

令和元年6月19日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10213

研究課題名(和文)重症心不全のreverse remodelingの特異的バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Metabolic profiling of reverse remodeling and cardiac recovery in end-stage congestive heart failure

研究代表者

仲村 輝也 (Nakamura, Teruya)

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：90511626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：補助人工心臓(LVAD)を装着した拡張型心筋症患者においてメタボロミクスによる代謝産物の変動を解析した。患者は健常人に比べてエネルギー代謝産物、およびコラーゲン代謝産物が増加しており、これらはLVAD装着による心負荷軽減で正常化した。一方で男性ホルモンの代謝産物や鬱病のマーカーは低下しており、これらはLVAD後も軽減しなかった。以上より、治療介入でエネルギー代謝やミトコンドリア機能が正常化する事が新たに示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡張型心筋症などによる重症心不全の発症メカニズムの多くは不明であり新たな研究手法として、メタボローム解析(メタボロミクス)が注目されている。本研究では、拡張型心筋症を代表とした心不全患者には特徴的な代謝パターン、特にエネルギー代謝、ミトコンドリア機能や性機能などの障害が認められ、一部は治療介入により正常化することを明らかにした。これらの結果はメタボロミクスによる代謝産物プロファイリングが重症心不全の発症メカニズム、治療効果判定(バイオマーカー)および新たな治療法の解明の一助となる可能性をもたらした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we examined the change in metabolic profiles using systematic analysis of metabolites in patients with dilated cardiomyopathy (DCM) that required left ventricular assist device (LVAD). Energy metabolites such as ones in TCA cycle and beta-oxidation are increased compared to normal, and the increased metabolites decreased to normal levels several weeks after LVAD insertion. In contrast, sex hormone metabolites and biomarkers of depression were low in DCM patients, and these did not change after LVAD insertion. These findings demonstrated that the energy metabolic profiles in patients with DCM were changed drastically by ventricular unload, supporting, at least in part, the biochemical mechanisms of reverse remodeling of the ventricle in patients with end-stage heart failure.

研究分野：外科学(心臓外科)

キーワード：心不全 reverse remodeling メタボロミクス 拡張型心筋症 補助人工心臓 バイオマーカー

1. 研究開始時の背景

心不全は拡張型心筋症や虚血性心疾患によって引き起こされる疾患群の総称である。慢性心不全患者は現在全世界で約 2300 万人とされ、癌と並んで世界的に最も重要な疾患の一つである。またその医療費は 2030 年には倍増するとも予測されている。心不全の初期には薬物治療が効果的であるものの、多くは進行性であり重症化する。治療抵抗性の重症心不全において根本的な治療は心臓移植しかないが、心臓移植の最大の問題は絶対的なドナー不足である。特にドナー不足が深刻な問題となっている我が国では移植到達までの長い待機期間に補助人工心臓を装着し移植を待つ事になる。一方、補助人工心臓を装着する事により、血液循環の改善のみならず左心室の負荷が軽減され、破綻した左室心筋構造および機能の回復(reverse remodeling)をもたらす可能性がある。時として補助人工心臓からの離脱が可能な症例も散見され、実際に当科ではこれまで 13 例において補助人工心臓の永久離脱に成功している。このような不全心筋の reverse remodeling の過程では心筋細胞において多くの分子生物学的変化が起こる事が報告されているが、その機序は大部分が不明である。また reverse remodeling の指標となるバイオマーカーはこれまで知られておらず、実際には人工心臓の離脱試験などを行い、臨床的に確認するしかない。補助人工心臓からの離脱症例は疾患の改善すなわち reverse remodeling のメカニズム探求において非常に有用なモデルとなり得る一方で、reverse remodeling のバイオマーカーが同定できれば、心不全の重症度や治療効果の判定のみならず新たな治療法の開発につながる可能性がある。

近年、分子生物学的なゲノムやタンパク解析で得られた大量情報とコンピュータープログラミングを結びつけたバイオインフォマティクスの手法が注目されている。今回の研究手法であるメタボミクスとは、個体や組織、新陳代謝の実態および代謝ネットワーク（代謝マップ）によって生じた、主に低分子量の代謝産物総体を、バイオインフォマティクス的手法を用いて網羅的に解析する研究手法である。メタボミクスは、ゲノム（ゲノミクス）やタンパク質（プロテオミクス）に比べて、1) 対象物質が約 3,000 とより集約、限定されており、そのほとんどは既知の物質である 2) 代謝物質は表現型に最も近いため表現型での変化が観察しやすい 3) 種を超えて分析情報を共有できるため動物実験と臨床サンプルの共通性も確認しやすい など多くの利点がある。ほとんどの代謝物質より細胞の遺伝子レベルでの反応のみならず環境的因子によっても起こる特定の代謝産物の量的変化をキャッチできることから、疾患のバイオマーカーの探索にも有用であることが期待され、実際に大腸がんや鬱病などの新たなバイオマーカーがこれまで同定されている。

2. 研究の目的

以上より、本研究の目的は、近年注目されているメタボローム解析により、拡張型心筋症の患者に対する補助人工心臓装着前後および離脱後の血液中に存在し、心機能の回復過程すなわち reverse remodeling に特異的に変化する低分子代謝産物を同定し、バイオマーカーとしての有用性を検討する事である。ひいては拡張型心筋症を代表とする重症心不全の病態解明および治療開発の一助とする事である。

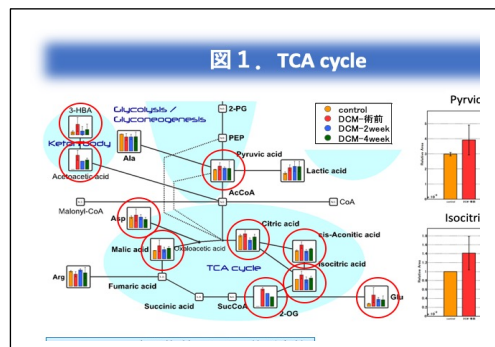
3. 研究の方法

1. 対象患者：大阪大学倫理委員会の承認のもとに、2015年8月から2016年1月に拡張型心筋症による末期心不全のため補助人工心臓埋め込みの必要な患者(4例、平均41.0±10.3歳)から研究参加の同意を得た。またコントロールとして健康人ボランティア(2名)からも同意を得た。補助人工心臓装着前の心エコー検査にて、左室拡張および収縮末期径はそれぞれ69.8±6.6mm, 63.0±8.1mm, 左室駆出率16.3%と著明な低左心機能であった。
2. 方法：補助人工心臓装着前、術後2週間目、術後4週目に血液を採取し、EDTA処理にて血漿分離し保存した。健康人より同様にサンプル採取した。心電図、心エコー、心臓カテーテル検査等のデータは患者カルテより取得した。
3. メタボローム解析：ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT)社のCapillary electrophoresis time-off-flight mass spectrometry (CE-TOFMS)法およびLiquid chromatography time-off-flight mass spectrometry (LC-TOFMS)法を用い、約1200のライブラリーより検索した。1) 正常個体と患者 2) 患者の装着前後で血液中の代謝産物を比較する事により 1) 心不全に特有のマーカー 2) 補助人工心臓による心負荷軽減の際に変動するマーカー を同定した。

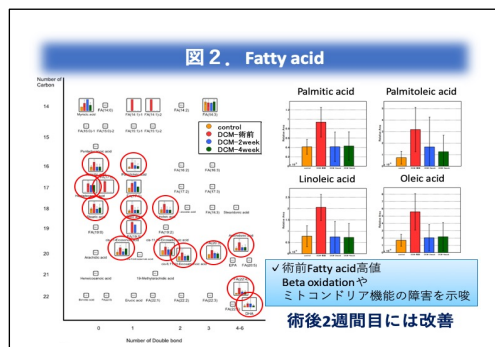
4. 研究の成果

1. 拡張型心筋症患者における代謝物質の変化

- 1) エネルギー代謝：拡張型心筋症患者においては、健康人と比べてTCAサイクルの中間物質であるピルビン酸(~1.3倍)、イソクエン酸(~1.4倍)、や、ケトン体のアセト酢酸が増加していた。これらの結果から拡張型心筋症患者において好気性解糖系などエネルギー代謝の障害が示唆された(図1)。



- 2) ミトコンドリア機能：β酸化の中間物質であるパルミチン酸(~2.3倍)、パルミトレイン酸(~4倍)、リノレイン酸(~2.7倍)、オレイン酸(~3倍)などの脂肪酸、およびアシルカルニチン(AC) 14:0(~3.5倍)、16:2(~3.9倍)、18:1(~2.3倍)がそれぞれ増加していた。これらの結果から拡張型心筋症患者においてミトコンドリア機能の障害が示唆された(図2, 3)。



3) コラーゲン構成物質：コラーゲン分解により産出される 5-Hydroxylysine (~1.8 倍) は拡張型心筋症患者において高値であった。これより拡張型心筋症患者において心筋組織線維化の亢進が示唆された(図 4)。

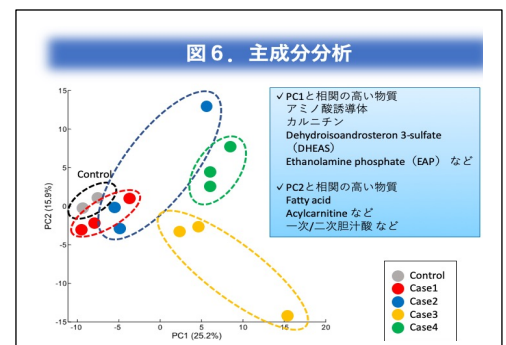
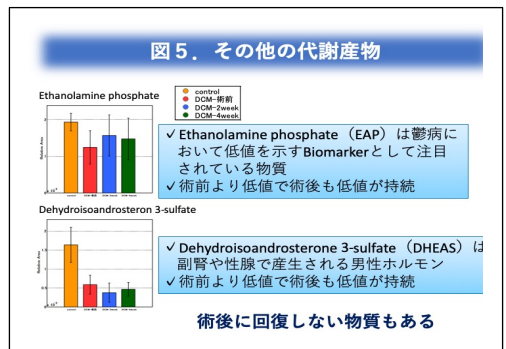
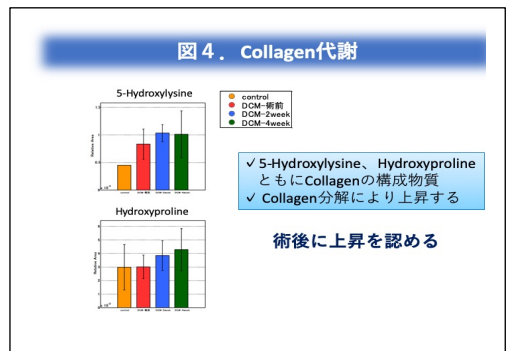
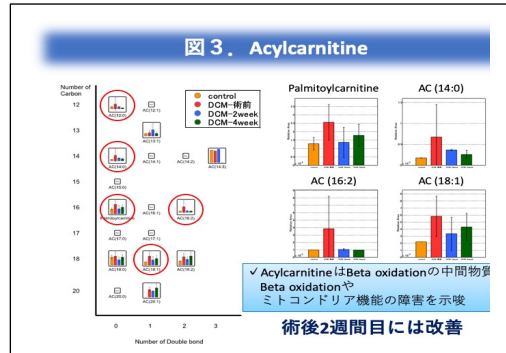
4) その他の代謝産物：男性ホルモンである Dehydroisoandrosterone 3-sulfate (DHEAS) (~0.3 倍)、 および鬱病のバイオマーカーとして報告されている Ethanolamine phosphate (EAP) はともに低値であり、性機能障害の存在とともに抑うつ傾向が示唆された (図 5)。

2. 補助人工心臓装着術による代謝物質の変化：TCA cycle および β 酸化の中間代謝産物は術後 4 週目までには健康人と同等まで低下し、エネルギー代謝の正常化が示唆された。一方でコラーゲン構成物質である 5-Hydroxylysine、Hydroxyproline は補助人工心臓後に上昇し、コラーゲン代謝の持続的な亢進が示唆された。また男性ホルモン、EAP などは補助人工心臓後にも低値で正常化は認められなかった (図 1~5)。

3. 主成分分析：アミノ酸誘導体、カルニチン、DHEAS、EAP、脂肪酸、アシルカルニチン、胆汁酸など代謝産物の主成分分析によると、補助人工心臓装着により多くの代謝物質が正常へ近似する事が示された (図 6)。

本研究により以下の点が明らかになった。

1. TCA サイクル、 β 酸化の中間物質の高値を認めたが、補助人工心臓により低下した。
2. 脂肪酸、アシルカルニチンの高値を認めたが補助人工心臓装着により低下した。
3. コラーゲン構成因子の高値を認め、補助人工心臓により正常化が認められなかった。
4. 鬱病マーカーである EAP の低値を認め、補助人工心臓装着後も低値で正常化が認められなかった。
5. 男性ホルモンである DHEAS の低値を認めたが、補助人工心臓装着後も低値で正常化



がみとめられなかった。

これまで、心筋症や心不全を対象にしたメタボロミクスの論文は少ないが、拡張型心筋症患者において TCA サイクル や β 酸化の中間物質が上昇している事、アンドロゲンの代謝産物が低下しており、男性患者においては **Feminization** と呼ばれる現象を認める事が報告されている(文献 1)。また、Ahmed らは心毒性のある長鎖アシルカルニチンの血中濃度の高い症例は予後不良である事を報告している(文献 2)。今回の我々の研究成果はこれらを裏付けるものであった。これまで、補助人工心臓装着患者と非装着患者の比較により、ミトコンドリア機能に与える影響を調べた報告はあったが、同一患者における術後今回われわれの研究では、補助人工心臓による心負荷軽減でエネルギー代謝やミトコンドリア機能が正常化する事が新たに示され、**reverse remodeling** を代謝面から新たに裏付ける結果となった。

以上より、重症心不全患者には特徴的な代謝パターンが認められ、一部は治療介入により速やかに変化することから、メタボローム解析によりこれら細胞の代謝活動の変化を治療効果として評価できる可能性がある。エネルギー代謝の正常化が心筋細胞保護作用、および **reverse remodeling** に与える影響や、バイオマーカーとして機能するかについては今後の検討を要する。

<引用文献>

- ① Alexander D. et al. Metabolomic distinction and insights into the pathogenesis of human primary dilated cardiomyopathy Eur J Clin Invest. 2011;41:527–38.
- ② Ahmad T. et al. Prognostic Implications of Long-Chain Acylcarnitines in Heart Failure and Reversibility with Mechanical Circulatory Support. J Am Col Cardiol.2016;67:291-9.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Saito T, Miyagawa S, Toda K, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Yoshioka D, Sakata Y, Daimon T, Sawa Y. Effect of Continuous-Flow Mechanical Circulatory Support on Microvasculature Remodeling in the Failing Heart. Artif Organs. 2019;43:350-362.
- ② Yoshikawa Y, Miyagawa S, Toda K, Saito A, Sakata Y, Sawa Y. Myocardial regenerative therapy using a scaffold-free skeletal-muscle-derived cell sheet in patients with dilated cardiomyopathy even under a left ventricular assist device: a safety and feasibility study. Surg Today. 2018;48:200-10.
- ③ Nakamura T, Toda K, Kuratani T, Miyagawa S, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Sawa Y. The impact of age on the postoperative response of the diastolic function and left ventricular mass regression after surgical or transcatheter aortic valve replacement for severe aortic stenosis. Surg Today. 2017;47:770-6.
- ④ Miyagawa S, Toda K, Nakamura T, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Yoshioka D, Saito T, Sawa Y. Building a bridge to recovery: the pathophysiology of 補助人工心臓-induced reverse modeling in heart failure. Surg Today. 2016;46:149-54.

[学会発表] (計2件)

- ① 松長由里子、仲村輝也、宮川繁、吉川泰司、齋藤俊輔、堂前圭太郎、戸田宏一、上野高義、倉谷徹、澤芳樹. Prompt Recovery of Systemic Energy Metabolic State by Left Ventricular Assist Device Support in Advanced Non-Ischemic Cardiomyopathy. 第81回日本循環器学会学術集会 2017年(金沢).
- ② 松長由里子、宮川繁、上野高義、吉川泰司、秦広樹、齋藤俊輔、堂前圭太郎、戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹. 重症心不全に対するバイオマーカー探索におけるメタボロミクスの有用性の検討. 第60回関西胸部外科学会 2017年(大阪).

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：上野 高義

ローマ字氏名：UENO, Takayoshi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号：60437316

研究分担者氏名：吉川 泰司

ローマ字氏名：YOSHIKAWA, Yasushi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科 寄付講座

職名：准教授

研究者番号：40570594

研究分担者氏名：宮川 繁

ローマ字氏名：MIYAGAWA, Shigeru

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：特任教授

研究者番号：70544237

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：松長 由里子

ローマ字氏名：(MATSUNAGA, Yuriko)