

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04038

研究課題名(和文)代謝リモデリングを標的とした心臓リハビリテーション栄養の実現化

研究課題名(英文) Establishment of molecular basis of rehabilitation nutrition for heart failure targeting cardiac metabolic remodeling

研究代表者

大南 博和 (OHMINAMI, Hirokazu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：90803057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂質源の異なる食餌と運動の組合せが心不全マウスの病態に及ぼす影響を検討したところ、大豆油添加食と運動の組合せでは心不全の進行が抑えられていたのに対し、ラード添加食では運動による病態改善効果が消失していた。さらに、ラード添加食群の心筋ではATP量の減少、脂肪酸酸化や解糖系に関わる酵素の遺伝子発現やATP合成酵素のタンパク質発現も低下しており、代謝リモデリングが亢進していることが示唆された。これらのことから、心不全病態下においては食餌由来の脂質成分が心筋の代謝リモデリングやATP産生能の制御に関わっており、運動の効果にも複合的に作用している可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、心不全患者にも運動療法(心リハ)の適用が広がっているが、運動療法併用時の栄養管理についてはほとんど議論に至っていない。本研究は、脂質摂取源の違いが運動による心不全抑制効果に影響を及ぼすことを明らかにした点に新規性があり、食習慣が心不全の運動療法の効果を左右することを示唆する成果である。本研究成果を受け、適切な栄養管理による心リハ効果の最大化(=心リハ栄養)の実現可能性が高まったと考えている。

研究成果の概要(英文)：The combination of soybean oil-rich diet and exercise suppressed the progression of heart failure, whereas the lard-rich diet abolished the effect of exercise on the suppression of heart failure progression. Furthermore, myocardium on the lard-rich diet showed decreased ATP levels, gene expression of enzymes involved in fatty acid oxidation and glycolysis, and protein expression of ATP synthase, suggesting enhanced cardiac metabolic remodeling. These findings suggest that dietary lipid components are involved in the regulation of cardiac metabolic remodeling and ATP production capacity under the pathophysiology of heart failure, consequently they influence the effectiveness of exercise.

研究分野：栄養学

キーワード：代謝リモデリング 心臓リハビリテーション リハビリテーション栄養 心不全

## 1. 研究開始当初の背景

心疾患はわが国の死因の第 2 位であり、現在も増加の一途をたどっている。なかでも高齢化に伴う心不全患者の増加が顕著であり、心不全パンデミックを防ぐための集学的な治療が求められている。このような背景のもと、近年では従来の運動療法の枠組みを超えた多職種協働による包括的心臓リハビリテーション(心リハ)の普及が進んでおり、積極的な栄養介入にも期待が高まっているが、運動と栄養の併用効果に関するエビデンスは基礎・臨床ともにほとんどないのが現状であり、包括的心リハの効果を最大限に発揮させるためにも“心リハ栄養”の効果を検証する研究や作用機序の解明が求められる。

## 2. 研究の目的

正常な心筋細胞はエネルギー基質として主に脂肪酸を利用しているが、不全心筋では持続的に脂肪酸の利用が低下し、グルコースの利用が増加することが知られている。これは代謝リモデリングと呼ばれ、結果的に ATP 産生量の減少を引き起こし、心筋の収縮力低下につながることから、代謝リモデリングの制御が新たな治療ターゲットとして注目されている。もともと心筋は代謝可塑性の高い臓器であり、運動の刺激や栄養状態に応じて、生理的に利用するエネルギー基質の種類や比率をダイナミックに変化させている。とくに運動には、ミトコンドリアの機能や生合成を活性化させる作用もあることから、心不全に対する運動療法は心筋におけるミトコンドリア障害を改善させることで、代謝リモデリングの緩和に働いている可能性がある。

また、代謝リモデリングの実態が心筋におけるエネルギーの需要と供給との不均衡な状態であることを考えると、エネルギー基質である脂肪酸やグルコースの取込みや代謝の異常も代謝リモデリングにつながり、心不全の病態に影響を及ぼすことが予想される。実際に、心臓特異的に脂肪酸トランスポーターである **CD36** 欠損マウスに心不全を誘発させると、脂肪酸利用の低下により、早期に病態が悪化することが報告されている。その一方で、心不全マウスに高脂肪食を投与すると病態の悪化が抑制されること、さらにその作用は高ラード食よりも高リノール酸食の方が顕著であることが報告されている。ゆえに、食事の脂質の量や組成をコントロールするも代謝リモデリングの制御につながる可能性があり、心筋の代謝リモデリングは運動と栄養に共通する作用標的として、心リハ栄養の科学的基盤になるのではないかと考えた。

そこで本研究では、運動と栄養の相互作用による代謝リモデリングの制御機構の解明に向け、基礎と臨床からエビデンスの構築に取り組むことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物および飼育方法

8 週齢の雄性 **C57BL/6J** マウスに横行大動脈縮窄 (**TAC**) を施し、圧負荷誘発性の心不全マウスを作製し、トレッドミル運動介入 (走行速度 **12 m/min**、**30** 分/日、週 **3** 回) および食餌介入 (標準食、大豆油添加食、ラード添加食) を **8** 週間行った。すべての動物実験は、徳島大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

### (2) 心機能超音波検査

動物用超音波画像診断装置 (**MyLab Sigma VET**、**esaote**) を用いて、左室拡張末期径 (**LVDd**)、左室収縮末期径 (**LVDs**)、左室内径短縮率 (**FS**) を計測した。

### (3) 遺伝子発現解析

心筋組織から **total RNA** を抽出し、逆転写酵素を用いて **cDNA** を合成後、**StepOnePlus** (**Applied Biosystems**) を用いてリアルタイム **PCR** を行った。**glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)** を内在性コントロールとして、各標的遺伝子の相対発現量を算出した。

### (4) ウエスタンブロット解析

心筋組織から抽出した総タンパク質を **SDS-PAGE** で分離し、**PVDF** メンブレンに転写した。ブロッキング後、各種一次抗体および **HRP** 標識二次抗体を反応させ、化学発光法にてタンパク発現量を解析した。

### (5) マッソントリクローム染色

固定した組織をエタノールで脱水し、パラフィンに包埋した後、マイクロトーム (**RM2145**、**Leica**) を用いて **5 μm** 厚の組織切片とした。脱パラフィン後、第一媒染剤、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液、**0.75%** オレンジ **G** 液、マッソン染色液、**2.5%** リンタングステン酸液、アニリン青で処理し、染色画像をオールインワン蛍光顕微鏡 (**BZ-X800**、**KEYENCE**) で取得した。

### (6) 統計解析

結果は平均値±標準誤差 (mean ± SEM) で示した。統計処理には **GraphPad Prism ver.5**

( **GraphPad Software** ) を用い、2 群間の差の検定には **Mann-Whitney's test** を用いた。2 群以上の差の検定には、分散分析 **analysis of variance (ANOVA)** を行い、各群間の比較には **Tukey-Kramer** 法を用いて **post-hoc test** を行った。有意水準は **P < 0.05** とした。

#### 4. 研究成果

当初の計画では臨床研究を予定していたが、新型コロナウイルスの感染拡大により研究期間中の臨床研究の遂行が制限されたため、基礎研究の成果を報告する。

##### ( 1 ) 脂質源の異なる食餌と運動の組合せが心不全マウスの病態に及ぼす影響

**TAC** マウスに運動介入および脂質源の異なる食餌介入を同時に行ったところ、標準食 + 運動 (**NE**) 群および大豆油添加食 + 運動 (**SE**) 群では心機能の指標である **FS** の低下や **LVDs** の拡大が抑えられていたのに対し、ラード添加食 + 運動 (**LE**) 群では運動による心機能改善効果が消失していた。

##### ( 2 ) 脂質源の異なる食餌と運動の組合せが心筋の線維化に及ぼす影響

マッソントリクローム染色で心筋の線維化を視覚的に評価したところ、**NE** 群および **LE** 群で線維化領域が多かった。なかでも **LE** 群では、線維化マーカー遺伝子である **collagen type I  $\alpha$  1 chain (COL1A1)** の発現が最も高値であった。

##### ( 3 ) 脂質源の異なる食餌と運動の組合せが心筋の代謝リモデリングに及ぼす影響

心臓組織中の **ATP** 量を評価したところ、統計学的に有意ではないものの **LE** 群で減少している傾向があった。また、ミトコンドリア電子伝達系複合体 を構成する **ATP synthase F1 subunit alpha (ATP5A)** の発現も **LE** 群で低かった。心不全の心筋では脂肪酸の利用能が低下することが知られているが、脂肪酸の酸化を活性化する転写調節因子である **peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )** の遺伝子発現は、**TAC** 群すべてにおいて有意に低下していた。一方、脂肪酸の取り込みに関わるトランスポーターである **fatty acid translocase (FAT/CD36)** の遺伝子発現は、**NE** 群では有意に低下していたが、**SE** 群では **NE** 群より有意に高値であった。また、脂肪酸酸化酵素の一つである **medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)** は、**NE** 群と **LE** 群で有意に低下していたのに対し、**SE** 群では発現が維持されていた。

心筋に発現する主要なグルコーストランスポーターの遺伝子発現を検討したところ、インスリン非依存性のグルコーストランスポーターである **glucose transporter 1 (GLUT1)** の発現に差は認められなかったが、インスリン依存性の **glucose transporter 4 (GLUT4)** の発現は **NE** 群と **LE** 群で有意に低下し、**SE** 群で維持されていた。また、グルコースをグルコース-6リン酸に変換する **hexokinase 2 (HK2)** の発現も同様の結果であった。

ケトン体を含むモノカルボン酸の取り込みに関わる **monocarboxylate transporter 1 (MCT1)** の遺伝子発現は、**NE** 群と **LE** 群の心筋では有意に低下していたが、**SE** 群では高く維持されていた。さらに、**SE** 群ではケトン体である **3-ヒドロキシ酪酸** と **アセト酢酸** の変換を触媒する **3-hydroxybutyrate dehydrogenase 1 (BDH1)** の遺伝子発現が **Sham** 群よりも有意に上昇していた。ケトン体の酸化に関与する **3-oxoacid CoA-transferase 1 (OXCT1)** および **acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT1)** の遺伝子発現もまた **SE** 群で高い傾向にあった。

細胞内においてエネルギー代謝のマスターレギュレーターとして働く **AMP-activated protein kinase (AMPK)** の関与を調べたところ、活性化の指標となるリン酸化タンパク質レベルは **LE** 群で低い傾向にあった。

本研究より、大豆油の摂取は運動介入の効果を維持あるいは高める方向に作用するのに対し、ラードの摂取は運動の効果を妨げることが明らかになったことから、食事の脂質源の影響を考慮することが、心臓の効果を高めることにつながる可能性が見出された。脂質源の違いにより運動介入の効果が異なる要因として、代謝リモデリングやミトコンドリアの **ATP** 産生能の関与が示唆されたが、今後はその相互作用メカニズムの全容を解明することで、心臓栄養の科学的基盤を構築するとともに、心臓患者の食習慣や栄養状態を調査し、運動療法の効果との関連を解析することで、心臓栄養の確立を目指す。

## 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 3件）

1. 著者名 Adachi Yuichiro, Masuda Masashi, Sakakibara Iori, Uchida Takayuki, Niida Yuki, Mori Yuki, Kamei Yuki, Okumura Yosuke, Ohminami Hirokazu, Ohnishi Kohta, Yamanaka-Okumura Hisami, Nikawa Takeshi, Taketani Yutaka	4. 巻 5
2. 論文標題 All-trans retinoic acid changes muscle fiber type via increasing GADD34 dependent on MAPK signal	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	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) 10.26508/lisa.202101345	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 Ohnishi Kohta, Yano Satoshi, Fujimoto Moe, Sakai Maiko, Harumoto Erika, Furuichi Airi, Masuda Masashi, Ohminami Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Hara Taichi, Taketani Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of Dietary Phytochemicals Capable of Enhancing the Autophagy Flux in HeLa and Caco-2 Human Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1193 ~ 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9121193	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 Niida Yuki, Masuda Masashi, Adachi Yuichiro, Yoshizawa Aika, Ohminami Hirokazu, Mori Yuki, Ohnishi Kohta, Yamanaka-Okumura Hisami, Uchida Takayuki, Nikawa Takeshi, Yamamoto Hironori, Miyazaki Makoto, Taketani Yutaka	4. 巻 67
2. 論文標題 Reduction of stearyl-CoA desaturase (SCD) contributes muscle atrophy through the excess endoplasmic reticulum stress in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 179 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.20-24	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 Sakai Maiko, Ohnishi Kohta, Masuda Masashi, Ohminami Hirokazu, Yamanaka-Okumura Hisami, Hara Taichi, Taketani Yutaka	4. 巻 84
2. 論文標題 Isorhamnetin, a 3'-methoxylated flavonol, enhances the lysosomal proteolysis in J774.1 murine macrophages in a TFEB-independent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1221 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1727309	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 -

〔学会発表〕 計49件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大南博和、北村彩乃、山口未来、滝川真輝、大西康太、増田真志、奥村仙示、伊勢孝之、八木秀介、福田大受、山田博胤、佐田政隆、竹谷豊
2. 発表標題 心不全マウスを用いた心リハビリテーションの評価系の確立
3. 学会等名 第27回日本心臓リハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川幸治、伊勢孝之、石井亜由美、鈴木佳子、大南博和、門田宗之、八木秀介、加藤真介、佐田政隆
2. 発表標題 TAVI患者におけるADLスコア（FIM）の変化
3. 学会等名 第27回日本心臓リハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井亜由美、伊勢孝之、西川幸治、鈴木佳子、大南博和、門田宗之、八木秀介、加藤真介、佐田政隆
2. 発表標題 外来心臓リハビリテーション通院に関する患者の意識調査
3. 学会等名 第27回日本心臓リハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村彩乃、大南博和、増田真志、奥村仙示、伊勢孝之、八木秀介、福田大受、山田博胤、佐田政隆、竹谷豊
2. 発表標題 運動および栄養介入が心不全マウスの病態に及ぼす影響
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第5回四国支部地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊勢孝之、石井亜由美、西川幸治、門田宗之、八木秀介、大南博和、竹谷豊、佐田政隆
2. 発表標題 Withコロナに対応したオンライン臨床実習システムの構築
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第6回四国支部地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川幸治、伊勢孝之、石井亜由美、大南博和、門田宗之、八木秀介、佐田政隆
2. 発表標題 心リハ研修施設としての活動報告
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第7回四国支部地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井亜由美、門田宗之、西川幸治、大南博和、伊勢孝之、八木秀介、佐田政隆
2. 発表標題 外来心リハ患者に対するACPアンケート調査から
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第8回四国支部地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門田宗之、石井亜由美、伊勢孝之、西川幸治、八木秀介、大南博和、竹谷豊、佐田政隆
2. 発表標題 当院における末期心不全に患者に対する緩和ケアの取り組み
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第9回四国支部地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井 亜由美、伊勢 孝之、西川 幸治、本間 友佳子、鈴木 佳子、大南 博和、門田 宗之、八木 秀介、早淵 康信、加藤 真介、佐田 政隆
2. 発表標題 小児に対する心臓リハビリテーションの取り組みと症例から学んだこと
3. 学会等名 第26回日本心臓リハビリテーション学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大南 博和、伊勢 孝之、八木 秀介、門田 宗之、西川 幸治、石井 亜由美、鈴木 佳子、竹谷 豊、加藤 真介、佐田 政隆
2. 発表標題 回復期における運動耐容能の向上は脂質パラメータと相關する
3. 学会等名 第26回日本心臓リハビリテーション学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井 亜由美、伊勢 孝之、西川 幸治、本間 友佳子、鈴木 佳子、大南 博和、門田 宗之、飛梅 威、八木 秀介、早淵 康信、加藤 真介、佐田 政隆
2. 発表標題 心肺停止をきたしQT延長症候群と診断されS-ICD植込みとなった5歳児に対する心リハの経験
3. 学会等名 第26回日本心臓リハビリテーション学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門田 宗之、八木 秀介、伊勢 孝之、石井 亜由美、西川 幸治、鈴木 佳子、大南 博和、加藤 真介、佐田 政隆
2. 発表標題 イバブラジン導入前後の運動耐容能の推移を観察した虚血性心筋症の一例
3. 学会等名 第26回日本心臓リハビリテーション学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川 幸治、伊勢 孝之、石井 亜由美、鈴木 佳子、大南 博和、門田 宗之、八木 秀介、加藤 真介、佐田 政隆
2. 発表標題 TAVI後の認知機能低下に関連する因子の検討
3. 学会等名 第26回日本心臓リハビリテーション学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川幸治、伊勢 孝之、石井亜由美、鈴木佳子、大南博和、門田宗之、八木秀介、加藤真介、佐田政隆
2. 発表標題 TAVI施行前後の認知機能の変化について
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第4回四国支部地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊勢孝之、門田 宗之、八木秀介、石井亜由美、西川幸治、鈴木佳子、大南博和、加藤真介、佐田政隆
2. 発表標題 TAVI実施症例の至適心臓リハビリテーションの考察
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第4回四国支部地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤朱門、八木 秀介、伊勢孝之、門田宗之、石井亜由美、西川幸治、鈴木桂子、大南博和、加藤真介、佐田政隆
2. 発表標題 若年健常人において、終末糖化産物は筋肉量・筋力の規定因子である
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第4回四国支部地方会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 石井亜由美、伊勢 孝之、西川幸治、鈴木佳子、大南博和、門田宗之、八木秀介、加藤真介、佐田政隆
2. 発表標題 心臓リハビリテーションの日独比較～ドイツ心リハ研修から
3. 学会等名 日本心臓リハビリテーション学会 第4回四国支部地方会
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	八木 秀介 (YAGI Shusuke) (00507650)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任教授  (16101)	
研究分担者	増田 真志 (MASUDA Masashi) (50754488)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・講師  (16101)	
研究分担者	伊勢 孝之 (ISE Takayuki) (90621649)	徳島大学・病院・助教  (16101)	
研究分担者	大西 康太 (OHNISHI Kohta) (80723816)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教  (16101)	

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