

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25860602
研究課題名(和文)心不全における心筋脂質代謝異常の機序の解明

研究課題名(英文)Metabolomics in heart failure

研究代表者

田中 秀和(Tanaka, Hidekazu)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20590342

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)：心房中隔欠損症患者の血中代謝物についてメタボローム解析を行ったところ、2-アミノ酪酸(2-AB)の血中濃度が健常人より有意に高く、閉鎖術により低下することを見出した。2-ABの生成経路について検討し、システインが合成される際に副産物として産生されることを明らかにした。システインはグルタチオンを構成するアミノ酸であり、酸化ストレス下でグルタチオン合成が代償的に亢進した際に2-ABも増加することを心不全モデル動物および心筋細胞を用いて明らかにした。2-ABはグルタチオンのホメオスターシスを反映しており、心臓における酸化ストレスを鋭敏に捉えることで心不全の超早期予知に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Heart failure is a major cause of morbidity and mortality worldwide. However, conventional biomarkers are insufficient to detect early stage of HF and identification of more sensitive markers is an urgent task. We conducted the comprehensive quantification of water-soluble metabolites in blood of atrial septal defect (ASD) patients using a gas chromatograph-mass spectrometry. We found the mean level of 2-Aminobutyric acid (2-AB) in ASD patients was significantly higher than that in healthy volunteers, and 1 month after transcatheter closure of ASD, serum 2-AB levels in patients decreased to almost the same levels as healthy volunteers. We revealed that 2-AB was produced as the byproduct of GSH synthesis reactions. We also demonstrated that oxidative stress lead to 2-AB production. 2-AB monitoring may facilitate the early diagnosis strategy for heart failure.

研究分野：医歯薬学

キーワード：心不全 メタボローム解析 2-アミノ酪酸 グルタチオン 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

心筋はエネルギー合成の基質として、脂肪酸とグルコースを取り込む。脂肪酸は細胞質でアシル化され、グルコースは解糖系でピルビン酸に代謝され、いずれもミトコンドリア内に移行する。

ミトコンドリア内で脂肪酸は酸化を受け、脂肪酸やピルビン酸由来のアセチル CoA が TCA 回路に入り、ATP が産生され、エネルギーとしてアクチンとミオシンの相互作用に利用される。成人の心臓では、エネルギー基質としては 70-90% が脂肪酸で、10-30% がグルコースである。

心不全では酸化が低下し、代償的にグルコース取込みが一時的に増加するが、進行すると脂肪酸・グルコース利用ともに減少し、エネルギーが供給されなくなり心不全は増悪する。

このように心臓はたゆまなく拍動を続けるため、巧みにエネルギーを供給するシステムを有する。一方で心臓にストレスがかかるとエネルギー代謝に速やかに影響が現れることが予想される。つまり、心臓に不可逆性変化が生じる前段階で、代謝異常を鋭敏に捕らえることができれば、心不全の超早期診断法の確立に寄与することが期待される。

心不全

- ・本邦での死因に占める比率は増加の一途
- ・多くは不可逆性
- ・再生医療の臨床応用はまだ先
- ・究極の治療は心移植だが、ドナー不足・拒絶反応の問題
- ・高額治療の増加(人工心臓・ペースメーカー)

早期診断・早期治療が非常に重要

心筋に不可逆性変化が生じる前段階でのストレスを代謝物プロファイルより察知する



2. 研究の目的

心不全の診断・治療法開発にブレイクスルーをもたらすことを目的に、メタボローム解析を用いて心不全における血中低分子代謝物のプロファイリングを行い、その情報に基づいて疾患制御標的分子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) 心不全患者における血清代謝物プロフ

ファイルについて質量分析を用いて検討する。

(2) 培養心筋細胞を用いて、各種ストレスを加えた際の代謝物プロファイルの変化について検討する。

(2) 心不全マウスモデルを用い、血清及び心臓の代謝物プロファイルと心不全の発症・進展との関係について検討する。

4. 研究成果

心房中隔欠損症患者においてカテーテル閉鎖術前および術後 1 か月での血清中の水性代謝物プロファイルについてガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて取得した。その中で我々はアミノ酸の一種である 2-アミノ酪酸 (2-AB) に注目し、下記のごとく病態における意義について検討した。

(1) 治療前における 2-AB の血中濃度は健常人より有意に高く、閉鎖術により健常人と同レベルにまで低下を示した。また治療前の血中 2-AB 濃度は心エコー図より求めた三尖弁収縮期圧格差と正の相関を示し、右室負荷を反映している可能性が示唆された。一方、臨床現場で心不全の病勢指標として用いられている脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) については治療前後でこのような関係は認めなかった。

(2) 培養心筋細胞を用い、伸展刺激を加えたところ、細胞内および培養液中で 2-AB が増加した。血中の 2-AB の一部は圧負荷により心筋より産生・放出されていることが示唆された。

(3) 2-AB の生成経路について検討したところ、ホモシステインからシステインが合成される経路の副産物として生体内で産生されることを証明した。

(4) 培養心筋細胞に酸化ストレスとして過酸化水素で刺激したところ、細胞内のグルタチオンおよび 2-AB とともに増加を認めた。システインはグルタチオンの生理活性に重要なチオール基を有する構成アミノ酸であり、酸化ストレス下でグルタチオンの合成が代償的に亢進した際にシステインの副産物として産生される 2-AB も増加することが示唆された。また、伸展刺激で心筋細胞内の 2-AB が増加した機序として酸化ストレスの亢進が関与している可能性が推察された。

(5) ドキソルピシンを腹腔内に投与して作成した心筋症モデルマウスで検討したところ、血中 2-AB 濃度の上昇を認めた。また、血中 2-AB 濃度は心エコー図より求めた左室内径短縮率と負の相関を示した。

(6) ドキソルビシン心筋症マウスより摘出した心臓でルシゲニン法を用い、活性酸素種が増加していることを確認した。また心臓組織を用い、メタボローム解析を行ったところ、2-AB もドキソルビシン投与により増加していた。一方、心臓組織中のグルタチオンは枯渇しておらず、酸化ストレス下で代償的に維持されていることが示唆された。

(7) これまでに酸化状態ではグルタチオンの消費に伴い、システインよりグルタチオンが合成される経路が活性化されると同一経路にて 2-AB よりオファタルミン酸も産生されることが報告されている。しかしながら、2-AB 自体が酸化ストレス下でどのように制御されているのかについてはこれまで不明であった。本研究において 2-AB がシステインの副産物として生成され、さらに酸化ストレス下ではグルタチオンのホメオスタシス調節を反映していることが明らかとなった。2-AB は心臓における酸化ストレスを鋭敏に捉えることで心不全の超早期予知に寄与することが期待される。

鋭敏な酸化ストレスマーカーとしての 2-ABの可能性

- ✓ GSHは細胞内に比べ細胞外の濃度が低く、血中濃度の正確な評価は難しい。
- ✓ GSHは酸化ストレス下で必ずしも枯渇しない。
- ✓ 2-ABはGSHの代償的な生合成を反映。
- ✓ 低分子である2-ABはGC/MSで精度よく、また再現性をもって測定が可能である。



GSH : グルタチオン

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)

Nakajima H, Ishida T, Satomi-Kobayashi S, Mori K, Hara T, Sasaki N, Yasuda T, Toh R, Tanaka H, Kawai H, Hirata K. Endothelial lipase modulates pressure overload-induced heart failure through alternative pathway for fatty acid uptake. Hypertension. 2013;61:1002-7.

Miyoshi T, Tanaka H, Kaneko A, Tatsumi K, Matsumoto K, Minami H, Kawai H, Hirata K. Left ventricular endocardial dysfunction in patients with preserved ejection fraction after receiving anthracycline.

Echocardiography. 2014;31:848-57.

Tanaka H, Matsumoto K, Sawa T, Miyoshi T, Motoji Y, Imanishi J, Mochizuki Y, Tatsumi K, Hirata K. Evaluation of global circumferential strain as prognostic marker after administration of β -blockers for dilated cardiomyopathy. Int J Cardiovasc Imaging. 2014;30:1279-87.

〔学会発表〕(計4件)

中島 英人、高比重リポ蛋白による心筋細胞保護作用の検討、2014.7.10-11、第46回 日本動脈硬化学会総会、東京(日本)

入野 康宏、GCMSを用いた心不全マーカー探索、2014.10.16-17、第39回日本医用マススペクトル学会年会、千葉(日本)

杜 隆嗣、心不全における新たなバイオマーカーとしての 2-Aminobutyric acidの可能性、2014.10.10-12、第18回 日本心不全学会学術集会、大阪(日本)

入野 康宏、Circulating levels of 2-Aminobutyric acid reflect myocardial redox state in patients with atrial septal defects、2014.11.15-19、American Heart Association Scientific Sessions 2014、シカゴ(アメリカ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im1/doctor/activity/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 秀和 (TANAKA, Hidekazu)
神戸大学 医学研究科・講師
研究者番号：20590342

(2) 研究協力者

杜 隆嗣 (TOH, Ryuji)
神戸大学 医学研究科・特命准教授
研究者番号：50379418

(3) 研究協力者

平田 健一 (HIRATA, Ken-ichi)
神戸大学 医学研究科・教授
研究者番号：20283880