

令和 5 年 9 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03671

研究課題名(和文) 圧負荷肥大心における脂肪酸の酸化と合成の統合的な調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of fatty acids synthesis and breakdown in pressure-overloaded heart

研究代表者

倉林 正彦 (Kurabayashi, Masahiko)

群馬大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：00215047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：心臓で産生されるATPの70%はミトコンドリアにおける脂肪酸酸化に由来することから脂肪酸代謝の恒常性の変化は心機能に大きな影響を与える。本研究では脂肪酸の代謝産物であるケトン体と代謝ホルモンであるFGF21が心臓のエネルギー代謝に与える影響について解析した。この結果、ケトン体とFGF21は協調的に心筋のエネルギー代謝において中心的な役割を持つPPARαやPGC-1αの発現を活性を促進すること、および抗酸化ストレス反応を増強して細胞保護効果を発揮することが明らかになった。ケトン体とFGF21は、エネルギー枯渇と酸化ストレス増加がその病態の中心となる心不全の新規治療に貢献することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓は生体で最もエネルギー産生が活発な臓器であり、脂肪酸酸化によるATP産生が全ATP産生の70%を占める。そのため、脂肪酸の酸化と合成は心臓の機能を維持する上で重要である。私たちは脂肪酸伸長酵素が細胞膜のリン脂質中の脂肪酸組成の決定に大きな役割を持つことを明らかにした。また、エネルギー枯渇に対する適応として肝臓で産生されるケトン体が、脂肪酸の燃焼・酸化を調節するかを検討した結果、ケトン体およびFGF21が脂肪酸酸化に重要な転写因子PPARαと転写コファクターPGC-1αの発現を増加し、抗酸化機能を増強させることを示した。ケトン体とFGF21が心不全治療における新たな治療方法になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The heart is the most energy-demanding and metabolically omnivorous organ which uses ketone bodies as well as fatty acids and glucose as fuel source. It is a growing appreciation that circulating ketone body (bOHB) is not just used during fasting and exercise, but also has important cellular signaling roles to regulate gene expression. Stimulation of neonatal rat cardiomyocytes with bOHB and FGF21 induced peroxisome proliferator-activated receptor-α (PPARα) and PGC1α expression along with the phosphorylation of LKB1 and AMPK. bOHB and FGF21 induced transcription of peroxisome proliferator-activated receptor response element (PPRE)-containing genes through an activation of PPARα. Additionally, bOHB and FGF21 induced the expression of Nrf2, a master regulator for oxidative stress response, and catalase and Ucp2 genes. These findings suggest that bOHB and circulating FGF21 coordinately regulate oxidative stress response gene expression in the heart.

研究分野：循環器内科

キーワード：エネルギー代謝 脂肪酸 遺伝子発現 ケトン体 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

心臓は生体で最もエネルギー需要が大きい臓器であり、1日約6kgものアデノシン三リン酸(ATP)を産生し、消費している。産生されるATPの70%はミトコンドリアにおける脂肪酸酸化に由来することから脂肪酸代謝の恒常性の変化は心機能に大きな影響を与える。私たちはこれまでに脂肪酸取り込みの機能をもつ脂肪酸結合蛋白 FABP4/5 あるいは CD36 の欠損マウスでは、圧負荷時、エネルギー基質が糖代謝にシフトしてもエネルギー枯渇は代償できないことを明らかにした。また、脂肪酸伸長酵素 Elovl6 欠損マウスでの解析から、心筋の脂肪酸組成の変化がミトコンドリア機能に影響を与えることを明らかにした。しかし、脂肪酸代謝産物がエネルギー代謝を調節する遺伝子(PPAR や PGC1)の発現調節メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋ミトコンドリアでのエネルギー代謝がどのようなメカニズムで調節されるのかを明らかにすることである。われわれはこれまでに FGF (Fibroblast growth factor)ファミリーに属する FGF21 が急性心筋梗塞時に血中濃度が上昇し、AMPK (AMP-activated protein kinase)の活性化を介して心筋エネルギー代謝を活性化し、ATP 産生を誘導することを見出した(Sunaga H, Kurabayashi M. et al. *Sci Rep* 2019)。また、心筋梗塞時に血中 OHB (生体で最も豊富なケトン体)濃度が上昇すること、および、培養心筋細胞において OHB が FGF21 の産生を増加させることを見出した。心不全患者では脂肪組織から脂肪分解によって脂肪酸が血中に動員され、その血中濃度は心不全の重症度や予後と関連することが古くから知られている。重症心不全患者の心筋のオミックス解析で、脂肪酸の取り込みや酸化経路に關与する蛋白の遺伝子発現が減少し、逆に OHB の酸化経路が活性化することも報告された。さらに、OHB はエピジェネティックな機序で脱アセチル化を誘導し、細胞の肥大、小胞体ストレス、ミトコンドリア機能などに影響を与える可能性もある。また、FGF21 欠損マウスでの検討から FGF21 は心肥大を抑制する作用も報告されている。さらに、私たちは心不全患者で血清 FGF21 と OHB 濃度が非常に強く相関することも見出した。しかし、FGF21 が心臓エネルギー代謝を調節するか否かについてはこれまで全く不明である。

以上より、本研究では、心筋における OHB と FGF21 が心筋ミトコンドリア代謝を調節する可能性を検証する。この仮説を検証するため、FGF21 欠損マウスの表現型の解析を行う。

3. 研究の方法

1) シグナル分子としての OHB および FGF21 の役割の解析

AMPK のリン酸化のメカニズムの解析

AMPK の主な調節因子であるセリン・スレオニンキナーゼ LKB が FGF21 による AMPK および PPAR の活性化に關与するか否かを明らかにするため、LKB siRNA 存在下で、OHB を添加して AMPK リン酸化および PPAR の活性化が起るか否かを検討する。また、PPAR の siRNA をトランスフェクトし、OHB による AMPK のリン酸化が起るか否かを解析する。

PPAR リガンドとしての役割

PPAR によって転写が活性化される PPRE 結合配列を含むルシフェラーゼベクターと、PPARα のリガンド結合ドメインを酵母菌の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインに結合させたコンストラクトを心筋細胞に導入し、OHB 添加によってルシフェラーゼ活性が増加するかを検討する。これによって、OHB が PPAR のリガンドとして作用することが証明できる。

培養ラット心筋細胞において OHB、FGF21 が FGF21、PPAR および b-klotho 遺伝子発現に及ぼす影響を解析する。また、OHB 濃度はカロリメトリック法、FGF21 濃度は ELISA 法で測定する。

2) in vivo 心筋の代謝における OHB および FGF21 の役割の解析

野生型マウスおよび FGF21 欠損マウスにおける血中ケトン体、脂質およびグルコース濃度を比較する。

野生型マウスおよび絶食マウス心筋での酸化ストレス関連遺伝子、心肥大関連遺伝子、およびミトコンドリア代謝関連遺伝子の発現を比較する。

4. 研究成果

(1) 培養心筋細胞において OHB は用量依存的に FGF21 の産生を増加させた。

A. 培養上清の ELISA

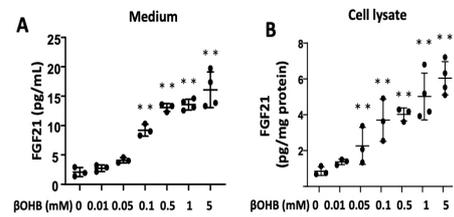
OHB は培養上清中 FGF21 濃度を増加させた。

B. 心筋細胞抽出物の ELISA

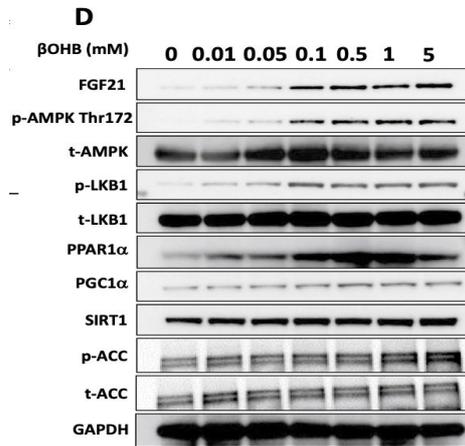
OHB は心筋細胞抽出物中の FGF21 の濃度を増加させた。

C. qPCR 分析

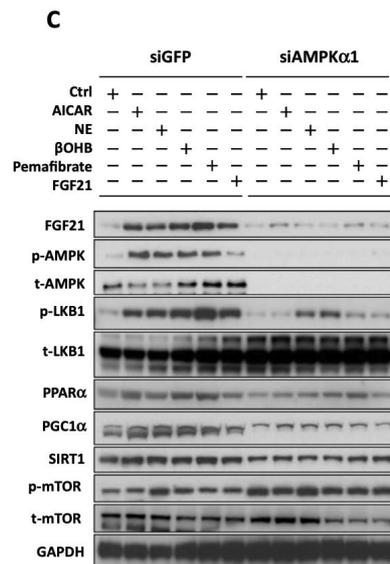
OHB は FGF21、PPAR α 、および b-klotho の mRNA レベルを増加させた。



(2) 培養心筋細胞において OHB は用量依存的に AMPK-p LKB1-p PPAR α 、PGC-1 α 、SIRT1 および p-ACC の発現量を増加させた。

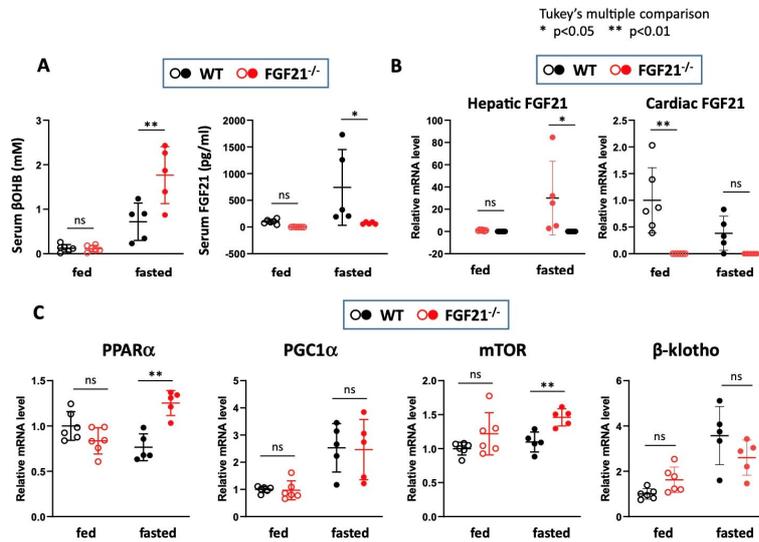


(3) OHB と FGF21 は AMPK の活性化を介して LKB-1p, PPAR α 、PGC1 α 、SIRT1 および mTOR の発現を増加させた。

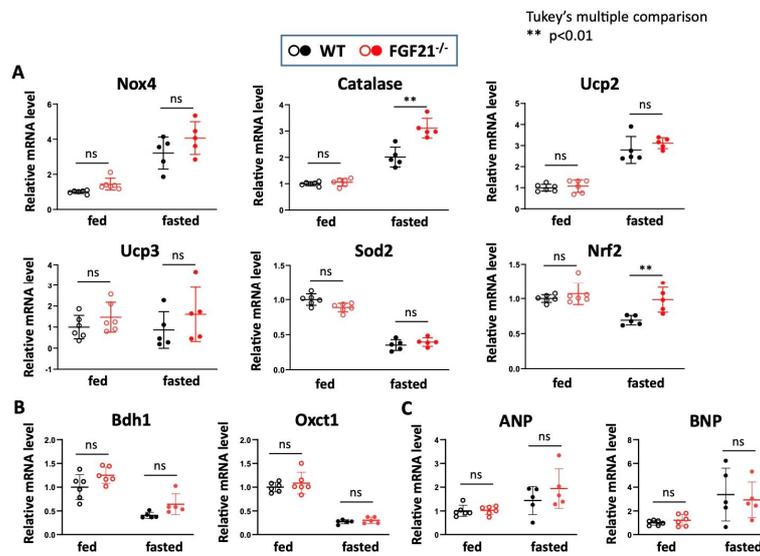


(4) FGF21 欠損マウスでは 24 時間の絶食負荷により血中 OHB が野生型に比して有意に

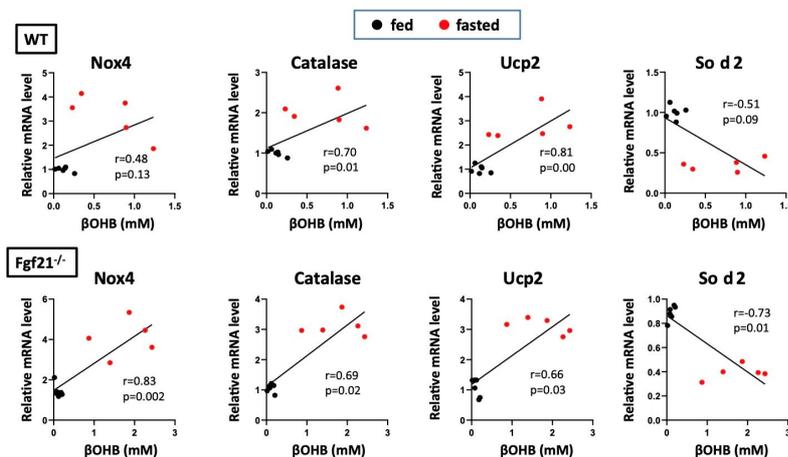
増加した。また、PPAR と mTOR の発現が有意に増加した。



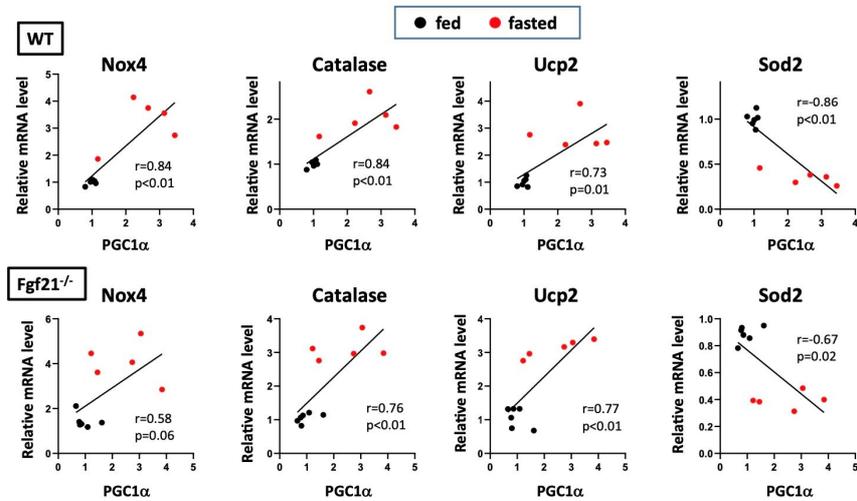
(5) FGF21 欠損マウスでは 24 時間の絶食負荷により心筋において野生型に比して、酸化ストレス関連遺伝子の発現が有意に増加した。また、心筋での OHB と酸化遺伝子(Bdh1 Oxct1) の発現は野生型でも FGF21 欠損マウスでも同等に減少した。



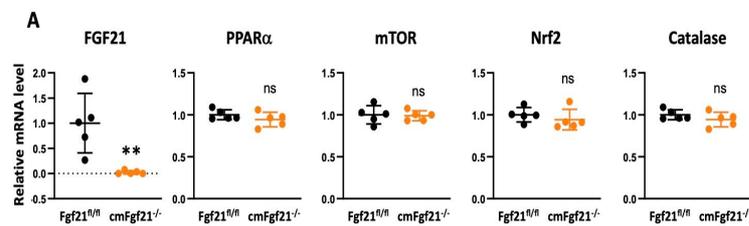
(6) 野生型および FGF21 欠損マウスにおいて、血中 OHB 濃度と心筋での酸化ストレス関連遺伝子の発現レベルの間には有意な相関があった。



(7)野生型および FGF21 欠損マウスにおいて、心筋での PGC1 α と酸化ストレス関連遺伝子の発現レベルの間には有意な相関があった。



(8)心筋特異的 FGF21 欠損マウスでは絶食負荷による PPAR α , mTOR, Nrf2, および Catalase の発現量は野生型と変わりなかった。



(9)FGF21 欠損マウスでは野生型に比して空腹時の OHB 濃度が有意に増加した。

Body weight, heart weight and serum parameters in WT and Fgf21^{-/-} mice. Data are mean \pm SD (n=5-6). *p<0.05 and **p<0.01 vs corresponding control (WT) analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey correction for multiple comparisons.

	Fed		Fasted		annotation
	WT (n=6)	FGF21 ^{-/-} (n=6)	WT (n=5)	Fgf21 ^{-/-} (n=5)	
BW (g)	27.7 \pm 1.4	25.7 \pm 1.0	24.0 \pm 3.4	23.2 \pm 1.8	none
HW/BW (mg/g)	4.1 \pm 0.1	4.2 \pm 0.3	4.0 \pm 0.5	4.1 \pm 0.5	none
FGF21 (pg/mL)	101.5 \pm 42.6	1.0 \pm 1.8	742.0 \pm 709.0	72.5 \pm 21.3 *	* p=0.03
NEFA (mEq/L)	0.38 \pm 0.06	0.35 \pm 0.05	0.41 \pm 0.46	0.37 \pm 0.09	none
TG (mg/dL)	85.2 \pm 27.1	71.1 \pm 14.5	20.6 \pm 11.7	28.3 \pm 6.3	none
βOHB (mM)	0.12 \pm 0.08	0.11 \pm 0.07	0.72 \pm 0.42	1.77 \pm 0.64 **	** p=0.002
glucose (mg/dL)	174 \pm 18	191 \pm 33	71 \pm 17	109 \pm 25	none

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ryo Kawakami, Hiroaki Sunaga, Tatsuya Iso, Ryosuke Kaneko, Norimichi Koitabashi, Masaru Obokata, Tomonari Harada, Hiroki Matsui, Tomoyuki Yokoyama, Masahiko Kurabayashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Ketone body and FGF21 coordinately regulate fastig-induced oxidative stress response in the heart	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10993-4	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 Iso Tatsuya, Kurabayashi Masahiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Cardiac Metabolism and Contractile Function in Mice with Reduced Trans-Endothelial Fatty Acid Transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 889 ~ 889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo11120889	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 Umbarawan Yogi, Kawakami Ryo, Syamsunarno Mas, Obinata Hideru, Yamaguchi Aiko, Hanaoka Hirofumi, Hishiki Takako, Hayakawa Noriyo, Koitabashi Norimichi, Sunaga Hiroaki, Matsui Hiroki, Kurabayashi Masahiko, Iso Tatsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Reduced Fatty Acid Use from CD36 Deficiency Deteriorates Streptozotocin-Induced Diabetic Cardiomyopathy in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 881 ~ 881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo11120881	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 Harada Tomonari, Araki Takeshi, Sunaga Hiroaki, Kagami Kazuki, Yoshida Kuniko, Kato Toshimitsu, Kawakami Ryo, Tomono Junichi, Wada Naoki, Iso Tatsuya, Kurabayashi Masahiko, Obokata Masaru	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathophysiological and diagnostic importance of fatty acid-binding protein 1 in heart failure with preserved ejection fraction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00760-2	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryo Kawakami, T. Iso, H Sunaga, H Mtasui, M. Kurabayashi
2. 発表標題 Cardiac growth and hypertrophic response require exogenous fatty acid uptake, but not endogenous de novo lipogenesis.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Kawakami, Y Umbarawan, T Iso, N Koitabashi, H Sunaga, H Matsui, M Kurabayashi
2. 発表標題 Limited FA use by CD36 deficiency accelerates the development of diabetic cardiomyopathy.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Kawakami, H Sunaga, T Iso, N Koitabashi, M Obokata, T Harada, H Matsui, T Yokoyama, M Kurabayashi
2. 発表標題 Fasting-induced ketone body and FGF2 regulate PPARγ signaling to restrain oxidative stress in the heart.
3. 学会等名 第85回日本循環器学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	磯 達也 (Iso Tatsuya) (10400756)	群馬大学・大学院医学系研究科・特任准教授 (12301)	

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
---------	---------