

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06780

研究課題名（和文）新生児低血糖症における心臓の未知の生理的役割とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Novel physiological function of heart in neonatal hypoglycemia

研究代表者

川岸 裕幸（Kawagishi, Hiroyuki）

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：30819082

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）：哺乳類は、胎盤循環から肺循環に移行する際に、低血糖状態に陥りやすい。低血糖ストレスに対する応答として、アドレナリンによる肝臓糖新生の誘導などが知られている。研究代表者は、新生児マウス単離心室筋細胞をアドレナリンで処理すると、細胞内のグリコーゲン分解を起点とした急速な解糖系が亢進され、乳酸の細胞外分泌が生じることを発見した。この作用を制御するシグナル経路の解析を行った結果、アドレナリン受容体の主要な下流経路であるcAMP-PKA系とは別の因子が機能することが判明した。本研究により、心臓のアドレナリン受容体を介した、新たな低血糖応答機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年乳酸は、エネルギー源だけではなく、細胞間シグナル分子として機能することが明らかになっている。このことは、心室筋細胞から分泌された乳酸が、自身や周辺細胞の表現型を調節している可能性がある。本研究で得られた知見は、発生・発達段階における乳酸を介した細胞間機能調節メカニズムに関する重要なものであり、発達期の環境が将来の健康状態に及ぼす影響（DOHaD）のメカニズムの理解に貢献できる。また、アドレナリンの糖代謝亢進作用は、従来のcAMP-PKA経路とは別の経路を介していることが示唆されることから、新生児低血糖などの小児代謝系疾患に対する新たな治療標的の発見につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Mammals are susceptible to hypoglycemia during the transition from placental to pulmonary circulation. Adrenaline is known to promote hepatic gluconeogenesis in response to hypoglycemic stress. Recently, we found that adrenergic stimulation rapidly promoted glycolysis and lactate secretion in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes without apparent changes in mitochondrial oxygen consumption. This effect was attributed to the induction of glycogenolysis. Pharmacological inhibition of the cAMP-PKA pathway, which is a major downstream signaling pathway of the adrenergic receptor, did not suppress the adrenergic enhancement of glycolysis, suggesting that adrenergic stimulation promotes cardiac glycolysis via a cAMP-PKA-independent pathway. Taken together, these data suggest a novel function of the mammalian heart in the hypoglycemic response through adrenergic signaling during developmental stages.

研究分野：細胞生物学、薬理学

キーワード：心筋細胞 アドレナリン 糖代謝 乳酸

1. 研究開始当初の背景

哺乳類は胎盤循環から肺循環に切り替わると、母乳による栄養（エネルギー基質）の獲得が必要になる。ヒトの新生児は、母乳による栄養補給が始まるまで出生後数日は飢餓状態となり、低血糖になりやすいことが知られている。特に未熟児は、肝臓のグリコーゲン貯蔵量が少ないことなどから、より重篤な低血糖状態に陥る傾向がある。このような低血糖ストレスに対する応答で、中心的なはたらきをするもののひとつがアドレナリンである。血中のグルコース濃度低下に応答し、アドレナリンが肝臓や骨格筋のグリコーゲン分解や糖新生を誘導することによって、血糖値を維持することが知られている。

胎児期や新生児期の心臓では、グルコースと脂肪酸の両方がエネルギー基質として利用されており、発達とともに脂肪酸主体に切り替わる。研究代表者は、新生児マウスの単離心室筋細胞にアドレナリン受容体（AR）アゴニストを添加すると、好氣的条件下での解糖系が急速に亢進し、乳酸の産生が向上することを見出した。これまでに、アドレナリンによる心筋細胞の糖代謝への作用については明らかになっておらず、その制御メカニズムも不明である。また、出生直後の哺乳類における乳酸は、中枢神経系ではATP基質として利用され、肝臓ではコリ回路によってグルコースに代謝される。すなわち、出生後の心臓は、AR刺激により乳酸産生を亢進することで、自身のATPを産生すると同時に乳酸供給器官としての機能を有すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、心臓のARを介した糖代謝亢進のメカニズムとその意義の解明を目的とする。ARのアゴニストを用いてマウス単離心室筋細胞を処理し、細胞のエネルギー代謝や代謝産物について解析を行うことで、細胞のエネルギー代謝経路における変化を捉える。また、ARの下流にあるシグナル経路のうち、糖代謝亢進作用を制御する経路に関して解析を行う。これらの検討を行い、出生直後の低血糖ストレス応答における、心臓の未知の生理的役割とその分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)細胞代謝解析

生後1日齢および8ヶ月齢のマウスから心臓を摘出し、酵素処理法により心室筋細胞を単離した。2mM L-glutamine 含有 XF 用 DMEM 培地（Agilent 社）に細胞を播種し、1g/L グルコース存在、非存在下において、細胞外フラックスアナライザー（Seahorse XF HS Mini Analyzer, Agilent 社）を用いて細胞のミトコンドリア機能の指標である酸素消費速度（OCR）と、細胞外への乳酸分泌量の指標である細胞外酸性化速度（ECAR）を測定した。アゴニストやアンタゴニスト等の薬物は、測定前、および測定中に添加した。

(2)細胞内代謝物の網羅的定量解析

生後 1 日齢のマウス心臓から心室筋細胞を単離し、16-24 時間、37 °C、5%CO₂ 環境下で培養した。AR アゴニストのイソプロテレノール (100 nM) で処理し、その後メタノール溶液にて細胞抽出液を調製した。LCMC-8050 (島津製作所) を用いて糖代謝経路、クエン酸回路、アミノ酸合成経路に注目してメタボローム解析を行った。

(3)細胞内グリコーゲンおよび細胞外乳酸の定量解析

新生児マウス単离心室筋細胞を培養後、100 nM イソプロテレノールで処理した。培養液と細胞を分画し、培養液は乳酸定量 (Lactate Assay Kit-WST, 同仁化学研究所) に、細胞は Glycogen Assay Kit (abcam 社) による細胞内グリコーゲン定量にそれぞれ用いた。吸光度の測定は、iMark マイクロプレートリーダー (Biorad 社) で実施した。

(4)マウスの血中乳酸濃度の測定

無麻酔の生後 1 日齢および 3 ヶ月齢のマウスに、イソプロテレノール (1 mg/kg 体重) プロプラノロール (1 mg/kg 体重) を皮下投与した。10 分後に尾部より採血を行い、血中の乳酸濃度を Lactate pro 2 (arkray 社) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1)アドレナリン添加により、マウス単离心室筋細胞の糖代謝が急速に亢進した。

グルコース、L-glutamine 存在下において、生後 1 日目のマウス心臓から単離した心室筋細胞の OCR、ECAR の測定を行ったところ、アドレナリン添加により ECAR の急速な上昇が確認された。アドレナリンによる ECAR の上昇は、1 nM-10 μM の範囲において濃度依存的であった。一方、OCR の大きな変化は認められなかった。次に、この現象がどの AR のサブタイプを介しているか調べるために、各 AR 特異的なアンタゴニストやアゴニストによる ECAR への影響を解析した。その結果、AR のアンタゴニストであるプロプラノロール (Prop) で前処理をすると、アドレナリンによる ECAR の上昇が抑制された (図 1A)。また、AR アゴニストであるイソプロテレノール (ISO) によって、急速な ECAR 上昇が確認された (図 1B)。これらの作用は、生後 8 ヶ月齢のマウス心室筋細胞では認められなかった。以上の結果から、新生児マウスの心室筋細胞では、AR 刺激によって糖代謝経路、乳酸分泌が亢進されることが示された。

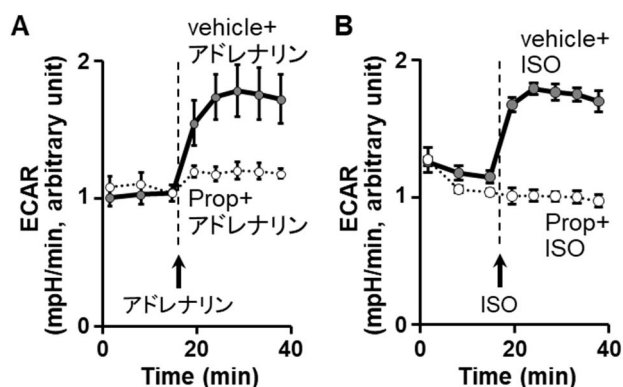


図1 マウス心室筋細胞のβARを刺激すると、急速なECARの上昇が生じた。

(2) AR 刺激により細胞のグリコーゲン分解が生じ、乳酸分泌が増加した。

AR 刺激による糖代謝亢進がグルコースを起点とするか調べるために、グルコース非含有培地を用いて AR 刺激による ECAR の変動を測定した。その結果、グルコース非存在下においても、マウス心室筋細胞はイソプロテレノールの処理により有意な ECAR 上昇を示した(図 2)。肝臓や骨格筋では、グリコーゲンを分解することで糖新生や糖代謝を亢進する。そこで、心室筋細胞内のグリコーゲン量について解析を行った。心室筋細胞をイソプロテレノールで処理したところ、細胞内のグリコーゲン含量が有意に低下した(図 3A)。その際、培地中の乳酸量の上昇も確認された(図 3B)。また、細胞のメタボローム解析を実施したところ、グリコーゲン分解物および乳酸量が増加しており、糖代謝の中間代謝物量の減少が見られた。

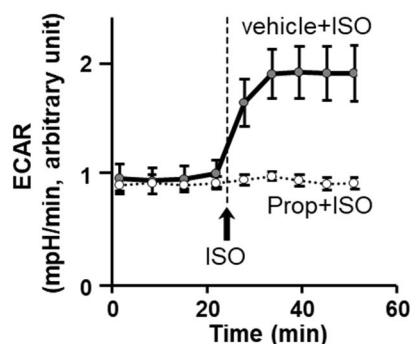


図2 グルコース非存在下でも、ISO刺激によりマウス心室筋細胞の急速な ECAR の上昇が生じた。

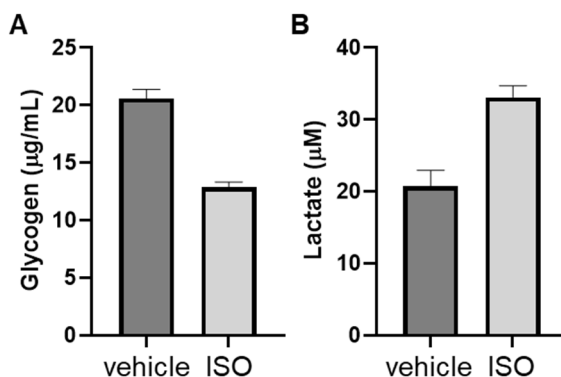


図3 ISO処理により細胞内グリコーゲン量が低下し、細胞外乳酸量が上昇した。

(3) AR 刺激による糖代謝亢進は、cAMP-PKA 経路非依存的である。

次に、AR 刺激による糖代謝亢進がどのようなシグナル伝達経路を介しているかについて理解するために、AR の下流シグナルの主経路である cAMP-PKA 経路に着目し、薬理的検討を実施した。PKA 阻害薬である H-89 (10 µM) で前処理を行うと、AR 刺激前の ECAR は低下したが、イソプロテレノールによる反応は H-89 非処理群と同程度生じた(図 4)。さらに、cAMP のアナログである 8-bromo-cAMP (10-100 µM) を添加したが、ECAR の上昇は誘導されなかった(未公開データ)。これらのデータは、AR が cAMP-PKA 経路非依存的に糖代謝を亢進していることを示唆した。

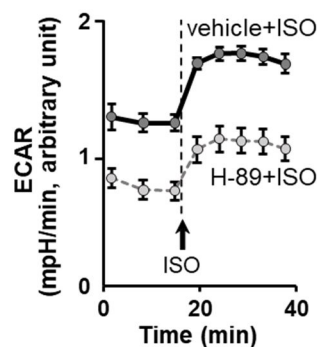


図4 PKA阻害薬H-89存在下でも、βAR刺激によるECARの急速な上昇が生じた。

(4) イソプロテレノールの急性投与は、血中の乳酸濃度を急速に上昇させる。

AR 刺激による糖代謝亢進、乳酸分泌作用が、生体においてもみられるか検討を行った。生後 1 日目のマウスにイソプロテレノール、プロプラノロールを皮下注射し、10 分後に採血、乳酸濃度の測定を行った。その結果、イソプロテレノールにより血中乳酸濃度は有意に上昇した。この上昇作用は、プロプラノロールと同時投与することで消失した(図 5)。また、生後 3 か月齢のマウスにイソプロテレノールを投与したところ、生後 1 日目のマウスと同様に血中乳酸濃度の上昇が検出された。

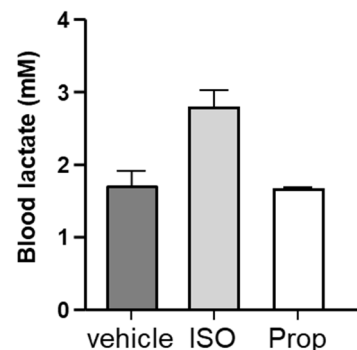


図5 生後1日目のマウスにISOを皮下投与すると、血中乳酸濃度が上昇した。

(5)考察

以上の研究結果から、新生児マウスの心室筋細胞の AR を刺激することで、グリコーゲン分解を起点とした糖代謝経路の活性化が生じ、乳酸分泌が増加することが示された。この作用は、AR 下流にあるシグナル伝達経路のうち、cAMP-PKA を介しておらず、別の因子が重要であることが示唆された。心臓における AR による糖代謝亢進が、生体においてどのような意義をもつかについては不明である。AR アゴニストの投与により新生児マウスの血中乳酸量の急速な増加が確認されたものの、この作用に関しては成獣マウスでも見られており、また肝臓や骨格筋などの他臓器への作用も考えられるため、今後臓器特異的なノックアウトマウスの解析などが必要である。

近年乳酸は、細胞間シグナル分子として機能することが報告されており、心臓から分泌された乳酸が、自身や周辺細胞の表現型を調節している可能性がある。本研究で得られた知見は、発生・発達段階における乳酸を介した細胞間機能調節メカニズムに関する重要なものであり、発達期の環境による将来の健康状態への作用(DOHaD)のメカニズムの理解や、新生児低血糖などの小児代謝系疾患に対する治療標的の発見につながることで期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Hideki, Tohyama Shugo, Ichimura Hajime, Ohashi Noburo, Chino Shuji, Soma Yusuke, Tani Hidenori, Tanaka Yuki, Yang Xiao, Shiba Naoko, Kadota Shin, ... Kawagishi Hiroyuki, Yamada Mitsuhiro, Narita Kazumasa, Naito Takafumi, Seto Tatsuichiro, Kuwahara Koichiro, Shiba Yuji, Fukuda Keiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Regeneration of Nonhuman Primate Hearts With Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Spheroids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Circulation	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） 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.064876	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 Kawagishi Hiroyuki, Yanagida Shota, Kanda Yasunari	4. 巻 -
2. 論文標題 Drug Development Using Human iPSC-Derived Cardiomyocytes and Future Perspectives	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	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） 10.1016/b978-0-323-95488-4.00078-4	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 Kawagishi Hiroyuki, Nakada Tsutomu, Numaga-Tomita Takuro, Larran-aga Maite, Guo Ang, Song Long-Sheng, Yamada Mitsuhiro	4. 巻 323
2. 論文標題 Cytokine receptor gp130 promotes postnatal proliferation of cardiomyocytes required for the normal functional development of the heart	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H103 ~ H120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpheart.00698.2021	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 該当する

1. 著者名 川岸 裕幸、山田 充彦	4. 巻 70
2. 論文標題 新生児マウス心臓の機能的発達におけるサイトカイン受容体gp130の役割	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 信州医学雑誌	6. 最初と最後の頁 373 ~ 382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11441/shinshumedj.70.373	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 川岸 裕幸、山田 充彦	4. 巻 45
2. 論文標題 アレスチンバイアス性アンジオテンシンII 1型受容体アゴニストによる新たな小児心不全治療戦略の創生.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 血管	6. 最初と最後の頁 9~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川岸裕幸
2. 発表標題 液性因子による新生児期特有の生理作用と その制御機構の探索
3. 学会等名 第46回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroyuki Kawagishi, Ayano Satsuka, Shota Yanagita, Naoya Hirata, Yasunari Kanda
2. 発表標題 Assessment of Cardiac Contractility Using Aligned Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes
3. 学会等名 2023 Safety Pharmacology Society (SPS) ANNUAL MEETING (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川岸裕幸, 中島岳郎, 松岡大輔, 中田勉, 富田拓郎, 諫田泰成, 山田充彦
2. 発表標題 新生児・乳児期心不全治療薬としての アレスチンバイアスAT1受容体アゴニストの有効性と安全性のメカニズム
3. 学会等名 第97回日本薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川岸裕幸, 中島岳郎, Risa Ramadhiani, 中田勉, 富田拓郎, 諫田泰成, 江本憲昭, 山田充彦
2. 発表標題 アンジオテンシンIIの新生児・乳児期特異的心臓作用の発見から小児心不全治療薬へ
3. 学会等名 第33回日本循環薬理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川岸裕幸, 中島岳郎, 諫田泰成, 山田充彦
2. 発表標題 アンジオテンシン受容体バイアスアゴニストの小児心不全治療薬としての有効性および安全性の非臨床評価
3. 学会等名 第15回日本安全性薬理研究会学術年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川岸裕幸, 中島岳郎, Risa Ramadhiani, 中田勉, 富田拓郎, 諫田泰成, 江本憲昭, 山田充彦
2. 発表標題 アンジオテンシン受容体を標的とした新生児・乳児心不全治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川岸 裕幸, 富田(沼賀) 拓郎, 中田 勉, 山田 充彦
2. 発表標題 アレスチンバイアスAT1Rアゴニストはヒト先天性拡張心筋症マウスの離乳前生命予後を改善する
3. 学会等名 第32回日本循環薬理学
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川岸裕幸, 山田充彦
2. 発表標題 幼若心筋細胞におけるリガンド特異的gp130受容体シグナルの意義
3. 学会等名 2022年 筋生理の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Kawagishi, Risa Ramadhiani, Naoto Minamino, Takuro Tomita-Numaga, Tsutomu Nakada, Noriaki Emoto, Mitsuhiro Yamada
2. 発表標題 アレチンバイアスAT1受容体アゴニストは先天性拡張型心筋症モデルマウスの生命予後を改善する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川岸裕幸, 中田勉, 富田(沼賀)拓郎, 山田充彦
2. 発表標題 出生後の心筋細胞分裂におけるインターロイキン-6/gp130シグナル経路の役割
3. 学会等名 第51回日本心脈管作動物質学会 2022年7月30日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 KAWAGISHI Hiroyuki, NAKADA Tsutomu, NUMAGA-TOMITA Takuro, YAMADA Mitsuhiro
2. 発表標題 Interleukin-6/gp130 signaling controls postnatal proliferation of mouse ventricular cardiomyocytes
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川岸裕幸, 中田勉, 富田(沼賀)拓郎, 山田充彦
2. 発表標題 インターロイキン-6/gp130経路による出生後心室筋細胞の分裂制御と心臓
3. 学会等名 第146回日本薬理学会関東部会 2022年6月18日
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroyuki Kawagishi , Tsutomu Nakada , Takuro Tomita-Numaga , Mitsuhiko Yamada
2. 発表標題 Rapid increase in aerobic glycolysis in neonatal mouse ventricular cardiomyocytes in response to acute α -adrenergic stimulation
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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