

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591049

研究課題名(和文) 左室駆出率が保たれた心不全におけるカルニチンの意義

研究課題名(英文) Impact of Carnitine on Heart Failure with Preserved Ejection Fraction

研究代表者

坂田 泰史 (Sakata, Yasushi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00397671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高食塩食により高血圧をきたし左室収縮機能の指標である左室駆出率が保たれた心不全に至る Dahl 食塩感受性ラットでは、腎臓でのカルニチン再吸収を担うトランスポーターである OCTN2 が高食塩食を開始すると早期に低下し、食塩抵抗性ラットでは認められないことを明らかにした。また、初期からの L-カルニチンの補充によって、腎臓の OCTN2 発現低下の改善と血圧上昇の軽減、さらに降圧効果に依存しない腎機能の改善が得られる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The expression of organic cation/carnitine transporter 2 (OCTN2) which uptakes carnitine with sodium in kidney was decreased at early hypertrophic stage in Dahl salt-sensitive rats that present hypertension and heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) with high salt diet. Urinary free-carnitine excretion also increased, and serum and cardiac level of carnitine decreased. Administration of L-carnitine with high salt diet from age 6 weeks attenuated the elevation of blood pressure and restored the expression of OCTN2 in kidney. Serum creatinine level was also attenuated with L-carnitine administration independently with systolic blood pressure. These data suggest that administration of carnitine may be effective to prevent the development of salt-sensitive hypertension, the worsening renal dysfunction and the transition to decompensated HFpEF.

研究分野：心不全

キーワード：カルニチン 心不全

1. 研究開始当初の背景

(1) 心不全症例の約 60%は、心臓の収縮機能指標の1つである左室駆出率 (LVEF) が低下した心不全 (HFrEF: Heart Failure with reduced Ejection Fraction) であるが、約 40%では左室駆出率が保たれており、拡張不全もしくは HFpEF (Heart Failure with preserved Ejection Fraction) と呼ばれている。特に、高齢者に多く、超高齢化を迎える現在において、HFpEF に対する診断・予防・治療は医療経済においても極めて重要な項目である。しかし、HFrEF の予後は年々良くなっているにもかかわらず、HFpEF の予後はあまり変化がなく HFrEF と同様に予後は良くないままである。HFrEF に相当する症例が以前からの基礎研究の積み重ねや、多くの大規模臨床研究の結果によってその診療が進んでいる一方、HFpEF はその病態形成や発症機序など不明なことが多く、特異的な診断・治療法が確立されていないことがその原因と考えられている。我々は、ダール食塩感受性高血圧ラットを用いて HFpEF モデルを作成し、その病態や発症機序の解明に努め、神経体液性因子の関与、病態発症時における左室線維化の意義、遮断薬などの有効性などを明らかにしてきたが、臨床における HFpEF の予後改善は未だに十分でなく、HFpEF の発症機序・病態解明はまだ十分ではないと考えられる。

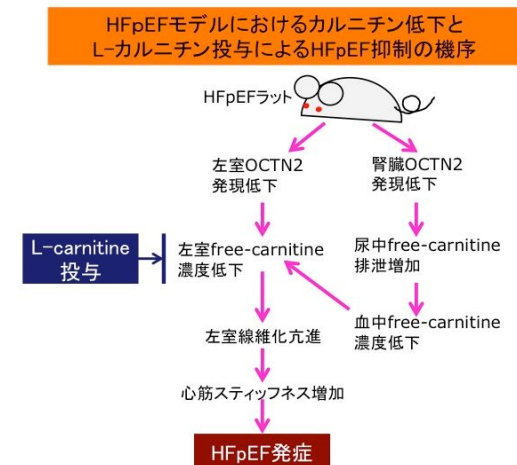
そこで、我々は HFpEF をきたす動物モデルがダール食塩感受性ラットを用いたモデルのほかに困難であることに着目し、食塩感受性と HFpEF の関係性を検討したところ、食塩感受性高血圧の臨床的特徴が、高齢、女性、高血圧、糖尿病、腎機能障害などを有するという既に報告されている HFpEF の疫学的特徴と極めて類似していた。このことより、食塩感受性が HFpEF の発症機序・病態に深く関与すると考えられた。さらに、ダール食塩非感受性ラットに、感受性ラットの腎臓を移植することにより、または、相互の循環器系を連結し交叉還流を行うと、非感受性ラットが感受性を獲得すると報告されていることより、食塩感受性を決定しているものは腎臓に關係し、血液中に存在するものが疑われた。

そこで、我々は、代謝中間体、ホルモン、シグナル分子などを含む生体中の小分子の濃度を網羅的かつ定量的に評価するメタボローム解析を高食塩食投与または正常食塩食投与されたダール食塩感受性ラットの血漿を用いて行ったところ、高食塩食を投与された HFpEF に至ったダール食塩感受性ラットではカルニチンが低下していることを見出した。

(2) カルニチンは、細胞内で長鎖脂肪酸と結合してミトコンドリア内に入ることで、脂肪酸酸化を促進する。体内にあるカルニチンは、そのほとんどが食事を通じて外部から摂取されたものであり、肝臓や腎臓でも生合成されるがごくわずかである。食事由来のカルニチンは腸管の organic cation/carnitine transporter 2 (OCTN2) を介して、Na と共輸送 (吸収) される。また、腎尿細管でも OCTN2 を介して Na と共輸送 (再吸収) される。

我々は、メタボローム解析において HFpEF モデルで低下していた血中カルニチンの HFpEF の発症への関与を検討するため、ダール食塩感受性ラット高食塩食負荷モデルにおいて、心肥大をきたし前心不全期である 17 週齢から食餌に L-カルニチン (390mg/kg/日) を加え、心不全期である 20 週齢にて血行動態を評価したところ、心臓・腎臓での OCTN2 発現低下に伴い心不全モデルラットで低下していた血漿遊離カルニチンが増加し、左室線維化を抑制することにより、左室拡張機能の構成要素の1つである心筋の硬さ (心筋スティッフネス定数) を改善し、左室拡張末期圧の上昇を抑え、結果としてカルニチン投与群は無投与群に比し、有意に予後を改善することを見出した。(下図)

我々は、メタボローム解析において HFpEF モデルで低下していた血中カルニチンの HFpEF の発症への関与を検討するため、ダール食塩感受性ラット高食塩食負荷モデルにおいて、心肥大をきたし前心不全期である 17 週齢から食餌に L-カルニチン (390mg/kg/日) を加え、心不全期である 20 週齢にて血行動態を評価したところ、心臓・腎臓での OCTN2 発現低下に伴い心不全モデルラットで低下していた血漿遊離カルニチンが増加し、左室線維化を抑制することにより、左室拡張機能の構成要素の1つである心筋の硬さ (心筋スティッフネス定数) を改善し、左室拡張末期圧の上昇を抑え、結果としてカルニチン投与群は無投与群に比し、有意に予後を改善することを見出した。(下図)



2. 研究の目的

(1) HFpEF モデルであるダール食塩感受性ラットの心不全期では、血中カルニチンが低下していたが、どの時期にどのように血中のカルニチンが低下しているのかは不明である。HFpEF 患者は腎機能の低下していることが多いことが知られており、慢性腎臓病 (CKD: chronic kidney disease) 症例では遊離カルニチン、アシルカルニチンのクリアランスはともに減少していることが報告されている。また、血中の遊離カルニチンは減少していないが、アシルカルニチンは GFR と逆相関していること (Fouque D, et al. J Ren Nutr. 2006; 16(2): 125) などが報告されている。カルニチンは腎臓において排泄される際に Na と共輸送されることを考慮すると、カルニチンのクリアランス変化が Na 貯留と関連し、HFpEF および食塩感受性の病態形成に関与している可能性が考えられるが、これまで十分な検討はされていない。そこで、腎臓とカルニチンとの関連を検討し、カルニチン動態を

中心とした心腎連関の可能性について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)モデル動物を用いたカルニチンと腎臓との関与の検討。

HFpEF モデルである高食塩食投与による高血圧をきたすダブル食塩感受性ラット(SSラット)と食塩により高血圧を起ささない食塩抵抗性ラット(SRラット)を用いて、6週齢より高食塩食投与により、心肥大から心不全移行期への時間経過で、心臓、腎臓におけるOCTN2発現の推移、および血中、尿中カルニチンおよび尿へのクリアランスを検討し、カルニチン代謝の食塩感受性への影響を検討した。

また、L-カルニチンの初期からの投与に関しては、ダブル食塩感受性ラットに6週齢より通常食もしくは高食塩食に加えてL-カルニチン(390mg/kg/日)を投与した。

またOCTN2の発現については培養心筋細胞、培養線維芽細胞、および食塩負荷(1%NaCl水6週間)およびアンジオテンシン(Osmotic pumpによる1.2mg/kg/day 2週間持続投与)を投与したマウス(野生型C57BL6)での検討を行った。各種遺伝子発現はRT-PCRにて評価を行った。総カルニチン濃度、遊離カルニチン濃度、アシルカルニチン濃度は酵素サイクリング法で測定し、prostacyclin産生は、Prostacyclinの安定代謝物である6-keto-prostaglandin F1(6-keto-PGF1)を酵素免疫測定法で評価した。また、尿中排泄は、尿中および血中のクレアチニンと対象物質の濃度から計算されるfractional excretion(%)を用いて評価した。

(2)HFpEF患者におけるカルニチン動態の検討については、大阪大学医学部附属病院における外来もしくは入院中の患者を対象とし、LVEF>40%で、Framingham心不全基準を現在もしくは過去に満たしたことがある心不全患者23名および、高血圧、糖尿病、心疾患を有さない年齢マッチを行った健常コントロール12名において、急性期および慢性期の血中・尿中カルニチン濃度と各種臨床指標との関連を検討し、治療および診断のマーカーとなりうるかについて検討を行った。

4. 研究成果

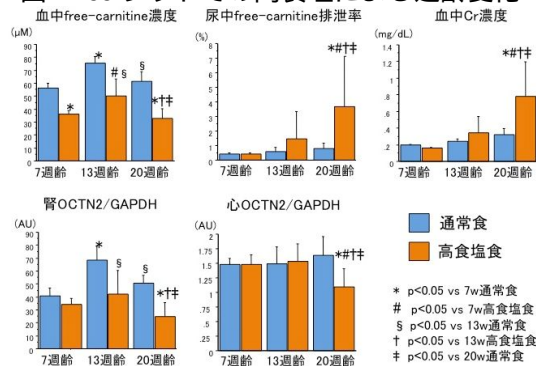
(1)SSラットに6週齢より高食塩食を投与した群では、通常食群に比較した場合、1週間の投与である7週齢の初期の段階で、有意に血中遊離カルニチンの濃度の低下を認め、13週齢の心肥大期および20週齢の心不全期でも共に有意に通常食群より低値であった(図1)。また総カルニチンおよびアシルカルニチンも同様に低下の推移を示した。

高食塩食投与群の中での推移を検討する

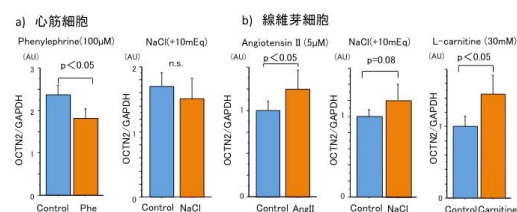
と、心肥大期にはカルニチンは増加し、その後心不全期で低下していた。このことは、通常食塩食群でも同様の推移を示していた。一方、尿への排泄率は、通常食では週齢の増加に伴った変化は認めなかったが、高食塩食群では、肥大期に軽度の増加傾向を示し、心不全期に至り有意に増加していた。また、血中クレアチニン濃度も尿中カルニチン排泄と同様に、20週齢の心不全期になり上昇をきたしていた。一方、尿へのカルニチン排泄に関する腎臓のOCTN2の発現は、高食塩食開始初期に軽度低下を示し、13週齢、20週齢とともに、通常食群と比し、有意に低下していた。一方、心臓でのOCTN2は、20週齢の心不全期にのみ、高食塩食群で低下していた。

これらの結果よりSSラットでは、高食塩食の投与により、初期から血中カルニチン濃度が低下をきたし、それには、比較的初期から腎臓でのOCTN2の発現が低下し、尿へカルニチン排泄増加し、特に腎機能障害を認める心不全期において著明に排泄亢進することが関連していると考えられた。また、13週齢の心肥大期においても、心臓組織中の遊離カルニチンは通常食に比して高食塩食群で有意に低下していた(0.50±0.13 vs. 0.35±0.10 μmol/g, p=0.01)が、心臓でのOCTN2発現低下を認めないことより、血中濃度の低下に伴う影響が考えられた。

図1. SSラットでの高食塩による週齢変化



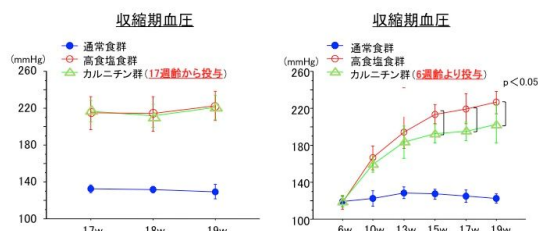
(2)培養細胞を用いて48時間の各種薬剤の負荷によるOCTN2発現の変化を検討したところ、心筋細胞ではNa濃度の変化ではOCTN2の変化は認めなかったが、肥大刺激であるフェニレフリンで発現低下を認めた。一方、線維芽細胞ではアンジオテンシンおよびカルニチンでOCTN2の発現亢進を認め、過酸化水素(1 μM)およびNaCl(+10mEq)負荷を含め、薬物負荷では発現低下を認めるものはなかった。



一方、vivo における変化を検討するため、1%NaCl 水を負荷したマウスを用いて、心臓における OCTN2 の発現を検討したが、有意な変化を認めなかった。また、アンジオテンシンにより血圧の上昇 (138 ± 13 mmHg vs. 104 ± 6 mmHg (sham), $p < 0.01$) をきたし、心肥大を認めた (LV weight/tibial length: 5.5 ± 0.7 mg/mm vs. 4.3 ± 0.3 mg/mm (sham), $p < 0.01$) マウスにおいても、心臓での OCTN2 の発現は変化を認めなかった。

これらの結果より、長期の負荷がかからないと心臓では OCTN2 の発現低下が生じない、もしくは、食塩感受性高血圧を示さないモデルにおいては、食塩負荷や angiotensin 負荷によっては、心臓での OCTN2 発現低下をきたさない可能性が考えられた。

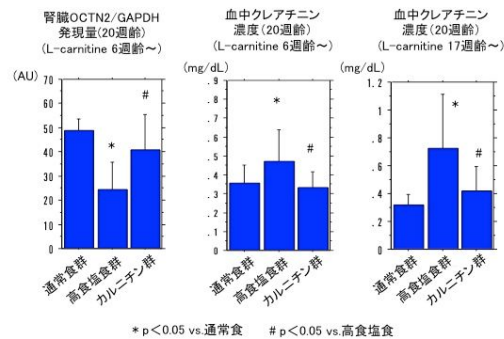
(3) SS ラットの週齢での変化の検討から初期の段階から高食塩食投与によって血中カルニチンが低下していたことより、高食塩食を開始すると同時に L-カルニチンの投与を開始し、その効果を検討した。結果、心不全期直前の 17 週齢から L-カルニチンを投与した場合は、収縮期血圧の変化を認めなかったのに対して、6 週齢からの投与は、高食塩食投与による生じる血圧の上昇を、15 週齢以降で有意に低下させた。



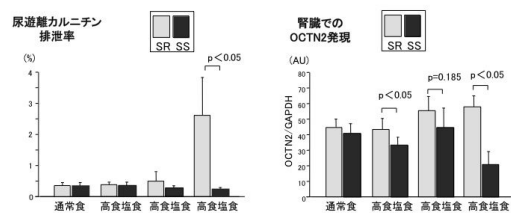
また、17 週齢から投与と同様に 6 週齢からのカルニチンの投与によっても、20 週齢の時点で有意に心不全期に低下している血中遊離カルニチン (通常食群: 63.3 ± 7.3 μ mol/l, 高食塩食群: 32.0 ± 9.2 μ mol/l, カルニチン群: 110.6 ± 20.8 μ mol/l) および心臓中の遊離カルニチン濃度 (通常食群: 0.43 ± 0.10 μ mol/g, 高食塩食群: 0.14 ± 0.07 μ mol/g, カルニチン群: 0.52 ± 0.11 μ mol/g) を改善させ、血中の 6-keto-PGF1 濃度 (通常食群: 1740 ± 1089 pg/ml, 高食塩食群: 1878 ± 402 pg/ml, カルニチン群: 3176 ± 1522 pg/ml) を上昇させ、有意に肺重量の増加を抑えた (肺重量脛骨長比, 通常食群: 3.4 ± 0.2 mg/mm, 高食塩食群: 5.1 ± 1.7 mg/mm, カルニチン群: 3.8 ± 0.5 mg/mm)。

また、腎臓における OCTN2 の発現は、17 週齢からのカルニチン投与では有意な変化を示さなかったのに比し、6 週齢からのカルニチン投与群では有意な改善を示した。さらに、カルニチン投与群では、血中クレアチニン値が高食塩群に比して有意に低下しており、普

通食群と同様の値となっていた。この変化は、カルニチンを 17 週齢より投与した群でも認めており、先の血圧の結果を踏まえると、カルニチンの投与は血圧と独立して腎機能を改善させる可能性が考えられた。



(4) カルニチンの動態がダール SS ラットにおける特有の結果であるかを検討するため SR ラットの 高食塩食投与群における経時的検体 (7 週齢、13 週齢、19 週齢) を用いて、血中・尿中カルニチン分画の経時変化を測定した。結果、血中の総カルニチン、遊離カルニチン、アシルカルニチンは、7 週齢、13 週齢では SS ラット > SR ラットであったが、19 週齢において SS ラット < SR ラットであった。尿中総カルニチン、遊離カルニチン、アシルカルニチンはすべての時点において、SS ラット > SR ラットであり、尿排泄率が SS ラットで週齢があがるにつれて増加するのに対し、SR ラットでは高食塩負荷によっても変化がなく、むしろ低下傾向にあった。また、腎臓での OCTN2 の発現は、高食塩の負荷でも SR ラットでは SS ラットに比して保たれており、むしろ SR ラットでは食塩負荷により発現が増加した。



(5) ヒト HFpEF において血中遊離カルニチンについて検討を行ったところ、心不全の急性期では低下をきたしていたが、慢性期の状態ではむしろ増加しており (健常対照群: 48.1 ± 6.7 μ mol/l, HFpEF 急性期群: 41.1 ± 6.3 μ mol/l, HFpEF 慢性期群: 62.5 ± 13.1 μ mol/l) 尿への排泄率は (健常対照群: $0.6 \pm 0.8\%$, HFpEF 急性期群: $3.0 \pm 0.9\%$, HFpEF 慢性期群: $1.0 \pm 0.6\%$) と急性期にのみ増加していた。

この結果は、拡張機能などの心機能とカルニチンが関連するというよりも心不全の状態と関連している可能性が考えられ、慢性期を SS ラットの 13 週の心肥大期と捉え、うっ血性心不全をきたす前もしくは治療後

の状態においては血中カルニチンが増加しており、急性期には尿中排泄が増加し、血中カルニチン濃度が低下する可能性が考えられた。しかし、症例数が十分でないため今後、さらに症例を積み重ねて検証していくことで明らかになるものと考えられた。

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2件)

Taniguchi T, Sakata Y, Ohtani T, 他8名. Usefulness of transient elastography for noninvasive and reliable estimation of right-sided filling pressure in heart failure. Am J Cardiol. 2014 Feb 1;113(3):552-8. doi:10.1016/j.amjcard.2013.10.018. Epub 2013 Nov 7. 査読有り

Takeda Y, Sakata Y, Ohtani T, Mano T, 他10名. Endovascular Aortic Repair Increases Vascular Stiffness and Alters Cardiac Structure and Function. Circ J. 2014;78(2):322-8. 査読なし

〔学会発表〕(計1件)

坂田泰史. HFpEF はどのように考えて治療すれば良いのか 日本高血圧学会(招待講演) 2014年10月17日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔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

坂田 泰史 (SAKATA, Yasushi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00397671

(2)研究分担者

大谷 朋仁 (OHTANI, Tomohito)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30623897

真野 敏昭 (MANO, Toshiaki)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90379165