

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08452

研究課題名（和文）アミノ酸－核酸代謝連関の制御による心不全の新規治療開発

研究課題名（英文）Development of novel therapy for heart failure targeting the crosstalk between amino acid and nucleotide metabolism

研究代表者

神津 英至（Kouzu, Hidemichi）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60596609

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまでミトコンドリアのみに局在すると考えられていた分岐鎖アミノ酸(BCAA)の代謝律速酵素BCKDHが、心筋ではミトコンドリア外にも高発現し、さらに核酸の代謝律速酵素AMPD3によってその活性が制御されているというBCAA代謝の新しい制御機構を見出した。さらに、糖尿病心筋ではBCKDHとAMPD3の発現不均衡が生じており、糖尿病心筋のエネルギー代謝障害に寄与している可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全の病態形成において、BCAA代謝不全の関与が近年示唆されているが、その分子機構は明らかでない。本研究で見出した心筋細胞におけるBCAA代謝の新たな制御機構は、BCAA代謝を標的とした心不全の新規治療法の開発に寄与する可能性がある。高齢化社会を背景に心不全は増加の一途をたどり、治療法の限られた予後不良な疾患である。心不全の発症や重症化を予防する治療法の開発を目指した研究は、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：We discovered that BCKDH, a rate-limiting enzyme in branched-chain amino acid metabolism, localizes not only to mitochondria but also outside mitochondria in cardiomyocytes and that AMPD3, a rate-limiting enzyme in the purine nucleotide cycle, regulates its activity. Furthermore, we found that the imbalanced expression of BCKDH and AMPD3 occurs in diabetic myocardium, which may contribute to impaired energy metabolism in diabetic hearts.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 糖尿病 心筋代謝 核酸 アミノ酸 AMP deaminase

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝障害がインスリン抵抗性や心不全など心代謝疾患の発症に関与していることが明らかとなってきた(Science 2019;363:582)。不全心筋では BCAA 代謝関連酵素の発現が低下し、遺伝的 BCAA 代謝障害マウスでは心不全が誘導される(Circulation 2016;133:2038)。興味深いことに、心不全治療薬として確立した SGLT2 阻害薬は、全身のアミノ酸代謝を活性化している(Circulation 2017;136:969)。これらの結果は、BCAA 代謝が心不全の新たな治療ターゲットとなる可能性を示唆する。一方で、心筋エネルギー基質としての BCAA の寄与度は数%と低く、BCAA 代謝障害が心不全を惹起するメカニズムについては不明な点が多い。申請者らは糖尿病心筋において、核酸代謝律速酵素 AMPD deaminase 3(AMPD3)の過剰発現がアデニンヌクレオチドの分解を介して心筋エネルギー代謝障害をきたすことを報告してきた(J Mol Cell Cardiol 2015;80:136, J Mol Cell Cardiol 2018;119:138)。AMPD3 は骨格筋において、筋萎縮誘導時に発現が顕著に亢進することや(FASEB J 2004;18:39)、アミノ酸・脂肪酸代謝に寄与していることが最近明らかとなった(Nat Med 2017;23:223)。

2. 研究の目的

申請者らのこれまでの研究成績より、心筋細胞における BCAA 代謝と核酸代謝との連関に着目し、その制御異常の心不全進展への寄与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

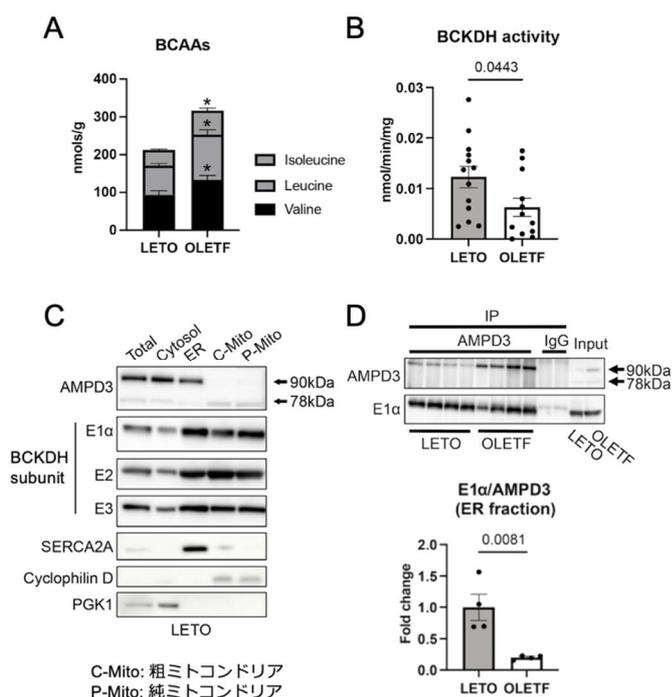
BCAA 代謝異常を合併する心不全モデルとして肥満 2 型糖尿病ラット OLETF および、正常対照ラット LETO を用いた。プロテオミクス解析にて、AMPD3 と結合する BCAA 代謝関連分子を同定し、その発現変化や AMPD3 との結合を細胞分画別にウエスタンブロットにて評価した。同定された変化が細胞エネルギー代謝へおよぼす影響を、新生ラット初代心筋細胞(NRCM)および不死化細胞株において遺伝的機能喪失および機能獲得によって再現し、in vitroにて評価した。さらに、新規心不全治療薬として近年確立した SGLT2 阻害薬が心筋アミノ酸代謝を修飾している可能性について、OLETF において心筋メタボローム解析を行い評価した。心不全症例におけるアミノ酸代謝障害の臨床意義を、血漿アミノ酸プロファイルの予後予測能により評価した。

4. 研究成果

結果 1: 糖尿病心では小胞体における AMPD3-BCKDH 結合不均衡がみられる

OLETF では心筋 BCAA が蓄積しており(図 1A)、その代謝律速酵素である BCKDH の活性は有意に低下していた(図 1B)。

我々は先行研究で、AMPD3 が BCKDH 構成タンパクと結合していることをプロテオミクス解析にて同定していた。これまで BCKDH はミトコンドリアマトリックスにのみ局在するとされていたが、細胞分画実験にて心筋では小胞体(ER)にも高発現し、AMPD3 と共局在していることを見出した(図 1C)。実際に ER 分画での免疫沈降にて、AMPD3 と BCKDH-E1 サブユニットの結合が確認された。糖尿病心では、AMPD3 の発現が亢進している一方、E1 サブユニットの発現は低下しており、AMPD3-BCKDH 結合は 80%低下していた(図 1D)。



結果 2: 心筋細胞において AMPD3 と BCKDH は相互制御の関係にある

次に、AMPD3 と BCKDH の相互作用関係を検討した。NRCM において、AMPD3 のノックダウンによって BCKDH 活性が有意に亢進したことから (図 2A)、AMPD3 は BCKDH 活性を負に制御していると考えられた。また、NRCM (図 2B) および H9c2 細胞 (図 2C) において BCKDH-E1 サブユニットをノックダウンしたところ、AMPD3 の発現上昇がみられた。以上より、心筋細胞において、AMPD3 と BCKDH は相互制御の関係にあることがわかった。NRCM (図 2D) および H9c2 細胞 (図 2E) において、AMPD3 は BCKDH-E1 および E2 サブユニットと結合していた。H9c2 細胞における E1 のノックダウンにより、OLETF 心筋で観察された AMPD3-BCKDH 結合の不均衡が再現された (図 2E)。以上の結果より、糖尿病心筋では BCKDH-E1 の発現低下により AMPD3 の発現が上昇し、BCKDH 活性のさるなる低下に寄与している可能性が示唆された。

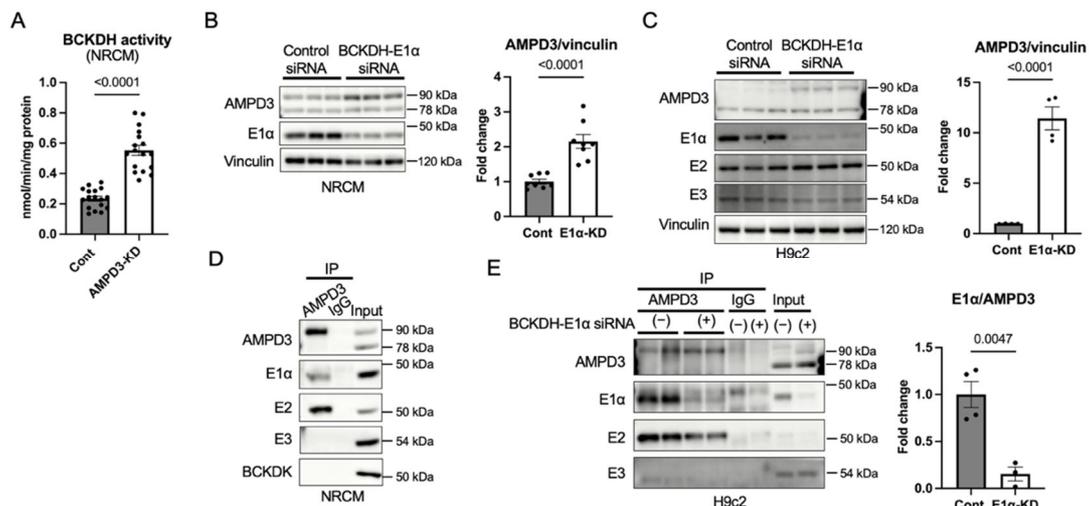


図 2

結果 3: BCAA 代謝は心筋細胞の脂肪酸およびグルコース代謝を制御する

次に、心筋細胞における BCAA 代謝の役割を、脂肪酸・グルコース代謝との関連に着目して検討した。NRCM において BCKDH-E1 をノックダウンし、オレイン酸負荷時の脂肪滴生成を蛍光染色にて評価した。コントロールでは濃度依存性に脂肪滴の合成亢進を認めたが、E1 ノックダウン細胞ではベースラインから脂肪滴が観察される一方で、オレイン酸負荷による脂肪滴増加反応は消失していた (図 3A)。さらに、脂肪酸酸化能を、細胞外フラックスアナライザーにて評価した。コントロール細胞ではパルミチン酸の添加によって有意な酸素消費量の増加がみられたが、E1 ノックダウン細胞では脂肪酸酸化が抑制されていた (図 3B)。さらに、E1 ノックダウン細胞ではインスリンによるグルコース代謝の促進反応が消失していた (図 3C)。以上より、BCAA 代謝は心筋細胞の脂肪酸貯蔵・酸化およびグルコース代謝の制御に寄与していることが示唆された。

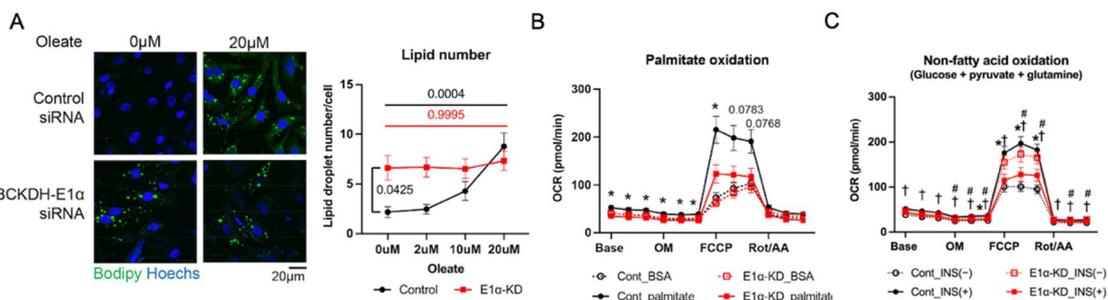


図 3

結果 4: SGLT2 阻害薬は心筋 BCAA 代謝を活性化する

SGLT2 阻害薬が心筋代謝に及ぼす効果を、エンパグリフロジンを投与した OLETF および、vehicle を投与した LETO、OLETF の 3 群で心筋メタボローム解析を行い検討した。主成分分析にて 3 群は明瞭に分離され、因子負荷量のプロットではエンパグリフロジンによって増加する代謝物の上位がアミノ酸であり、BCAA 増加の寄与度が最も高いことがわかった(図 4)。さらに、尿素サイクルの活性化を示唆する代謝物も上昇していることから、SGLT2 阻害薬によって心筋アミノ酸代謝が活性化することが示唆された。

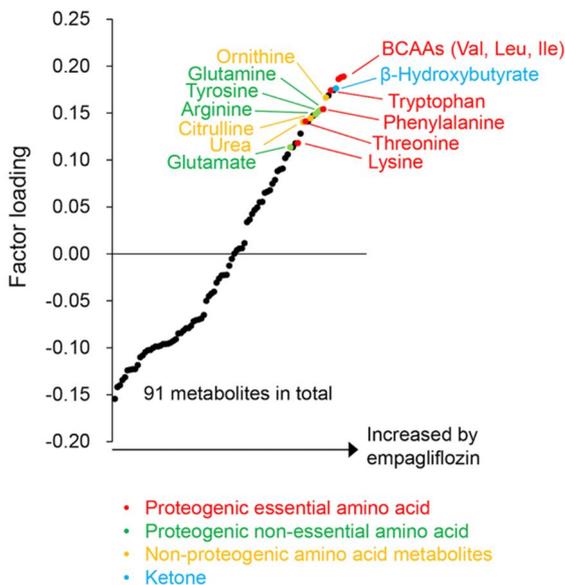


図 4

臨床研究: 血中アミノ酸プロファイルは心不全患者のリスク層別化に有用である

入院患者 301 人で血漿アミノ酸プロファイリングを行い、心不全入院・致死性不整脈もしくは総死亡で定義した予後との関連を検討した。測定した 29 のアミノ酸の中から PLS-DA による多変量解析にて、筋分解マーカーである 3-methylhistidine(3-Me-His)の上昇と BCAA バリンの低下がイベント発症と関連することを同定した(図 5A)。これらのアミノ酸プロファイルは既知の因子と独立して予後を予測し、両者の組み合わせによってリスクの層別化が可能であった(図 5B)。53 人の validation コホートでも同様の結果が確認された。

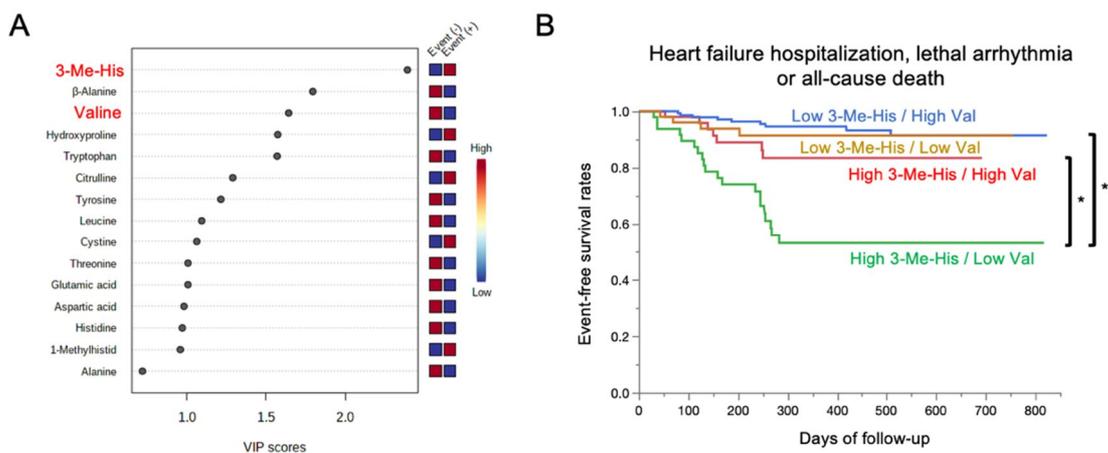


図 5

【今後の展望】

BCAA 代謝が心筋細胞の主要なエネルギー基質である脂肪酸およびグルコースの代謝制御に寄与していること、BCAA の代謝律速酵素 BCKDH の活性制御に核酸代謝酵素 AMPD3 が関与していることを見出した。糖尿病性心筋症では AMPD3-BCKDH 結合の不均衡が生じ、エネルギー基質の代謝障害およびアデニンヌクレオチド分解亢進によってエネルギー代謝障害をきたすことが示唆された。SGLT2 阻害薬による心筋代謝の変化より、アミノ酸代謝の活性化が糖尿病性心筋症の治療標的となる可能性が示唆された。臨床研究では、心不全症例において血中 BCAA バリンの低下が独立した予後規定因子であることを見出した。これらの結果は、BCAA 代謝が心不全の新たな治療標的となる可能性を示唆している。

今後は、AMPD3 を介した心筋代謝の制御が心不全発症にどのように関与しているのかについて、AMPD3 ノックアウトマウスを用いて解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ogawa T, Kouzu H, Osanami A, Tatekoshi Y, Sato T, Kuno A, Fujita Y, Ino S, Shimizu M, Toda Y, Ohwada W, Yano T, Tanno M, Miki T, Miura T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Downregulation of extramitochondrial BCKDH and its uncoupling from AMP deaminase in type 2 diabetic OLETF rat hearts.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiol Rep	6. 最初と最後の頁 e15608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15608.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Osanami A, Sato T, Toda Y, Shimizu M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ohwada W, Ogawa T, Miura T, Tanno M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Adenosine monophosphate deaminase in the endoplasmic reticulummitochondria interface promotes mitochondrial Ca ²⁺ overload in type 2 diabetes rat hearts.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 560-569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13982.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kouzu H, Katano S, Yano T, Ohori K, Nagaoka R, Inoue T, Takamura Y, Ishigo T, Watanabe A, Koyama M, Nagano N, Fujito T, Nishikawa R, Ohwada W, Miura T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Plasma amino acid profiling improves predictive accuracy of adverse events in patients with heart failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ESC Heart Fail	6. 最初と最後の頁 5054-5056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ehf2.13572.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Igaki Y, Tanno M, Sato T, Kouzu H, Ogawa T, Osanami A, Yano T, Kuno A, Miki T, Nakamura T, Miura T.	4. 巻 154
2. 論文標題 Xanthine oxidoreductase-mediated injury is amplified by upregulated AMP deaminase in type 2 diabetic rat hearts under the condition of pressure overload	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol.	6. 最初と最後の頁 21-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2021.01.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 神津 英至, 片野 峻敏, 大堀 克彦, 長岡 凌平, 沼澤 瞭, 小山 雅之, 永野 伸卓, 藤戸 健史, 大和田 渉, 佐藤 達也, 矢野 俊之
2. 発表標題 糖尿病合併心不全における血漿分枝鎖アミノ酸の規定因子と予後予測能の検討
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神津 英至, 小川 俊史, 久野 篤史, 丹野 雅也, 矢野 俊之, 三木 隆幸, 三浦 哲嗣
2. 発表標題 SGLT2阻害薬による心保護効果における飢餓代謝の役割
3. 学会等名 第26回日本心不全学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogawa T, Kouzu H, Osanami A, Shimizu M, Toda Y, Ohwada W, Sato T, Yano T, Kuno A, Tanno M, Miura T, Furuhashi M
2. 発表標題 Downregulation of BCKDH activity and uncoupling from AMP deaminase underlie substrate inflexibility in type 2 diabetic hearts
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ogawa T, Kouzu H, Osanami A, Tatekoshi Y, Oshima H, Mizuno M, Kuno A, Fujita Y, Ino S, Shimizu M, Ohwada W, Sato T, Yano T, Tanno M, Miura T.
2. 発表標題 Intracellular localization of AMP deaminase and its novel role in BCAA and lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy.
3. 学会等名 ESC congress (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T and Miura T.
2. 発表標題 AMP deaminase in mitochondria-associated ER membranes contributes to reduction of the threshold for mitochondrial permeability transition in type 2 diabetic hearts.
3. 学会等名 AHA Scientific Sessions (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T, Miura T.
2. 発表標題 The threshold for mitochondrial permeability transition is reduced by upregulated AMP deaminase in mitochondria-associated ER membranes in type 2 diabetic hearts.
3. 学会等名 第5回 日本循環器学会 基礎研究フォーラム (BCVR)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ogawa T, Kouzu H, Osanami A, Tatekoshi Y, Mizuno M, Kuno A, Fujita Y, Ino S, Shimizu M, Ohwada W, Sato T, Yano T, Miura T, Tanno M.
2. 発表標題 Novel role of AMP deaminase in cardiac branched-chain amino acid metabolism: A potential therapeutic target for diabetic cardiomyopathy.
3. 学会等名 第25回 日本心不全学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T, Miura T.
2. 発表標題 AMP deaminase in mitochondria-associated ER membranes contributes to reduction of the threshold for mitochondrial permeability transition in type 2 diabetic hearts.
3. 学会等名 CVMW2021 心血管代謝週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T, Toda Y, Miura T.
2. 発表標題 Upregulated AMP Deaminase in Mitochondria-associated ER Membranes in Diabetic Hearts Lowers the Threshold for Mitochondrial Permeability Transition
3. 学会等名 第86回 日本循環器学会 学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogawa T, Kouzu H, Osanami A, Tatekoshi Y, Kuno A, Fujita Y, Ino S, Shimizu M, Toda Y, Ohwada W, Sato T, Yano T, Miura T, Tanno M.
2. 発表標題 Novel Role of Cardiac AMP Deaminase in Extramitochondrial BCAA Metabolism: A Potential Therapeutic Target for Lipotoxicity in Diabetic Hearts
3. 学会等名 第86回 日本循環器学会 学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kouzu H, Katano S, Ohori K, Nagaoka R, Numazawa R, Koyama M, Nagano N, Fujito T, Ohwada W, Nishikawa R, Yano T
2. 発表標題 Plasma 3-methylhistidine Predicts the Impact of Renin-angiotensin System Inhibition on Skeletal Muscle Preservation in Heart Failure Patients
3. 学会等名 第86回 日本循環器学会 学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kouzu H, Katano S, Yano T, Ohori K, Honma S, Shimomura K, Inoue T, Takamura Y, Takahashi R, Nishikawa R, Nagano N, Koyama M, Fujito T, Hashimoto A, Miura T.
2. 発表標題 Plasma valine-to-glycine ratio is a novel prognostic maker for adverse events in patients with heart failure.
3. 学会等名 第84回 日本循環器学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogawa T, Kouzu H, Tatekoshi Y, Osanami A, Oshima H, Mizuno M, Kuno A, Igaki Y, Sugawara H, Fujita Y, Sato T, Yano T, Tanno M, Miki T, Miura T.
2. 発表標題 Novel regulation of cardiac branched-chain amino acid metabolism through AMP deaminase: A possible therapeutic target for diabetic cardiomyopathy.
3. 学会等名 ESC congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Igaki Y, Osanami A, Tanno M, Sato T, Ogawa T, Yano T, Kouzu H, Miura T.
2. 発表標題 Inhibition of xanthine oxidase ameliorates functional and metabolic impairment in type 2 diabetic hearts under pressure overload.
3. 学会等名 ESC congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Kuno A, Sato T, Miura T.
2. 発表標題 Distinct intracellular localization and possible functional significance of AMP deaminase in diabetic cardiomyopathy.
3. 学会等名 第4回 日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kouzu H, Katano S, Yano T, Ohori K, Honma S, Shimomura K, Inoue T, Takamura Y, Takahashi R, Nishikawa R, Nagano N, Koyama M, Fujito T, Hashimoto A, Miura T.
2. 発表標題 Prognostic role of plasma amino acid profile in patients with chronic heart failure.
3. 学会等名 第 24 回 日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osanami A, Igaki Y, Tanno M, Sato T, Kouzu H, Kuno A, Miura T.
2. 発表標題 Xanthine oxidoreductase-mediated metabolic and functional dysfunction is amplified by upregulated AMP deaminase in diabetic hearts.
3. 学会等名 第 24 回 日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogawa T, Kouzu H, Osanami A, Tatekoshi Y, Mizuno M, Kuno A, Sugawara H, Fujita Y, Ino S, Ohwada W, Sato T, Yano T, Moniwa N, Tanno M, Miura T.
2. 発表標題 Novel regulation of cardiac branched-chain amino acid metabolism through AMP deaminase: A possible therapeutic target for diabetic cardiomyopathy
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanno M, Osanami A, Kouzu H, Ogawa T, Kuno A, Miura T
2. 発表標題 Upregulated AMP Deaminase in Mitochondria-associated ER Membranes and Cytosol Distinctively Contributes to Pressure Overload-induced Cardiac Dysfunction in Diabetic Hearts
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T, Miura T
2. 発表標題 Role of AMPD3 in Mitochondria-associated ER Membranes in Regulation of Threshold for Mitochondrial Permeability Transition
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osanami A, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Yano T, Ogawa T, Sato T, Miura T
2. 発表標題 Intracellular Localization of AMP Deaminase and a Role of Cytosolic AMPD in XOR-mediated ROS Production
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

〔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	久野 篤史 (Kuno Atsushi) (30468079)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	矢野 俊之 (Yano Toshiyuki) (40444913)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

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
---------	---------