

平成30年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19400

研究課題名(和文)ミトコンドリア脱共役の心臓および全身に対する長期的影響の探索

研究課題名(英文)Long-term effects of mitochondrial uncoupling on the heart and the body

研究代表者

加藤 貴雄 (Kato, Takao)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30583877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1) 肥満モデル動物における慢性的なミトコンドリア脱共役剤投与が心臓および全身へ与える影響を明らかにする事については、脱共役薬投与により、高脂肪食を摂取していてもそれを打ち消し、肥満に至らないのは高濃度を投与したときであり、低濃度ではレプチンを介さない食欲増進により体重増加が示唆された。心重量が変化する機序については検討中であるが、心機能への影響は明らかでなかった。

2) 生理的な老化にミトコンドリア脱共役剤が与える影響を検討する事を目的として、通常餌投与と上記低容量のDNPを6か月投与した。生存率に変化を認めなかった。体重増加をDNP群で認め、老化マーカーについて検討中である。

研究成果の概要(英文)：1) To clarify the effects of chronic mitochondrial uncoupler administration on obesity model animals on the heart and the whole body, the administration of uncouplers could not cancel the obesity caused by high fat diet. Only when they take high fat diet with high dose uncouplers, they canceled the obesity. At low concentration, weight gain was suggested by appetite stimulation not mediated by leptin. The mechanism by which heart weight changes is under consideration, but the effect on cardiac function was not evident.

2) For the purpose of examining the influence of mitochondrial uncoupler on physiological aging, normal diet administration and DNP of the above low dose were administered for 6 months. There was no change in survival rate. Weight gain was observed in the DNP group, and senescence markers are being studied.

研究分野：Mitochondria

キーワード：Mitochondria Uncoupler Cardiac function

1. 研究開始当初の背景

細胞は、糖あるいは脂肪酸、あるいはその両方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、その活動の大部分のエネルギー源とする。またミトコンドリアはエネルギー産生のみならず、酸化還元の恒常性を保ち、老化や細胞死に関わる重要な役割を果たす (Green, Science 626:305;2004)。

ミトコンドリアにおいて内膜におけるプロトンの移動が電気化学的勾配を生じそれを利用して ATP が産生されるが、一部は ATP 合成に関わらず「脱共役」する。その電気化学的ポテンシャルは熱として解放され活性酸素の産生は減少する。しかし、不全心など病的モデルにおける、脱共役の意義は明らかではない。ミトコンドリアにおける活性酸素種 (ROS) の産生は、電子伝達系が関与しており、抗酸化システムを凌駕した場合、Ca²⁺ 回転や細胞死、電子伝達系そのもののダメージを引き起こす。また、ATP 産生に関与しないプロトンの移動 (リーク) は「脱共役」と呼ばれ、熱産生に関わり、結果として ROS 産生を抑制する。このリークは全体の 20-70% といわれている。この役割を担う脱共役タンパク (Uncoupling protein) の過剰発現マウスは、食欲過剰にもかかわらずやせ形であることが報告され (Clapham, Nature. 415:406;2000)、化学的なミトコンドリア脱共役剤 2,4-dinitrophenol の慢性投与が肥満抑制効果を持つことがマウスで報告され (Goldgof, J Biol Chem. 19341;289;2014)、米国における特許申請から薬剤が開発中であることも示唆されている。

過栄養と肥満は、ますます増加傾向にあり、その対処にはいかにエネルギーを使うか、という視点が重要である (Geisler, Diabetologia 237:54;2011)。熱を産生させ ROS を減少させることで肥満の治療に役立つ可能性のあるミトコンドリア脱共役薬を使用し、健康および病的モデルラットに長期投与を行い心臓・全身の組織への影響、生存率や老化にどのように影響するかを網羅的に解析する点が本研究の特徴がある。

ミトコンドリア障害が関係する老化やインスリン抵抗性の抑制、虚血耐性の強化など正の効果が予想される反面、ATP を多量に必要とする臓器 (心臓・腎臓など) でのエネルギー枯渇とそれに引き続く機能不全、深部体温の上昇、摂食量の増加など負の側面も予想される。しかしながら、もしそれらが投与期間や量の工夫などで克服できた場合、ますます増加する肥満や内臓脂肪の関係する疾患に対する中心的介入が可能になる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 通常餌もしくは高脂肪餌を投与した SD ラットにおける慢性的なミトコンドリア脱共役剤投与の心臓および全身への影響を明らかにする事、2) 死亡に至る長期間の投与が、寿命や重要臓器に与える影響を検討する事、3) 心不全モデルラットにおける慢性的脱共役剤投与が心機能・生存率および全身に与える影響を明らかにする事である。

3. 研究の方法

1) ミトコンドリア脱共役剤投与慢性投与による心臓および全身への影響を明らかにする

1-1 薬剤投与量の決定

経口投与可能なミトコンドリア脱共役剤 2,4-dinitrophenol を飲水にとかし投与を行う。投与量の設定は、SD ラットに高脂肪餌投与を 4 週間続け、肥満ラット (HFD 群) を作成した後、2,4-dinitrophenol をいくつかの dose で 1 週間投与し、体重増加が打ち消される最低投与量を同定し、それを慢性投与の基準とする。

1-2 HFD 群 (肥満) と通常餌群での比較

次に、HFD 群と通常餌投与群に、2,4-dinitrophenol の基準量もしくは vehicle を 6 週間投与する。生体内での経時的観察 体温・体重・食餌量・飲水量・血圧・脈拍を経時的に測定する。また心機能の変化を経時的に計測する。

2) 長期継続投与により、寿命への影響や老化マーカーへの修飾、過度の体温上昇や重要臓器の障害の有無を検討し、長期投与の意義・投与期間の目安を明らかにする。心不全ラットへの投与を条件を合わせて行う。

4. 研究成果

1) 肥満モデル動物における慢性的なミトコンドリア脱共役剤投与が心臓および全身に与える影響を明らかにする事、2) 生理的な老化にミトコンドリア脱共役剤が与える影響を検討する事を目的として研究を実施した。肥満モデルとして、高脂肪食投与モデルを用いた。

1-1 投与量の決定

ラットにおいて長期投与可能なミトコンドリア脱共役剤 2,4-dinitrophenol (DNP) の投与量を決定するために、高脂肪食を 4 週間摂取後の 10 週 SD ラットを DNP の投与量別に 6 匹ずつ 4 群に分けて検討した。DNP は DNP2g をジメチルスルホキシド 25ml に溶解したストック水に溶解させて各濃度の DNP 溶液を作

成した。高脂肪食を与えた SD ラットに、コントロール群 0mg/l、低容量群 25mg/l、中等容量群 195mg/l、高容量群 400mg/l を自由飲水形式による経口投与した結果、高容量群では体重増加は抑制され、食餌摂取量および飲水量が少なく、活動性の低下を認めた。中等容量群では体重増加は抑制されたが、食餌摂取量および飲水量はコントロール群と差は無かった。この結果から、本研究においてラットに投与する DNP 濃度の上限を 200mg/l とした。

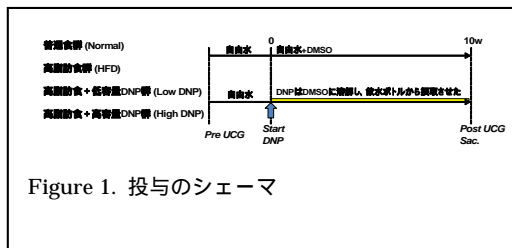


Figure 1. 投与のシエーマ

1-2 HFD 群 (肥満) と通常食餌群での比較
通常食ラット (コントロール群) と、高脂肪食を 4 週間与えた SD ラットに DNP 高容量 200mg/l (高容量群)、低容量 100mg/l (低容量群)、プラセボ (プラセボ群) の 4 群で 9 週間の体温・体重・食餌量・飲水量・血圧・脈拍・心エコー所見の経時的変化を検討した。DNP もしくはプラセボは自由飲水形式による経口投与とした。DNP 投与群は飲水量の減少はなく、DNP 摂取量は高容量群で 6~16mg/kg/day、低容量群で 3~8mg/kg/day であり高容量群は低容量群の 2 倍摂取できていた。DNP 高容量群では、食事摂取量はプラセボ群と差がなかったが、高脂肪食を摂取していても体重増加不良と体重あたりの肝重量の増加抑制が認められ、体温は上昇していた (Figure 2,3,4)。血圧、心拍数に変化はなく、心エコーのパラメーターでは、左室拡張末期径、Fractional shortening、壁厚に各群で有意差を認めなかった。一方、低容量群ではプラセボ群よりも食餌摂取量が増加し、投与から 7 週目では有意に体重増加を認めたが、体重あたりの肝重量の増加は抑制されていた。

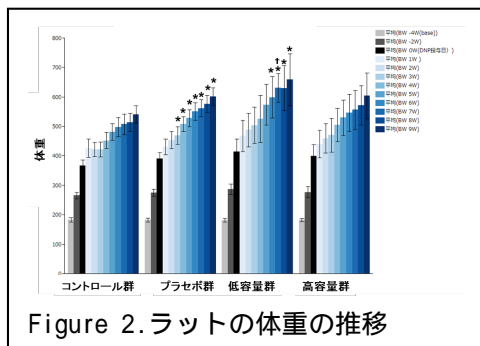


Figure 2. ラットの体重の推移

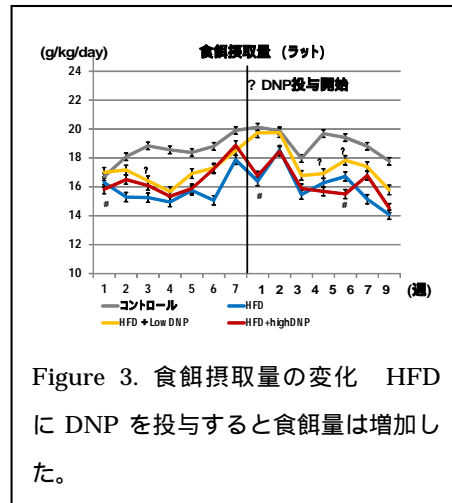


Figure 3. 食餌摂取量の変化 HFD に DNP を投与すると食餌量は増加した。

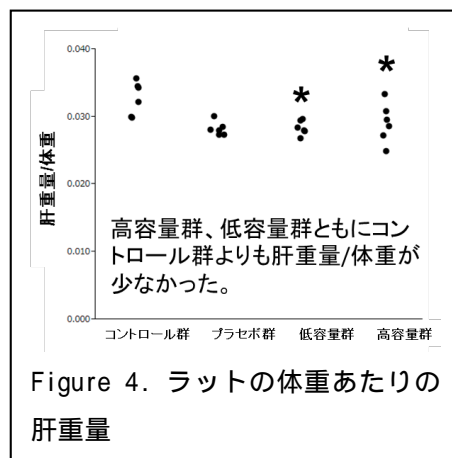


Figure 4. ラットの体重あたりの肝重量

上記について、急性期実験につき論文投稿中である。

種差が関係している可能性を考え、マウス (C57BL6/J) でも同様の実験を 4 週間施行した。マウスでは、高容量群 3.4mg/kg/day の DNP 投与によりプラセボ群と比較して体重増加不良、体重あたりの肝重量の増加抑制が認められたが、体温の変化は認めなかった。一方、体重あたりの心重量は高脂肪食のみの群よりも有意に重かった (Figure.5, 6)。

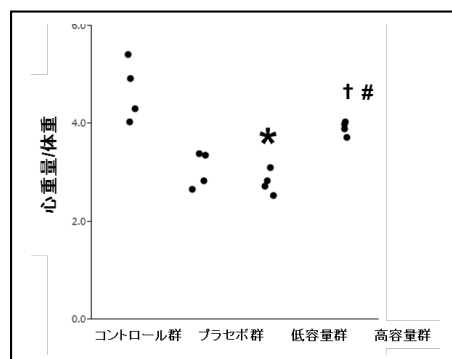


Figure 5. マウスの体重あたりの心重量 (前頁より)

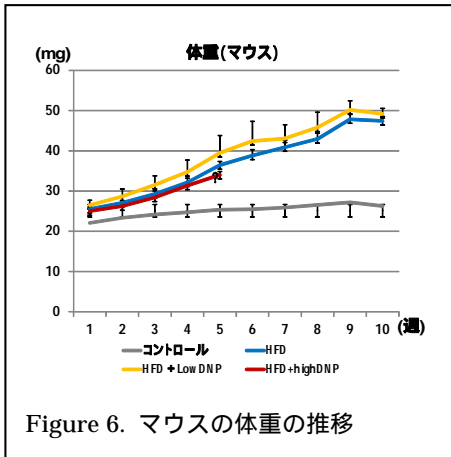


Figure 6. マウスの体重の推移

一方で、心エコーによる心機能解析では、DNP 投与による変化を認めなかった。(Figure 7) 体重あたりの心重量の増加は、相対的な心肥大の状態と考えられるが、心機能指標において変化なく、長期にわたる血行動態への影響の評価が必要である。生理的心肥大でなく、病的な場合には、brain natriuretic peptide 値や mRNA で定量される atrial natriuretic factor の発現程度を比較することで鑑別でき、検討課題としている。

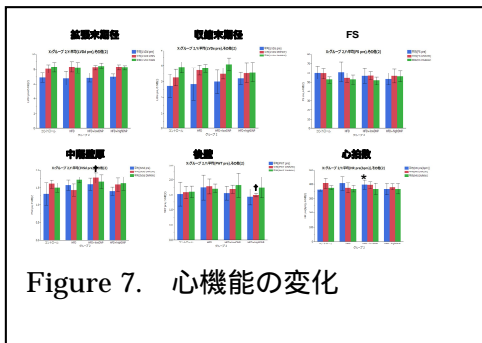


Figure 7. 心機能の変化

このマウス低容量群は 1.1 mg/kg/day を摂取し、プラセボ群と体重や肝重量は差がなかった。DNP 投与による食事摂取量の差はなく (Figure 8) レプチンにも差は認めなかった。

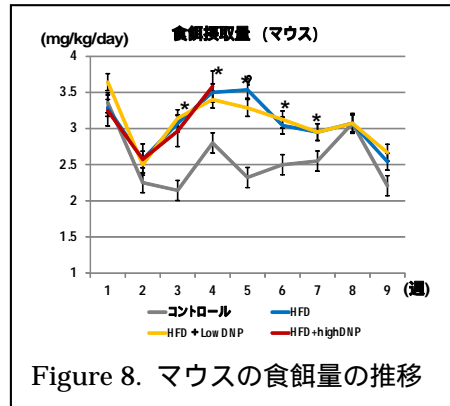


Figure 8. マウスの食餌量の推移

マウスでは血液生化学検査を行い、高容量群は低容量群およびプラセボ群と比較して AST は有意に上昇した。DNP 投与群において腎機能障害を示唆する検査所見は認めなかった (Figure 9)。

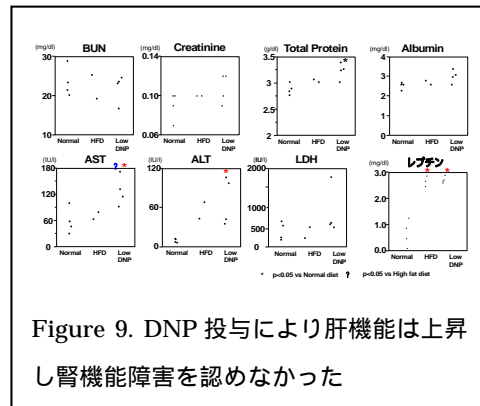


Figure 9. DNP 投与により肝機能は上昇し腎機能障害を認めなかった

また、Alb の低下を認めず、悪液質を想起する所見を認めなかった。

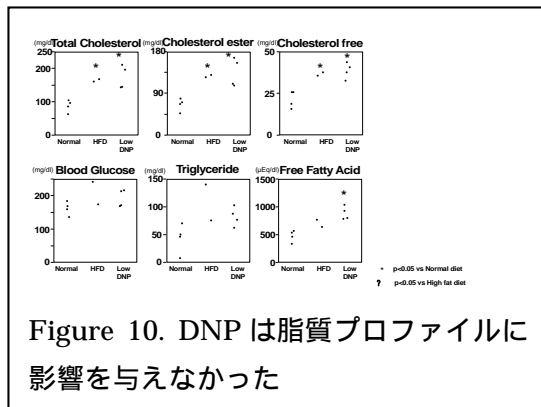


Figure 10. DNP は脂質プロファイルに影響を与えなかった

また DNP 投与は、高脂肪餌投与により静していた脂質異常のプロファイルに影響を与え

なかった (Figure 10)。

結果のまとめ

1. ラットおよびマウス共に、DNP 摂取による心機能の変化は認めなかった。
2. マウスでは、LV mass は高脂肪食で増加し、low dose DNP で低下する傾向にあった。
3. ラットにおいて、High dose DNP 群(6 ~ 16mg/kg/day)で有意な体温上昇を認め、体重減少は認めなかったが体重あたりの肝重量は有意に低かった。

この研究の展望と展開

脱共役薬投与により、高脂肪食を摂取していてもそれを打ち消し、肥満に至らないのは高濃度を投与したときであり、低濃度ではレプチンを介さない食欲増進により体重増加が示唆された。心重量が変化する機序、食欲増進の機序について検討中である。DNP の効果については、体重が増加していることもあり、高脂肪餌負荷による総コレステロールの上昇を打ち消す作用は認めず、病的状態を改善するに至るまでは、高濃度の投与が必要と考えられた。

2) 生理的な老化にミトコンドリア脱共役剤が与える影響を検討する事を目的として、通常餌投与と上記低容量のDNPを6か月投与した。生存率に変化を認めなかった。体重増加をDNP群で認め、レプチンを介さない食欲増進により体重増加が示唆された。

心機能に影響はなく、現在老化マーカーの解析中である。心不全ラットにおいては、現在投与中である。

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4件)

1. Tanada Y, Shioi T, Kato T, Kawamoto A, Okuda J, Kimura T. Branched-chain amino acids ameliorate heart failure with cardiac cachexia in rats. *Life Sci.* 2015 Sep 15;137:20-7. doi: 10.1016/j.lfs.2015.06.021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26141987>

2. Kato T. A data sheet for the simultaneous assessment of dual radioactive tracer uptake in the heart. *MethodsX.* 2016 Apr 2;3:289-96. doi: 10.1016/j.mex.2016.03.015. eCollection 2016.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114927>

3. Nakagawa Y, 他 Kato T (21人中13番目). MiR30-GALNT1/2 Axis-Mediated Glycosylation Contributes to the Increased Secretion of Inactive Human Prohormone for Brain Natriuretic Peptide (proBNP) From Failing Hearts. *J Am Heart Assoc.* 2017 Feb 10;6(2). pii: e003601. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188250>

4. Tanada Y, Okuda J, Kato T, Minamino-Muta E, Soga T, Murata I, Shioi T, Kimura T. The metabolic profile of a rat model of chronic kidney disease. *Peer J* 2017;5:e3352. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560105>

[学会発表](計2件)

1. Keystone Symposia Heart Failure: Crossing the Translational Divide. Jan 14-18, Keystone, USA. Morita Y, Muta E, Tanada Y, Shioi T, Kimura T, Kato T. Spatiotemporal and integrative analysis of the transcriptome and metabolome response to systemic energetic starvation with cardiac dysfunction (Oral presentation)
2. ESC Congress 2016, Aug 27-Sep 1, Rome, Italy. Kato T, Minamino-Muta E, Shioi T, Kimura T. Chronic administration of dehydroepiandrosterone sulfate does not improve survival in rats with hypertensive heart failure.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤貴雄 (KATO, Takao)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30583877

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

塩井哲雄 (SHIOI, Tetsuo) (草津総合病院)

棚田洋平 (TANADA, Yohei) (大学院生)

牟田恵理 (MUTA, Eri) (大学院生)

森田雄介 (MORITA, Yusuke) (大学院生)