

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：24405

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K23992

研究課題名（和文）乳酸を基軸とした心臓エネルギー代謝可塑性の理解

研究課題名（英文）Role of lactate metabolism in the metabolic flexibility of the heart.

研究代表者

中釜 悠（Nakagama, Yu）

大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60846880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：臓器固定法、代謝物抽出法の工夫により、高感度な心臓メタボローム解析のプラットフォームを構築した。心臓負荷下での心臓特異的LDHアイソフォーム欠失マウスの表現型解析から、心筋ミトコンドリア呼吸を賦活する乳酸が、運動など心筋代謝ストレスに耐受するために重要なエネルギー基質であることが示唆された。それらを説明する心臓代謝シグネチャとして、乳酸代謝の障害を契機とした「過還元状態（電子の鬱滞）」を描出することに成功した。さらに、乳酸代謝は、細胞質とミトコンドリア間でNADHの還元当量を連携する、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルとの協調的な作用を介し、ミトコンドリア呼吸を賦活していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝回転の早い心臓組織においてエネルギー代謝を高精度に解析することは困難であったが、我々は、独自に最適化した試薬投与方法、臓器固定・回収時間、代謝物抽出法により、高感度な心臓メタボローム解析を実現した。これらを、世界に先駆け樹立したLDHアイソフォーム心臓特異的欠失マウスの心臓疾患代謝解析に適用することで、心臓病態を通底する疾患代謝の特徴の一つとして「過還元状態」の存在が示唆された。エネルギー基質としての乳酸が持つ固有の役割が明らかとなり、今後、乳酸代謝を切り口とした病態理解、心筋ミトコンドリア呼吸賦活法の開発への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：It has long been difficult to analyze energy metabolism with high precision in cardiac tissues, which show rapid metabolic turnover. We herein applied our optimized methodology for tissue fixation and metabolite extraction for depicting, with high sensitivity, cardiac lactate metabolism. We performed phenotypic analysis of LDH-deficient mice under multiple cardiac overload conditions and were able to show that LDH-deficient mice have impaired tolerance to increased afterload and/or exercise. Furthermore, we succeeded in depicting that the "hyperreduced state (electron congestion)" of the heart, triggered by impaired lactate metabolism, characterized the metabolic signature of LDH-deficient hearts and played central roles in inducing the cardiac dysfunction. Heart lactate oxidation was stimulating mitochondrial respiration via a concerted NADH recycling reaction with the malate-aspartate shuttle.

研究分野：循環器病学

キーワード：心臓 エネルギー代謝 乳酸

## 1. 研究開始当初の背景

乳酸に対しては、従来、「筋疲労の原因物質」或いは「敗血症の予後増悪因子」といった、グルコース代謝過程の老廃物たる悪評が既成概念化していた。しかし、ありとあらゆるエネルギー代謝基質を取り込む「雑食な心臓」においては、心筋細胞は乳酸すらも積極的に取り込み、利用することが近年報告された。心臓のエネルギー代謝は、一見すると、無秩序で選択性に乏しい代謝様式の印象を与えてきた。しかし、近年の心臓エネルギー代謝研究が明らかにしたことは、あらゆる状況下で循環維持装置としての役割を全うするためにも、心臓においてはエネルギー代謝基質の積極的使い分けが行われている、という事実であった。すなわち心臓の雑食性は、激しく変化する外的環境および内的需要に呼応しながら正常な臓器機能を保つための、エネルギー基質を巧みに使い分ける適応戦略、と捉え直されている。

乳酸は、血中に最も豊富に存在する代謝物の一つであるが、心臓乳酸代謝の詳細な解析が試みられたことは無く、(i) 心筋細胞における乳酸代謝を可能たらしめる分子メカニズム、そして、(ii) 心臓の代謝適応戦略における乳酸代謝の意義付けはこれまで不明であった。心筋に備わった分子遺伝学的特徴および表現型の中で、乳酸代謝と強く関連する因子を探索する過程で、心筋に特異的に発現する乳酸脱水素酵素 (LDH) アイソフォーム B に着目し、同アイソフォームが心筋における乳酸利用調整のキー酵素であることを見出した。また乳酸は、心筋細胞におけるミトコンドリア酸素呼吸の活性化作用を有していた。これら予備的知見に基づき、「莫大な酸素消費と引き換えにしてまで、他の細胞にとっては老廃物に過ぎない乳酸を、敢えて積極的に代謝するようになった心筋細胞の適応戦略」を理解したい、と考えた。

## 2. 研究の目的

心臓乳酸代謝へ遺伝子工学的に介入した「LDH アイソフォーム心臓特異的 KO (cKO) マウス」を用いて、乳酸を代謝老廃物ではなく生理的代謝基質として捉え直し、心臓乳酸代謝可塑性が臓器・個体の恒常性維持に果たす役割を解明することが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 単離マウス成獣心筋細胞の代謝フラックス解析

8-10 週齢雄 C57BL6 野生型 (対照) マウスおよび LDH アイソフォーム cKO マウス心臓にランゲンドルフ灌流を行い、心筋細胞を単離した。単離心筋細胞はアッセイ培地 (低緩衝能 Dulbecco 改変 Eagle 培地 + 25 mM ブドウ糖) に 10000 細胞/mL の密度で懸濁され、675  $\mu$ L/ウェルがラミニン (Invitrogen) コートを施した Seahorse XF24 V7 プレート (Agilent) に播種された。Seahorse XF 代謝フラックスアナライザー (Agilent) を用いて、酸素消費速度、細胞外酸性化速度計測を行った。

### (2) マウス表現型解析

安静時、および薬物 (イソプロテレノール塩酸塩 (東京化成工業) 0.1  $\mu$ g/g 体重、腹腔内投与) 負荷時、経胸壁心臓超音波検査を実施し、左室駆出率を計測した。また、トレッドミル試験による走行距離・時間を記録し、運動耐容能を評価した。

### (3) 組織固定、代謝物抽出

浅吸入麻酔下に MMW-05 マイクロウェーブアプリケーション (室町機械) を用いてマウス心臓組織へのマイクロ波フォーカス照射を行い、固定後の心臓組織からクロロホルム/メタノール抽出

により、水溶性画分の代謝物を回収し、乾燥濃縮した。

#### (4) 代謝物の定量解析、および安定同位体ラベル法による乳酸代謝動態解析

安静時の8-12週齢LDHアイソフォームcKOおよび対照マウスに、18 mM (pH 7.4) に調整されたL-乳酸13C (大陽日酸) 300  $\mu$ Lを腹腔内投与した。5分、10分、30分時点でマイクロ波心臓固定を行い、前項の方法で代謝物を抽出した。13Cラベル/非ラベル代謝物をLC-MS/MSで定量した。

#### (5) 高性能液体クロマトグラフィー (UPLC)、酵素発光法によるNADH、NAD<sup>+</sup>定量

UPLC (Waters) およびNADH/NAD<sup>+</sup> Glo Assay (Promega) によりNADH/NAD<sup>+</sup>、を定量した。前者では、分離用カラムに逆相UPLCカラム18C ODS (Acquity) を使用し、10 mMリン酸ナトリウム (pH 6.9) と10%アセトニトリルを溶媒としたグラジエント溶出を行い、検出には260 nmの吸光を用いた。後者では、マウス心臓代謝物抽出液に検出試薬混合液を添加後、15分値の発光を計測した。

#### (6) 心筋炎モデルの樹立、解析

コクサッキーウイルス、トリパノソーマ (MOI = 10:1) を用い、代表的心臓病態の一例として、「心筋炎」を模倣する疾患モデルを樹立し、心臓の「過還元状態」が、心臓病態を通底する疾患代謝の特徴であるかを検証した。

### 4. 研究成果

10 mM乳酸ナトリウム添加前後で、単離マウス成獣心筋細胞の酸素消費速度は有意に上昇し、乳酸による心筋ミトコンドリア呼吸の賦活が示唆された。LDHBは、LDHAに比べ乳酸酸化反応の最大速度がおおよそ2倍上回り ( $V_{maxLDHB} > V_{maxLDHA}$ )、 $K_{mLDHB} = 1.079$  mM ( $K_{mLDHA}$ のおおよそ1/4) は、生体内乳酸濃度 (0-2.0 mM) を勘案するに、LDHBを主体とした乳酸酸化を説明する数値として妥当であった。研究開発期間の前半 (R1-2年度) までに、(i) 薬剤負荷、(ii) トレッドミル運動試験の2つの負荷モデル下でLDHアイソフォームcKOマウスの表現型解析を進めた。その結果、同マウス心においては乳酸代謝障害が背景となり、(i) イソプロテレノールの陽性変時・変力作用に伴う心負荷によってエネルギー代謝不全が顕在化 ( $p = 0.003$ ) し、(ii) 運動負荷耐容強度 ( $p = 0.027$ ) が減弱していた。さらに、次に、これら表現型の背景にある代謝シグネチャを理解したいと考え、代謝回転の早い心臓組織においても堅牢なデータ取得が可能となる方法論構築を進めた。慶應大学との共同研究によって独自に最適化した臓器固定法、代謝物抽出法を用いたことによって、旧来の心臓エネルギー代謝研究では成し得なかった、高精度・高感度な心臓メタボローム解析プラットフォームの整備を達成した。またLDHアイソフォームcKOマウス心の後負荷/運動耐容能低下を説明する心臓代謝プロファイルを理解する目的で、13C安定同位体標識化合物を用いたマウス心代謝フラックス解析系を構築し、基盤データ取得を行った。さらに、心臓代謝プロファイルを発現代謝酵素のパターンと突合し理解するために、網羅的心臓遺伝子発現解析系 (RNA-seq) を構築し、データ取得を行った。

研究開発期間の後半 (R3-4年度) 以降、心臓メタボロームおよびトランスクリプトームデータの統合解析から、LDHアイソフォームcKOマウス心臓においては、NADH貯留によりNADH/NAD<sup>+</sup>が上昇 ( $p = 0.002$ ) し「過還元状態 (電子の鬱滞)」が存在することが見出された。細胞質プールの酸化還元状態を反映すると言われる乳酸/アラニン比のマウス系統間比較から、細胞質プールにおける電子鬱滞の可能性が示唆された ( $p = 0.031$ )。なお、PDKを介したPDH複合体のリン酸化・脱リン酸化調節が、この心臓過還元状態を駆動していることが明らかになった。糖に加え、乳酸をも積極的に酸化する心筋細胞の細胞質では、余剰に生じるNADHを再酸化・再利用す

る機構の存在が示唆された。LDH アイソフォーム cKO マウス心においては、細胞質 MDH 活性までもが低下しており ( $p = 0.016$ )、心臓乳酸代謝がリンゴ酸-アスパラギン酸シャトルと協調的に機能している傍証が得られた。同成果をまとめた論文は、公表に向けた編纂の段階にある。

また心臓の「過還元状態」が、心臓病態を通底する疾患代謝の特徴であるかを検証すべく、心筋炎モデルを樹立した。宿主心筋と病原体との相互作用が引き起こす心臓代謝変容について、網羅的心臓遺伝子発現解析のデータを取得した他、病原体感染後のリアルタイム代謝フラックス解析の実験系を構築し、心筋炎モデルの酸素呼吸、嫌氣的解糖の活性評価を進めた。心筋炎進行の分子的背景の中でもシグナル因子を介した重症化カスケードについて解明した研究成果は複数の学会（国内学会 3 件、国際学会 3 件）において公表しており、代謝シフト含めた遺伝子発現変動の網羅的解析結果を学術論文として公表することができた (doi: 10.1101/2023.02.27.530371)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakagama Shun, Candray Katherine, Yamamoto Tasuku, Tsugeno Yuta, Nakagama Yu, Kido Yasutoshi, Nitahara Yuko, Maejima Yasuhiro, Sasano Tetsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Inflammatory cardiomyopathy of possibly overlapping aetiology: a case posing treatment dilemma and potential association	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ESC Heart Failure	6. 最初と最後の頁 761 ~ 765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ehf2.13771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakagama Yu, Ito Masamichi	4. 巻 86
2. 論文標題 Towards Deeper Phenotyping of the Dilated Cardiomyopathies in Children Where Are We Now, and Where Are We Heading?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 116 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-21-0802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tamamitsu Ayaka Monoi, Nakagama Yu, Domoto Yukako, Yoshida Kenichi, Ogawa Seishi, Hirono Keiichi, Shindo Takahiro, Ogawa Yosuke, Nakano Katsutoshi, Asakai Hiroko, Hirata Yoichiro, Matsui Hikoro, Inuzuka Ryo	4. 巻 62
2. 論文標題 Poor Myocardial Compaction in a Patient with Recessive <i>MYL2</i> Myopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 445 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1536/ihj.20-639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamura Kenichi, Nakagama Yu, Takeda Norihiko, Soma Katsura, Sato Tatsuyuki, Isagawa Takayuki, Kido Yasutoshi, Sakamoto Masaya, Manabe Ichiro, Hirata Yasutaka, Komuro Issei, Ono Minoru	4. 巻 141
2. 論文標題 Therapeutic targeting of mitochondrial ROS ameliorates murine model of volume overload cardiomyopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagama Yu, Takeda Norihiko, Ogawa Seishi, Takeda Hiroyuki, Furutani Yoshiyuki, Nakanishi Toshio, Sato Tatsuyuki, Hirata Yoichiro, Oka Akira, Inuzuka Ryo	4. 巻 8
2. 論文標題 Noonan syndrome associated biallelic LZTR1 mutations cause cardiac hypertrophy and vascular malformations in zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e1107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.1107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shun Nakagama, Katherine Candray, Tasuku Yamamoto, Yu Nakagama, Yasutoshi Kido, Yasuhiro Maejima, Tetsuo Sasano
2. 発表標題 Symptomatic AV block encountered in the Latin American context: rethinking the etiological diagnosis in the globalized era
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中釜悠、Katherine Candray、伊藤正道、仁田原裕子、金子明、城戸康年
2. 発表標題 シャーガス心筋症in vitroモデリングによる病態理解
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中釜悠
2. 発表標題 シャーガス慢性心筋炎の病態形成機構
3. 学会等名 第56回日本小児循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakagama Y, Takeda N, Kido Y, Sato T, Inuzuka R, Komuro I
2. 発表標題 Lactate as a fuel for the mammalian heart
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------