

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17081

研究課題名（和文）糖尿病性心筋症における早期診断バイオマーカーと治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new biomarker and treatment for diabetic cardiomyopathy

研究代表者

長尾 学（Nagao, Manabu）

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：70866029

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：グルタミンは血中に最も豊富に存在するアミノ酸で“グルタミノリシス”と呼ばれる代謝経路を通して、生体の主要なエネルギー産生系であるTCAサイクルへ、 α -ケトグルタル酸を補填している。本研究ではAdipo-PDK1KOマウスをモデル動物として用い、糖尿病性心筋症におけるグルタミノリシスの制御機構の解明を試みた。同マウスは心肥大と心筋インスリン抵抗性を示し、心臓組織中のグルタミンおよびその代謝物は、野生型マウスに比し、有意に増加していた。一方、グルタミンの安定同位体を用いた実験からは心臓におけるグルタミン利用の亢進は認めず、グルタミノリシスの薬理的阻害は心肥大を改善しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は、グルタミンをエネルギー源としてのみでなく、細胞増殖に必要な核酸やタンパク質合成のための炭素・窒素の供給源として利用するため、グルタミンに強く依存することがわかっている。一方、インスリン抵抗性により、糖利用が障害された心筋におけるグルタミン代謝機構や役割については不明である。本研究では糖尿病性心筋症におけるグルタミン代謝機構を解明することで、糖尿病を基盤とした心不全の新たなバイオマーカーや治療法の開発を試みた。予想に反し、グルタミンの同病態への直接的な関与は証明できなかったが、心筋代謝に注目した研究は来るべき心不全パンデミックの抑止に繋がる可能性を持つ、意義深い研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Glutamine, the most abundant amino acid in the circulation, is metabolized through a mitochondrial anaplerotic pathway known as glutaminolysis, which incorporates α -ketoglutarate (KG) into the tricarboxylic acid (TCA) cycle. In this study, we used Adipo-PDK1 knockout mouse as a model of diabetic cardiomyopathy and sought to investigate the regulatory mechanism of glutaminolysis in diabetic cardiomyopathy. The KO mice exhibited cardiac hypertrophy and insulin resistance. In addition, the glutamine and its metabolites levels in heart tissue were significantly increased compared to those of wild type mice. On the other hand, stable isotope tracing with $^{13}C_5$ -glutamine did not show the significant difference of cardiac glutamine utilization between KO and wild type mice. Finally, pharmacological inhibition of glutaminolysis did not improve the cardiac hypertrophy of KO mice.

研究分野：心筋代謝

キーワード：グルタミノリシス 心筋代謝 糖尿病性心筋症 心不全 心筋代謝リモデリング

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病は心不全の独立した危険因子であることが報告され、その原因として“糖尿病性心筋症”という病態が知られている。同病態は冠動脈疾患や高血圧に起因しない心室機能障害と定義され、心筋の肥大・線維化といった心リモデリングの進展により、最終的に心不全を発症することがわかっている。糖尿病患者の心不全発症リスクは、非糖尿病患者に比べ、男性で2倍、女性で5倍を超えると報告されており、2型糖尿病に限れば、75歳未満では心不全のリスクは約3倍、75歳~84歳では2倍となるという報告もある。また、心不全を合併する2型糖尿病患者は非患者群に比べてQOLが低く、心不全もより重症になる傾向にある。このように2型糖尿病と心不全は密接な関係にあり、合併した場合は予後を相加的に増悪させる。

本研究では2型糖尿病における心筋でのグルタミン代謝に注目した。グルタミンは血中に最も豊富に存在するアミノ酸で、細胞増殖に必要な核酸や脂質の合成に利用される他、“グルタミノリシス”と呼ばれる代謝経路を通して、生体の主要なエネルギー産生系であるTCAサイクルへ、 α -ケトグルタル酸を補填している。腫瘍学分野ではグルタミノリシスは精力的に研究され、細胞増殖能の高い癌細胞は、グルタミンをエネルギー源としてのみでなく、細胞増殖に必要な核酸や脂質・タンパク質合成のための炭素・窒素の供給源として利用するため、グルタミンに強く依存することがわかっている。一方、インスリン抵抗性により、糖利用が障害された心筋におけるグルタミン代謝機構や役割については明らかにされていない。

2. 研究の目的

グルタミン代謝制御機構に注目し、糖尿病性心筋症の病態の解明と新たな治療法・バイオマーカーの確立を目的とする。

3. 研究の方法

・本研究ではインスリンシグナルにおいて中心的な役割を担う分子である3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ(PDK1)を脂肪細胞特異的にノックアウトしたマウス(Adipo-PDK1KOマウス)を自施設で作成し、2型糖尿病のモデル動物として用いた。

・心臓インスリン抵抗性を評価するため、インスリンシグナル伝達を担う、Aktのリン酸化をウエスタンブロット法によって評価した。

・心重量や心臓切片のHE染色によってAdipo-PDK1KOマウスの心臓フェノタイプを観察した。

・液体クロマトグラフィー質量分析計によってAdipo-PDK1KOマウスの血漿、心臓組織中の代謝物を定量した。

・安定同位体標識されたグルタミン($^{13}\text{C}_5$ -glutamine)を腹腔内投与し、心臓組織におけるグルタミン利用をトレースした(stable isotope tracing)。

・グルタミノリシスの律速酵素であるグルタミナーゼ(glutaminase)阻害薬の一つであるbis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide (BPTES)をAdipo-PDK1KOマウスに離乳後より6週間腹腔内投与し(3mg/kg、週3回)、グルタミノリシスの阻害が心臓フェノタイプへ与える影響を観察した。

4. 研究成果

・Adipo-PDK1KOマウスは心臓インスリン抵抗性および心肥大を呈した

Adipo-PDK1KOマウスの10週令、30週令時の心重量/体重比、心重量/脛骨長比を測定したところ、いずれもノックアウト群で有意な増加を認めた(図1; a)。また、心臓切片のHE染色を行い、心筋断面積を定量したところ、ノックアウト群で有意な増加を認めた(図1; b)。続いて、同マウスの心臓インスリン抵抗性を評価するため、Aktのリン酸化をウエスタンブロット法で評価したところ、インスリン投与後のAktのリン酸化はノックアウト群で著明に低下していた(図1; c)。以上の結果より、Adipo-PDK1KOマウスは野生型に比し、心肥大と心臓インスリン抵抗性を呈することが明らかとなった。

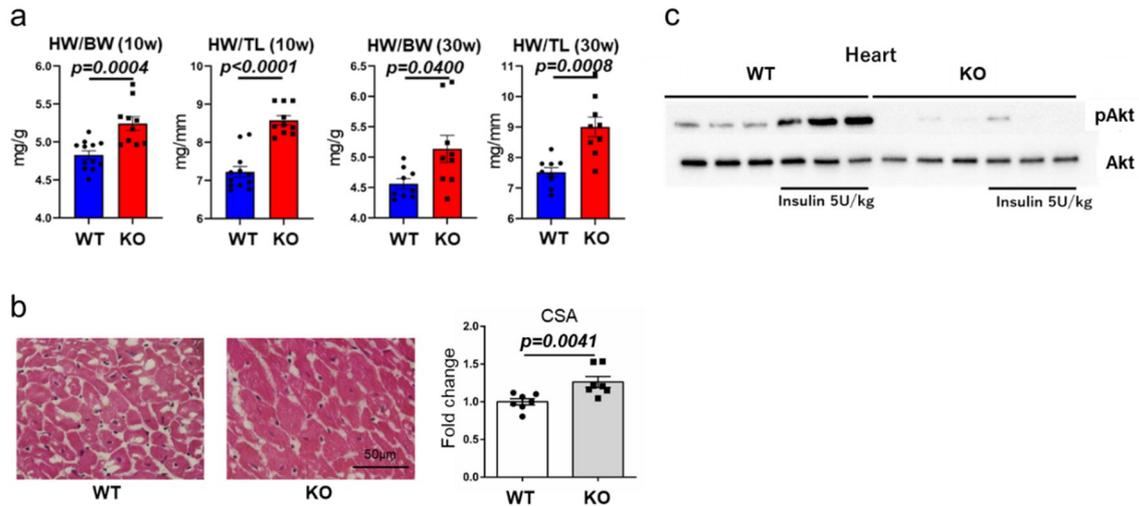


図 1. Adipo-PDK1KO マウスは心肥大および心臓インスリン抵抗性を呈した

a) 10, 30 週令時の心重量/体重比 (HW/BW), 心重量/脛骨長比 (HW/TL) (n=8)

b) 心臓切片の HE 染色と定量 (n=7)

c) Vehicle、もしくは 5U/kg のインスリン投与後 20 分における心臓組織のウエスタンブロットで Akt のリン酸化を評価した。

Mann- whitney U test, *WT; 野生型、KO; ノックアウト

Adipo-PDK1KO マウスの心臓組織ではグルタミンおよびその代謝物が野生型に比し、有意に増加していた

Adipo-PDK1KO マウスの心臓組織のメタローム解析を行った。グルタミン、グルタミン酸をはじめ、分岐鎖アミノ酸など種々のアミノ酸がノックアウト群で有意に増加していた(図 2; a, b, c)

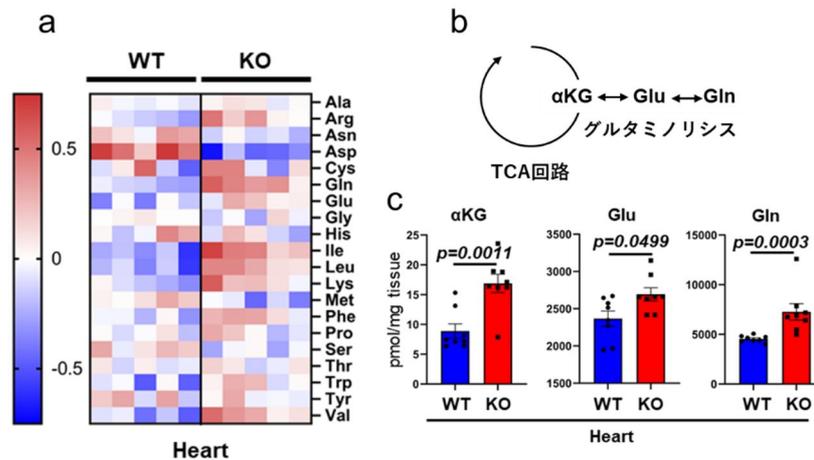


図 2. Adipo-PDK1KO マウスの心臓組織中アミノ酸

a) 心臓組織中のアミノ酸を液体クロマトグラフィー質量分析計で定量し、ヒートマップで示した (n=5)

b) グルタミンノリシスの概念図。

c) 心臓組織中のグルタミン (Gln)、グルタミン酸 (Glu)、ケトグルタル酸 (αKG) (n=8)

Mann- whitney U test, *WT; 野生型、KO; ノックアウト

外因性のグルタミンの心臓への取り込みは野生型群とノックアウト群で差はなかった

インスリン抵抗性を呈する心臓におけるグルタミン代謝を評価するため、安定同位体ラベルされたグルタミンを投与し、stable isotope tracingを行った。外因性に投与されたグルタミンは心臓組織中のグルタミン総量の10%にも満たないという結果であった(図3; a, b)。

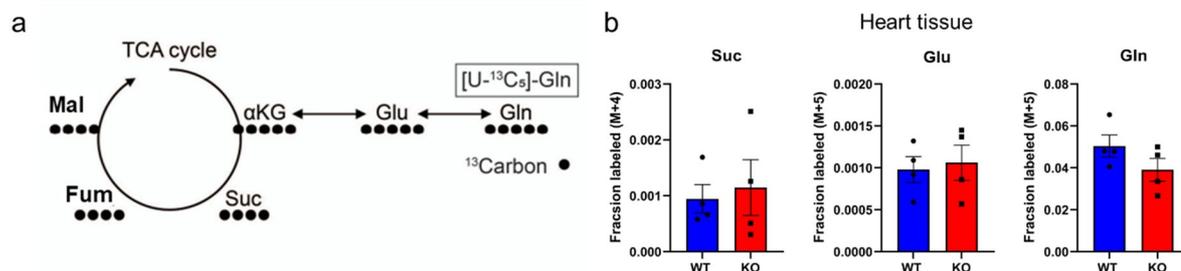


図3. Adipo-PDK1KO マウスへ安定同位体標識グルタミン ($^{13}\text{C}_5$ -glutamine) を投与し、グルタミン由来代謝物の追跡をおこなった (stable isotope tracing)

- a) 安定同位体標識グルタミン ($^{13}\text{C}_5$ -glutamine) 投与時の代謝図。
 b) $^{13}\text{C}_5$ -glutamine に由来するグルタミン(Gln)、グルタミン酸 (Glu)、コハク酸 (Suc) の分画 (n=4)。Mann- whitney U test, *WT; 野生型、KO; ノックアウト

Adipo-PDK1KO マウスは心臓における遺伝子改変を行うことなく、強いインスリン抵抗性と心肥大を呈することや、長期間に及ぶ食餌介入が不要なことから、糖尿病性心筋症のモデル動物として非常に有用であると考えた。心臓組織のメタボローム解析ではグルタミンやグルタミン酸をはじめとした種々のアミノ酸が上昇した。予想に反し、外因性に投与したグルタミンの取り込みは野生型とノックアウト群で差はなく、インスリン抵抗性下の心筋におけるグルタミン利用の亢進は認めなかった。また、グルタミノリシスの律速酵素であるグルタミナーゼ阻害薬 (BPTES) を投与する実験では糖尿病性心筋症における心肥大を抑制しなかった。

心肥大の大部分は遺伝的な要因によるものだけでなく、高血圧等による後天的な因子によって引き起こされることが多く、心肥大は心不全患者の約半数を占める拡張機能障害型心不全 (heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF) の素因となることも知られている。HFpEF の治療に関しては、循環器内科領域で盛んに議論され、新たな治療薬の探索が行われているにも関わらず、有効なものは確立されていない。従って、心筋代謝リモデリングを標的とした新たな治療法やバイオマーカーの開発は、来るべき心不全パンデミックの抑止が期待される意義深い研究であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sachiko Yoshikawa, Manabu Nagao, Ryuji Toh, Masakazu Shinohara, Takuya Iino, Yasuhiro Irino, Makoto Nishimori, Hidekazu Tanaka, Seimi Satomi-Kobayashi, Tatsuro Ishida, Ken-Ichi Hirata	4. 巻 322(5)
2. 論文標題 Inhibition of glutaminase 1-mediated glutaminolysis improves pathological cardiac remodeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Physiol Heart Circ Physiol	6. 最初と最後の頁 H749-H761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00692.2021.	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 Watanabe Koichi, Nagao Manabu, Toh Ryuji, Irino Yasuhiro, Shinohara Masakazu, Iino Takuya, Yoshikawa Sachiko, Tanaka Hidekazu, Satomi-Kobayashi Seimi, Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 534
2. 論文標題 Critical role of glutamine metabolism in cardiomyocytes under oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 687 ~ 693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.018	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川 祥子*、長尾 学、杜 隆嗣、篠原 正和、飯野 琢也、西森 誠、入野 康宏、田中 秀和、小林 成美、石田 達郎、平田 健
2. 発表標題 Inhibition of Glutaminase1-dependent Glutaminolysis Improves Pathological Cardiac Remodeling
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Sachiko Yoshikawa, Manabu Nagao, Ryuji Toh, Masakazu Shinohara, Takuya Iino, Hidekazu Tanaka, Seimi Satomi-Kobayashi, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata
2. 発表標題 Inhibition of glutaminase1-mediated glutaminolysis ameliorates angiotensin II-induced cardiac remodeling
3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 吉川祥子
2. 発表標題 Inhibition of glutamine anaplerosis improves Ang -induced cardiac remodeling
3. 学会等名 Cardiovascular and metabolic week2020
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 長尾 学
2. 発表標題 Crucial Role of Cardiac Glutamine Metabolism under Oxidative Stress
3. 学会等名 Cardiovascular and metabolic week2020
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 長尾 学
2. 発表標題 Critical roles of glutamine metabolism in failing heart
3. 学会等名 Cardiovascular and metabolic week2020
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 長尾 学
2. 発表標題 Critical Role of Cardiac Glutamine Metabolism under Oxidative Stress
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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