測定を行い、10 週齢、15 週齢、18 週齢に血圧測定を行なった。

全てのラットは筑波大学動物資源センターの実験プロトコールに則り、同施設管理下で飼育を行った (承認番号; 20-146)。

### 3-3 血圧測定

ラット用非観血血圧計(CODA standard system, ハクバテックライフサイエンスソリューション, 東京, 日本)を用いて、尾動脈圧測定を行った。専用の固定器内にラットを収容し、尾根部にカフセンサーを装着し、暗幕で被覆し安静とした状態で、テイルカフ法で収縮期血圧及び拡張期血圧を測定した。

### 3-4 心エコー図法

全ての DSS ラットは 10 週齢, 15 週齢, 18 週齢に心エコー図検査により評価した。小動物用超音波診断装置 Vevo2100 (VisualSonic 株式会社, Tronto, Ontario, Canada) とラット心臓用 13-25MHz リニア型高周波深触子 MS-250 (VisualSonic 株式会社)を用い, フレームレートが 120 frames/sec の条件下で記録した。記録中の麻酔方法はイソフルランを用いて全身麻酔を行った。

麻酔導入用ボックスにラットを入れ, 4~5%イソフルランで麻酔を導入し, 濃度を 2%前後とした後に, プラットフォームに移動させ, マスクから酸素及びイソフルランを投与した。37°Cに保温されたプラットフォームの上で, ラットの心拍数を 300-350/分になるように適宜容量を調整した。四肢に心電図用電極を固定し, 胸腹部の除毛を行った後に記録を行った。

傍胸骨アプローチで左室拡張期径 (left ventricular diastolic diameter; LVDd), 左室収縮期径 (left ventricular systolic diameter; LVDs), 拡張期左室中隔厚 (diastolic interventricular septum thickness; IVSTd), 左室後壁厚 (diastolic posterior wall thickness; PWTd), 左室長軸方向ストレイン (left ventricular global longitudinal strain; LV-GLS) の測定を行った。左室心筋重量 (left ventricular mass; LV mass)は  $1.053 \times [(LVDd + IVSTd + PWTd)^3 - LVDd^3]$  から算出した<sup>43)</sup>。左室駆出率 (left ventricular ejection fraction; LVEF)



は Teichholz 法により求めた<sup>44)</sup>.

### 3-5 採尿方法

ラット用実験動物用代謝ケージ(CT-10s type II; CLEA Japan, Inc., 東京, 日本)を用いて 24 時間蓄尿を行った. 尿量を測定した後に, 尿検体を 1.5mL チューブに分注し, -20°Cで保存した. 尿アルブミン, 尿中ナトリウム, 尿中クレアチニン, 尿中 L 型脂肪酸結合蛋白(Liver-type fatty acid-binding protein; L-FABP)を測定した. 尿中ナトリウム, 尿中カリウムは 7180 形日立自動分析装置(H-7180, 日立ハイテク, 日本), 尿中アルブミン, 尿中クレアチニンは JCA-BM6050(日本電子株式会社, 東京, 日本), L-FABP はマイクロプレートリーダー(VersaMax™ ELISA, MOLECULAR DEVICES, San Jose, California, USA)を使用して測定した.

血液検体は, 胸郭を解放し, 心臓を露出した状態で右室を視認し, 同部位から 23G 針で穿刺し, 検体採取を行った. 検体採取後に多本架冷却遠心器(A X-511, 株式会社トミー精工, 東京, 日本)を用いて 3400rpm で 5 分間遠心し, 血清を分離した. 血清ナトリウム, クレアチニン, interleukin-6 (IL-6), tumor necrotic factor alpha (TNF- $\alpha$ )を測定した. IL-6, TNF- $\alpha$  は免疫アッセイシステム(MESO®QuickPlex SQ120, 和研薬, 京都, 日本)を用いて測定し, その他の項

目は自動分析装置(KABOSPECT008, 日立ハイテク, 東京, 日本)で測定を行った。

### 3-6 臓器重量測定

心臓は摘出した後に右室を切り取り, 左室のみの重量を測定した。腎臓は左腎と右腎のそれぞれの重さを測定した。肺は左右の肺を左右気管支から分離し, 左右肺を合わせて重量測定を行った。いずれも体重あたりの臓器重量を表記した。

### 3-7 腎間質圧ならびに微小循環血流評価

腎造影超音波法を用いて, CVP が上昇するに従って, RMP が上昇し, 腎髄質微小循環が増悪することが示されている<sup>15,16)</sup>。そのため, 本研究でもこれらの評価方法を用いることとし, 腎うっ血評価としてカテ先マノメータによる CVP 測定, RMP 測定, 腎造影剤超音波法による腎皮質及び髄質微小循環評価を行った。

#### 3-7-1 中心静脈圧測定および腎髄質内圧測定

ケタラルールおよびセラクターール腹腔内投与による全身麻酔下で右鼠径部を皮

膚切開し，大腿静脈を露出した．大腿静脈から 24G 留置針を挿入し，Y 型コネクタと接続した．ここから圧測定用細径カテーテルマノメータ (FISO-LS-PT9, FISO Technologies, Quebec City, Quebec, Canada) を挿入し，CVP を測定した．

続いて，左腎を体外に露出し，カテーテルマノメータをガイドワイヤーイントロデューサを用いて腎髄質内に誘導し，エコーガイド下に適切な位置に先端があることを確認した (図 2A, B)．ガイドワイヤーイントロデューサを腎外へ抜去し，マノメータ単独を腎髄質に留置し，圧が安定した状態で RMP の測定を行った．

### 3-7-2 腎造影超音波法による腎微小循環血流評価

腎造影超音波法は，腎微小循環血流を評価する目的で行った<sup>15,16)</sup>．エコー診断装置は Aplio (Canon Medical Systems, 大田原, 栃木, 日本)，深触子は PLT-1204BP を用いた．RMP 測定に用いた右腎と反対側の左腎を対象とした．造影剤はペルフルブタン (ソナゾイド®; 第一三共株式会社, 東京, 日本) を使用し，注射用水に溶解し，ペルフルブタンマイクロバブル 8 $\mu$ L/mL に調製した．左腎を長軸方向に描出した状態で，ペルフルブタンマイクロバブル 0.5 $\mu$ L/kg を大腿静脈に留置している Y 型コネクタから投与した後に，生理食

塩水 5mL でポーラス投与し，超音波動画を取得した(図 3A)．腎微小循環評価は Vitrea Workstation (Canon Medical Systems, 大田原, 栃木, 日本)を用いて行った (図 3B)．関心領域 (region of interest; ROI) は最も均一に造影される部位に任意選択し，皮質，髓質にそれぞれ設置した．ROI 内の平均信号強度 (decibel; dB)を縦軸，時間 (milli second; ms)を横軸とした曲線を time-intensity curve として描出され (図 3C)，平均信号強度の立ち上がりの変曲点から，最大信号強度になるまでの時間を time to peak intensity (TTP)として算出した (図 3D)<sup>15)</sup>．

### 3-8 病理組織検査

ラットの左室を基部，中部，心尖部に短軸方向に三分割し，中部の組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定した．腎臓は腎髓質組織圧を測定した左腎と対側の右腎を使用し，腎門部を中心に長軸方向に半分に切り，左室同様に 4%パラホルムアルデヒドで固定した．固定した組織は，パラフィン包埋ブロックを作製した後に，3 $\mu$ m 厚に薄切し，ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin eosin: HE)染色，マッソン・トリクロム (Masson's trichrome: MT)染色，Periodic Acid-Schiff (PAS)染色で標本を作製した．標本は蛍光顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE Japan, 大阪, 日本)及びバーチャルスライドスキャナ

(NanoZoomer 2.0RS, 浜松ホトニクス, 浜松, 静岡, 日本)を用いてデジタル画像としてコンピュータに取り込んだ。

### 3-8-1 左室心筋線維化率の解析

左室線維化は、圧負荷に対する代償反応や心筋障害の修復過程によって生じる<sup>45)</sup>。左室線維化の解析には、画像解析ソフト Image J version1.52 を用いた。左室 MT 染色標本の画像から組織全体を指摘し、その面積を測定した。次に、MT 染色によって青色に染色された線維化部分を指定し、その面積を測定した。この二つの値を用いて、単位組織断面積あたりの線維化の割合を百分率で算出した (図 4A)。

### 3-8-2 左室心筋断面積, 左室心筋細胞幅の解析

左室肥大を評価するために、左室心筋断面積, 左室心筋細胞幅を測定した。MT 染色標本において、乳頭筋を避けて左室心筋細胞を描出した。心筋細胞の核は細胞中央に位置していることから、左室心筋断面積として核が描出される部分の断面積を測定した。左室心筋細胞幅も同様に核を中心とした部位の短軸径を測定した。それぞれ 50 ヶ所を測定し、平均値を使用した<sup>46)</sup> (図 4B)。

### 3-8-3 尿細管円柱の解析

Dahl 食塩感受性ラットは、尿細管円柱形成が多く生じる<sup>47)</sup>。尿細管間質障害やそれに伴う尿流うっ滞によって円柱が貯留するため、尿細管間質障害の評価目的に尿細管円柱形成の評価を行った。解析ソフト QuPath version 0.2.3 を用いて、尿細管円柱の解析を行なった<sup>48)</sup>。腎臓 PAS 染色標本の画像から組織全体を指定し、腎臓断面積を測定した。次に、腎臓 PAS 染色で青色に染色された尿細管内円柱の面積の総和を腎臓断面積で除した百分率を算出した(図 5)。

### 3-8-4 糸球体評価

巣状分節性糸球体硬化症(focal segmental glomerulosclerosis; FSGS)は、腎血行動態が発症の一因となる<sup>49)</sup>。また、本研究では食塩感受性ラットを用いており、著明な高血圧を呈する。この高血圧に起因する輸入細動脈硬化症から二次的に全節性硬化性病変(global sclerosis; GS)を生じる<sup>50)</sup>。そのため、本研究では、HE 染色標本で、糸球体を正常、FSGS、GS の 3 つに分類し、一断面辺り全てをカウントし、総糸球体数で除すことで、百分率として算出した。FSGS、GS はそれぞれ、腎皮質全体、傍髄質皮質、皮質表層にわけ評価した。

### 3-9 mRNA 発現

細断した左室心筋から、TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して全 RNA の抽出を行った。RNA ペレットを 30  $\mu$ L の Milli-Q 水に溶解し、Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, California, USA) で、Agilent RNA 600 Nano Kit (Agilent) を使用して、各グループ 3 標本ずつサンプルの RNA 溶液を確認した。ライブラリは、各サンプルから 500 ng の RNA を使用し、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) を使用して調製し、12 ポリメラーゼ連鎖反応サイクルを行った。ライブラリの濃度とサイズ分布は、Bioanalyzer 上で、Agilent DNA 7500 kit (Agilent) で評価し、すべてのサンプルは、次世代シーケンス分析可能であると判断した。ライブラリは、変性と中和のためにプールし、濃度 1nM に調製した。ライブラリを 1.8 pM に希釈し、NextSeq 500 System (Illumina, Inc, San Diego, California, USA) を用いて、NextSeq500/550 v2.5 (75 Cycles) Kits (Illumina, Inc) で、次世代シーケンシングを実行した。シーケンスは、36 塩基のペアリードで実行した。最後に FASTQ ファイルを、分析のためにエクスポートした。

### 3-10 統計解析

各データは群ごとに平均値を算出し、平均値 $\pm$ 標準誤差を表記した。多重比

較は、分散分析を行った。片側検定で群間の有意差を評価した。LS 群および HS 群をコントロール群とし、これらとの比較は Dunnett 検定を用いて行った。パラメータ間の相関関係は、Pearson の相関係数により評価を行った。  $p$  値  $< 0.05$  の場合に統計学的に有意差ありと判断した。全てのデータは JMP 11.0 (SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA) を用いて解析を行った。



## 第4章 結果

### 4-1 高血圧性心不全モデルラットの経時的観察

HS 群で 2 匹，SGLT2-i 群で 2 匹，Loop-d 群で 3 匹が 18 週齢までに死亡した。LS 群は 1 匹が，実験中に死亡した。

#### 4-1-1 体重および臓器重量

いずれの群のラットも経時的な体重増加を示したが，18 週齢で LS 群は HS 群，SGLT2 阻害薬群よりも有意な体重の増加を認めた（表 1）。左室重量は，LS 群に比べて，他 3 群は有意に増加していた。4 群間で肺重量の差はなく，肺水腫はいずれも生じていなかった。

#### 4-1-2 血行動態評価

血行動態の経時的変化を図 6 に示す。12 週齢以降の収縮期および拡張期血圧は，全ての高食塩食投与ラットが LS 群に比べて一貫して有意に上昇しており，SGLT2-i 群は HS 群に比して有意な血圧低下は認められなかった。また，心拍数はいずれの週齢でも 4 群間で差を認めなかった（図 6，表 1）。

### 4-2 血液及び尿検査

表 2 に，18 週齢における血清及び尿検査結果を示す。4 群間の血清ナトリウム

ム値に有意差は認めなかった。8%高食塩食を与えられた全ての DSS ラットにおいて、尿量、ナトリウム排泄が LS 群に比して多かった。また、尿中アルブミン排泄は LS 群に比べ HS 群、SGLT2 阻害薬はともに有意に増加し、Loop-d 群は統計学的有意差を認めなかったが、平均値で 6 倍以上の差を認め、上昇していた。SGLT2-i 群と Loop-d 群はいずれも HS 群と比べて尿量に有意差は見られなかった。腎機能評価として用いた血清クレアチニン値およびクレアチニンクリアランスは 4 群間で差はなかった。尿中 L-FABP は LS 群よりも HS 群が有意な上昇を来していたが、SGLT2-i 群、Loop-d 群でも有意差は認めなかったが、平均値では 15 倍以上に上昇していた。炎症性バイオマーカーとして測定した血清 IL-6 と血清 TNF- $\alpha$  は 4 群間で差はなかった。

#### 4-3 心エコー図検査

図 7A に心エコー図検査の経時的推移を示す。10 週齢の左室評価は、4 群間に統計学的有意差は認めなかった。左室収縮能評価である LVEF は、15 週齢において、LS 群よりもその他 3 群は低下していたが、HS 群はその後さらに低下した。また、LV mass においては、15 週齢の時点では、LS 群よりもその他 3 群は有意に増加していたが、18 週齢までは HS 群と Loop-d 群は直線的な増加を認めた一方で、SGLT2-i 群は増加しなかった。左室肥大の評価として用いた左

室壁厚は、IVSTd, PWTd とともに、15 週齢以降、HS 群と Loop-d 群は LS 群よりも有意に増大していたが、LS 群と SGLT2-i 群には有意差は認めなかった。Dd は経過中のいずれの時点でも 4 群間に統計学的な有意差は認めず、左室拡大は進行していなかった。表 3 に 18 週齢時点の心エコー図データを示す。図 7B の左室収縮を M モードで示す代表的なケースのように、LVEF は HS 群のみが有意に低下していた。LV-GLS は HS 群と Loop-d 群で有意に低下していたが、LS 群と SGLT2-i 群はほぼ同等であり、SGLT2-i 群では縦軸方向の収縮が保たれていた。SGLT2-i 群における左室壁厚と LV mass は、HS 群及び Loop-d 群よりも小さく、左室肥大の進行が抑制されていた。

#### 4-4 中心静脈圧と腎髄質循環評価

RMP と CVP はわずかな正の相関関係があった( $R=0.32$ ,  $p=0.044$ )(図 8A)。SGLT2-i 群の CVP と RMP とともに HS 群よりも低下しており、心不全の静脈うっ滞の改善とともに腎髄質内圧が低下していた。Loop-d 群では CVP が HS 群と比較して有意に低下していた一方で、RMP は低下しておらず、静脈圧は改善していた一方で、腎髄質内圧は低下していなかった (図 8B)。

腎造影超音波法による、皮質 TTP は 4 群間に有意差は認めなかったが、髄質 TTP は HS 群と Loop-d 群で有意な腎髄質の微小循環障害を認めており、LS 群

と SGLT2-i 群の間に有意差は認めなかった (図 9A, B). RMP と皮質 TTP に相関関係は認めなかった ( $R=0.31$ ,  $p=0.139$ ) が, RMP と髄質 TTP の間には正の相関関係 ( $R=0.62$ ,  $p=0.001$ ) があり, これら 2 つの指標の関連が示唆された (図 9C).

#### 4-5 病理

##### 4-5-1 腎臓病理

MT 染色で評価した腎髄質間質の線維化は, いずれの群でもわずかな線維化を認めるのみであった (Data not shown). また, わずかではあったが, SGLT2-i 群では一部の線維化周辺に間質浮腫が残存していた (図 10)C 一方で, Loop-d 群では線維化周辺に浮腫残存している部位は認めなかった (図 10D). LS 群における尿細管円柱面積割合は, 4 群の中で最も小さかった (図 11A). SGLT2-i 群は, HS 群よりも尿細管円柱形成が有意に抑制されていた一方で, Loop-d 群は抑制されておらず, 尿細管内の尿流の改善が考えられた. SGLT2-i 群における FSGS および GS の割合は, HS 群と有意な差を認めなかった (図 11B). しかし, 皮質表層の FSGS に変化なかったが, 傍髄質皮質の FSGS 割合は有意に減少しており, 糸球体障害の偏在を認めた. 尿細管円柱面積は RMP ( $R=0.50$ ,  $P=0.013$ ), 髄質 TTP ( $R=0.73$ ,  $P<0.001$ ) の間に正の相関を認めた (図 11C).

#### 4-5-2 心臓病理

HS 群における左室線維化は LS 群よりも有意に進行していた(図 12A)。 HS 群と比較して SGLT2-i 群は左室線維化進行が有意に抑制されていたが、 Loop-d 群では抑制されていなかった。 さらに、 HS 群と Loop-d 群の左室肥大の評価として行った心筋断面積や心筋幅は有意に増大していたが、 SGLT2-i 群は左室肥大の有意な進行を認めなかった(図 12B, C)。 図 13 に示すように、 RMP や髄質 TTP と左室線維化、 左室肥大評価とは強い相関関係を認めた。 他方、 CVP と左室線維化には弱い正の相関があったが( $R=0.42$ ,  $p=0.036$ )、 左室心筋断面積( $R=0.34$ ,  $p=0.101$ )や心筋幅( $R=0.33$ ,  $p=0.109$ )との相関関係は認めなかった(図 14)。

#### 4-6 左室における RNA 発現

図 15 に 4 群の左室における RNA 発現をヒートマップにして示す。 遺伝子発現 -1.5 倍未満かつ FDR  $p$  value  $<0.05$  をカットオフとした。 SGLT2-i 群では、 HS 群と比較して合計 109 の遺伝子が有意に発現抑制されており、 左室線維化や左室機能不全に関連する *ALAS2*<sup>51)</sup>, *NCOA4*<sup>52)</sup>, *CILP*, *LTBP2*, *Comp*<sup>53)</sup>, *GPNMB*<sup>54)</sup>, *NCAM1*<sup>55)</sup> の 7 つの遺伝子発現が抑制されていた(表 4)。 さらに、 NPPA (atrial natriuretic peptide; ANP) や NPPV(B-type natriuretic peptide; BNP)

の発現は有意に抑制されていた。

## 第5章 考察

本研究では、高血圧性心不全モデルラットにおいて、SGLT2 阻害薬が腎髄質内圧を下げ、腎髄質微小循環を改善させることがわかった。さらに、SGLT2 阻害薬によって得られた腎間質循環の改善は、左室肥大や収縮能と相関があった。ループ利尿薬は中心静脈圧を低下させたが、腎髄質内圧や腎髄質微小循環は改善しておらず、左室評価においても改善は見られなかった。この研究は、SGLT2 阻害薬による腎間質循環改善と左室リモデリングについて、良好な関係があることを示した最初の報告である。

### 5-1 利尿薬による腎うっ血改善

本研究で、カナグリフロジンは CVP を下げ、RMP を減少させた。他方、フロセミドは CVP を低下させたが、RMP は上昇したままであった。これは、ループ利尿薬が血管内中心の利尿効果である一方で、SGLT2 阻害薬は間質浮腫低減が中心的な効果であるとする既報の生体シミュレーションの結果と一致しており、SGLT2 阻害薬による間質浮腫改善との関連が示唆された<sup>28)</sup>。ループ利尿薬は、ヘンレループ上行脚での Na<sup>+</sup>再吸収を阻害することにより強力な利尿効果を発揮する一方で、SGLT2 阻害薬は近位尿細管細胞においてグルコースとナトリウムの再吸収を阻害し、浸透圧利尿効果とナトリウム利尿効果を持ち、細胞外液の浮腫を改善することが報告されている<sup>26,28,56,57)</sup>。これにより、腎

尿細管と間質の間の浸透圧勾配が減少する可能性が指摘されており、カナグリフロジン投与により腎髄質内圧が低減し、腎髄質微小循環を改善した一因となった可能性が考えられた。

さらに、カナグリフロジンは腎尿細管円柱形成を有意に抑制したが、フロセミドでは円柱形成を抑制していなかった(図 11A)。本研究では、尿細管内の尿流改善は、円柱形成の減少につながる要因の 1 つであるため円柱形成を尿細管間質障害の評価として使用した。従って、この結果は腎髄質内圧が軽減されることで、尿細管内の尿流が改善し、腎保護に寄与したことを示唆している。また、傍髄質皮質の糸球体は、主として腎髄質の灌流障害による障害を受けるが、皮質表層の糸球体は Renin-Angiotensin-Aldosterone system (RAAS) 関与していることが示されている<sup>58)</sup>。本研究においてカナグリフロジンは傍髄質皮質の FSGS 形成を減少させ、この結果はカナグリフロジンが腎髄質灌流を改善したことを支持する結果と考えられた(図 11B)。しかし、カナグリフロジンの糸球体保護は傍髄質皮質に限られており、高食塩食ラット間で糸球体病変の総数や尿中アルブミンに差はなかったと考えられる。

本研究において、ナトリウム利尿をきたすはずのフロセミド投与により尿中  $\text{Na}^+$  が有意に増加しなかった。本来、ループ利尿薬はヘンレループの上行脚における  $\text{Na}^+$  排出を増加させるが、ループ利尿薬の長期投与は、遠位尿細管での



ナトリウム再吸収の増加を誘発し、ループ利尿薬は徐々に十分な浸透圧勾配を生成できなくなることが指摘されている<sup>59)</sup>。慢性心不全は、静脈圧上昇を引き起こし、続いて身体の間質に体液が貯留する臓器うっ血をもたらす。さらに、腎髄質灌流の自己調節が不十分な直血管は間質圧の影響を受けやすく、さらなる腎うっ血をきたす可能性がある<sup>60)</sup>。つまり、腎髄質微小循環の低下は、ナトリウム再吸収の増加を引き起こし<sup>28)</sup>、間質を含む体液量の保持を助長し、これによって心不全を増悪させる懸念がある。フロセミド投与による尿中 Na<sup>+</sup>増加がみられなかったことは、腎髄質灌流への不十分な介入がナトリウム利尿抵抗性の一因となりうることが考えられた。ループ利尿抵抗性は心不全の予測因子として知られており<sup>61)</sup>、ループ利尿薬単独での治療では腎うっ血解除が不十分となり得ることは临床上重大な問題である。実際、うっ血性心不全で入院した患者で、退院時に腎臓を含めた臓器うっ血解除が不十分であることが少なくなることが報告されている<sup>62)</sup>。腎間質循環障害の重症度は心不全患者の予後と関連しており、退院後の心不全再入院や心不全死亡への影響が懸念され<sup>23,24)</sup>、残存する腎うっ血への SGLT2 阻害薬による介入が重要と考えられた。

Dahl ラットはループ利尿薬投与により尿量が増加することが報告されているが<sup>63)</sup>、本研究の結果では、他の高食塩摂取群に比べると、Loop-d 群では尿量が少ない傾向があった。さらに CVP が十分に低下していたことから、ループ利

利尿薬による利尿効果が得られていたと考えられるが、ループ利尿薬でうっ血の十分な解除を試みた場合、主に血管内脱水を引き起こすことから<sup>26,28)</sup>、腎機能のさらなる悪化につながる懸念がある。一方、SGLT2-i群ではHS群に比べて有意な尿量増加はなかったが、CVPが低下し、腎髄質循環が改善していた。慢性心不全の患者では、SGLT2阻害薬の腎保護効果は、腎髄質のうっ血除去が一因となっている可能性が考えられた。

## 5-2 腎循環改善と左室リモデリング

近年、多くの臨床試験で、SGLT2阻害薬による左室肥大の改善が示されており、LVEFの程度や糖尿病の有無に関わらず、SGLT2阻害薬は心不全患者の心保護作用を持ち、心血管死または心不全入院のリスクを低下させることが報告されている<sup>28-37)</sup>。本研究において、SGLT2阻害薬がもたらした心臓保護効果として、心エコー図所見における左室肥大進行の抑制とLV-GLS改善(図7)、病理所見における左室線維化抑制、左室肥大進行の抑制(図11)、遺伝子発現における左室線維化抑制、左室機能改善が認められた(表4)。一方で、同様にCVP低下に寄与したループ利尿薬には、これらの心保護効果は見られなかった。SGLT2阻害薬による心保護効果は次に述べるさまざまな機序が提唱されている。まず、前負荷低減効果はループ利尿薬でも見られていたが、心保護作

用は見られなかった(図 8)。後負荷低減効果についても、本研究では、カナグリフロジンは血圧を有意に低下させず、カナグリフロジンの心臓保護効果は血圧低下を介するものではなかった(図 6)。不全心では ATP 濃度が低下し、SGLT2 阻害薬によってケトン体濃度が上昇し、ケトン体利用が増加することで心筋 ATP 産生が増加するなど、心臓エネルギー代謝の改善による心保護効果が考えられているが<sup>64-70)</sup>、本研究ではケトン体利用に関連する *Bdh1* や *Oxct1* などの遺伝子発現に差は見られなかった<sup>71)</sup>。さらに、酸化ストレスや炎症抑制を介した心保護作用も指摘されているが<sup>72,73)</sup>、本研究では、血清 IL-6 や TNF- $\alpha$  といった炎症関連バイオマーカーは上昇しておらず(表 2)、酸化ストレスや炎症に関連する遺伝子発現の差は認めなかった。また、カナグリフロジンは心臓にも発現している SGLT1 にも選択性を持つ。SGLT1 は病的な心筋肥大や心不全に関連することが報告されているが<sup>74,75)</sup>、カナグリフロジンは心筋や骨格筋の SGLT1 に影響を与える血中濃度には達しにくいことが示されている<sup>76)</sup>。これらのことから、腎間質循環指標と左室線維化および心筋肥大との間に正の相関関係があり(図 13)、SGLT2 阻害薬による腎間質循環改善が、心保護作用の一機序である可能性が考えられた。

ただし、SGLT2 阻害薬は動物実験で腎臓の RAAS を抑制し<sup>77)</sup>、神経体液性因子への影響も報告されているが<sup>78,79)</sup>、本実験では RAAS による心血管への効果

は評価していない。また、本研究では、心臓血管における保護作用が腎間質圧低下および腎微小循環改善から得られるのか、SGLT2 阻害薬による直接的な作用によるものなのかを結論付けることはできなかった。

### 5-3 本研究の限界

この研究にはいくつかの制限がある。まず、4 群間でクレアチニン値やクレアチニンクリアランスなどの腎機能評価に有意差がなく、SGLT2 阻害薬が、臨床的に評価可能な腎機能に影響を与えるかどうかを評価できていない。ただし、ナトリウム利尿が期待される Loop-d 群では、他の群に比べてナトリウム排泄量及び尿量減少傾向があった。Loop-d 群では、腎微小循環増悪により、尿細管からのナトリウム再吸収が増加した結果<sup>27,53)</sup>、18 週齢でのナトリウム排泄量及び尿量が HS 群より低下していたと考えられる。この側面において、SGLT2 阻害薬は長期的な腎保護効果を有する可能性がある。

第二に、本研究では DSS ラットを使用した。これは、高食塩食を与えられると、著明な高血圧に続発する腎硬化症を引き起こす。したがって、腎うっ血の原因はうっ血性心不全だけでなく、高血圧による腎硬化症が影響した可能性もあるが、SGLT2 阻害薬は対照群と比較して統計的に有意な血圧低下はなく、SGLT2 阻害薬は心不全に起因する腎うっ血が改善したと考えられた。

第三に、SGLT2 阻害薬群では、HS 群および Loop-d 群と比較して LV リモデリングに関連する複数の遺伝子が抑制されていた。しかし、この RNA 発現の変化は SGLT2 阻害薬による腎うっ血除去が直接関与して生じたものかどうかはわからなかった。SGLT2 阻害薬による腎うっ血除去が左心室に有益な効果をもたらすメカニズムは本研究では調査できなかったため、このメカニズムを明らかにするには、分子生物学実験を含むさらなる調査が必要である。

第四に、本研究では、間質浮腫について定量的評価を行っておらず、SGLT2 阻害薬による間質浮腫改善効果を評価できなかった。しかし、Dahl ラットの腎病理を経時的に観察した本研究の先行研究で、12 週齢では 8%高食塩食 Dahl ラットで髄質の間質浮腫が見られたが(図 10A)、18 週齢には浮腫ではなく線維化が目立っていた(図 10B)。本研究の腎病理所見の間質浮腫定性評価では、SGLT2-i 群では間質浮腫所見が残存していた一方で(図 10C)、Loop-d 群では浮腫病変は目立たず、線維化を生じていた(図 10D)。SGLT2 阻害薬が、間質浮腫を軽減することで不可逆的な間質線維化を抑制する可能性もあり、今後、SGLT2 阻害薬投与による経時的変化を調査する必要がある。

また、第五に、SGLT2 阻害薬群のラットはすべて同じ用量のカナグリフロジン投与されているため、SGLT2 阻害薬の効果が用量依存的であるかどうかは不明であった。

## 第6章 結論

SGLT2 阻害薬であるカナグリフロジンは、高血圧性心不全モデルラットにおいて、腎髄質内圧及び腎微小循環を改善し、高血圧の是正とは無関係に左室の線維化及び肥大を抑制した。腎間質循環の改善は、高血圧性心不全における、左室線維化や肥大といった心臓リモデリングに対する治療標的となりうることが示された。

## 第7章 図表

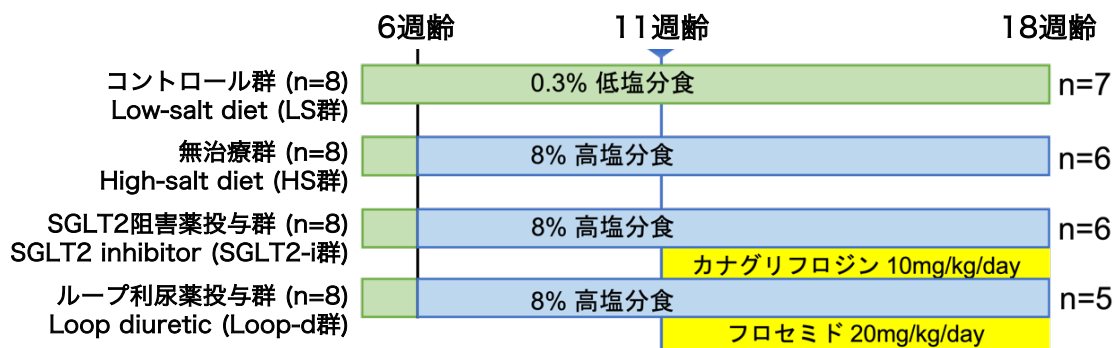
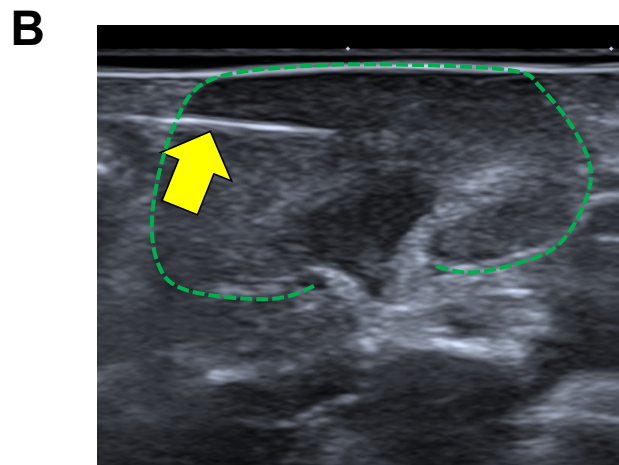
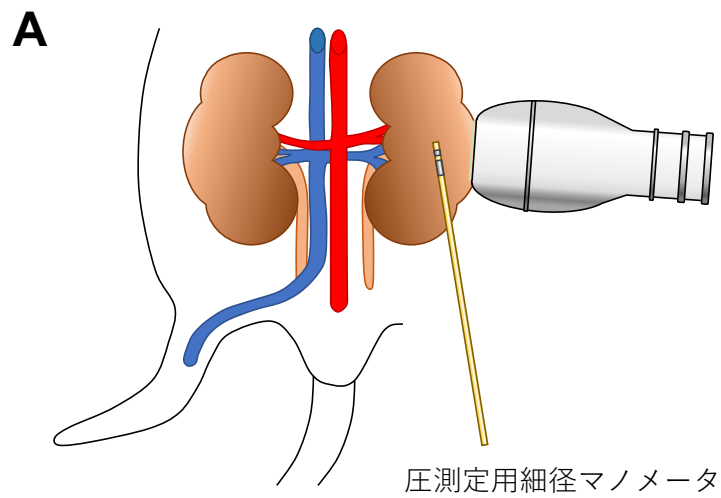


図 1. 実験プロトコール

実験動物：Dahl 塩分感受性ラット (DIA/EIS(Dahl-Iwai S))



## 図 2 . 腎髄質間質圧測定

- A. 全身麻酔下で左腎(緑破線)を体外に露出させ、圧測定用細径マノメータ(黄矢印)を腎内に挿入した.
- B. 超音波法により、圧測定用細径マノメータの先端部位が腎髄質に位置していることを確認した.



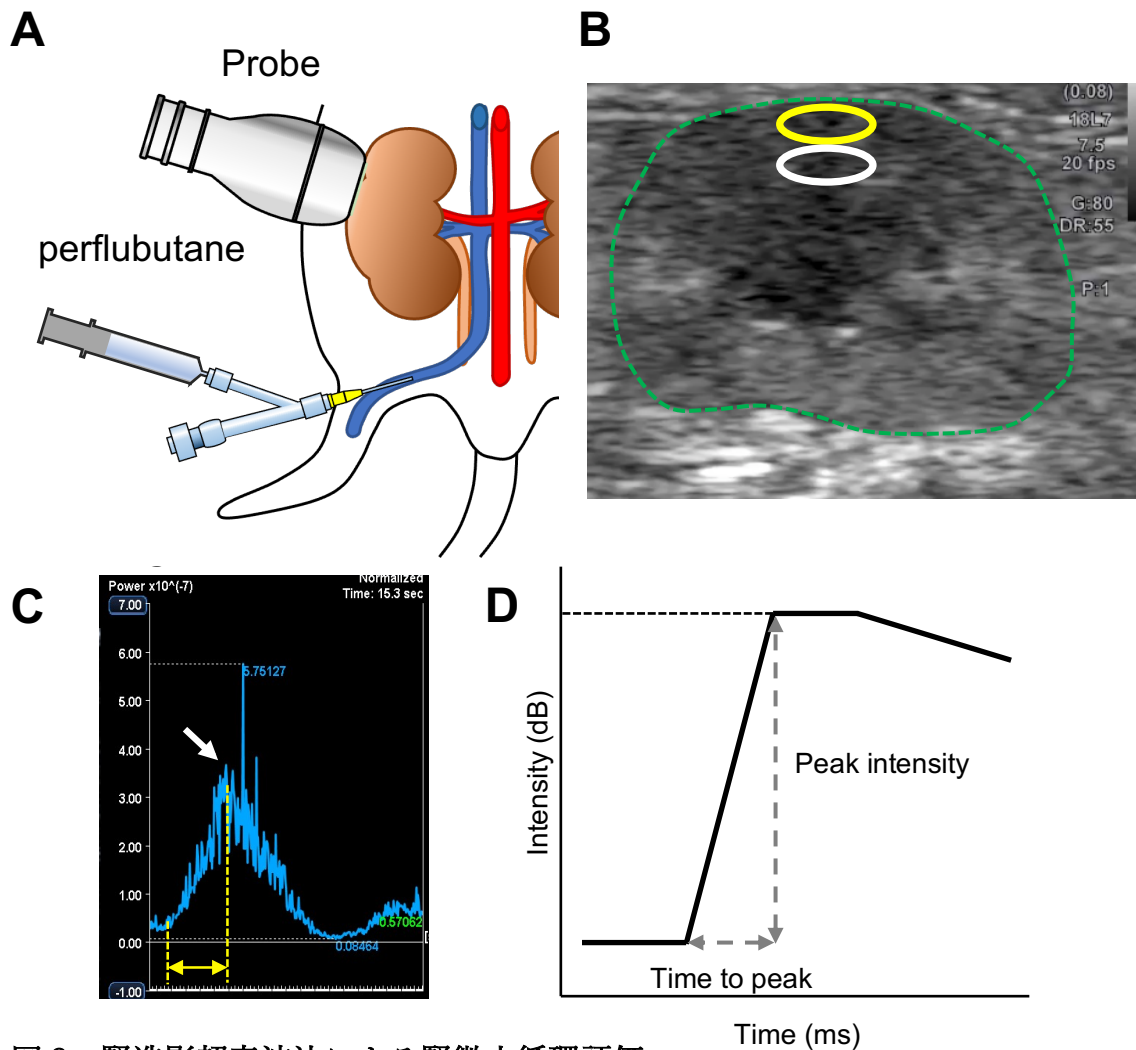
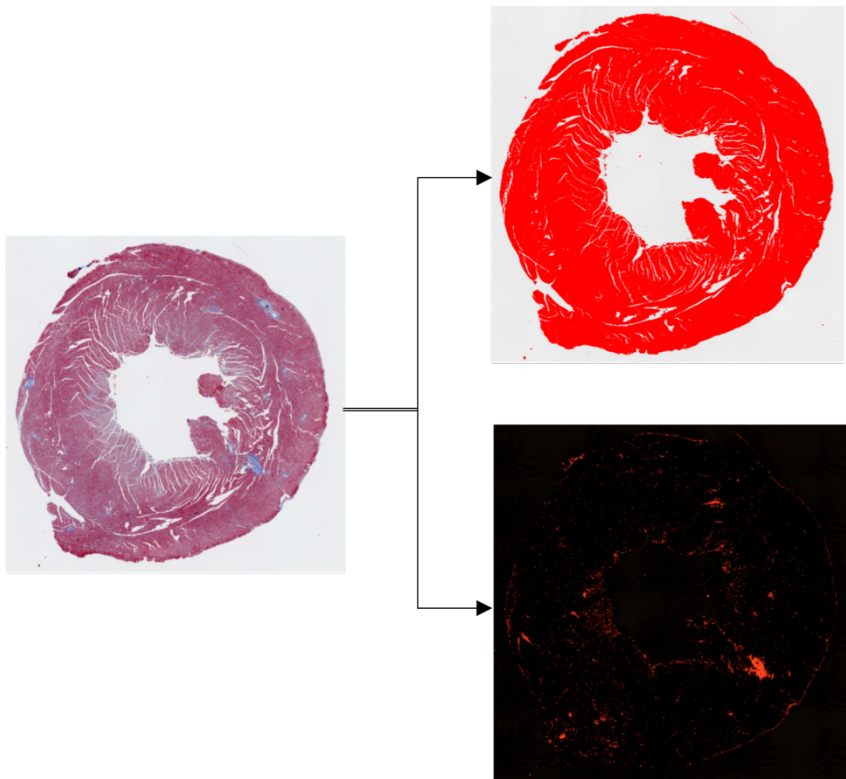


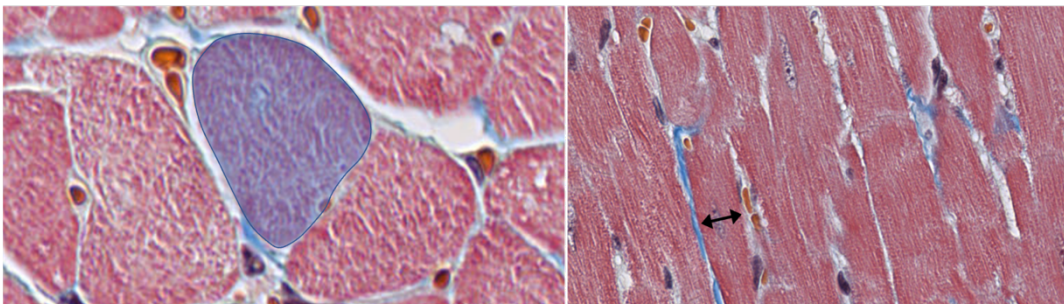
図3 腎造影超音波法による腎微小循環評価

- A. 右大腿静脈からペルフルブタンを投与し、生理食塩水 5mL をボラス投与した。画像は、右腎(緑破線)で取得した。
- B. 関心領域を皮質(黄色)、髄質(白色)のなるべく表層に近い部位に置いた。
- C. ペルフルブタンを静脈投与し、関心領域内の造影強度を intensity curve として得た。
- D. 造影強度立ち上がりの変曲点を始点とし、造影強度が最大になるまでの時間を time to peak intensity: TTP として定義して測定した。

**A**



**B**



**図 4 左室心筋線維化面積測定**

- A. MT 染色標本から左室断面積と(右上), 青色に染色された部位を指定し(右下), それぞれの面積を得ることで, 単位組織断面積あたりの線維化の割合を求めた.
- B. 左室心筋断面積は, 核が確認できる断面で短軸面積を測定した(左). 左室心筋幅は, 長軸で核が描出された部位を測定した(右).

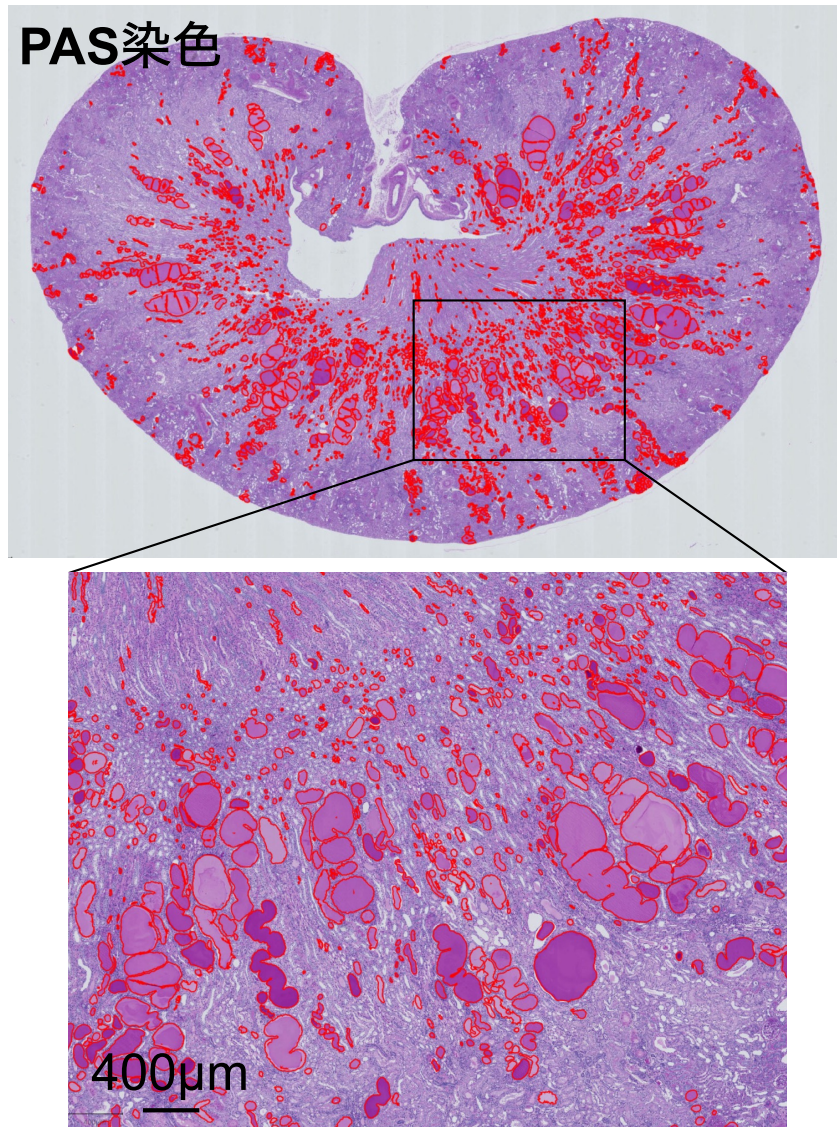
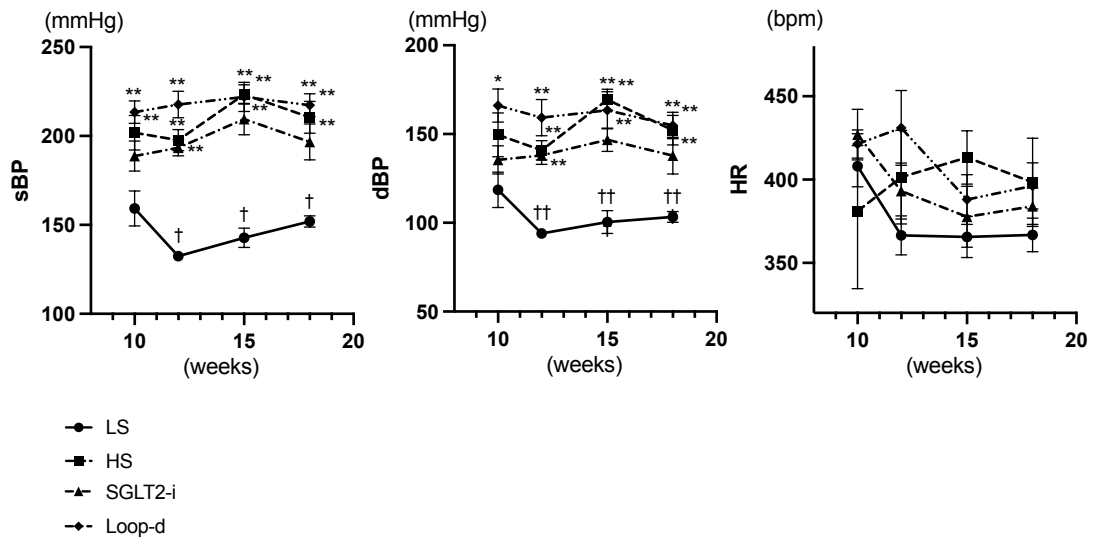


図5 腎尿細管円柱

腎臓 PAS 染色標本の画像から、全体面積を指摘し、面積を測定した。続いて、図に示すように、尿細管内に形成された円柱を指定することで(赤線で囲まれた部位)、標本全体の円柱面積の総和を求めた。



## 図6 血行動態変化

各4群の血行動態の経時的变化を示す(左図から収縮期血圧, 拡張期血圧, 心拍数).

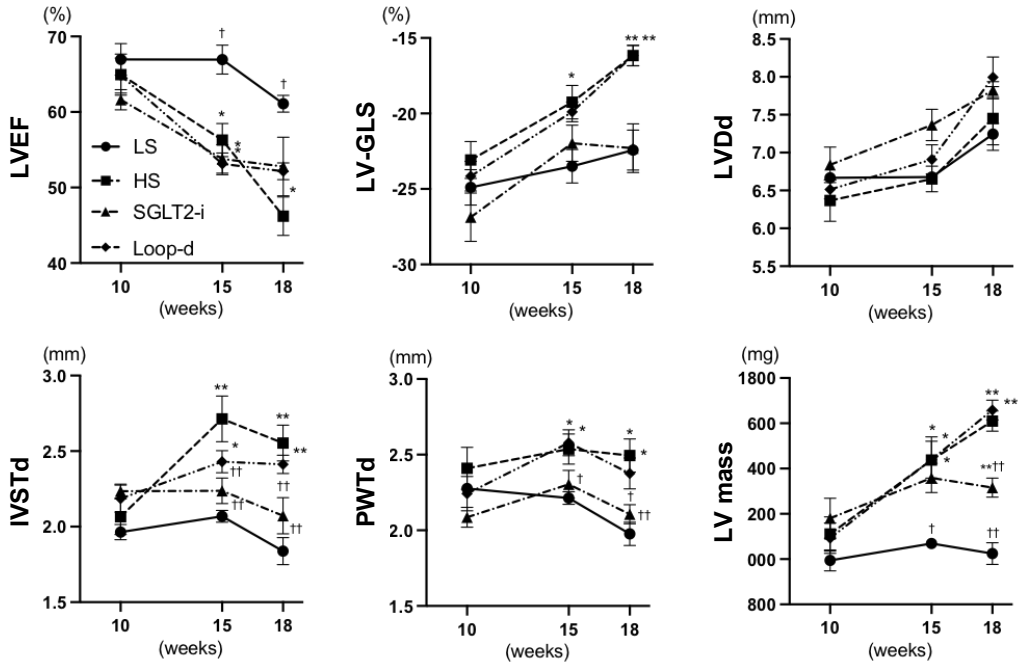
エラーバーは標準誤差を示す.

sBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; HR, heart rate

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. LS群, † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  vs. HS群

対照群とのそれぞれの2群間の差はDunnett' testを用いて評価した.

A



B

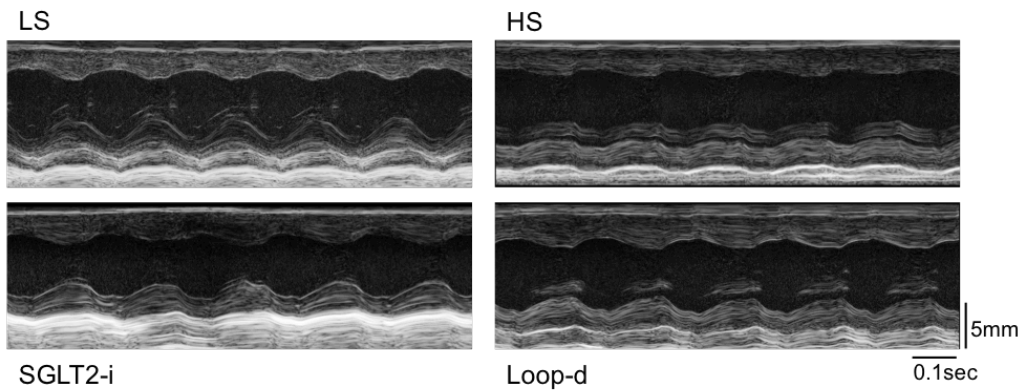


図7 心エコー図結果

A. グラフは、各群の LVEF(左上), LV-GLS(上中), Dd(右上), IVSTd(左下), PWTd(下中), LV mass(右下)を示し、エラーバーは標準誤差を示す。LVEF; left ventricular ejection fraction, LV-GLS; left ventricular global longitudinal strain, LVDd; left ventricular diastolic diameter, IVSTd; diastolic intraventricular septum thickness, PWTd; diastolic posterior wall thickness

B. 18 週齢における M モードで評価された左室 (LV) 収縮の代表的なケース  
 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. LS 群, † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  vs. HS 群  
 対照群とのそれぞれの 2 群間の差は Dunnett' test を用いて評価した。

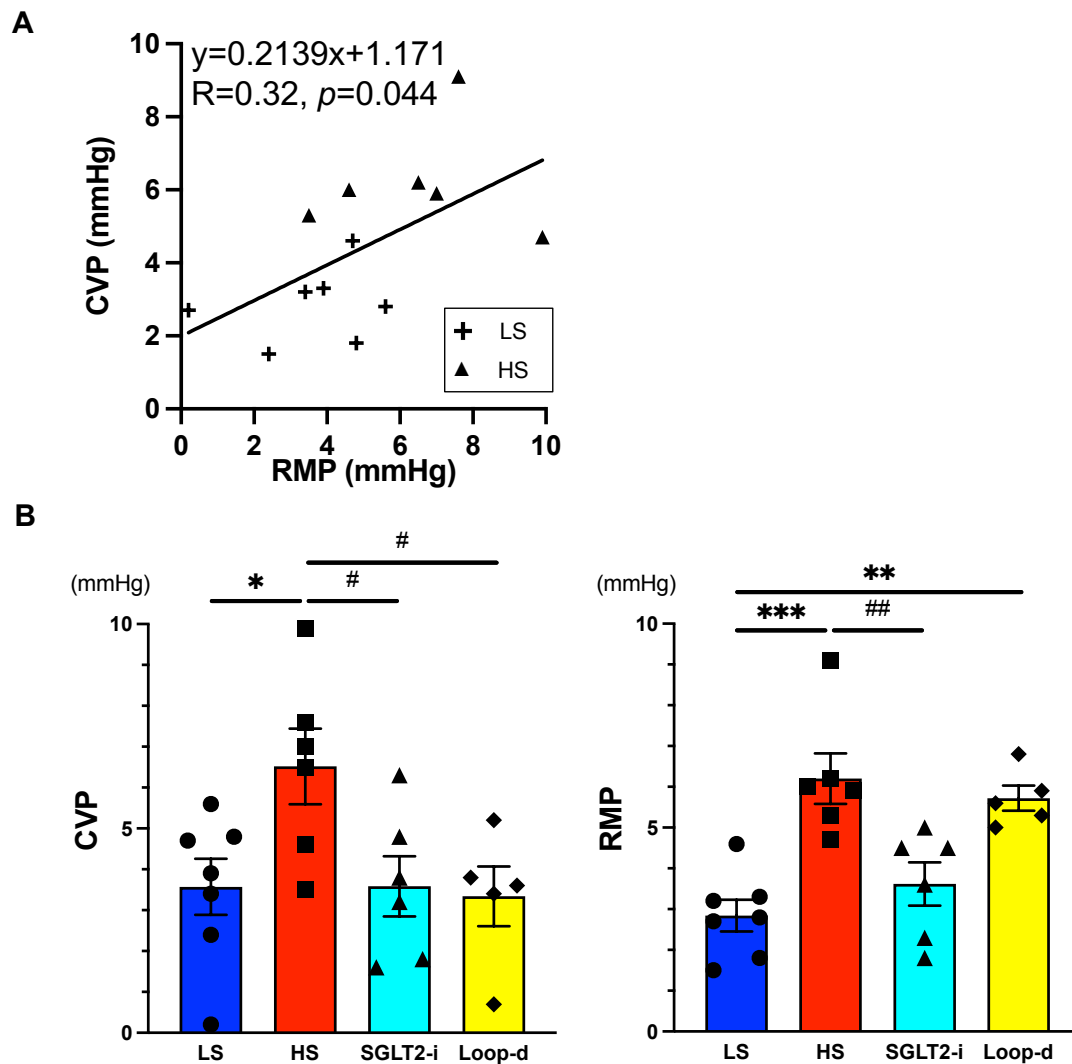


図 8 中心静脈圧と腎髄質間質圧

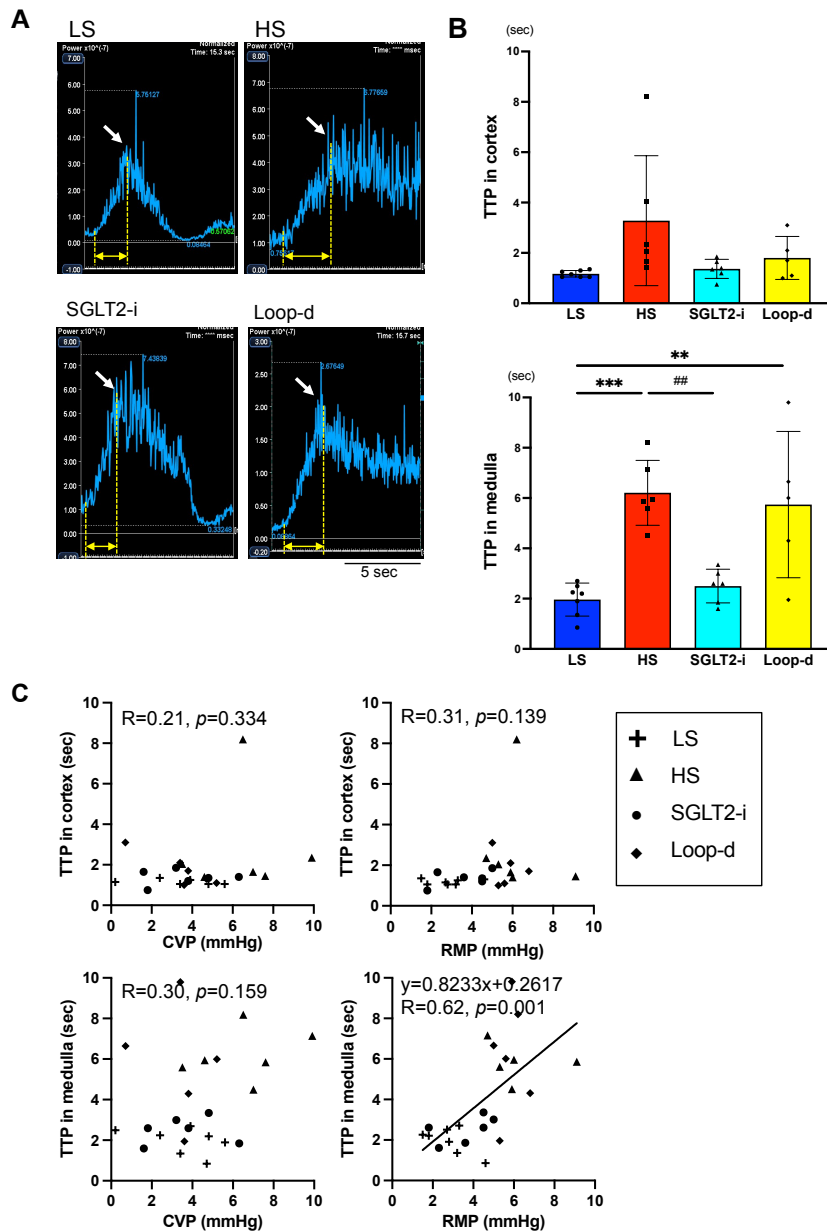
A. 腎髄質間質圧を横軸，中心静脈圧を縦軸とし，相関関係を Pearson の相関係数から求めた。

B. 4 群における中心静脈圧と腎髄質間質圧をそれぞれ示す。エラーバーは，標準誤差を示す。

CVP; central venous pressure, RMP; renal medullary pressure

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. LS 群, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. HS 群

対照群とのそれぞれの 2 群間の差は Dunnett' test を用いて評価した。



### 図9 腎造影超音波法

- A. 腎造影超音波法で得られた髄質の intensity curve の代表例を示す。
- C. 上段は腎皮質，下段は腎髄質の4群それぞれの TTP を示す。エラーバーは、標準誤差を示す。
- B.  $**p<0.01, ***p<0.001$  vs. LS 群,  $##p<0.01$  vs. HS 群
- C. 対照群とのそれぞれの2群間の差は Dunnett' test を用いて評価した。
- D. CVP, RMP と腎皮質，髄質 TTP の相関関係は Pearson の相関係数を用いた。

CVP; central venous pressure, RMP; renal medullary pressure, TTP; time to peak intensity

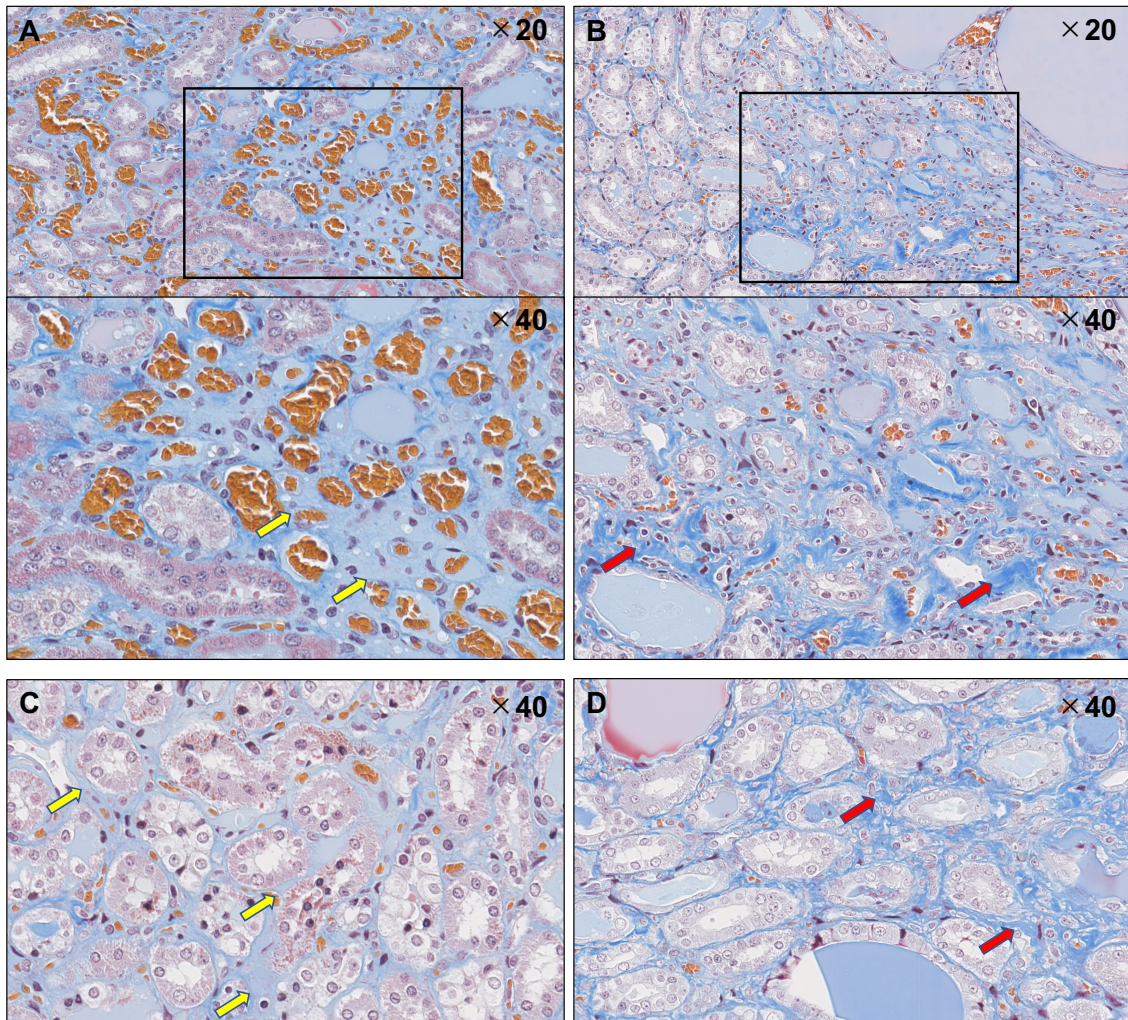


図 10 腎臓間質浮腫

黄色矢印は間質浮腫，赤矢印は間質線維化を示す。

A. 12 週齢 B. 18 週齢 C. SGLT2-i 群 D. Loop-d 群

12 週齢で目立っていた間質浮腫(A)は，18 週齢では線維化の方が目立つ(B)。

本研究では，SGLT2-i 群では間質浮腫を認めていた(C)一方で，Loop-d 群では間質浮腫よりも間質線維化が目立っていた。



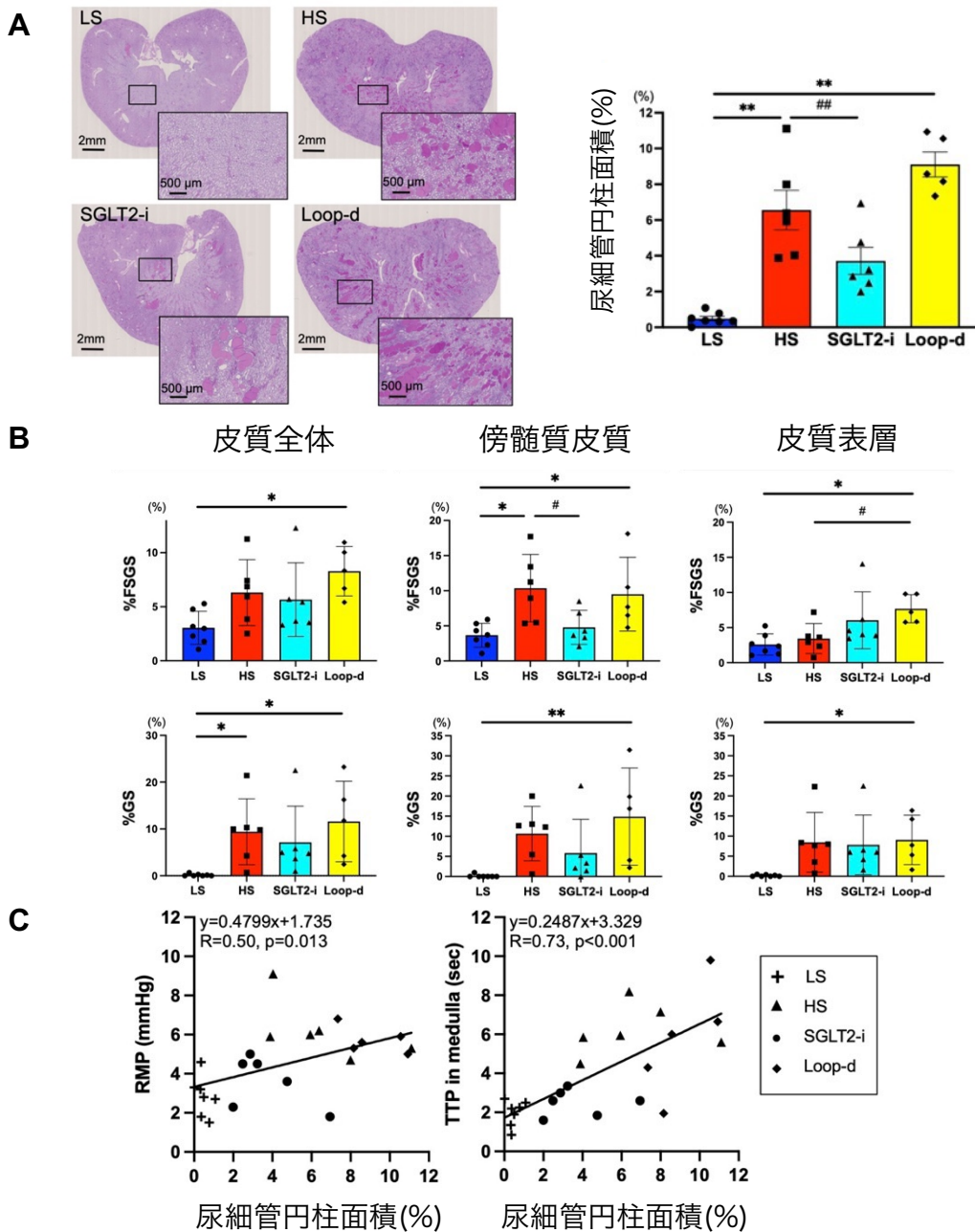


図 11 腎臓病理所見

A. 尿細管円柱所見: 左図に各 4 群の PAS 染色で染色された腎尿細管円柱の代表例を示す。右図に 4 群それぞれの TTP を示す。

B. 各 4 群の FSGS と GS の割合を示す。

C. 尿細管円柱面積と RMP, 腎髄質 TTP の相関関係を示す。相関関係を Pearson の相関係数から求めた。

エラーバーは、標準誤差を示す。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. LS 群, # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. HS 群

対照群とのそれぞれの 2 群間の差は Dunnett' test を用いて評価した。

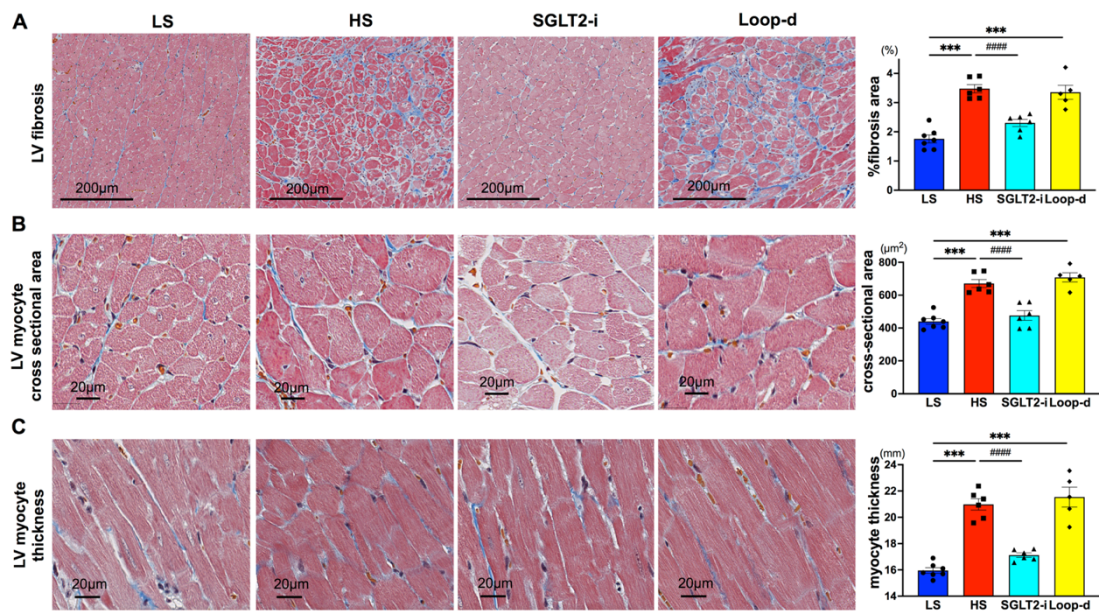


図 12 左室線維化と左室肥大

左図は、左室線維化(A)、左室心筋細胞断面積(B)、左室心筋幅(C)の代表的標本を示す (いずれも Masson's trichrome 染色)。

右図は 4 群それぞれの比較であり、エラーバーは標準誤差を示す。

\*\*\* $p < 0.001$  vs. LS 群, ### $p < 0.001$  vs. HS 群

対照群とのそれぞれの 2 群間の差は Dunnett' test を用いて評価した。

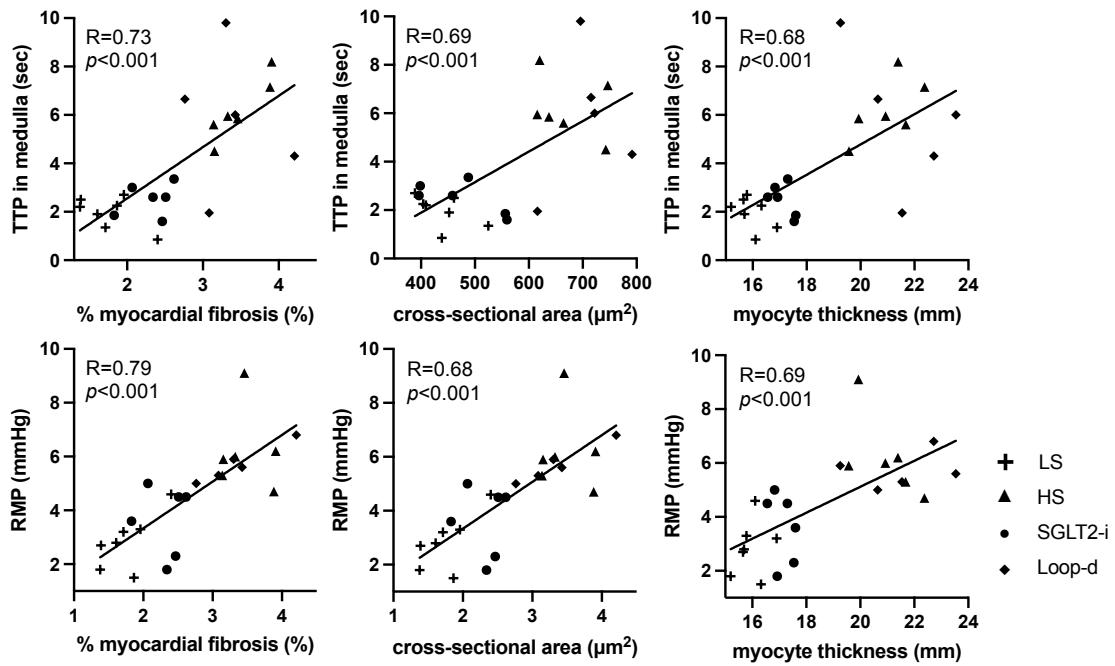


図 13 腎うっ血指標と左室心筋線維化および肥大との関係

腎うっ血指標である髄質 TTP 及び RMP と、左室線維化面積、左室心筋断面積、および左室心筋細胞幅の相関関係を示す。

相関関係を Pearson の相関係数から求めた。

time to peak intensity; TTP, renal medullary pressure; RMP

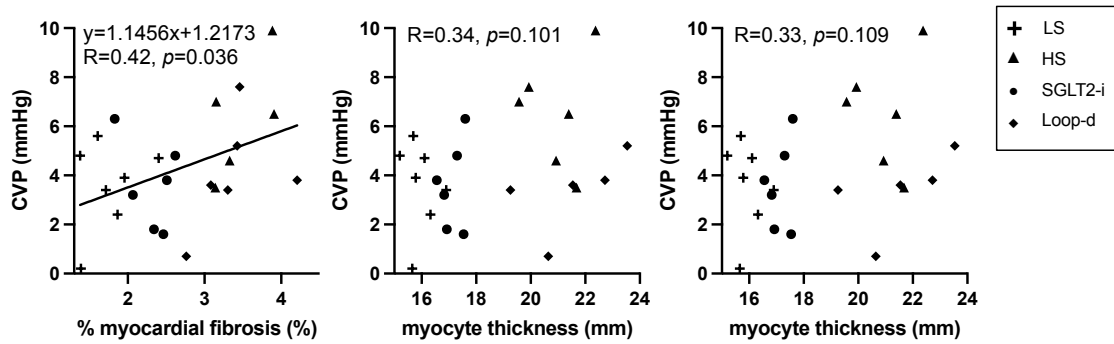


図 14 中心静脈圧と左室線維化および左室肥大との関係

中心静脈圧と左心室線維化面積，左室心筋断面積，および左室心筋幅との相関関係を示す。相関関係を Pearson の相関係数から求めた。

CVP; central venous pressure

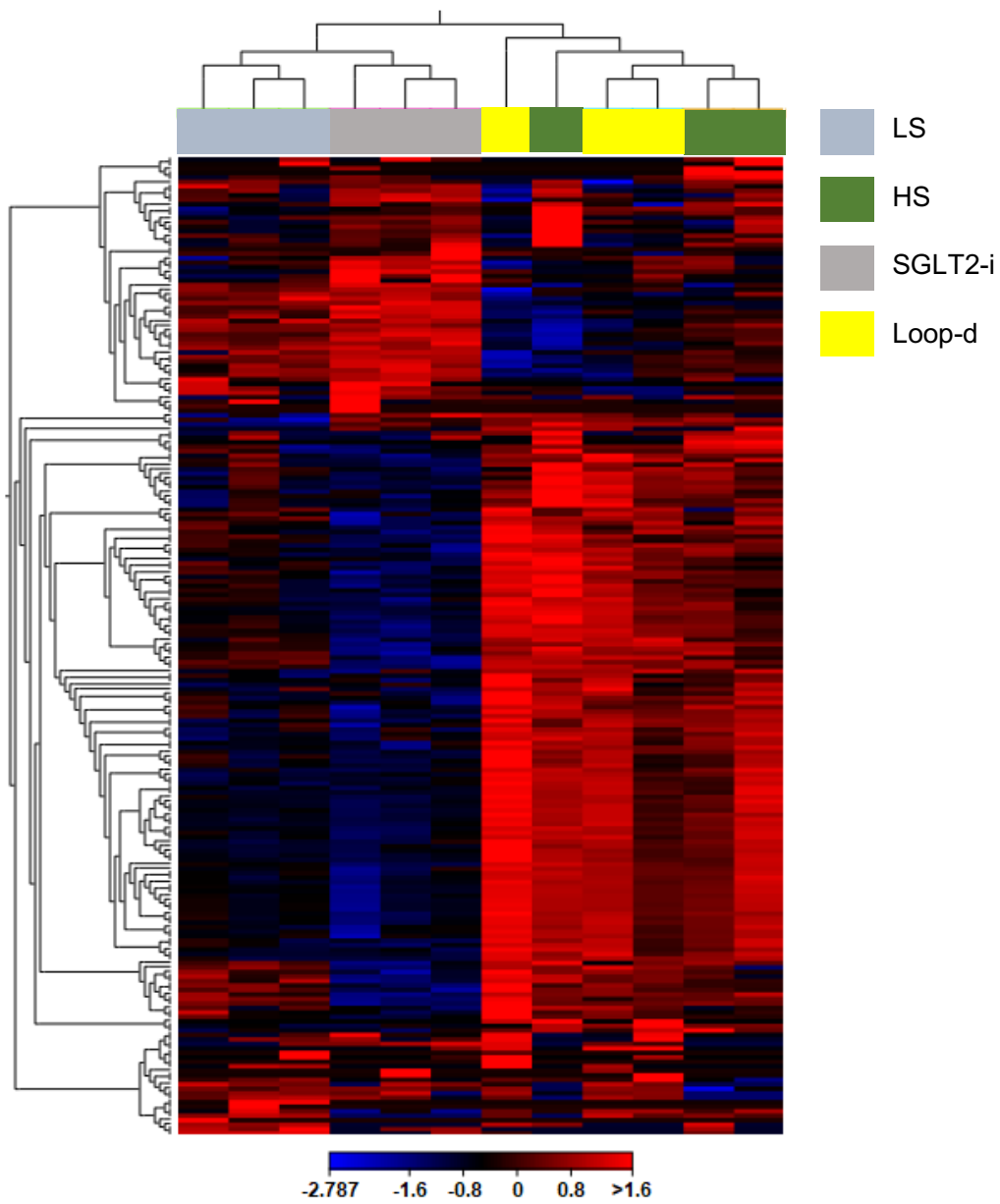


図 15 高血圧性心不全モデルラットにおける左心室遺伝子発現ヒートマップ  
 RNA シーケンスから特定された、4 群間で発現された左心室の遺伝子ヒート  
 マップ.

表 1 18 週齢における臓器重量および血行動態

	LS (n=7)	HS (n=6)	SGLT2-i (n=6)	Loop-d (n=5)	<i>p</i> -value
Weight, g	361.0 ± 5.7	325.2 ± 10.1*	323.1 ± 8.7*	330.3 ± 10.1	0.011
LV/BW, g/kg	2.6 ± 0.1	4.0 ± 0.3*	3.4 ± 0.1*	4.0 ± 0.3*	<0.001
Lung/BW, g/kg	4.4 ± 0.1	5.1 ± 0.4	4.4 ± 0.1	4.7 ± 0.2	0.074
Kidney/BW, g/kg	7.4 ± 0.2	11.6 ± 0.7*	11.7 ± 0.3*	10.9 ± 0.2*	<0.001
Hemodynamics					
sBP, mmHg	152.0±3.2	210.5±9.0*	196.7±10.1*	217.3±6.5*	<0.001
dBp, mmHg	103.3±3.1	152.2±8.4*	137.9±10.3*	154.9±7.5*	<0.001
HR, bpm	336.8±10.2	398.4±26.5	384.0±10.9	396.2±13.8	0.4978

表記は、平均値 ± 標準誤差とする。

LS, low-salt diet; HS, high-salt diet; SGLT2-i, sodium glucose co-transporter 2 inhibitor; Loop-d, loop diuretics; LV, left ventricular; BW, body weight; sBP, systolic blood pressure; dBp, diastolic blood pressure; HR, heart rate

\*: versus LS  $p < 0.05$ , *p*-value は 4 群間の分散分析結果を示す。

対照群とのそれぞれの 2 群間の差は Dunnett' test を用いて評価した。

表 2 18 週齢における血清学的及び尿検体評価

	LS (n=7)	HS (n=6)	SGLT2-i (n=6)	Loop-d (n=5)	p-value
Serum parameters					
Sodium, mEq/l	147.0±0.6	139.5±4.2	144.2±0.5	145.4±2.0	0.14
Cre, mg/dl	0.43±0.08	0.51±0.05	0.44±0.05	0.61±0.07	0.06
IL-6, pg/ml	32.4±1.7	30.0±1.5	38.5±5.7	37.6±4.7	0.33
TNF- $\alpha$ , pg/ml	5.71±2.14	6.71±0.87	4.82±1.04	7.68±1.58	0.64
Urine parameters					
UV, ml/day	15.9±2.1	76.8±9.2*	104.3±16.2*	59.4±9.9*	<0.001
Alb · Cre, mg/g	498±89	6057±1403*	3819±537*	3253±390	<0.001
Sodium, mEq/day	0.4±1.8	20.5±1.9*	22.7±1.9*	12.4±2.1*	<0.001
CCR, mg/min/kg	6.2±0.4	6.8±0.9	8.7±0.9	5.5±0.6	0.036
L-FABP, ng/mgCr	1.69±0.17	51.2±15.3*	35.7±17.1	28.6±9.8	0.046

表記は、平均値±標準誤差とする。

Cre; creatinine, IL-6; interleukin 6, TNF- $\alpha$ ; tumor necrotic factor alpha, UV; urinary volume, Alb; albumin, CCR; creatinine clearance, L-FABP; liver fatty acid binding protein

\*: versus LS p<0.05, p-value は 4 群間の分散分析結果を示す。

対照群とのそれぞれの 2 群間の差は Dunnett' test を用いて評価した。

表 3 18 週齢における心エコー図評価

	LS(n=7)	HS(n=6)	SGLT2-i(n=6)	Loop-d(n=5)	p-value
LVDd, mm	7.2±0.1	7.5±0.4	7.8±0.1	8.0±0.3	0.1882
LVDs, mm	4.8±0.1	5.6±0.3*	5.6±0.2*	5.8±0.2*	0.0129
IVSTd, mm	1.8±0.1	2.6±0.1*	2.1±0.1†	2.4±0.1*	0.0002
PWTd, mm	2.0±0.1	2.5±0.1*	2.1±0.1†	2.4±0.1*	0.0014
LVEF, %	61.1±1.1	46.2±2.6*	52.8±3.9	52.1±1.1	<0.001
LV mass, mg	1024.3±47.9	1609.5±45.1*	1326.2±42.4*†	1658.8±43.6*	<0.001
LV-GLS, %	-22.4±1.3	-16.2±0.7*	-22.3±1.6†	-16.2±0.7*	0.0006

表記は、平均値±標準誤差とする。

LVDd; diastolic left ventricular diameter, LVDs; systolic left ventricular diameter, IVSTd; diastolic intraventricular thickness, PWTd; diastolic posterior wall thickness, LVEF; left ventricular ejection fraction, LV-GLS; left ventricular global longitudinal strain

\*: versus LS p<0.05, †: versus HS p<0.05, p-value は 4 群間の分散分析結果を示す。

対照群とのそれぞれの 2 群間の差は Dunnett' test を用いて評価した。



表 4 左室線維化および左室機能障害の関連遺伝子

	Fold-change	FDR p-value
<i>ALAS2</i>	-5.73	<0.001
<i>NCOA4</i>	-1.94	<0.001
<i>CILP</i>	-2.44	0.007
<i>LTBP2</i>	-5.23	<0.001
<i>GPNMB</i>	-1.70	0.002
<i>NCAM1</i>	-2.43	<0.001
<i>Comp</i>	-4.85	0.037
<i>NPPA</i>	-2.61	0.002
<i>NPPB</i>	-1.75	0.002

左室線維化と左室機能障害に関連する 9 つの遺伝子が, HS 群と比較して SGLT2-i 群で抑制されていた.

## 引用論文

1. Shimokawa H, Miura M, Nochioka K, et al. Heart failure as a general pandemic in Asia. *Eur J Heart Fail.* 2015; **17**: 884-892.
2. Shiba N, Shinozaki T, Koseki Y, et al. Analysis of chronic heart failure registry in the Tohoku district. *Circ J.* 2004; **68**: 427-434.
3. Tsutsui H, Tsuchihashi-Makaya M, Kinugawa S, et al. Clinical characteristics and outcome of hospitalized patients with heart failure in Japan. *Circ J.* 2006; **70**: 1617-1623.
4. Tsuchihara-Makaya M, Hamaguchi S, Kinugawa S, et al. Characteristics and outcomes of hospitalized patients with heart failure and reduced vs preserved ejection fraction. Report from the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). *Circ J.* 2009; **73**: 1893-1900.
5. Damman K, Valente MA, Voors AA, et al. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: an updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014; **35**: 455-469.
6. Hillge HL, Girbes AR, Kam PJ, et al. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2000; **102**: 203-210.
7. Dries DL, Exner DV, Domanski MJ, et al. The prognostic implication of renal

insufficiency in asymptomatic and symptomatic patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2000; **35**: 681-689.

8. Smilde TDJ, Hillege HL, Navis G, et al. Impaired renal function in patients with ischemic and nonischemic chronic heart failure: association with neurohormonal activation and survival. *Am Heart J.* 2004; **148**: 165-172.

9. Oka T, Hamano T, Ohtani T, et al. Variability in estimated glomerular filtration rate and patients' outcomes in a real-world heart failure population. *ESC Heart Fail.* 2021; **8**: 4976-4987.

10. Ueda T, Kawakami R, Sugawara Y, et al. Worsening of renal function during 1 year after hospital discharge is a strong and independent predictor of all-cause mortality in acute decompensated heart failure. *J Am Heart Assoc.* 2014; **3**: e001174.

11. Bagshaw SM, Cruz DN, Aspromonte N, et al. Epidemiology of cardio-renal syndromes: workgroup statements from the 7th ADQI consensus conference. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; **25**: 1406-1416.

12. Ronco C, McCullough PA, Bellomo R, et al. Cardiorenal syndromes: an executive summary from the consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). *Contrib Nephrol.* 2010; **165**: 54-67.

13. Damman K, van Deursen VM, Navis G, et al. Increased central venous pressure is

associated with impaired renal function and mortality in a broad spectrum of patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009; **53**: 582-588.

14. Mullens W, Abrahams Z, Francis GS, et al. Importance of venous congestion for worsening of renal function in advanced decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009; **53**: 589-596.

15. Komuro K, Seo Y, Yamamoto M, et al. Assessment of renal perfusion impairment in a rat model of acute renal congestion using contrast-enhanced ultrasonography. *Heart Vessels.* 2018; **33**: 434-440.

16. Chiba H, Seo Y, Sai S, et al. Renoprotective effects of tolvaptan in hypertensive heart failure rats depend on renal decongestion. *Hypertension Research.* 2019; **42**: 319-328.

17. Winton F. The influence of venous pressure on the isolated mammalian kidney. *J Physiol.* 1931; **72**: 49-61.

18. Burnett JC Jr, Knox FG. Renal interstitial pressure and sodium excretion during renal vein congestion. *Am J Physiol.* 1980; **238**: 279-282.

19. Firth JD, Raine AE, Ledingham JG. Raised venous pressure: a direct cause of renal sodium retention in oedema? *Lancet.* 1988; **1**: 1033-1035.

20. Shimada S, Hirose T, Takahashi C, et al. Pathophysiological and molecular

mechanisms involved in renal congestion in a novel rat model. *Sci Rep.* 2018; **8**: 16808.

21. Mori T, Ohsaki Y, Oba-Yabana I, et al. Diuretics usage for protection against end-organ damage in liver cirrhosis and heart failure. *Hepatol Res.* 2017; **47**: 11-22.

22. Vanhoutte P, Leusen I. The reactivity of isolated venous preparations to electrical stimulation. *Pflunger Arch.* 1969; **306**: 341-353.

23. Iida N, Seo Y, Sai S, et al. Clinical implications of intrarenal hemodynamic evaluation by Doppler ultrasonography in heart failure. *JACC Heart Fail.* 2016; **4**: 674-682.

24. Yamamoto M, Seo Y, Iida N, et al. Prognostic impact of changes in intrarenal venous flow pattern in patients with heart failure. *J Card Fail.* 2021; **27**: 20-28.

25. Masuda T, Murakami T, Igarashi Y, et al. Dual impact of tolvaptan on intracellular and extracellular water in chronic kidney disease patients with fluid retention. *Inter Med.* 2015; **55**: 2759-2769.

26. Ohara K, Masuda T, Murakami T, et al. Effects of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor dapagliflozin on fluid distribution: a comparison study with furosemide and tolvaptan. *Nephrology.* 2019; **24**: 904-911.

27. Yamada T, Ueyama H, Chopra N, et al. Systematic review of the association between worsening renal function and mortality in patients with acute decompensated

heart failure. *Kidney Int Rep.* 2020; **5**: 1486-1494.

28. Hallow KM, Helmlinger G, Greasley PJ, et al. Why do SGLT2 inhibitors reduce heart failure hospitalization? A differential volume regulation hypothesis. *Diabetes Obes Metab.* 2018; **20**: 479-487.

29. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2015; **373**: 2117-2128.

30. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2017; **377**: 644-657.

31. Wiviott SD, Raz I, Bonaca MP, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2019; **380**: 347-357.

32. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, et al. Dapagliflozin in patient with heart failure and reduced ejection fraction. *N Engl J Med.* 2019; **381**: 1995-2008.

33. Packer M, Anker SD, Butler J, et al. Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure. *N Engl J Med.* 2020; **383**: 1413-1424.

34. Anker SD, Bulter J, Filippatos G, et al. Empagliflozin in heart failure with a preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2021; **385**: 1451-1461.

35. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, et al. Empagliflozin and progression of kidney disease in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2016; **375**: 323-334.

36. Jhund PS, Solomon SD, Docherty KF, et al. Efficacy of dapagliflozin on renal function and outcomes in patients with heart failure with reduced ejection fraction: results of DAPA-HF. *Circulation*. 2021; **143**: 298-309.
37. Verma S, Mazer CD, Yan AT, et al. Effect of empagliflozin on left ventricular mass in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: the EMPA-HEART cardioliNK-6 randomized clinical trial. *Circulation*. 2019; **140**: 1693-1702.
38. Lee MMY, Brooksbank KJM, Wetherall K, et al. Effect of empagliflozin on left ventricular volumes in patients with type 2 diabetes, or prediabetes, and heart failure with reduced ejection fraction (SUGAR-DM-HF). *Circulation*. 2021; **143**: 516-525.
39. Hayakawa H, Coffee K, Raji L. Endothelial dysfunction and cardiorenal injury in experimental salt-sensitive hypertension-effects of antihypertensive therapy. *Circulation*. 1997; **96**: 2407-2413.
40. Klotz S, Hay I, Zhang G, et al. Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats – focus on heart failure with preserved ejection fraction. *Hypertension*. 2006; **47**: 901-911.
41. Hung BS, White RA, Bi L, et al. Central infusion of aliskiren prevents sympathetic hyperactivity and hypertension in Dahl salt-sensitive rats on high salt intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012; **302**: R825-R832.

42. Kim S, Yoshiyama M, Izumi Y, et al. Effects of combination of ACE inhibitor and receptor blocker on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure. *Circulation*. 2001; **103**: 148-154.
43. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015; **28**: 1-39. e14.
44. Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, et al. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence or absence of asynergy. *Am J Cardiol*. 1976; **37**: 7-11.
45. Shirwany A, Weber KT. Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006; **48**: 97-98.
46. Civitarese RA, Talior-Volodarsky I, Desjardins JF, et al. The  $\alpha$ 11 integrin mediates fibroblast- extracellular matrix– cardiomyocyte interactions in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; **311**: H96-H106.
47. Mori T, Polichnowski A, Glocka P, et al. High perfusion pressure accelerates renal injury in salt-sensitive hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2008; **19**: 1472-82.
48. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for



digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 2017; **7**: 16878.

49. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med.* 2011; **365**: 2398 – 2411.

50. Freedman BI, Iskandar SS, Appel RG. The link between hypertension and nephrosclerosis. *Am J Kidney Dis.* 1995; **25**: 207-21.

51. Sawicki KT, Shang M, Wu R, et al. Increased heme levels in the heart lead to exacerbated ischemic injury. *J Am Heart Assoc.* 2015; **4**: e002272.

52. Tang M, Huang Z, Luo X, et al. Ferritinophagy activation and sideroflexin1-dependent mitochondria iron overload is involved in apelin-13-induced cardiomyocytes hypertrophy. *Free Radic Biol Med.* 2019; **134**: 445-457.

53. Park S, Ranjbarvaziri S, Zhao P, et al. Cardiac fibrosis is associated with decreased circulating levels of full-length CILP in heart failure. *JACC: Basic Transl Sci.* 2020; **5**: 432-443.

54. Järve A, Mühlstedt S, Qadri F, et al. Adverse left ventricular remodeling by glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B in myocardial infarction. *FASEB J.* 2017; **31**: 556-568.

55. Ackermann MA, Petrosino JM, Manring HR, et al. TGF-1 $\beta$  affects cell-cell adhesion in the heart in an NCAM1-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;

**112:** 49-57.

56. Shimizu K, Kurosawa T, Sanjo T, et al. Solute-free versus electrolyte-free water clearance in the analysis of osmoregulation. *Nephron*. 2002; **91**: 51-57.

57. Lindner G, Schwarz C, Funk GC. Osmotic diuresis due to urea as the cause of hypernatraemia in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; **27**: 962-967.

58. Mori T, Cowley AW Jr. Role of pressure in angiotensin II-induced renal injury: chronic servo-control of renal perfusion pressure in rats. *Hypertension* 2004; **43**: 752-759.

59. Abdallah JG, Schrier RW, Edelstein C, et al. Loop diuretic infusion increases thiazide-sensitive Na(+)/Cl(-)-cotransporter abundance: role of aldosterone. *J Am Soc Nephrol*. 2001; **12**: 1335-1341.

60. Cowley AW, Roman RJ, Fenoy FJ, et al. Effect of renal medullary circulation on arterial pressure. *J Hypertens Suppl*. 1992; **10**: S187-S193.

61. Biegus J, Zymlíński R, Sokolski M, et al. Serial assessment of spot urine sodium predicts effectiveness of decongestion and outcome in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2019; **21**: 624-633.

62. Komuro K, Shimazu K, Koizumi T, et al. Demonstration of improved renal congestion after heart failure treatment on renal perfusion imaging with contrast-

enhanced ultrasonography. *Circ Rep.* 2019; **1**: 593-600.

63. Mougnot D, Laforest S, Drolet G. Challenged sodium balance and expression of angiotensin type 1A receptor mRNA in the hypothalamus of Wistar and Dahl rat strains. *Regul Pept.* 2007; **142**: 44-51.

64. Ho KL, Karwi QG, Wagg C, et al. Ketones can become the major fuel source for the heart but do not increase cardiac efficiency. *Cardiovasc Res.* 2021; **117**: 1178-1187.

65. Nielsen R, Moller N, Gormsen LC, et al. Cardiovascular effects of treatment with the ketone body 3-hydroxybutyrate in chronic heart failure patients. *Circulation.* 2019; **139**: 2129-2141.

66. Verma S, Rawat S, Ho KL, et al. Empagliflozin increases cardiac energy production in diabetes: Novel translation insights into the heart failure benefits of SGLT2 inhibitors. *JACC: Basic Transl Sci.* 2018; **3**: 575-587.

67. Ferrannini E, Mark M, Mayoux E. CV protection in the EMPA-REG OUTCOME trial: a “Thrifty Substrate” hypothesis. *Diabetes Care.* 2016; **39**: 1108-1114.

68. Santos-Gallego CG, Requena-Ibanez JA, San Antonio R, et al. Empagliflozin ameliorates adverse left ventricular remodeling in nondiabetic heart failure by enhancing myocardial energetics. *J Am Coll Cardiol.* 2019; **73**: 1931-1944.

69. Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy

to support cardiac function. *Circ Res.* 2004; **95**: 135-45.

70. Ferrannini E, Baldi S, Frascerra S, et al. Shift to fatty substrate utilization in response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in subjects without diabetes and patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2016; **65**: 1190-1195.

71. Kimura T, Nakamura K, Miyoshi T, et al. Inhibitory effects of Tofogliflozin on cardiac hypertrophy in Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats sed a High-Fat diet. *Int Heart J* 2019; **60**: 728-735.

72. Hatanaka T, Ogawa D, Tachibana H, et al. Inhibition of SGLT2 alleviates diabetic nephropathy by suppressing high glucose-induced oxidative stress in type 1 diabetic mice. *Pharmacol Res Perspect.* 2016; **30**: e00239.

73. Oshima H, Miki T, Kuno A, et al. Empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, reduced after acute myocardial infarction with modification of cardiac metabolism and antioxidants in diabetes rats. *J Pharmacol Ther.* 2019; **368**: 524-534.

74. Ramratnam M, Sharma RK, D'Auria S, et al. Transgenic knockdown of cardiac sodium/glucose cotransporter 1 (SGLT1) attenuates PRKAG2 cardiomyopathy, whereas transgenic overexpression of cardiac SGLT1 causes pathologic hypertrophy and dysfunction in mice. *J Am Heart Assoc.* 2014; **3**: e000899.

75. Di Franco A, Cantini G, Raimondi L, et al. Sodium-dependent glucose transporter

(SGLT) in human ischemic heart: a new potential pharmacological target. *Int J Cardiol.* 2017; **243**: 86-90.

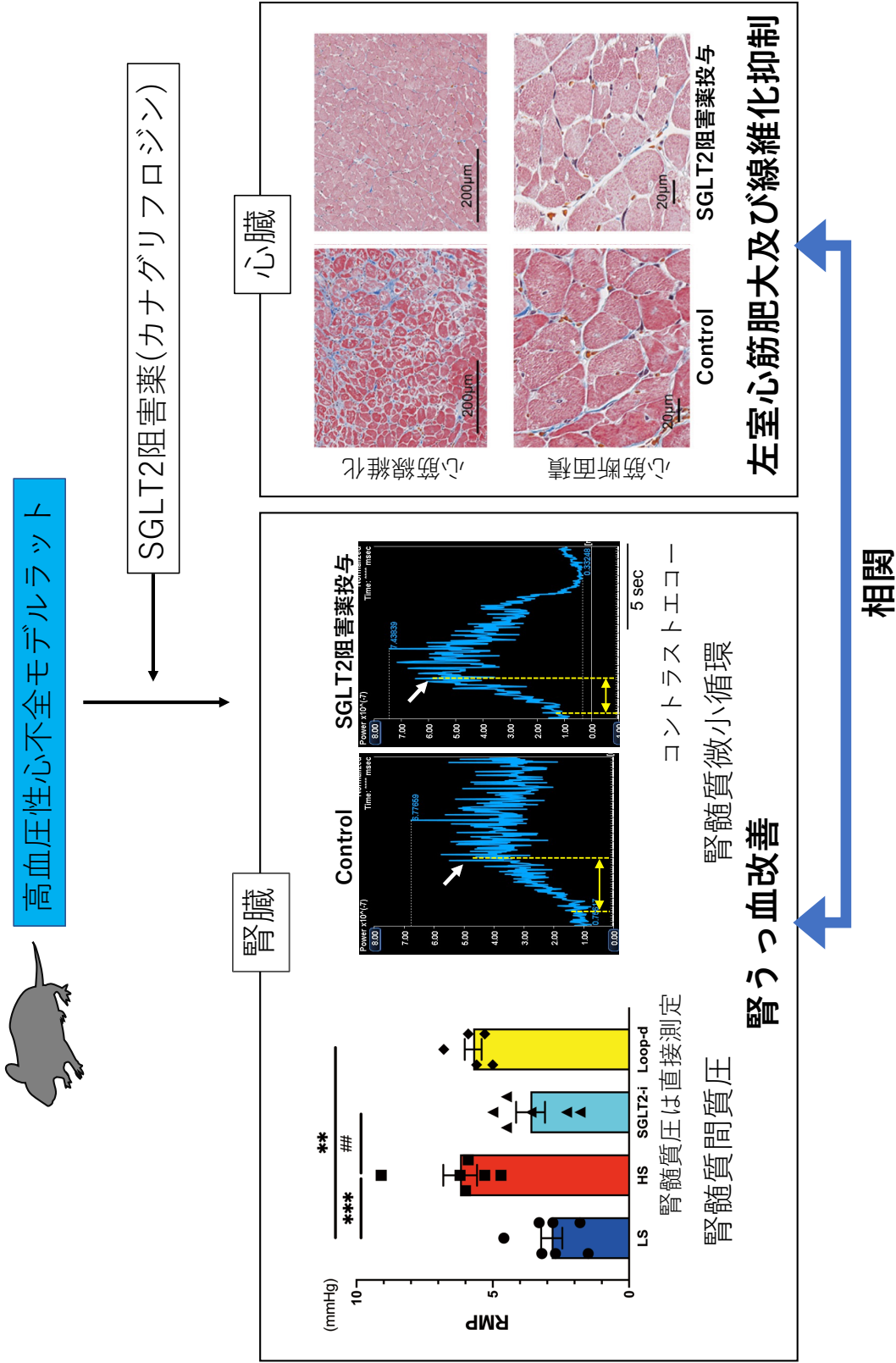
76. Ohgaki R, Wei L, Yamada K, et al. Interaction of the sodium/glucose Cotransporter (SGLT) 2 inhibitor canagliflozin with SGLT1 and SGLT2: inhibition kinetics, sidedness of action, and transporter-associated Incorporation accounting for its pharmacodynamic and pharmacokinetic features. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016; **358**: 94-102.

77. Satou R, Cypress MW, Woods TC, et al. Blockade of sodium-glucose cotransporter 2 suppresses high glucose-induced angiotensinogen augmentation in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020; **318**: F67-F75.

78. Zhang N, Feng B, Ma X, et al. Dapagliflozin improves left ventricular remodeling and aorta sympathetic tone in a pig model of heart failure with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Diabetol.* 2019; **18**: 107.

79. Matthews VB, Elliot RH, Rudnicka C, et al. Role of the sympathetic nervous system in regulation of the sodium glucose cotransporter 2. *J Hypertensions.* 2017; **35**: 2059-2068.

要約図



## 謝辞

本研究を進めるにあたり，ご指導とご鞭撻を賜りました筑波大学医学医療系循環器内科准教授 石津智子先生に心より御礼申し上げます。

研究の進行において，多岐にわたってご協力いただきました筑波大学大学院フロンティア医科学学位プログラム(修士) 大内真澄さん，腎臓病理における実験方法，解析方法についての的確なご指導，ご助言をいただき，多大な貢献を頂きました筑波大学医学医療系実験病理学 川西邦夫先生に深く感謝申し上げます。

研究活動の全域に渡って，大変お世話になりました，筑波大学医学医療系循環器内科教授 家田真樹先生をはじめとする筑波大学循環器内科の先生方および大学院生・スタッフの皆様にご心より感謝申し上げます。

最後に，大学院生活を公私にわたって支えてくださった皆様にご心から感謝の意を捧げます。