

令和 6 年 5 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：2021～2023

課題番号：21K08105

研究課題名（和文）心不全におけるグルタミン代謝制御機構の解明と新規治療戦略の構築

研究課題名（英文）Elucidation of regulatory mechanisms of glutamine metabolism in heart failure and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

小林 成美（Satomi-Kobayashi, Seimi）

神戸大学・医学部附属病院・特命准教授

研究者番号：20379415

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：グルタミノリシスはグルタミンを α -ケトグルタル酸として、TCA回路へ補充する代謝経路であり、がんに関連する様々な疾患に関与している。アンギオテンシンIIを投与したマウスの心臓組織やラット心筋細胞では、グルタミノリシスの律速酵素であるグルタミナーゼ1の発現が亢進しており、その阻害は心リモデリングを抑制することが明らかとなった。これは細胞の成長や増殖に用いられるグルタミン由来のアスパラギン酸、クエン酸の産生がグルタミナーゼ1の阻害により抑制されたためと考えた。本研究結果はグルタミン代謝経路が、心不全の新たな治療標的となる可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は心血管疾患すべての終末像であり、心不全患者数は全世界的に増加の一途をたどっている。本邦においても2040年頃まで新規心不全患者の発症数は増加することが予測され、医療経済の観点でも大きな社会問題となっている。心不全治療薬の多くは、交感神経系や液性因子を標的としたもので、代謝経路を直接的な標的とした治療薬は存在しない。このような中、本研究ではグルタミン代謝経路に着目し、その阻害が心肥大や心臓線維化を抑制することを証明した。これは全く新しい知見であり、今後新たな心不全治療薬の創薬へと繋がる意義深い研究である。

研究成果の概要（英文）：Glutamine-derived anaplerosis, also known as glutaminolysis, is strongly associated with the pathophysiology of various diseases represented by cancer. Glutaminase 1 (GLS1), a rate-limiting glutaminolysis enzyme, was increased in angiotensin II (Ang II)-induced mouse hearts and cultured rat cardiac cells, and anaplerotic glutamine flux into the tricarboxylic acid (TCA) cycle was markedly enhanced in cardiomyocytes, suggesting that glutaminolysis is activated in failing hearts. GLS1 inhibition improved Ang II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis in vitro and in vivo, possibly by reducing the production of glutamine-derived aspartate and citrate, which are used for the biosynthesis of nucleotides and lipids required for cellular growth and proliferation. The findings of the present study reveal that GLS1-mediated upregulation of glutaminolysis leads to maladaptive cardiac remodeling. Inhibiting this anaplerotic pathway could be a novel therapeutic approach for HF.

研究分野：心筋代謝

キーワード：グルタミノリシス 心筋代謝 心不全 グルタミナーゼ1 グルタミン

1. 研究開始当初の背景

心不全は虚血性心疾患・心臓弁膜症をはじめとした種々の原因によって引き起こされるポンプ不全である。高齢化や心臓病の原因となる生活習慣病の有病率の増加に伴い、我が国においても欧米諸国と同様に心不全患者は増加の一途にある。心臓は全身の中で最もエネルギー（アデノシン三リン酸;ATP）を消費する臓器であるが、心筋ミトコンドリア内におけるTCA(tricarboxylic acid)回路が主要なエネルギー産生系として機能しており、健常心筋では第一に脂肪酸、それに次いで糖を基質としたATP合成が行われている。一方で“心臓は雑食性である”と言われるように一部に乳酸、ケトン体、アミノ酸などもエネルギー基質として利用可能である。心不全をはじめとした病的状況下では心筋におけるエネルギー基質の利用バランスが崩れることがわかっており、この“代謝リモデリング”が心不全の病態と深く関わっている。具体的には心不全の初期段階では脂肪酸利用の低下とともにグルコース利用が亢進し、病期が進行するにつれて両者ともにその利用が低下する。近年、ケトン体利用が重症心不全患者の心筋において亢進していることが明らかにされ、エネルギー的な飢餓状態である心不全において、心保護的に作用することも示唆された。

一方、本研究で対象としたグルタミンは血中に最も豊富に存在するアミノ酸で、“グルタミンオリシス”として知られる代謝経路を通して、ミトコンドリア内でグルタミン酸、 α -ケトグルタル酸 (α -ketoglutarate: α KG)と順に変換され、TCA 回路を経て最終的に乳酸まで代謝される。本経路は TCA 回路へ、その中間体である α KG を補充する重要な役割を担っており、細胞増殖能の高いがん細胞はグルタミンをエネルギー源及び、細胞増殖に必要な核酸や脂肪酸合成のための炭素・窒素の供給源として利用するため、グルタミンに強く依存している。しかし、エネルギー代謝異常をきたした不全心筋におけるグルタミン代謝のもつ生理学的意義については十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、(1)不全心筋におけるグルタミン代謝制御機構を解明し、(2)代謝経路への介入による心不全治療への応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

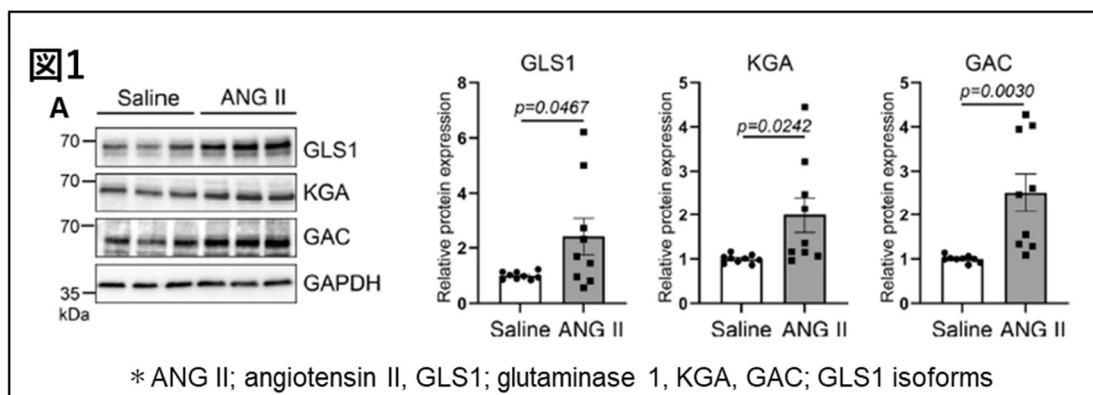
- ・野生型マウス(C57BL6)に浸透圧ポンプを用いて、アンジオテンシン II(2 mg/kg/day)を14日間持続投与し、心肥大・線維化の動物モデルとして用いた。また、細胞実験では新生仔ラット心筋の初代培養を行った。
- ・上記動物モデルにおけるグルタミンナーゼ1の薬理的阻害には3 mg/kg の bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES)を週に3回腹腔内投与した。
- ・細胞実験におけるグルタミンナーゼ1の阻害にはsiRNA GLS1 knockdown、もしくはBPTES (10 μ M)を用いた。
- ・組織中の代謝物の定量にはガスクロマトグラフィー質量分析計を用いた。
- ・組織中のタンパク、遺伝子の発現は、それぞれウエスタン法、RT-qPCR 法によって評価した。
- ・心臓切片のHE染色、マッソントリクロム染色を行った。
- ・心臓超音波法による心機能と心肥大の評価を行った。
- ・ $^{13}\text{C}_5$ -glutamine トレーサーを用いた stable isotope tracing を行った。

4. 研究成果

<結果>

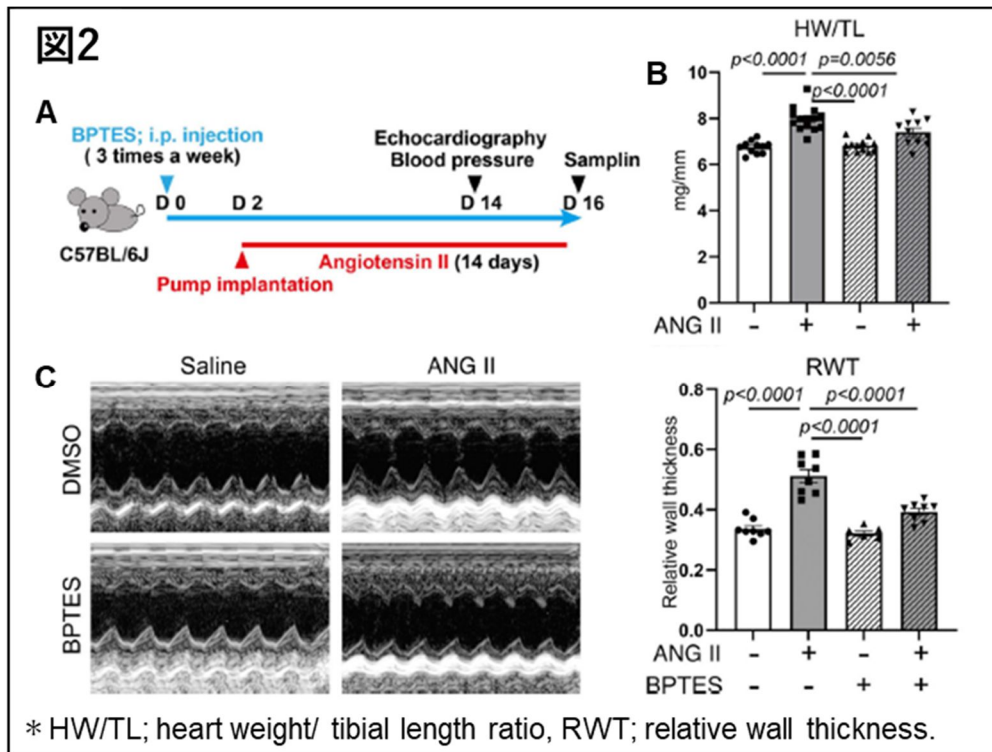
1) 肥大心ではグルタミンナーゼ1(GLS1)の発現が亢進していた

アンジオテンシン II(2 mg/kg/day)を14日間投与したマウスの心臓組織では、GLS1 およびその isoform である KGA、GAC の発現が有意に増加していた(図1)。



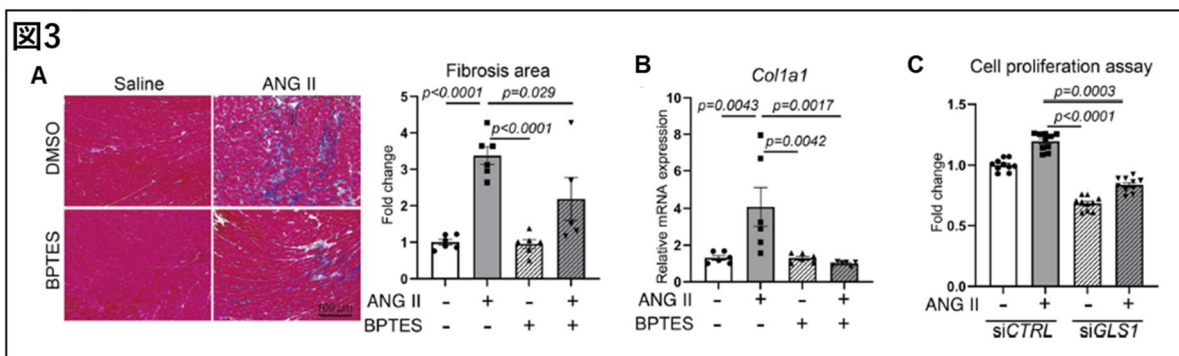
) GLS1 の阻害はアンジオテンシン II による心肥大を抑制した

野生型マウス(C57BL/6J)に GLS1 阻害剤である BPTES を投与したところ(図 2A)、アンジオテンシン II による HW/TL の増加が抑制された(図 2B)。心臓超音波法による評価においても同様に、アンジオテンシン II による左室壁の肥厚(RWT)が、BPTES によって抑制された。



) GLS1 の阻害はアンジオテンシン II による心臓線維化を抑制した

野生型マウスにアンジオテンシン II によって、心臓線維化を誘導した。GLS1 の BPTES による阻害はマッソントリクロム染色で評価した心臓切片の線維化面積を有意に低下させた(図 3A)。また、同マウスの心臓組織における線維化マーカー遺伝子(Collagen1a1; Col1a1)を qPCR で定量したところ、BPTES はアンジオテンシン II によるマーカー遺伝子の増加を抑制した(図 3B)。さらに新生仔ラット心臓線維芽細胞の増殖能を評価したところ、アンジオテンシン II による細胞増殖の亢進が GLS1 の siRNA knockdown により抑制された(図 3C)。以上の結果より、GLS1 の阻害は心臓線維化を抑制することが明らかとなった。

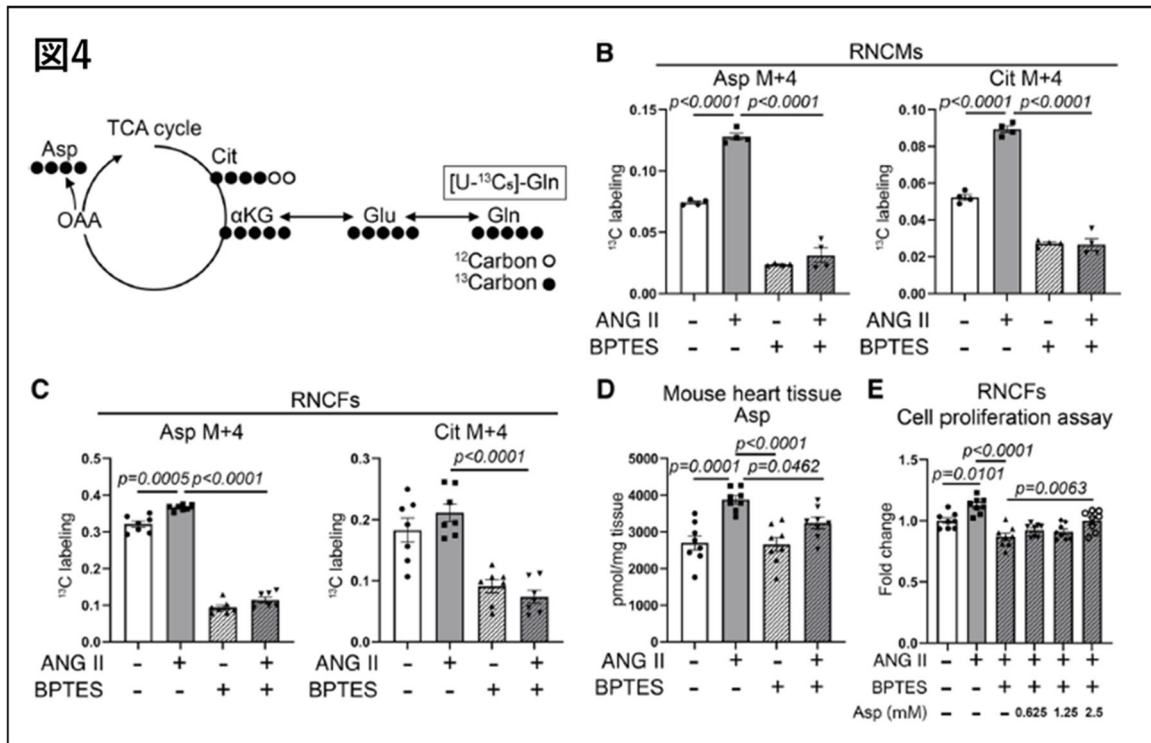


) グルタミン由来のアスパラギン酸、クエン酸は GLS1 の阻害により減少した

¹³C₅-glutamine トレーサーをラット心筋(RNCMs)もしくはラット心臓線維芽細胞(RNCFs)に添加し、細胞内におけるグルタミン代謝フラックスをガスクロマトグラフィー質量分析計によって、評価した(stable isotope tracing)(図 4A)。¹³C₅ 5 つからなる ¹³C₅-glutamine は TCA 回路に供給された後、最初の 1 サイクルで ¹³C を 4 つ保有するアスパラギン酸(Asp M+4)と同じく ¹³C

を4つ保有するクエン酸(Cit M+4)に代謝される(図4A)。これら M+4 分画の Asp、Cit はいずれもアンジオテンシン II の刺激により増加し、BPTES 処理により低下した(図4B)。これは肥大心筋細胞ではグルタミンの利用が亢進し、GLS1 の阻害でグルタミン由来の Asp、Cit が減少することを直接的な代謝フラックスの定量により証明した結果である。続いて、ラット心臓線維芽細胞においても同様の実験を行い、心筋細胞と同様の傾向が示された(図4C)。

マウスの心臓組織における Asp の含量を質量分析計によって測定したところ、肥大心において増加していた Asp が BPTES 投与により有意に低下していた(図4D)。この結果より、In vivo の実験系においても Asp の代謝と心肥大の関連が示唆された。最後にラット心臓線維芽細胞を用いて細胞増殖能を評価する実験を行った。本実験では BPTES による細胞増殖能の抑制効果が、Asp の添加によりキャンセルされた(図4E)。以上の結果より、心筋細胞の肥大や心臓線維芽細胞の増殖にはグルタミン由来の Asp や Cit が関与していることが明らかになった。



<考察>

高血圧や弁膜症・虚血など、種々の要因により傷害を受けた心臓は、左室拡大や壁肥厚・心筋細胞の肥大や間質の線維化といった構造的・組織学的変化を来す。それに先立って基質の選択性が変化することが知られている。このような“心筋リモデリング”と“代謝リモデリング”が深く関わっていることが提唱されて久しいが、現在までに糖や脂肪酸などの主要な基質における代謝制御機構については多くの研究報告がなされてきた。しかし、未だ心筋代謝経路を直接的な標的とする心不全の治療法は確立されていないのが現状である。

そこで、我々はグルタミン特有の代謝経路であるグルタミノリシスに着目した。Angiotensin 誘導肥大心筋ではグルタミノリシスの律速酵素である GLS1 の発現が亢進していることを発見した。さらに、GLS1 阻害は心筋肥大や線維化といった心筋リモデリングを抑制することを証明した。この機序については、Angiotensin 誘導肥大心筋細胞で、¹³C₅-グルタミン由来のアスパラギン酸、クエン酸が有意に増加していることに着目した。心筋ストレス負荷時には、グルタミンが優先的にアスパラギン酸やクエン酸に変換されることで、細胞肥大や増殖に必要な核酸や脂質などの細胞構成成分を効率的に得ていると考えた。

本研究はグルタミノリシスと心筋リモデリングの関連を示す、最初の報告である。2010 年以降グルタミノリシスに関連する報告は増加傾向にあり、悪性腫瘍に関するものを中心に肺高血圧症や細胞老化に関する論文も発表されている。それらの病態の共通事項として、グルタミノリシスは種々の細胞において細胞の増殖と生存に寄与し、結果的に病態や臓器機能を悪化させていることがわかる。心筋細胞は分裂を行わない細胞だが、心肥大や線維芽細胞の増殖といった心筋リモデリングの分子メカニズムにおいて、グルタミノリシスが重要な役割を果たしている可能性を考えた。

我々が行った先行研究では酸化ストレスを加えた心筋細胞で GLS1 活性が亢進し、グルタミンは ATP やグルタチオンの産生に利用され心筋保護的に作用することを示した(1)。これは、本研究の結果とは相反する結果であり、心筋細胞は急性ストレス負荷にはグルタミノリシスを活性化させ細胞保護・生存に寄与するが、慢性ストレス負荷による長期的なグルタミノリシスの亢進は、病的な心筋細胞の肥大や線維芽細胞の増殖を導き、心筋リモデリングの進展に繋がっているのではないかと推測している。

我々は、グルタミン代謝阻害が心筋リモデリングを抑制することを発見した。近年、糖尿病治療薬である SGLT2 阻害薬の心保護作用が注目され、新たな心不全治療薬の一つとして保険収載された。作用機序の一つとして、SGLT2 阻害薬による心筋エネルギー代謝への影響が示唆されているが、本研究は心不全におけるエネルギー代謝機構の新たな分子メカニズムを提唱したもので、心筋代謝が心不全の治療標的となり得る可能性を示している。

< 結語 >

Angiotensin によって心筋肥大・線維化を来した心臓では、GLS1 の発現亢進を介したグルタミノリシスの活性化が認められ、GLS1 の阻害は心筋リモデリングの進展を抑制した。

< 引用文献 >

- (1) Koichi Watanabe, Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Masakazu Shinohara, Takuya Iino, Sachiko Yoshikawa, Hidekazu Tanaka, **Seimi Satomi-Kobayashi**, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata. Critical role of glutamine metabolism in cardiomyocytes under oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;534:687-693.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masato Ogawa, Seimi Satomi-Kobayashi, Naofumi Yoshida, Kodai Komaki, Kazuhiro Izawa, Mari Hamaguchi, Takeshi Inoue, Yoshitada Sakai, Ken-Ichi Hirata, Kenji Okada	4. 巻 2
2. 論文標題 Impact of Frailty on Postoperative Dysphagia in Patients Undergoing Elective Cardiovascular Surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACC Asia	6. 最初と最後の頁 114-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacasi.2021.11.004	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 -

1. 著者名 Sachiko Yoshikawa, Manabu Nagao, Ryuji Toh, Masakazu Shinohara, Takuya Iino, Yasuhiro Irino, Makoto Nishimori, Hidekazu Tanaka, Seimi Satomi-Kobayashi, Tatsuro Ishida, Ken-Ichi Hirata	4. 巻 322(5)
2. 論文標題 Inhibition of glutaminase 1-mediated glutaminolysis improves pathological cardiac remodeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Physiol Heart Circ Physiol	6. 最初と最後の頁 H749-H761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00692.2021.	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川 祥子*、長尾 学、杜 隆嗣、篠原 正和、飯野 琢也、西森 誠、入野 康宏、田中 秀和、小林 成美、石田 達郎、平田 健
2. 発表標題 Inhibition of Glutaminase1-dependent Glutaminolysis Improves Pathological Cardiac Remodeling
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Sachiko Yoshikawa, Manabu Nagao, Ryuji Toh, Masakazu Shinohara, Takuya Iino, Hidekazu Tanaka, Seimi Satomi-Kobayashi, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata
2. 発表標題 Inhibition of glutaminase1-mediated glutaminolysis ameliorates angiotensin II-induced cardiac remodeling
3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年～2022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	杜 隆嗣 (Toh Ryuji) (50379418)	神戸大学・医学研究科・特命准教授 (14501)	
研究 分担者	長尾 学 (Nagao Manabu) (70866029)	神戸大学・医学研究科・特命助教 (14501)	

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