

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09081

研究課題名(和文)代謝制御機構解析に基づく新たな心不全治療戦略の構築

研究課題名(英文) Establishment of a novel therapeutic strategy for heart failure based on an understanding of metabolic regulation

研究代表者

田中 秀和 (Tanaka, Hidekazu)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：20590342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1) 心房中隔欠損症患者の血中代謝物プロファイルを解析したところ、血行動態を反映してヒドロキシ酪酸( $\beta$ -OHB)および2-アミノ酪酸(2-AB)が上昇していた。ケトン体の一つであるOHBは酸化ストレスに対し心保護的に作用することを明らかにした。2-ABは不全心のグルタチオン代謝と密接に関連することがわかった。2) 左室駆出率が保持された心不全(HFpEF)の病態は極めて複雑であるが、糖尿病と肥満は病態を増悪させる重要な因子であることが知られている。糖尿病患者では肥満が左室長軸方向の収縮能ならびに左室拡張能により大きく影響していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1) A comprehensive quantification of serum metabolites in patients with atrial septal defect revealed that circulating levels of  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -OHB) and 2-aminobutyric acid (2-AB) reflected hemodynamic changes. We found that  $\beta$ -OHB exert cardioprotective effects against oxidative stress. We also revealed that 2-AB modulates glutathione homeostasis. 2) Coexistence of left ventricular (LV) longitudinal myocardial systolic dysfunction with LV diastolic dysfunction could lead to heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). Diabetes mellitus (DM) is known as a significant factor associated with HFpEF. We revealed the impact of overweight on LV longitudinal myocardial systolic function in patients with type II DM.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 メタボローム解析 ヒドロキシ酪酸 2-アミノ酪酸 グルタチオン 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

高齢化及び虚血性心疾患の増加に伴い、我が国においても他の先進国同様、心不全が死因に占める比率は増加の一途である。心不全は不可逆的に進行するため、いかに早くその発症を予知し、タイミングを逸さずに介入していくかが循環器領域において非常に重要な課題である。つまり低侵襲的で、簡便な早期に心不全を予知するマーカーの確立は疾病対策のみならず、医療経済の観点からも非常にニーズの高い課題である。

2. 研究の目的

近年、計測分析機器の飛躍的な発展により細胞内の代謝変化を網羅的に解析することが可能となり、従来の概念とは異なる代謝制御機構の存在が示唆されている。さらに代謝物が生体内におけるタンパク質活性の変動を反映するだけではなく、細胞の恒常性・機能性の維持に関与することも明らかになってきている。本研究では心筋に不可逆性変化が生じる前段階でのストレスを反映する代謝物を探索する。さらに、心不全における代謝調節機構を解明することで先制医療のための新たな戦略の構築を目指す。

3. 研究の方法

心不全の診断・治療法開発にブレイクスルーをもたらすことを目的に、メタボローム解析を用いて心不全における血中低分子代謝物のプロファイリングを行い、その情報に基づいて疾患制御標的分子の同定を試みる。

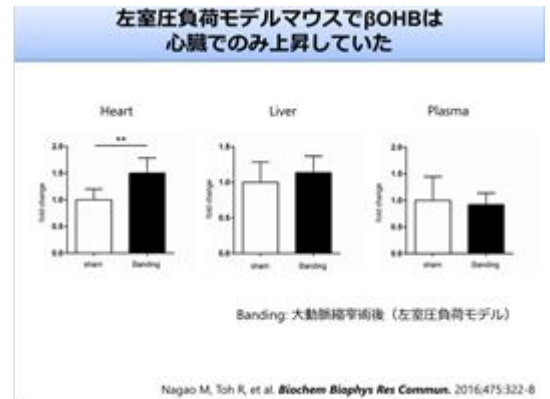
4. 研究成果

ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて心房中隔欠損症患者の血中代謝物プロファイルを解析したところ、血行動態を反映してヒドロキシ酪酸 (OHB) および 2-アミノ酪酸 (2-AB) が変化していたことに着目し、心不全における両者の役割について解明した。

a) ケトン体は糖が枯渇した際に主に脳や骨格筋、心筋で代替エネルギー源となる。心不全では血中や呼気中のケトン体濃度が上昇することがこれまでに報告されていた。その機序のひとつとして交感神経の活性化に伴い、脂肪分解が促進し、その結果として肝臓でのケトン体産生が亢進するためと考えられている。一方、近年、ケトン体のひとつである OHB は代替エネルギーとしてだけではなく、HDAC 阻害作用を有し、抗酸化作用などの生理作用を発揮することが報告されている。

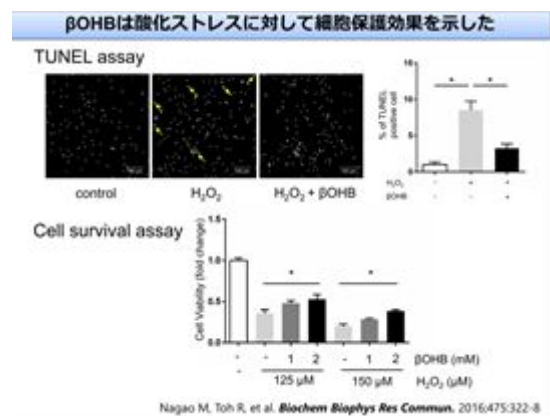
大動脈縮窄による圧負荷モデル・マウスを用い、血中の OHB 濃度を測定したところ、予想に反し上昇を認めなかった。さらに肝臓の OHB 濃度も増加を認めていなかった。一方で、心臓の OHB 濃度は上昇しており、肝臓でのケトン体産生の亢進が起こる前より心

臓での濃度上昇が起こりうることを示唆された。そこでラット新生児の心臓より初代培養した細胞を用いて検討したところ、過酸化水素刺激により心筋細胞では OHB 濃度が上昇するが、非心筋細胞では変化しないことを明らかにした。



血中より OHB が供給されないにもかかわらず、心臓で OHB 濃度が上昇する機序について不全心モデルの心臓組織を用いて検討を行った。ケトン体の肝外利用に重要な酵素であるサクシニル-CoA : 3-ケト酸 (SCOT) について検討したところ、不全心では発現が低下しており、不全心ではケトン体の利用が抑制されることで OHB が蓄積する可能性が示唆された。

不全心における OHB の病態生理的役割について検討した。培養心筋細胞に OHB を添加したところ、過酸化水素刺激による活性酸素種の産生が抑制されることを確認した。さらに過酸化水素刺激による心筋細胞のアポトーシスも抑制することを明らかにした。



b) 2-AB は神経伝達物質として知られる GABA の構造異性体であるが、これまでにグルタミン合成の際に同時に産生されるオフタルミン酸の基質であることが報告されていたのみであり、2-AB 自体の代謝や生理作用についてはまったくわかっていなかった。生体内での 2-AB の代謝について検討したところ、グルタミンの構成アミノ酸の一つであるシステインがシスタチオンinから産生される際の副産物である 2-オキソ酪酸にトランスアミナーゼの触媒によりアミノ基が転移され合成されることを明らかにした。

システインのチオール基はグルタチオンによる還元的な活性酸素種の除去や、求電子的な化合物の解毒などの化学反応をつかさどり、グルタチオンの生合成においてシステインの供給が律速段階となる。過酸化水素や伸展刺激を加えた培養心筋細胞を用いて検討したところ、グルタチオンが代償性に合成が亢進すると 2-AB も増加することを明らかにした。

2-AB の生理作用を検討するにあたり、その前駆体である 2-オキソ酪酸はエステル化を要するのに対し、2-AB はそのまま細胞内に取り込まれることをまず確認した。さらに 2-AB は細胞内のグルタチオン濃度を上昇させ、酸化ストレスに保護的に作用することを発見した。また、マウスを用いた検討により 2-AB は経口投与により血中濃度を上昇させることができるとともに、血中ならびに心臓中のグルタチオン濃度を効率的に増加させ、ドキシソルピシンによる心筋障害を軽減させることを確認した。

2-アミノ酪酸によるグルタチオン代謝制御機構



- ✓ 2-アミノ酪酸はシステインが合成される際の副産物として産生され、グルタチオンの変動を鋭敏に反映する。
- ✓ 2-アミノ酪酸は細胞内のグルタチオン濃度を増加させ、酸化ストレスを軽減する

左室駆出率が保持された心不全 (HFpEF) の病態は極めて複雑であるが、糖尿病と肥満は病態を増悪させる重要な因子であることが知られている。さらに、左室長軸方向の収縮能低下は HFpEF と密接に関連していることも報告されている。しかしながら、糖尿病患者において肥満が左室長軸方向の収縮能および左室拡張能に与える影響は十分に検討されていない。

左室駆出率が保持され、虚血性心疾患が否定された糖尿病患者 206 例と年齢、性別、左室駆出率をマッチさせた健常者 82 例を対象とした。左室長軸方向の収縮能の指標として、2 次元スペクトルトラッキング法を用いて、心尖部 18 領域から global longitudinal strain (GLS) を計測した。左室拡張能の指標としては E/e' を用いた。また、body mass index  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  を肥満と定義した。

糖尿病患者では健常者と比較して、GLS は低下しており、E/e' は高値であった。糖尿病患者においては、肥満群は非肥満群と比較して有意に GLS が低下していたが ( $17.3 \pm 2.7\%$  vs.  $19.4 \pm 2.6\%$ ,  $p < 0.001$ )、健常者では肥満の有無による GLS の差は認めなかった ( $20.5 \pm 1.4\%$  vs.  $20.5 \pm 2.0\%$ ,  $p = 0.98$ )。また、糖尿病患者では肥満群は非肥満群と比較して E/e' が有意に高値であったが ( $11.1 \pm 4.2$  vs.  $9.7 \pm 3.7$ ,  $p = 0.01$ )、健常者では肥満の有無

による E/e' の差は認めなかった ( $8.3 \pm 2.1$  vs.  $8.1 \pm 2.5$ ,  $p = 0.83$ )。

糖尿病患者では健常者と比較して、肥満が左室長軸方向の収縮能ならびに左室拡張能により大きく影響していると考えられた。本研究により、糖尿病患者では血糖コントロールのみならず、肥満の厳格な是正により、HFpEF の発症を予防できる可能性が示唆された。

## 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 5 件)

1. Nagao M, Toh R, Irino Y, Mori T, Nakajima H, Hara T, Honjo T, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Hirata K. -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;475:322-8.

2. Irino Y, Toh R, Nagao M, Mori T, Honjo T, Shinohara M, Tsuda S, Nakajima H, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Miyata O, Hirata KI. 2-Aminobutyric acid modulates glutathione homeostasis in the myocardium. *Sci Rep*. 2016;6:36749.

3. Suto M, Tanaka H, Mochizuki Y, Mukai J, Takada H, Soga F, Dokuni K, Hatani Y, Hatazawa K, Matsuzoe H, Sano H, Shimoura H, Ooka J, Matsumoto K, Hirota Y, Ogawa W, Hirata KI. Impact of overweight on left ventricular function in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16:145.

4. Tanaka H, Hirata KI. Potential impact of SGLT2 inhibitors on left ventricular diastolic function in patients with diabetes mellitus. *Heart Fail Rev*. 2018;23:439-444.

5. Hatani Y, Tanaka H, Mochizuki Y, Hatazawa K, Matsuzoe H, Shimoura H, Ooka J, Sano H, Sawa T, Motoji Y, Ryo-Koriyama K, Matsumoto K, Otake H, Shinke T, Hirata KI. Left ventricular dispersion as a parameter for augmented left ventricular stroke volume in patients with atrial septal defect following transcatheter closure. *Echocardiography*. 2018;35:218-226.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takeshige Mori, Tomoyuki Honjo, Seimi

Satomi-Kobayashi, Toshiro Shinke, Hidekazu Tanaka, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata. Elevated  $\gamma$ -hydroxybutyrate due to downregulation of SCOT exerts cardioprotective effects in failing hearts. 第 80 回 日本循環器学会学術集会. 仙台. 2016 年.

2. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takeshige Mori, Tetsuya Hara, Tomoyuki Honjo, Seimi Satomi-Kobayashi, Toshiro Shinke, Hidekazu Tanaka, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata. Compensatory Accumulation of Hydroxybutyrate Accompanied by SCOT Downregulation in Failing Hearts. American Heart Association Scientific sessions 2016. ニューオリンズ(米国). 2016 年.

3. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takeshige Mori, Tetsuya Hara, Tomoyuki Honjo, Seimi Satomi-Kobayashi, Toshiro Shinke, Hidekazu Tanaka, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata. Compensatory Accumulation of Myocardial  $\gamma$ -Hydroxybutyrate Accompanied by SCOT Downregulation in Response to Oxidative Stress. 第 33 回 ISHR 日本部会総会. 東京. 2016 年.

4. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Hidekazu Tanaka, Toshiro Shinke, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata. 2-aminobutyric acid as a newly identified modulator of glutathione homeostasis in failing myocardium. 第 81 回 日本循環器学会学術集会. 金沢. 2017 年.

〔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：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
田中 秀和 (TANAKA, Hidekazu)  
神戸大学大学院医学研究科・講師  
研究者番号：20590342

(2) 研究分担者  
杜 隆嗣 (TOH, Ryuji)  
神戸大学大学院医学研究科・特命准教授  
研究者番号：50379418

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )