

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461070

研究課題名(和文) 心不全発症・進展の超早期予知を目的とした新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Metabolomic Identification of Novel Regulators of Cardiac Oxidative Stress in Heart Failure

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて心房中隔欠損症患者の血中代謝物プロファイルを解析したところ、血行動態を反映して ヒドロキシ酪酸(OHB)および2-アミノ酪酸(2-AB)が変化していた。負荷がかかった心臓ではケトン体の一つである OHBが蓄積し、酸化ストレスに対し保護的に作用することを明らかにした。一方、2-ABはグルタチオンの構成アミノ酸であるシステイン合成時の副産物であり、体内のグルタチオン代謝を鋭敏に反映することがわかった。さらに2-ABはグルタチオン合成自体も促進し、やはり酸化ストレスに対し心筋保護的に作用することを証明した。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive quantification of serum metabolites in patients with atrial septal defect revealed that circulating levels of β -hydroxybutyrate (OHB) and 2-aminobutyric acid (2-AB) reflected hemodynamic changes. First, we demonstrated that oxidative stress can cause myocardial OHB accumulation by downregulation of SCOT, a key enzyme of ketone body utilization. Since we found that OHB has anti-oxidative properties, the accumulation of myocardial OHB may serve as a compensatory response against oxidative stress. Next, we newly revealed that 2-AB modulates glutathione (GSH) homeostasis. We proved that 2-AB is a byproduct of cysteine in GSH synthetic pathway. Intriguingly, we revealed that 2-AB increased intracellular GSH levels by activating AMPK, and exert protective effects against oxidative stress in cardiomyocytes. Furthermore, oral administration of 2-AB increased both circulating and myocardial GSH levels in mouse model of heart failure.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 メタボローム解析 ヒドロキシ酪酸 ケトン体 2-アミノ酪酸 グルタチオン

1. 研究開始当初の背景

高齢化及び虚血性心疾患の増加に伴い、我が国においても他の先進国同様、心不全が死因に占める比率は増加の一途である。近年、心不全に対する薬物および非薬物療法は飛躍的進歩を遂げているものの、心筋細胞の再生が臨床応用にいたる目途がたっていない現状ではいまだ心移植が最終手段であるが、ドナー数の絶対的な不足、また拒絶反応の問題もあり究極の治療法ではない。そのため心不全の発症をいち早く予知し、進展を予防すべくタイミングを逸さずに治療介入していくことが非常に重要である。しかしながら、早期診断に有用なバイオマーカーはいまだ確立されておらず、心電図や心エコー図、心臓カテーテル検査をはじめとした各種生理学的・画像診断法では心筋障害がある程度進行していないと検出が難しいのが実情である。つまり低侵襲的で、簡便な早期に心不全を予知するマーカーの確立は疾病対策のみならず、医療経済の観点からも非常にニーズの高い課題である。

2. 研究の目的

心筋に不可逆性変化が生じる前段階でのストレスを反映する代謝物を探索し、心不全の画期的な超早期診断法の開発さらには新たな治療戦略の構築を目指した。

3. 研究の方法

心房中隔欠損症患者の血清中の水溶性代謝物プロファイルをガスクロマトグラフィー質量分析計により検討したところ、ケトン体の一つであるヒドロキシ酪酸 (OHB) 及び 2-アミノ酪酸 (2-AB) がともに上昇しており、一方で欠損孔閉鎖術により健常人レベルまで低下することを明らかにした。そこでこれら代謝物の心不全における代謝制御機構ならびに病態生理的役割について培養心筋細胞および心不全モデル動物を用いて検討した。

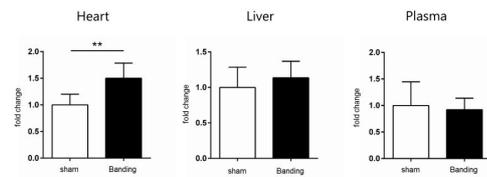
4. 研究成果

ケトン体は糖が枯渇した際に主に脳や骨格筋、心筋で代替エネルギー源となる。心不全では血中や呼気中のケトン体濃度が上昇することがこれまでに報告されていた。その機序のひとつとして交感神経の活性化に伴い、脂肪分解が促進し、その結果として肝臓でのケトン体産生が亢進するためと考えられている。一方、近年、ケトン体のひとつである OHB は代替エネルギーとしてだけでなく、HDAC 阻害作用を有し、抗酸化作用などの生理作用を発揮することが報告されている。

我々はまず大動脈縮窄による圧負荷モデ

ル・マウスを用い、血中の OHB 濃度を測定したところ、予想に反し上昇を認めなかった。さらに肝臓の OHB 濃度も増加を認めなかった。一方で、心臓の OHB 濃度は上昇しており、肝臓でのケトン体産生の亢進が起こる前より心臓での濃度上昇が起こりうることが示唆された。そこでラット新生児の心臓より初代培養した細胞を用いて検討したところ、過酸化水素刺激により心筋細胞では OHB 濃度が上昇するが、非心筋細胞では変化しないことを明らかにした。

左室圧負荷モデルマウスでβOHBは心臓でのみ上昇していた

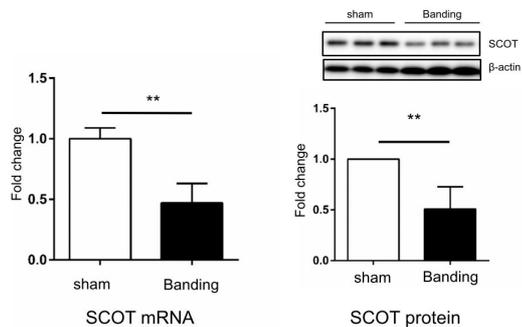


Banding: 大動脈縮窄術後 (左室圧負荷モデル)

Nagao M, Toh R, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;475:322-8

血中より OHB が供給されないにもかかわらず、心臓で OHB 濃度が上昇する機序について不全心モデルの心臓組織を用いて検討を行った。まずケトン体を合成する HMG-CoA 合成酵素については発現の亢進を認めなかった。そこでケトン体の肝外利用に重要な酵素であるサクシニル-CoA : 3-ケト酸 (SCOT) について検討したところ、不全心では発現が低下していることを確認した。上述の培養心筋細胞でも過酸化水素刺激により、SCOT の発現が低下することを確認した。以上より不全心ではケトン体の利用が抑制されることで OHB が蓄積する可能性が示唆された。

圧負荷モデルマウスの心筋でSCOTの発現は低下していた

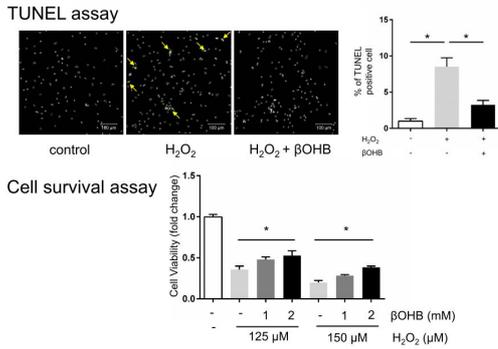


Nagao M, Toh R, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;475:322-8

次に不全心における OHB の病態生理的役割について検討した。培養心筋細胞に OHB を添加したところ、抗酸化に作用する FOXO3a や SOD2、カタラーゼの遺伝子発現がいずれも亢進した。また過酸化水素刺激による活性酸素種の産生が OHB をあらかじめ添加しておくことで抑制されることをジハイドロエチジウム染色にて確認した。さらに過酸化水素

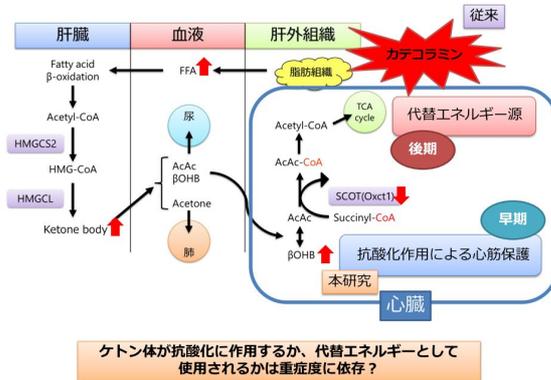
刺激による心筋細胞のアポトーシスも抑制することを明らかにした。

βOHBは酸化ストレスに対して細胞保護効果を示した



Nagao M, Toh R, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;475:322-8

以上より酸化ストレスに対し代償性反応として OHB は心臓内に蓄積し、心筋保護的に作用する可能性が示唆された。一方で末期心不全では OHB を代替エネルギーとして利用する経路が活性化し、ATP 産生源として重要な役割を果たすとの報告が近年、なされている。不全心における OHB の役割が病態の重症度に応じ抗酸化作用または代替エネルギー、どちらかにウェイト・シフトする可能性について今後、さらに検討を予定している。



2-AB は神経伝達物質として知られる GABA の構造異性体であるが、これまでにグルタチオン合成の際に同時に産生されるオファルミン酸の基質であることが報告されていたのみであり、2-AB 自体の代謝や生理作用についてはまったくわかっていなかった。

我々はまず、生体内での 2-AB の代謝について検討したところ、グルタチオンの構成アミノ酸の一つであるシスチンがシスタチオニンから産生される際の副産物である 2-オキソ酪酸にトランスアミナーゼの触媒によりアミノ基が転移され合成されることをはじめて明らかにした。

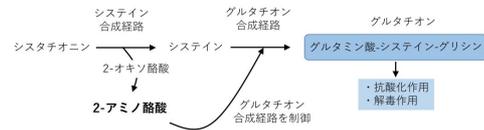
シスチンのチオール基はグルタチオンによる還元的な活性酸素種の除去や、求電子的な化合物の解毒などの化学反応をつかさどり、グルタチオンの生合成においてシスチンの供給が律速段階となる。そこで引き続き、過酸化水素や伸展刺激を加えた培養心筋細胞を用いて検討したところ、グルタチオンが代償性に合成が亢進すると血中の 2-AB も

増加することを明らかにした。

また酸化ストレスを介してミトコンドリアが豊富な心臓にダメージを与えるドキシソルピシンを用いた心筋症モデル・マウスにおいても、2-AB が体内でのグルタチオンの変動を鋭敏に反映するバイオマーカーとなりうることを証明した。

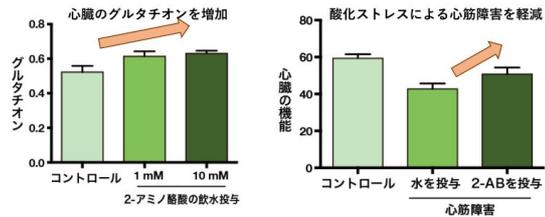
次に 2-AB の生理作用を検討するにあたり、その前駆体である 2-オキソ酪酸はエステル化を要するのに対し、2-AB はそのまま細胞内に取り込まれることをまず確認した。そして驚くべきことに 2-AB は細胞内のグルタチオン濃度を上昇させ、酸化ストレスに保護的に作用することを発見した。その傍証として 2-AB を添加した細胞では代謝プロファイルはグルタチオン合成亢進を示唆しており、また NADPH による還元型グルタチオンの維持に関与する AMPK を活性化することも明らかにした。さらに 2-AB は経口投与により血中濃度を上昇させることができるとともに、血中ならびに心臓中のグルタチオン濃度を効率的に増加させ、前述のドキシソルピシンによる心筋障害を軽減させることも動物実験にて確認した。

2-アミノ酪酸によるグルタチオン代謝制御機構



✓ 2-アミノ酪酸はシスチンが合成される際の副産物として産生され、グルタチオンの変動を鋭敏に反映する。

✓ 2-アミノ酪酸は細胞内のグルタチオン濃度を増加させ、酸化ストレスを軽減する



生体内においてグルタチオンは活性酸素種の消去や、求電子的な生体異物の解毒代謝において極めて重要な役割を果たしており、老化やがん、生活習慣病、動脈硬化、アルツハイマー病など酸化ストレスが関与する様々な疾患、薬剤や毒物による臓器障害、さらには化学療法や薬剤耐性など多様な病態に関与している。したがってグルタチオンの代謝を制御すべく、世界中で精力的に研究が行われているが、2-AB による恒常性維持機構を解明したのは我々がはじめてであり、これまでとは全く異なるユニークなアプローチの診断ツール開発および創薬へと展開してゆくことが期待される（特許出願中）。さらに特筆すべき点は 2-AB は天然に存在するアミノ酸であり、日頃より摂取している食品中にも存在しているため、機能性食品としての

開発を通じて実際の臨床現場へのスピーディーな導入につなげていけるよう産学連携も視野に入れている。

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 3件)

1. Nagao M, Toh R, Irino Y, Mori T, Nakajima H, Hara T, Honjo T, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Hirata K. -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;475:322-8.

2. Irino Y, Toh R, Nagao M, Mori T, Honjo T, Shinohara M, Tsuda S, Nakajima H, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Miyata O, Hirata KI. 2-Aminobutyric acid modulates glutathione homeostasis in the myocardium. *Sci Rep*. 2016;6:36749.

3. 杜 隆嗣、入野 康宏. 2-アミノ酪酸による体内酸化防止機能 ~新たなグルタチオン代謝制御機構の発見~. 月刊 BIO INDUSTRY(株式会社シーエムシー出版). 2017年.

〔学会発表〕(計 9件)

1. 入野 康宏、杜 隆嗣、森 健茂、長尾学、本庄 友行、小林 成美、新家 俊郎、石田 達郎、宮田 興子、平田 健一. GCMSを用いた心不全バイオマーカー探索. 第39回日本医用マススペクトル学会年会. 千葉. 2014年.

2. Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takeshige Mori, Manabu Nagao, Tomoyuki Honjo, Seimi Satomi-Kobayashi, Tatsuro Ishida, Okiko Miyata, and Ken-ichi Hirata. 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. 第18回日本心不全学会学術集会. 大阪. 2014年.

3. Yasuhiro Irino, Ryuji Toh, Takeshige Mori, Manabu Nagao, Tomoyuki Honjo, Seimi Satomi-Kobayashi, Toshiro Shinke, Tatsuro Ishida, Okiko Miyata, and Ken-ichi Hirata. Circulating levels of 2-Aminobutyric acid reflect myocardial redox state in patients with atrial septal defects. *American Heart Association Scientific Sessions 2014*. シカゴ(米国). 2014年.

4 Nagao M, Toh R, Irino Y, Mori T, Honjo T, Satomi-Kobayashi S, Shinohara M, Shinke T, Ishida T, Hirata K. 2-Aminobutyric acid reflect myocardial redox state in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Metabolomics* 2015. サンフランシスコ(米国). 2015年.

5. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takeshige Mori, Tomoyuki Honjo, Seimi Satomi-Kobayashi, Masakazu Shinohara, Toshiro Shinke, Tatsuro Ishida, and Ken-ichi Hirata. Feasibility of 2-Aminobutyric acid as a biomarker for early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity. 第79回日本循環器学会学術集会. 大阪. 2015年.

6. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takeshige Mori, Tomoyuki Honjo, Seimi Satomi-Kobayashi, Toshiro Shinke, Hidekazu Tanaka, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata. Elevated -hydroxybutyrate due to downregulation of SCOT exerts cardioprotective effects in failing hearts. 第80回日本循環器学会学術集会. 仙台. 2016年.

7. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takeshige Mori, Tetsuya Hara, Tomoyuki Honjo, Seimi Satomi-Kobayashi, Toshiro Shinke, Hidekazu Tanaka, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata. Compensatory Accumulation of Hydroxybutyrate Accompanied by SCOT Downregulation in Failing Hearts. *American Heart Association Scientific sessions 2016*. ニューオリンズ(米国). 2016年.

8. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Takeshige Mori, Tetsuya Hara, Tomoyuki Honjo, Seimi Satomi-Kobayashi, Toshiro Shinke*, Hidekazu Tanaka, Tatsuro Ishida*, Ken-ichi Hirata. Compensatory Accumulation of Myocardial -Hydroxybutyrate Accompanied by SCOT Downregulation in Response to Oxidative Stress. 第33回 ISHR日本部会総会. 東京. 2016年.

9. Manabu Nagao, Ryuji Toh, Yasuhiro Irino, Hidekazu Tanaka, Toshiro Shinke, Tatsuro Ishida*, Ken-ichi Hirata. 2-aminobutyric acid as a newly identified modulator of glutathione homeostasis in failing myocardium. 第81回日本循環器学会学術集会. 金沢. 2017年.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：抗酸化誘導剤および抗酸化誘導剤を併用する主治療薬のスクリーニング方法
発明者：入野康宏、杜 隆嗣、平田健一
権利者：国立大学法人神戸大学
番号：特願 2016-136751
出願年月日：2016/7/11
国内外の別： 国内

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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/ebim/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()