

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617010

研究課題名(和文) 中性脂肪蓄積心筋血管症に対する栄養療法の開発

研究課題名(英文) Development of dietary therapy for triglyceride deposit cardiomyovasculopathy

研究代表者

平野 賢一 (Ken-ichi, Hirano)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30332737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)は、代表研究者らが見出した新規疾患概念である。心筋及び冠動脈に中性脂肪が蓄積する結果、重症心不全、不整脈、虚血性心疾患を呈する。TGCVの今のところ明らかな原因は、細胞内中性脂肪分解の必須酵素であるAdipose triglyceride lipase(ATGL)の遺伝的欠損である。本研究では、ATGL欠損皮膚線維芽細胞、ATGLノックアウトマウスを用いたin vitro, in vivoの実験結果から、食事の脂肪を中鎖脂肪酸に一部置換する食事療法を開発した。本食事療法をATGL欠損症例に対して、短期間、安全に実施しえた。

研究成果の概要(英文)：Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy(TGCV) is a novel clinical entity in which TG accumulates in both myocardium and coronary arteries, leading to severe heart disease. A known cause of TGCV is genetic mutations in the adipose triglyceride lipase(ATGL), an essential molecule for intracellular hydrolysis of TG. In this study, we examined in vitro and in vivo effect of medium chain triglyceride on intracellular TG metabolism in ATGL-deficient fibroblasts and ATGL knockout mice, respectively. Based up these results, we developed a dietary therapy in which majority of natural fata was replaced by MCT. We investigated the effect of MCT diet on cardiac and skeletal muscle symptoms in ATGL-deficient patients. The diet was tolerable and possibly favorable effects were observed.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：中性脂肪 中性脂肪蓄積心筋血管症

### 1. 研究開始当初の背景

中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV)は、代表研究者らが、我が国の心臓移植症例より見出した新規疾患概念である。心筋及び冠動脈に中性脂肪が蓄積する結果、重症心不全、不整脈、虚血性心疾患を呈する (Hirano K, et al. N Engl J Med. 2008)。TGCVの今のところ明らかな原因は、細胞内 TG 分解の必須酵素である adipose triglyceride lipase (ATGL)の遺伝的欠損である。これまでのところ、グローバルにみて、40例程度が報告されている。本症は、既存の治療法がほとんど無効であり、治療法の開発が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

中鎖脂肪酸トリグリセリド (Medium chain triglyceride, MCT)は、約50年前から他の疾患において食事療法として、使用されるなど歴史が長く、安全性が担保されている。MCTは、体内で燃焼しやすく、たまりにくい脂肪として知られていたため、TGCVに対する治療法として、MCTを含有する食事療法の開発を試みた。

### 3. 研究の方法

1) ATGL 欠損症由来皮膚線維芽細胞を用いて、細胞生物学的研究を行った。種々の脂肪酸を細胞に添加して、TG代謝について検討した。添加脂肪酸の細胞内輸送は、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。細胞死は、DAPI染色を用いて評価した。

#### 2) ATGL 欠損症の摘出心臓標本の解析

代表研究者所属機関の医学部附属病院で心臓移植を受けた2例について、その摘出心臓の心筋及び冠動脈の病理学的評価を行った。

#### 3) ATGL ノックアウトマウスを用いた動物実験

オーストリア グラーツ大学の Zechner 教授らから ATGL KO マウスの供与を受け、MCTを含有する食餌を与えて、マウスの心機能や寿命に与える効果を検討した。

#### 4) ATGL 欠損症症例に対して、短期間の食事療法を実施した。

#### 5) ATGL 欠損症の報告例の文献的考察をおこなった。

### 4. 研究成果

1) ATGL 欠損皮膚線維芽細胞に、パルミチン酸などの長鎖脂肪酸 (Long chain fatty acids, LCFA) を添加すると細胞内 TGが増加するとともに細胞死を来した。一方、中鎖脂肪酸では、細胞内 TGが減少傾向を示すとともに、細胞死が回避できた。LCFAは、正常者由来細胞では、ミトコンドリアに輸送される

の対して、TGCV 症例由来細胞では、脂肪滴に、その大部分が輸送され、TG合成の基質になっていると考えられた。また、本症皮膚線維芽細胞では、細胞内 TG分解の欠損状態にも関わらず、LCFAの取り込みが亢進していることも明らかとなり、正常心では、エネルギー源となるLCFAが、TGCV症例では、細胞に蓄積して毒性を発揮するものと考えられた (LCFAの細胞内悪循環、Vicious cycle of LCFA) この悪循環が、本症の重症化に重要である可能性が示唆された。

2) TGCV 症例の摘出心の解析では、心筋細胞及び冠動脈の血管平滑筋細胞 (Smooth Muscle cells, SMCs) に、著明なTGの蓄積が観察し得た。TGCV 症例の心筋細胞では、LCFAの取り込み受容体であるCD36や脂肪細胞分化に重要な役割を果たすことが知られる Peroxisome proliferated activated receptor-g (PPAR-g)が、過剰発現しており、前述した脂肪酸の代謝の悪循環を分子レベルで説明しえられと考えられた。

また、冠動脈は、びまん性の求心性狭窄病変が観察しえ、内膜、中膜、外膜の血管壁全体を占める泡沫細胞のほとんどは、alpha smooth muscle actin 陽性のSMC由来であった。この特徴は、これまで報告されているコレステロール蓄積型動脈硬化では、局所的、偏心性の狭窄病変であり、その泡沫細胞の起源がマクロファージであることと比べると対照的であり、全く新しいヒトの粥状動脈硬化であることが明らかとなった。

3) ATGL KO マウスの心臓を病理学的に探索すると心筋細胞に著しい脂肪が蓄積しているものの、CD36やPPARgは、むしろ低発現であり、ヒトATGL欠損症とは対照的な結果を呈した。これは、ヒトとマウスでは、原因となる遺伝子異常が同一でも、二次的に生じる遺伝子発現変化が全く異なっていることを示し、本ノックアウトマウスをヒト欠損症治療開発に用いる際の注意点であると考えられた。

4) MCTを含有する食餌療法をATGL KOマウスに与えたところ、心機能の改善、寿命の延長が観察し得た。

5) 上記を基盤に、MCTを用いた食事療法を開発した。食事の大部分をMCTに置換した。本食事療法をATGL欠損症例に短期間実施したところ、心筋における中性脂肪の減少などが観察し得た。

#### 6) ATGL 欠損症の文献的考察

ATGL 欠損症では、末梢血多核白血球の空胞化 (Jordans 奇形)が必発であり、心症状や骨格筋症状の発現以前から観察しえ、診断に有用であることが明らかとなった。心不全症状は報告例中、約半数に認められた。また、糖

尿病は約 25%に観察し得た。ATGL 遺伝子変異は、エクソン 4-7 に多く認められるが、明らかな genotype-phenotype correlation は、認められなかった。

#### 7) ATGL 欠損症の診断方法

前述した末梢血多核白血球の異常は、市販の血球計算機器の一部で検出可能な可能性が示唆された。

#### 8) 新たな ATGL 遺伝子異常の発見

我が国の 2 症例において、TGCV の原因となる新規 ATGL 遺伝子変異 2 種を発見、報告した。1 例は、c.696+1G>C のホモ接合体、もう 1 例は、c.576delC のホモ接合体であり、いずれの変異も ATGL 蛋白機能の喪失に重要であると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

- (1) Suzuki A, Nagasaka H, Ochi Y, Kobayashi K, Nakamura H, Nakatani D, Yamaguchi S, Yamaki S, Wada A, Shirata Y, Hui SP, Toda T, Kuroda H, Chiba H, Hirano K. (査読有) Peripheral leucocytes' anomaly detected with routine automated hematology analyzer sensitive to adipose triglyceride lipase deficiency manifesting neutral lipid storage disease with myopathy/triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. **Mol Genet Metab Rep**. doi: 10.1016/j.ymgmr.2014.05.001
- (2) Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Kato M, Sugimura K, Sakata Y, Ikeda Y, Hirano K, Aoki M. (査読有) A novel mutation of PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. **Neuromuscl Dis** 2014 Apr 21. pii: S0960-8966(14)00103-5. doi: 10.1016/j.nmd.2014.04.001. [Epub ahead of print]
- (3) Yamaguchi S, Zhang B, Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H, Suzuki A, Miida T, Yamada S, Sasaguri Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, Hirano K. (査読有) Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique. **J Lipid Res**. 55:(5) 905-918, 2014 First Published on February 25, 2014, doi:10.1194/jlr.M047761
- (4) Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Hashimoto Y, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T. (査読有) Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. **Orphanet J Rare Dis**. 2013 Dec 21; 8(1):197. [Epub ahead of print]
- (5) Hirano K, Tanaka T, Ikeda Y, Yamaguchi S, Zaima N, Kobayashi K, Suzuki A, Sakata Y, Sakata Y, Kobayashi K, Toda T, Fukushima N, Ishibashi-Ueda H, Tavian D, Nagasaka H, Hui SP, Chiba H, Sawa Y, Horii M. (査読有) Genetic mutations in the adipose triglyceride lipase and myocardial up-regulation of peroxisome proliferated activated receptor-gamma in patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy. **Biochem Biophys Res Commun**. 443: 574-9, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.003. [Epub ahead of print].
- (6) Ikeda Y, Hirano K, Fukushima N, Sawa Y. (査読有) A novel type of human spontaneous coronary atherosclerosis with triglyceride deposition. **Eur Heart J**. 35: 875, 2014. doi: 10.1093/eurheartj/ehf522. Epub 2013 Dec 13. [Epub ahead of print]
- (7) Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Maeda Y, Hirata E, Fujimura Y, Miura D, Hirano K, Takayanagi R. (査読有) Down regulation of adipose triglyceride lipase in the heart aggravates diabetic cardiomyopathy in db/db mice. **Biochem Biophys Res Commun**. 438: 224-9, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.063. Epub 2013 Jul 22. [Epub ahead of print]

- (8) Lin Y, Chiba S, Suzuki A, Yamaguchi S, Nakanishi T, Matsumoto H, Ikeda Y, Ishibashi-Ueda H, Hirano K, Kato S. (査読有) Vascular smooth muscle cells isolated from adipose triglyceride lipase-deficient mice exhibit distinct phenotype and phenotypic plasticity. **Biochem Biophys Res Commun.** 434: 534-540, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.109. Epub 2013 Apr 10. [Epub ahead of print]
- (9) Nakamura K, Hirano K, Wu SM. (査読有) iPS Cell Modeling of Cardiometabolic Diseases. **J Cardiovasc Trans Res.** 6; 46-53, 2013.
- (10) Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Fujii M, Maeda Y, Fujimoto Y, Miura D, Hirano K, Takayanagi R. (査読有) Reduced expression of adipose triglyceride lipase enhances tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced intracellular adhesion molecule-1 expression in human aortic endothelial cells via protein kinase C-dependent activation of nuclear receptor factor- $\kappa$ B. **J Biol Chem.** 286; 32045-32053, 2011.
- (11) 平野賢一 (査読無) 中性脂肪蓄積心筋血管症 先端医療シリーズ43 循環器疾患の最新医療(永井良三ら 編集) 114-7, 2012.
- (12) 平野賢一、鈴木 朗 (査読無) ATGL 欠損症 先天代謝ハンドブック(遠藤文夫編集) 394-5, 2012.
- (13) 平野賢一、鈴木 朗 (査読無) 中性脂肪蓄積心筋血管症 医学のあゆみ 242; 937-41, 2012.
- (14) 平野賢一 (査読無) 中性脂肪蓄積心筋血管症 循環器内科 71; 576-8, 2012.
- (15) 平野賢一 長坂博範 (査読無) 脂質異常症と脂質蓄積症 Surgical Frontier 19; 23-8, 2012.
- (16) 平野賢一 (査読無) 中性脂肪蓄積心筋血管症 呼吸と循環 59; 115-9, 2011.
- (17) 平野賢一 (査読無) 中性脂肪蓄積心筋血管症 カレントセラピー 29; 78, 2011.
- (18) 平野賢一 (査読無) 中性脂肪蓄積心筋血管症 The Lipid 22; 94-7, 2011.
- (19) 平野賢一 (査読無) 中性脂肪蓄積心筋血管症 病理と臨床 29; 254-6, 2011.
- [学会発表](計 0 件)
- [図書](計 0 件)
- [産業財産権]  
出願状況(計 0 件)  
取得状況(計 0 件)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
平野 賢一 (HIRANO, Ken-ichi)  
大阪大学大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 30332737
- (2) 研究分担者  
井上 裕康 (INOUE, Hiroyasu)  
奈良女子大学 生活環境部・教授  
研究者番号: 40183743
- 竹中 優 (TAKENAKA, Masaru)  
神戸女子大学 家政学部・教授  
研究者番号: 20222101