

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16096

研究課題名（和文）高植物性脂質食の心不全抑制効果の機序解明：低炭水化物食の脂質構成に着目した研究

研究課題名（英文）Elucidating the effect of low-carbohydrate diets containing plant-derived fat on heart failure: focusing on the lipid composition of the diets

研究代表者

武城 怜史 (Bujo, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：20931827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、心疾患危険因子を改善する低炭水化物食(LCD)を構成する脂質の差異に注目し、特に心血管死を減少することが大規模臨床試験で報告された高植物性脂質LCDの心臓に与える影響を分子生物学的手法を用いて解明することを目指した。その結果、圧負荷心不全モデルマウスでは、高動物性脂質LCDが心機能を増悪すること、高植物性脂質LCDが心機能を改善することを確認した。マウス心臓のトランスクリプトーム解析や脂肪酸組成解析を行い、高植物性脂質LCDに多く含まれるステアリン酸が、転写因子PPAR を活性化し、脂肪酸エネルギー代謝改善と炎症の制御を介して心不全を抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な臨床試験から心不全に適した食事療法の探索が続けられているが、分子生物学的な根拠に基づいた心不全予防・治療食の確立が喫緊の課題である。本研究は、これまで臨床試験で報告された高植物性脂質LCDの心疾患抑制効果の一端を、心不全モデルマウスを用いて科学的に解明した。今後の臨床応用への進展に資する成果であり、分子機序をさらに詳細に探索することで、心不全新規治療を目指した研究などへの展開も期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the differences in lipid composition that constitute low-carbohydrate diets (LCDs) aimed at improving risk factors for cardiovascular diseases. Specifically, it aimed to elucidate the effects of LCDs containing plant-derived fat, which have been reported in large clinical trials to reduce cardiovascular deaths in the heart using molecular biological methods. Significantly, our study found that LCDs containing animal-derived fat exacerbated cardiac function in a murine pressure overload heart failure model, while those with plant-derived fat ameliorated it. Transcriptome and fatty acid composition analyses of murine hearts revealed that stearic acid, a key component in LCDs with plant-derived fat, activated the transcription factor PPAR. This activation enhanced fatty acid energy metabolism and regulated inflammation, effectively suppressing heart failure.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 低炭水化物食 植物性脂質 ステアリン酸 PPAR

1. 研究開始当初の背景

最近の心不全治療の進歩は目覚ましいものの、いまだ根本的治療はなく、その発症および進展抑制が喫緊の課題である。特に毎日の生活で欠くことのできない食事の影響は大きい、心不全に適した食事療法は確立されていない。

近年、心疾患危険因子を改善する低炭水化物食 (Low carbohydrate diet: LCD) が注目されている。さらに、LCD の心血管系への効果に炭水化物の代わりに摂取する脂質の質が重要であり、心血管死は動物性脂質で置換した LCD (動物性 LCD) で増加し、植物性脂質で置換した LCD (植物性 LCD) で減少することが大規模臨床試験で報告された。しかし、その詳細な機序は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、植物性 LCD が有する心保護効果の分子機序を解き明かし、科学的根拠に基づいた心不全予防・治療食を確立することである。そこで、圧負荷心不全モデルマウスを用いて、LCD の脂質組成が心臓に与える影響を探索し、得られた食餌間の結果の違いから、心保護作用の機序を検討した。

3. 研究の方法

(1) 高脂質 LCD と圧負荷心不全モデルマウスを用いた検討

精製原料を用いた 2 種類の高脂質 LCD を作成した。動物性脂質の牛脂を主成分としたものを LCD with animal-derived fat (LCD-A)、植物性脂質のカカオバターを主成分としたものを LCD with plant-derived fat (LCD-P) と名付けた。コントロールの通常食 (Standard diet: SD) として CE-2 (日本クレア株式会社) を使用した (図 1)。

次に、9-10 週齢の野生型マウスに横行大動脈縮窄術 (Transverse aortic constriction: TAC) を施行し、圧負荷心不全モデルを作成した。術直後より 3 種類の食餌 (SD、LCD-A、LCD-P) を投与し、術後 4 週目に心臓超音波検査で心機能を評価した。

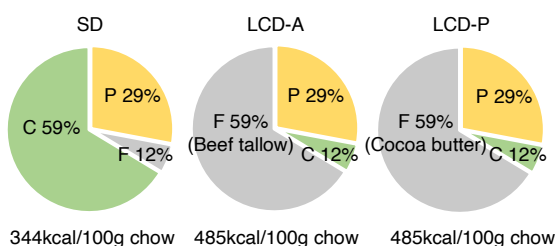


図 1. 各食餌の組成
C, carbohydrate; F, fat; P, protein

(2) 心臓 RNA-sequencing による機序検討

高脂質 LCD が心臓に与える効果の機序解明のため、3 種類の食餌 (SD、LCD-A、LCD-P) を 1 週間摂取した圧負荷心不全モデルマウスの心臓遺伝子発現を RNA-sequencing で解析した。発現変動遺伝子 (False discovery rate < 0.05、Fold change > $\sqrt{2}$) を抽出し、それぞれの発現変動遺伝子群の特徴を把握するため、遺伝子オントロジー (Gene ontology: GO)、ネットワーク、上流因子解析を行った。

(3) PPAR α の心不全における役割と LCD-P の作用との関連の検証

RNA-sequencing の結果から注目した peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α の心臓における役割を検証するため、心筋細胞特異的 Ppar α ノックアウト (Conditional knockout: cKO) マウスと PPAR α 活性化薬であるペマフィブラートを用いて、Loss- and gain- of function の実験を行った。9-10 週齢の PPAR α cKO マウスに TAC 手術を行い、術後 4 週目に心臓超音波検査で心機能を評価した。同様に、野生型マウスにも TAC 手術を行い、ペマフィブラートの経口投与を行った。経口投与は手術 1 週間前から術後 4 週目まで実施した。さらに、LCD-P の効果が PPAR α を介した作用であるか検証するため、TAC 手術を行った 9-10 週齢の PPAR α cKO マウスに術直後より LCD-P を投与し、4 週目に心臓超音波検査で心機能を評価した。

(4) PPAR α を活性化させる脂肪酸の検索

LCD-P に含まれる特有の脂肪酸が PPAR α を活性化し得るか検討した。まず、各食餌中の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー質量分析法により測定した。次に、3 種類の食餌 (SD、LCD-A、LCD-P) を 1 週間摂取した圧負荷心不全モデルマウスの血清および心臓組織内の脂肪酸組成も同様に測定した。検出した脂肪酸を新生仔ラット培養心筋細胞 (Neonatal rat cardiomyocyte: NRCM) に投与し、PPAR α 下流遺伝子発現との関連を検証した。肥大刺激にはフェニレフリン (100 μ M、24 時間) を用いた。

4. 研究成果

(1) LCD-A は心不全を増悪する一方で、LCD-P は心不全を改善した。

死亡率や体重は食餌間で違いを認めなかった。心機能は非手術 (Sham) 群では食餌間の差は

なかったが、TAC 群において LCD-A が SD と比較して有意に左室が拡大し、左室内径短縮率 (Fractional shortening: FS) も低下した。一方で、LCD-P では SD や LCD-A と比較して左室拡大および FS 低下の改善を認めた。これらの結果と相関して、TAC 後の心重量も SD と比較して LCD-A で有意に増加し、LCD-P では増加が抑制された (図 2)。また、心肥大・心不全マーカーである *Nppb* 遺伝子の発現も SD と比較して LCD-A で有意に上昇し、LCD-P では低下した。

(2) LCD-P の心保護効果に転写因子 PPAR α が重要な役割を担っている可能性が考えられた。

TAC 群において SD と LCD-A 間で 363 遺伝子、SD と LCD-P 間で 139 遺伝子が有意に変動していると判定した。SD と LCD-A 間では細胞分裂・炎症関連、SD と LCD-P 間では脂質代謝関連の GO が主に統計学的に有意であった。さらに、SD と LCD-P 間の発現変動遺伝子のネットワークおよび上流因子解析を行い、心筋脂質代謝調節のマスターレギュレーターである転写因子 PPAR α が活性化し、その下流遺伝子の発現が増加していることを同定した。

(3) LCD-P は PPAR α 活性化を介して心不全を抑制することが示唆された。

まず、Gain of function の実験において、コントロール群 (Vehicle) と比較し、ペマフィブラート群で TAC による左室拡大や FS 低下が有意に抑制された。加えて、*Nppb* 遺伝子の発現もペマフィブラート群で低下した。

次に、Loss of function の実験において、sham 群ではコントロール群 (PPAR α flox/flox マウス) と cKO 群の心機能に差を認めなかった。一方で、TAC 群ではコントロール群と比較し、cKO 群で著明に左室が拡大し、FS も低下した。同様に、*Nppb* 遺伝子の発現も cKO 群でコントロール群より有意に上昇していた。これらの TAC により生じた心機能低下は LCD-P の投与で改善を認めなかった (図 3)。また、PPAR α およびその下流遺伝子は PPAR α cKO マウスの心臓で発現が低下していたが、LCD-P の投与後も発現量は変化しなかった。

(4) LCD-P が多く含有するステアリン酸が PPAR α を活性化させ、心肥大を抑制した。

LCD の脂質の大部分は長鎖脂肪酸 (パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸など) で構成されていたが、LCD-A ではオレイン酸、LCD-P ではステアリン酸が最も多かった。また、血清・心臓組織内ともにオレイン酸やステアリン酸が LCD で増加したが、LCD-P でステアリン酸が LCD-A より有意に増加していた (図 4)。そのため、LCD-P が含有するステアリン酸が PPAR α を活性化する可能性を考えた。

そこで、NRCM にステアリン酸を投与すると、PPAR α 下流遺伝子 (*Acaa2*、*Atgl*、*Cpt1a*) の発現は濃度依存的に増加した。さらに、フェニレフリンによる肥大刺激を加えた NRCM では PPAR α 下流遺伝子の発現は低下したが、ステアリン酸の投与によりこれらの発現は回復を認めた (図 5)。*Nppb* 遺伝子の発現もステアリン酸の投与により低下した。

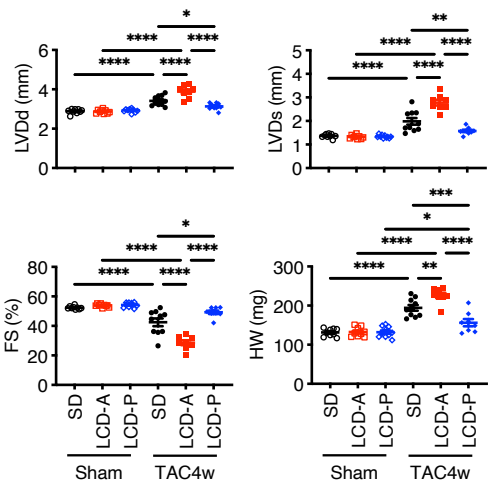


図 2. LCD 摂取による心機能と心重量の変化
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.
LVdD, left ventricular end-diastolic dimension; LVDs, left ventricular end-systolic dimension; FS, fractional shortening; HW, heart weight

の下流遺伝子の発現が増加していることを同定した。

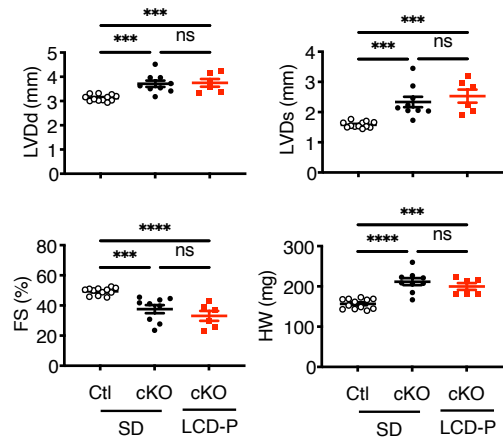


図 3. PPAR α 欠損時に LCD-P が心臓に与える影響

(4) LCD-P が多く含有するステアリン酸が PPAR α を活性化させ、心肥大を抑制した。

LCD の脂質の大部分は長鎖脂肪酸 (パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸など) で構成されていたが、LCD-A ではオレイン酸、LCD-P ではステアリン酸が最も多かった。また、血清・心臓組織内ともにオレイン酸やステアリン酸が LCD で増加したが、LCD-P でステアリン酸が LCD-A より有意に増加していた (図 4)。そのため、LCD-P が含有するステアリン酸が PPAR α を活性化する可能性を考えた。

そこで、NRCM にステアリン酸を投与すると、PPAR α 下流遺伝子 (*Acaa2*、*Atgl*、*Cpt1a*) の発現は濃度依存的に増加した。さらに、フェニレフリンによる肥大刺激を加えた NRCM では PPAR α 下流遺伝子の発現は低下したが、ステアリン酸の投与によりこれらの発現は回復を認めた (図 5)。*Nppb* 遺伝子の発現もステアリン酸の投与により低下した。

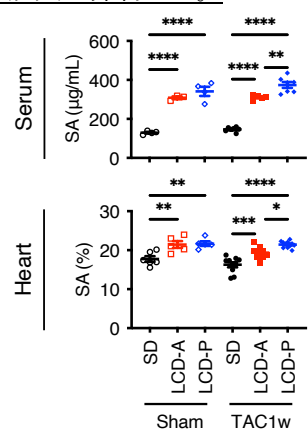


図 4. LCD 摂取後の血清・心臓の脂肪酸組成
SA, stearic acid

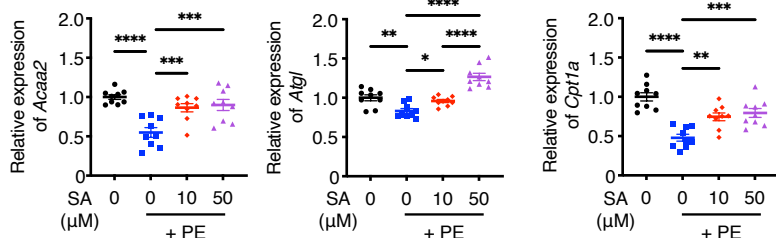


図 5. NRCM へステアリン酸投与後の PPAR α 下流遺伝子発現量
PE, phenylephrine

以上より、LCD-A と LCD-P には心臓に対する相反する効果があり、特に LCD-P にはステアリン酸による PPAR α 活性化を介した心保護効果があることが示唆された。今後は、ステアリン酸の心不全に対する効果を、シグナル分子としての機能のみならず、生体膜成分・エネルギー源としての機能に着目した研究を展開する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bujo Satoshi, Toko Haruhiro, Ito Kaoru, Koyama Satoshi, Ishizuka Masato, Umei Masahiko, Yanagisawa-Murakami Haruka, Guo Jiaxi, Zhai Bowen, Zhao Chunxia, Kishikawa Risa, Takeda Norifumi, Tsushima Kensuke, Ikeda Yuichi, Takimoto Eiki, Morita Hiroyuki, Harada Mutsuo, Komuro Issei	4. 巻 13
2. 論文標題 Low-carbohydrate diets containing plant-derived fat but not animal-derived fat ameliorate heart failure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-30821-7	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武城怜史、東口治弘、伊藤薫、石塚理人、梅井正彦、郭嘉熙、テキ博文、岸川理紗、原田睦生、小室一成
2. 発表標題 高植物性脂質低炭水化物食は心保護作用を有する-ステアリン酸による転写因子PPAR 活性化に着目して-
3. 学会等名 第51回日本心臓血管作動物質学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武城怜史、東口治弘、伊藤薫、原田睦生、小室一成
2. 発表標題 高植物性脂質食の心不全予防食への期待
3. 学会等名 第20回日本機能性食品医用学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Bujo, Haruhiro Toko, Kaoru Ito, Mutsuo Harada, Issei Komuro
2. 発表標題 Low-carbohydrate diets containing plant-derived fat ameliorate heart failure through stearic acid-induced PPAR activation
3. 学会等名 第39回国際心臓研究学会日本部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Bujo, Haruhiro Toko, Kaoru Ito, Masato Ishizuka, Masahiko Umei, Jiaxi Guo, Bowen Zhai, Risa Kishikawa, Mutsuo Harada, Issei Komuro
2. 発表標題 Low-carbohydrate diet containing plant-derived fat ameliorate heart failure via PPAR activation
3. 学会等名 22nd International congress of nutrition (国際学会)
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----

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