

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：74314

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790790

研究課題名(和文)心不全による代謝リモデリングとミトコンドリア機能の解析

研究課題名(英文)Analysis of metabolic remodeling and mitochondrial function in heart failure

研究代表者

加藤 貴雄(Kato, Takao)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第2研究部・研究員

研究者番号：30583877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア障害により、エネルギー産生障害を惹起し、 ^{99m}Tc -MIBI保持は低下した。心不全ラットでは、 ^{99m}Tc -MIBI保持は脂肪酸取り込みと相関し心重量と逆相関した。心不全患者において、 ^{99m}Tc -MIBIの洗い出し率は、BNPと相関を認め重症度を示す指標と考えられた。生体内での観察において ^{99m}Tc -MIBIの洗い出し率は、非侵襲的に心臓ミトコンドリア機能を推定する方法として有用であると考えられた。また、解糖系の遺伝子発現により、ミトコンドリア機能障害が認められた。

研究成果の概要(英文)：Although mitochondria play pivotal roles in heart failure, there are few feasible methods for cardiac assessing mitochondrial function in vivo. We validated that the retention of technetium- 99m sestamibi (^{99m}Tc -MIBI) is useful for assessing cardiac mitochondrial function in vivo and that increased washout (or decreased retention) of ^{99m}Tc -MIBI occurs in an animal model of HF and patients with HF, associated with the severity of the disease. Next, we examined the effects of persistent overexpression of phosphoglycerate mutase 2 (Pgam2), a glycolytic enzyme, on cardiac energy metabolism and function. The uptake of analogs of glucose or fatty acids and the phosphocreatine/ATP ratio at rest were normal. The levels of metabolites in the initial few steps of glycolysis and lactate remained unchanged. The levels of metabolites in the tricarboxylic acid (TCA) cycle were altered, and the capacity of mitochondrial function was decreased.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：ミトコンドリア ミトコンドリア機能 悪液質 非侵襲的評価 心不全

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓は、糖あるいは脂肪酸を基質として取り込み、それぞれ解糖系・酸化から TCA 回路での代謝を経てミトコンドリアで ATP を産生し、その収縮活動の大部分のエネルギー源とする。平均 300g のヒトの心臓には、ある瞬間には 0.7g の ATP しか存在しないが一日の総消費量は 6kg に達する (Ingwall, ATP and the Heart 2002)。よって、その産生機構の変化や破綻は心機能に大きな影響を及ぼすと考えられる。心不全は「心臓のエネルギー枯渇状態」であるとする仮説が以前よりあり、心筋代謝研究がなされてきた (Neubauer, N Engl J Med. 356: 1140; 2007)。しかし、いまだ心不全の代謝変化 (代謝リモデリング) には不明な点が多く、代謝リモデリングを標的とした診断・治療はほとんど臨床応用されていない (Soukoulis 他, J Am Coll Cardiol. 54: 1660; 2009)。これまでの心筋代謝研究の問題点は、異なった臨床背景をもつ患者や異なった動物モデルを用いて、別々のパラメーターを測定している点にあった。又、動物モデルの検討は摘出した心臓に特定の基質を加えて灌流した短期的な実験が多く、慢性状態の心不全の心筋代謝リモデリングには不明な点が多かった。心不全にはインスリン抵抗性などの全身の代謝異常も伴うが (Doehner 他, J Am Coll Cardiol. 46: 1019; 2005)、その病的意義も不明である。具体的には、(1)代謝異常が心不全の原因により違いがあるか、(2)心不全の進展によりどのように変化するのか、(3)保護因子であるのか増悪因子であるのか、(4)人為的に変更可能であるのか、が明らかにされる必要がある (Ingwall, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293: 3225; 2007)。

(2) 申請者はこれまでの研究の問題点を踏まえ、単一の遺伝的背景をもつダールラット高血圧性心不全モデルを用い心肥大から心不全の進行に伴う代謝リモデリングをメタボローム解析、RI を用いた基質取り込み、MR スペクトロスコピーによる生体内でのエネルギー予備能の測定、などを用いて包括的に解析した。また糖代謝を活性化する薬剤であるジクロロアセテート (DCA) が心不全を改善することから (図 3)、糖代謝が心臓に対し保護的に働くことを示した (Kato (1 番目) 他, Circ Heart Fail. 3:420;2010)。さらに、包括的な代謝関連遺伝子発現の検討により心肥大から心不全への移行にミトコンドリアの異常が大きな役割を果たし、また DCA がミトコンドリア内にある解糖系の最終酵素であるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) を標的にすることから、ミトコンドリアを対象にした治療も有効である可能性が示唆された。また、心不全期における肝臓での代謝変化を解析し、心不全における炎症と肝臓の代謝異常が心臓悪液質につながることを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 心不全は典型的な加齢疾患であり、人口の高齢化とともに増加している。さらに、一度心不全を発症すると入退院を繰り返し患者のみならず家族と社会へ多大な負担を強いることから、その適切な管理は健康政策上の大きな問題である。しかし、心不全は最良の治療を受けたとしても年間 10% が死亡する予後不良の症候群であり、新しい視点に立った治療が必要である。本研究の目的は、心不全における心臓のおよび全身の代謝変化 (代謝リモデリング) の分子基盤を明らかにし、心不全の新しい診断・治療法を開発することである。

(2) 具体的には、

心不全の代謝治療の治療指針を得るため、^{99m}Tc-MIBI (Sestamibi) シンチグラムを使い、生体内で心臓のミトコンドリア機能を評価する方法を確立する。

異なる基礎疾患による心不全での代謝リモデリングを検討するため、代謝改変モデル動物でのミトコンドリア機能を解析し基質利用について評価する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア膜電位変化を非侵襲的に推定する方法の開発

^{99m}Tc-MIBI は、広く心筋虚血の診断に臨床使用されている放射性診断薬剤である。^{99m}Tc-MIBI が初期に心筋細胞へ取り込まれる仕組みは血流に依存した受動拡散であるが、時間が経過した後の心筋細胞内での保持はミトコンドリア膜電位に依存する (Piwnicka-Worms 他, Circulation. 82: 1826; 1990)。具体的には、正常ラットにミトコンドリアの膜電位を脱分極させる薬剤 (CCCP: Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, 図 1) を投与し、心臓からの ^{99m}Tc-MIBI の洗い出し率を測定した。CCCP は、ミトコンドリア呼吸鎖を阻害し、心筋のミトコンドリア膜電位の脱分極を惹起する (Heytler PG. Biochemistry. 2: 357; 1963)。CCCP (4.5mg/kg) を投薬し、心機能の評価、^{99m}Tc-MIBI の初期の心臓への取り込みと 180 分後の心臓での残留を、小動物用のガンマカメラを用いて測定し、心臓からの洗い出し率を計算した。また摘出心において、心臓の残留率を測定した。摘出灌流心においても、TMRE を還流して 2 光子共焦点顕微鏡を用いてミトコンドリア膜電位を観察し、ミトコンドリア機能と比定した。

最後に、ダール食塩感受性ラットを用いて心不全期のラットを観察した。0.4% 低食塩餌で飼育し、心不全を発症しないラット 10 匹をコントロールとし、8% 高食塩餌で飼育し、高血圧性心肥大から心不全に至る 18 週齢の 26 匹を心不全群として、^{99m}Tc-MIBI の保持と脂肪酸取り込みを比較した。

(2) 心不全患者への応用

心不全患者の外来・入院での評価の際、心筋 viability と心機能を評価するために、心臓 RI 検査が施行されていが、この際に、 ^{99m}Tc -MIBI を RI の検査薬として使い、従来通り、静注後 20 分に心筋への取り込みを SPECT 装置で計測するものであり、これを初期像とする。さらに、静注後 3 時間に SPECT 装置で ^{99m}Tc -MIBI の計測を行い、心筋の残留を計測する。これを後期像とする。初期像と後期像の差すなわち心臓からの洗い出し率を評価することで、ミトコンドリアの機能を評価した。

(3) 代謝改変動物での検討

解糖系の遺伝子発現を心筋特異的に増加させミトコンドリア機能、基質利用への影響を測定した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア膜電位変化を非侵襲的に推定する方法の開発

CCCP 投与により一過性の左室の拡大、収縮能低下を来した。

各 6 匹の vehicle 投与群と CCCP 投与群の心機能を、30-60 分、90-120 分、180-210 分後に分けて測定した。投与初期に見られていた収縮能低下は、時間と共に改善した。

^{99m}Tc -MIBI の心臓での保持は CCCP 投与により低下した (図 1)。

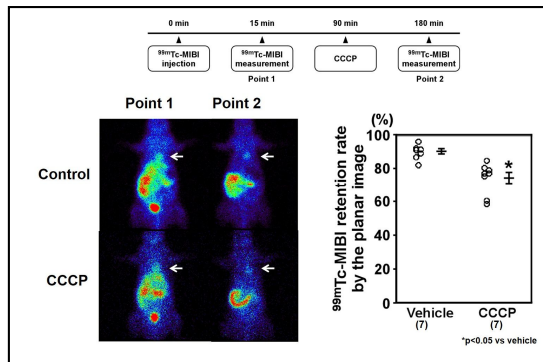


図 1

尾静脈より ^{99m}Tc -MIBI を全身投与し、vehicle と CCCP を各群 6-7 匹で腹腔内投与を行い、90 分後の心臓での保持を小動物用ガンマカメラで観察した。 ^{99m}Tc -MIBI の保持は CCCP 群で低下しており (図 1 左) 洗い出し率を計算すると CCCP 群で洗い出し率は亢進していた (図 1 右)。

CCCP は摘出灌流心においてミトコンドリア膜電位を減弱させ、 ^{99m}Tc -MIBI の保持も低下させた (図 2)。

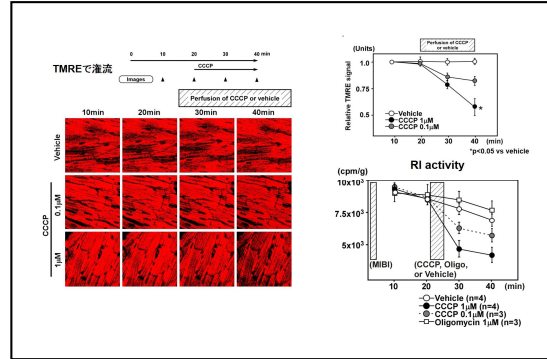


図 2

TMRE で標識した灌流心をつぎ光子共焦点顕微鏡で観察し、CCCP 投与によりミトコンドリア膜電位は低下していた (図 2 左)。同様に実験した ^{99m}Tc -MIBI の保持も同様に低下していた (図 2 右)。

ダールラットにおいて ^{99m}Tc -MIBI 保持は心重量と逆相関した (図 3)。

ダールラットにおいて、 ^{99m}Tc -MIBI 保持は心重量と逆相関し、心不全進展に伴い ^{99m}Tc -MIBI 保持が低下していた。

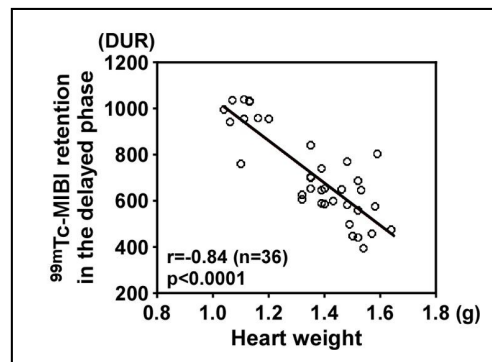


図 3

結果のまとめ: CCCP を投与したラットでは、心収縮能は一過性に低下し、エネルギー産生障害を惹起し、 ^{99m}Tc -MIBI 保持は低下した。CCCP はラットの灌流心においてミトコンドリア膜電位を低下させた。心不全ラットでは、 ^{99m}Tc -MIBI 保持は脂肪酸取り込みと相関し心重量と逆相関した。生体内での観察において ^{99m}Tc -MIBI の洗い出し率は、非侵襲的に心臓ミトコンドリア機能を推定する方法として有用であると考えられた。

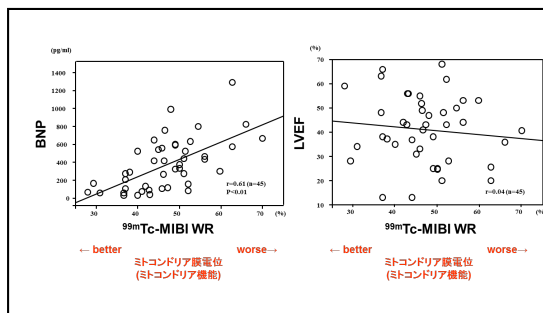
今後の展望: この結果は、生体において安全な放射性診断薬を用いてミトコンドリア機能を推定しうることを示しており、心不全分野への応用が期待される。また、虚血性心疾患の診断には、運動負荷心筋血流検査や

血管拡張薬を用いた薬剤負荷心筋血流検査が行われているが、負荷方法の工夫により虚血評価以上の情報が得られる可能性を示唆している。

(2) 心不全患者への応用

^{99m}Tc-MIBI の洗い出し率は、BNP と相関を認めた (図 4 左) が左室駆出率とは相関しなかった (図 4 右)。

図 4



結果のまとめ：^{99m}Tc-MIBI の洗い出し率は、BNP と相関を認め、重症度を示す指標と考えられたが左室駆出率とは相関しなかった。過去の報告との違いは、急性増悪後の安定期に測定している点であり、ミトコンドリア機能は BNP のように可変かもしれないと考えられた。

(3) 代謝改変動物での検討

解糖系遺伝子の PGM(phosphoglycerate mutase)を alpha-MHC プロモーターの下流に入れ、心筋特異的過剰発現マウスを作製した。

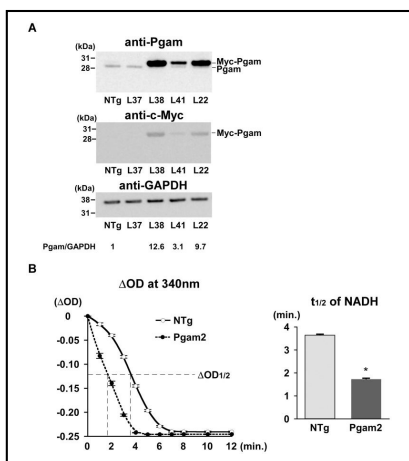


図 5

酵素活性をもった解糖系遺伝子の過剰発現モデルと考えられた。

このマウスにおいて、ミトコンドリア関連遺伝子発現の低下、活性酸素種の産生能の亢進を認めたが、基質の取り込みには変化を認めず、また MR スペクトロスコピーで推定されたエネルギー予備能についても変化を

認めなかった。

また、メタボローム解析により、エネルギー代謝に関連する、解糖系、クレブス回路、アミノ酸、核酸などの代謝産物を測定すると、解糖系の代謝産物については大きな変化を認めなかった。しかしクレブス回路の代謝産物には変化を認めた。

結果のまとめ：代謝産物の変化や基質利用、エネルギー予備能に変化は認めなかったが、何らかの作用により、ミトコンドリア機能に影響する可能性が示唆された (雑誌論文)。

今後の展望：解糖系は代謝に重要な役割を果たすため、代謝ネットワークの頑健さにより、変化を認めなかったと考えられた。介入に対して、より効果的な方法を模索する必要が示唆された。

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 5 件)

Okuda J, Niizuma S, Shioi T, Kato T, Inuzuka Y, Kawashima T, Tamaki Y, Kawamoto A, Tanada Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Adachi S, Soga T, Takemura G, Kondoh H, Kita T, Kimura T. Persistent overexpression of phosphoglycerate mutase, a glycolytic enzyme, modifies energy metabolism and reduces stress resistance of heart in mice.

PLoS One. 2013 Aug 12;8(8):e72173. doi: 10.1371/journal.pone.0072173. 査読有

Tamaki Y, Iwanaga Y, Niizuma S, Kawashima T, Kato T, Inuzuka Y, Horie T, Morooka H, Takase T, Akahashi Y, Kobuke K, Ono K, Shioi T, Sheikh SP, Ambartsumian N, Lukanidin E, Koshimizu TA, Miyazaki S, Kimura T. Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts. J Mol Cell Cardiol. 2013 Apr;57:72-81. 査読有

Kato T, Niizuma S, Inuzuka Y, Kawashima T, Okuda J, Tamaki Y, Iwanaga Y, Narazaki M, Matsuda T, Soga T, Kita T, Kimura T, Shioi T. Analysis of liver metabolism in a rat model of heart failure. Int J Cardiol. 2012 Nov 29;161(3):130-6. 査読有

Kato T, Shioi T. Abnormal liver metabolism and pro-inflammatory responses are modulators of cardiac cachexia in a rat model of heart failure. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2013; 4: 307-308. 査読有

Kato T, Shioi T, Kawamoto A, Kimura T, Nagakura D, Nakane E, Miyamoto S, Izumi T, Haruna T, Inoko M, Nohara R. Tc-99m Sestamibi washout is a useful method to assess cardiac mitochondrial function and the increased risk of a failing heart: A translational approach to understand the metabolic state of the heart. Circulation. 2012; 126: A10905. 査読有
http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/126/21_MeetingAbstracts/A10905

〔学会発表〕(計6件)

Kato T, Shioi T. Abnormal liver metabolism and pro-inflammatory responses are modulators of cardiac cachexia in a rat model of heart failure. 7th Cachexia Conference 2013.12.9-11, Kobe, Japan.

Kato T, Inoko M. A potential linkage between mitochondrial function of the heart and leg muscle in heart failure patients. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2014. 2014.5.4-7. Melbourne, Australia

Kato T, Fukui S, Kimura M, Okano M, Suu K, Morita Y, Minamino E, Nakane E, Miyamoto S, Izumi T, Haruna T, Inoko M. Mitochondrial Structural Abnormalities are Common Features in the Myocardium of Patients with Various Types of Cardiomyopathy. 第77回日本循環器学会学術集会 2014.3.21-23. 東京.

Kato T, Niizuma S, Inoko M, Shioi T, Kimura T. Cardiac Cachexia Accompanied with Abnormal Liver Metabolism and Pro-Inflammatory Responses in a Rat Model of Heart Failure. 第77回日本循環器学会学術集会 2014.3.21-23. 東京.

Kato T, Shioi T, Kawamoto A, Kimura T, Nagakura D, Nakane E, Miyamoto S, Izumi T, Haruna T, Inoko M, Nohara R. Tc-99m Sestamibi washout is a useful method to assess cardiac mitochondrial function and the increased risk of a failing heart: A translational approach to understand the metabolic state of the heart. AHA Scientific session 2012. 11.3-11.6. Los Angeles, CA, USA.

Kato T, Shioi T, Kawashima T, Kawamoto A, Kimura T. Mitochondrial function as a potential mediator of metabolic remodeling in the heart. ESC Congress 2012. 2012.8.25-29. Munich, Germany.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 貴雄 (KATO, Takao)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第

2 研究部・研究員

研究者番号：30583777