







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第710号	氏名	高野正幸
審査委員会委員	主査氏名	山岡吉生 	
	副査氏名	緒方正男 	
	副査氏名	木野賢一 	
<p>論文題目                  Empagliflozin suppresses the differentiation/maturation of human epicardial preadipocytes and improves paracrine secretome profile                  (Empagliflozin による心外膜脂肪前駆細胞の分化/成熟抑制と傍分泌効果の改善)</p> <p>論文掲載雑誌名                  Journals of the American College of Cardiology (JACC): Basic to Translational Science</p> <p>論文要旨  <b>【背景と目的】</b>心外膜脂肪組織(Epicardial adipose tissue:EAT)は心臓に直接付着する内臓脂肪の一種であり、内分泌機能として炎症性サイトカインを放出し、隣接する心筋の収縮能低下や線維化を惹起する可能性が報告されている。近年、大規模臨床試験によって SGLT2 阻害薬の心不全に対する有効性が認められるようになったが、その理由の一つに EAT の抑制が推測されており、実際に同薬投与患者では EAT の量が有意に減少することも知られている。しかし、現在までこの EAT に関連する心保護効果の詳細な機序は明らかになっておらず、我々は脂肪細胞の分化/成熟メカニズムに焦点を当て、今回、SGLT2 阻害薬が EAT に与える影響について研究を行った。</p> <p><b>【方法】</b>現在、当講座では当院心臓血管外科と共同で開胸手術患者の余剰な EAT を保存するバイオバンク計画に取り組んでいる。我々はまず最初に SGLT2 分子が脂肪組織の間質に存在する間葉系幹細胞(=脂肪前駆細胞)で発現しており、脂肪細胞への分化に伴ってその発現量が減少することを見出した。この点に着目し、EAT 検体から抽出した脂肪前駆細胞を SGLT2 阻害薬投与下に分化させ、実験を行った(n=92)。評価として脂肪滴形成と脂肪関連遺伝子、および炎症性サイトカインの発現変動をそれぞれ定量的に測定した。また、IPS 細胞由来心筋細胞との共培養システムを用いることで、心筋側へ与える酸化ストレスを観察した。さらに SGLT2 阻害薬内服患者とそれ以外の糖尿病治療薬(主に DPP4 阻害薬)内服患者で EAT 中の炎症性サイトカイン発現量を比較し、その高低によって心不全マーカーである血中 NT-proBNP に差が生じているのかを検証した。</p> <p><b>【結果】</b>Empagliflozin(0μM:コントロール・10μM・100μM)を投与しながら脂肪前駆細胞に分化誘導行くと、初期～後期の脂肪分化に関わる PPARγ や CABPA の発現に影響は無かったが、脂肪成熟マーカーである FABP4 は発現が低下し、形成される脂肪滴の量も減少した。また、いくつかの炎症性サイトカイン遺伝子についても抑制が見受けられ、共培養実験では傍分泌効果を介して与える心筋細胞の酸化ストレスが軽減される結果となった。さらに SGLT2 阻害薬内服患者では非内服群に比べ、EAT 中の IL6 発現量が少なく、それらの患者は血中の NT-proBNP 値も上昇が抑えられていた。</p> <p><b>【結論】</b>今回、我々は SGLT2 阻害薬が脂肪前駆細胞に作用して脂肪成熟を抑制することを示した。これまでに臨床所見として報告されている EAT 量の減少効果は、脂肪組織のターンオーバーを遅延させることで生じている可能性がある。また、本研究によって SGLT2 阻害薬は脂肪細胞における炎症性を改善し、隣接する心筋の酸化ストレスを軽減させることも明らかとなった。SGLT2 阻害薬はこのような機序を介し、心保護効果を発揮しているのかも知れない。</p> <p>本研究は、Empagliflozin による心外膜脂肪前駆細胞の分化/成熟抑制と傍分泌効果の改善に関する新規性のある研究であり、審査員の合議により本存分は学位論文に値するものと判定した。</p>			

**最終試験**  
の結果の要旨  
**学力の確認**

審査区分 (課・論)	第 <b>710</b> 号	氏名	高野正幸
審査委員会委員	主査氏名	山岡 吉生	
	副査氏名	齋藤 正男	
	副査氏名	木村 賢一	

学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

**Introduction**

1. 前駆脂肪細胞における SGLT-2 の存在は既知なのか
2. 脂肪細胞における SGLT-2 の局在とその働きは。また SGLT2 は他の内臓脂肪にも存在しているのか
3. EAT が心外膜下に蓄積する機序を説明して下さい
4. EAT と心筋細胞との解剖学的関係を説明して下さい
5. EAT は CT などの画像で測定可能か
6. EAT の中で、前駆脂肪細胞の割合はどの程度か

**Materials and Methods**

7. 採取された心外膜脂肪組織について本実験での選択基準、除外基準はどのような考えのもと決定したか
8. 前駆脂肪細胞の初代培養は確立された手技か
9. EGF を添加する理由と抗生剤の添加の有無を説明してください
10. 測定に用いた患者数は適切な数と言えるか
11. サイトカインの測定に関して、マイクロアレイなどの網羅的な測定はしなかったのか
12. タイムコースなどはどのように設定したのか

**Results**

13. 実験で示されている SGLT2 阻害薬の濃度は体内で到達可能か
14. 前駆脂肪細胞からの IL-6 が心不全に決定的な影響があるような結果となっているが、そうなのか
15. 心筋細胞と前駆脂肪細胞の共培養の実験が行われているが、前駆脂肪細胞を加えない場合は心筋の酸化ストレスはどうなるか
16. 図4：アディポカインに対する直接効果に関して、分化後にも一定量の SGLT2 の発現があるのに効果がないのは何故か
17. 図7：臨床検体の AF 患者での IL-6 mRNA の上昇は EAT 内部に浸潤しているマクロファージもかなり影響しているのではないか
18. Empagliflozin の濃度に関して 10 $\mu$ M と 100 $\mu$ M では違いはなかったのか。生体では、どの程度の濃度が推測されるか
19. IL-1 と脂肪細胞の分化で興味深い結果 (Suppl Figure 6) がでていますが、推定される機序などは何か

**Discussion**

20. 心外膜脂肪組織以外においても広く内臓脂肪に対し SGLT-2 阻害薬が脂肪細胞の分化を抑制し、炎症性サイトカインを減少させる可能性は興味深い、今後の展開は
21. アディポネクチンの分泌など EAT が心筋に与えるいい影響はないのか
22. Empagliflozin と Dapagliflozin では、作用機序がかなり異なるようであるが、Dapagliflozin での機序はどの程度わかっているか

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 高野 正幸

## 論 文 題 目

**Empagliflozin suppresses the differentiation/maturation of human epicardial preadipocytes and improves paracrine secretome profile****(Empagliflozin による心外膜脂肪前駆細胞の分化/成熟抑制と傍分泌効果の改善)**

## 要 旨

**【背景と目的】**心外膜脂肪組織(Epicardial adipose tissue:EAT)は心臓に直接付着する内臓脂肪の一種であり、内分泌機能として炎症性サイトカインを放出し、隣接する心筋の収縮能低下や線維化を惹起する可能性が報告されている。近年、大規模臨床試験によって SGLT2 阻害薬の心不全に対する有効性が認められるようになったが、その理由の一つに EAT の抑制が推測されており、実際に同薬投与患者では EAT の量が有意に減少することも知られている。しかし、現在までこの EAT に関連する心保護効果の詳細な機序は明らかになっておらず、我々は脂肪細胞の分化/成熟メカニズムに焦点を当て、今回、SGLT2 阻害薬が EAT に与える影響について研究を行った。

**【方法】**現在、当講座では当院心臓血管外科と共同で開胸手術患者の余剰な EAT を保存するバイオバンク計画に取り組んでいる。我々はまず最初に SGLT2 分子が脂肪組織の間質に存在する間葉系幹細胞(=脂肪前駆細胞)で発現しており、脂肪細胞への分化に伴ってその発現量が減少することを見出した。この点に着目し、EAT 検体から抽出した脂肪前駆細胞を SGLT2 阻害薬投与下に分化させ、実験を行った(n=92)。評価として脂肪滴形成と脂肪関連遺伝子、および炎症性サイトカインの発現変動をそれぞれ定量的に測定した。また、iPS 細胞由来心筋細胞との共培養システムを用いることで、心筋側へ与える酸化ストレスを観察した。さらに SGLT2 阻害薬内服患者とそれ以外の糖尿病治療薬(主に DPP4 阻害薬)内服患者で EAT 中の炎症性サイトカイン発現量を比較し、その高低によって心不全マーカーである血中 NT-proBNP に差が生じているのかを検証した。

**【結果】** Empagliflozin(0  $\mu$  M:コントロール・10  $\mu$  M・100  $\mu$  M)を投与しながら脂肪前駆細胞に分化誘導行くと、初期～後期の脂肪分化に関わる PPAR  $\gamma$  や CABPA の発現に影響は無かったが、脂肪成熟マーカーである FABP4 は発現が低下し、形成される脂肪滴の量も減少した。また、いくつかの炎症性サイトカイン遺伝子についても抑制が見受けられ、共培養実験では傍分泌効果を介して与える心筋細胞の酸化ストレスが軽減される結果となった。さらに SGLT2 阻害薬内服患者では非内服群に比べ、EAT 中の IL6 発現量が少なく、それらの患者は血中の NT-proBNP 値も上昇が抑えられていた。

**【結論】** 今回、我々は SGLT2 阻害薬が脂肪前駆細胞に作用して脂肪成熟を抑制することを示した。これまでに臨床所見として報告されている EAT 量の減少効果は、脂肪組織のターンオーバーを遅延させることで生じている可能性がある。また、本研究によって SGLT2 阻害薬は脂肪細胞における炎症性を改善し、隣接する心筋の酸化ストレスを軽減させることも明らかとなった。SGLT2 阻害薬はこのような機序を介し、心保護効果を発揮しているのかも知れない。