

心筋細胞内代謝のストレス応答機構の解明

所属機関 慶應義塾大学医学部
研究者名 佐野 元昭

《研究の概要》

心筋細胞の代謝と機能は密接に連携しており、ストレス応答においても重要な役割を果たしている。本研究では、心筋代謝システムの動作機構を、エネルギー基質の選択性や細胞内代謝の機能的変動の観点から解き明かし、次世代の新規治療戦略の創成を狙った。

研究代表者の佐野は、質量分析による代謝産物の計測技術を心臓病の病態解明に世界で先駆けて導入し、心筋代謝の機能的変動の病態生理学的意義を明らかにしてきた。本研究では、代謝調節薬 dichloroacetate (DCA) が、「心筋細胞内代謝－エビジェネティクス連関」を介して、心筋リモデリング（心筋細胞肥大、間質線維化、心臓収縮機能低下）を抑制することを明らかにした。eIF2 α -ATF4 経路が、アミノ酸代謝系（解糖系→セリン合成系→グルタチオン産生経路）の活性化を介して、心筋抗酸化ストレス応答に重要な役割を果たしていることを報告してきた。本研究では、心筋虚血ストレス条件下でも eIF2 α -ATF4 経路が活性化することを見出した。軽度から中等度の eIF2 α リン酸化の活性化は、心機能には影響を与えずに低酸素に対する抵抗性を獲得させ、高度の eIF2 α リン酸化の活性化は心筋収縮力を一過性に低下させた。eIF2 α リン酸化シグナルの高度の活性化を解除すると心筋収縮力は完全に回復した。高度かつ持続的な eIF2 α リン酸化の活性化は心不全死を誘導した。以上の結果から eIF2 α リン酸化のダイナミックが、preconditioning、途絶心筋 stunning、心不全 heart failure といった病態を連続的に制御していることを明らかにした。質量顕微鏡を用いて、心筋代謝産物を可視化する技術を慶應義塾大学医化学教室との共同研究で樹立した。これまで、不安定性のため可視化、定量化が困難であった虚血時のダイナミックな代謝産物の変動を Focused microwave 法を導入することによって可能にした。

共同研究者の磯は、心筋代謝システムの動作機構を、エネルギー基質の選択性の観点から解き明かすことをめざした。心臓の主要なエネルギー基質は脂肪酸とグルコースであり、運動・虚血・圧負荷などの外的負荷に応答してダイナミックに変化する。FABP4/5double KO マウスあるいは CD36 KO マウスでは、心臓の脂肪酸取り込みが低下し、糖利用が著明に増加する（心臓のエネルギー基質依存度が脂肪酸から糖へシフトする）。これら遺伝子欠損マウスに大動脈縮窄 (TAC) による圧負荷モデルを作製すると、生存率が低下し心収縮能と ATP 産生能が低下する。一方、糖由来の脂肪酸合成は保たれていた（生体膜構成因子であるリン脂質を補充するため）。中等度に脂肪酸取り込みが低下する FABP4/5double KO マウスでは、ペントースリン酸経路を介する酸化還元反応が増加したが、高度に低下する CD36 KO マウスではそれらが低下した。以上、心負荷が加わった際のエネルギー代謝応答のためには、ATP 産生・リン脂質合成のベースとなる恒常的な脂肪酸供給と、負荷に対応したダイナミックな糖代謝増加（ATP 産生、ペントースリン酸経路、脂肪酸合成）の両者が必須であり、単純に脂肪酸代謝抑制や糖代謝亢進のみが心保護的に働くと考えることはできない、と考えられた。

共同研究者の新村は、心筋細胞の Sirt1 が、代謝ストレスに対する心適応現象において中心的な役割を担っていることを明らかにした。抗老化療法の一つであるカロリー制限は、栄養失調をきたさない程度の低栄養による代謝ストレスであり、多面的な心血管保護効果を誘導する。心臓 Sirt1 は、抗酸化酵素の発現亢進と、虚血再灌流時の補体系活性化を抑制することによりカロリー制限による虚血心保護効果を仲介していた。また心臓 Sirt1 は、過栄養状態と位置づけられる高脂肪食負荷時に、心臓におけるエネルギー基質の switching を助け、抗炎症作用を発揮し、心筋障害を防ぐ役割を持つことが明らかになった。

磯 達也 群馬大学大学院 エネルギー基質選択性の重要性と心筋
臓器病態内科学部内講師 ストレス応答の意義の解明

新村 健 慶應義塾大学医学部 Sirtuin の心臓代謝調節機構における
老年内科専任講師 役割の解明
(平成 26 年 4 月から慶應義塾大学 循環器内科学 学部内講師、平成 26 年
12 月から兵庫医科大学兵庫医科大学 総合診療科 主任教授)

研究報告

I 研究目的

心筋細胞の代謝と機能は密接に関連しており、ストレス応答においても重要な役割を果たしている。本研究では、心筋代謝システムの動作機構を、エネルギー基質の選択性や細胞内代謝の機能的変動の観点から解き明かし、次世代の新規治療戦略の創成を狙う。

研究代表者の佐野は、メタボローム解析を駆使して、

- (1) 代謝調節薬 dichloroacetate (DCA) による圧負荷ストレス応答制御機構の解明
- (2) α MHC-Fv2E-PERK トランスジェニックマウスを用いた心筋虚血ストレス応答機構の解明
- (3) 心筋グルコース代謝のイメージング技術の確立と病態解明への応用

の 3 つの研究を通して、心筋代謝の機能的変動を治療標的とした次世代の心不全治療戦略の創成を狙う。

(1) 心臓に圧負荷がかかった時に観察される解糖系とミトコンドリア酸化的リン酸化のアンカップリングを代謝調節薬 dichloroacetate (DCA) で改善させたときに肥大、線維化の進行が抑制される分子機序を「心筋細胞内代謝-エビジェネティクス連関」を軸に解析していく。(2) 心筋細胞特異的にアルデヒド脱水素酵素 ALDH2 のドミナントネガティブ変異体蛋白質を過剰発現させて、恒常的にミトコンドリアが酸化ストレスに暴露されているマウスの心筋代謝産物のメタボローム解析の結果、アミノ酸代謝系(解糖系→セリン合成系→グルタチオン産生経路)が心筋抗酸化ストレス応答に重要な役割を果たしていることを見出した(Endo J & Sano M. Circ Res. 2009)。さらに、この代謝リモデリングには、c1F2alpha-ATF4 経路が関与していたことから e1F2 α リン酸化シグナルを心筋細胞特異的にさまざまな強度と持続時間で活性化可能な α MHC-Fv2E-PERK トランスジェニックマウス

を作成した。このトランスジェニックマウスを使って、アミノ酸代謝および c1F2alpha-ATF4 経路のストレス応答機構の解明をさらに深化させる。

(3) 最近、慶應大学医化学研究室との共同研究で、代謝産物の局在を $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ の解像度で可視化する質量顕微鏡の技術開発に成功した。マウス左冠動脈結紮直後の急性虚血モデルを用いて、質量顕微鏡を用いた代謝産物の可視化を行い、心筋代謝産物、代謝経路の局在的变化の全貌を明らかにすることを目的とする。

共同研究者の磯は、心筋細胞への脂肪酸の取り込みに FABP (fatty acid binding protein) が必須の担体であることを発見した。FABP4/5 ダブルノックアウトマウスの心臓では脂肪酸代謝が減少し、圧負荷下で容易に心不全を呈する。圧負荷直後よりエネルギー代謝が破綻する（相対的な ATP 産生が低下する）ことが原因と推察された。メタボローム解析、フラクソーム解析、ATeam ノックインマウス（細胞内 ATP 濃度モニターマウス）を用いて、この仮説を実証する。FABP4/5 ダブルノックアウトマウスに加えて、脂肪酸取り込み障害を示すマウスモデルとして FAT (fatty acid translocase) /CD36 KO マウスを用いて同様の検討を行いこの仮説を一般化する。

共同研究者の新村は、心臓特異的 Sirt1 ノックアウトマウスを用いて、カロリー制限による虚血再灌流障害に対する心筋保護効果に Sirt1 が重要な役割を果たしていることを確認した。Sirt1 には、FOXO を介して、抗酸化酵素を誘導することが知られているが、心筋細胞における Sirt1 の新規標的分子の同定とその病態生理学意義の解明をめざす。Sirt1 はこれまでカロリー制限に伴う健康寿命の延長と言う点で注目を集めてきたが、最近、メタボリック症候群の病態形成における Sirt1 の役割に関しては、まだ十分解明されていない。心不全のリスク因子は、これまでの、高血圧、虚血性心疾患から、肥満や糖尿病に変わりつつあり、それとともに心不全の病態も心筋収縮力の低下した心不全から心筋収縮力は維持されて拡張機能が低下する心不全にシフトしつつある。そこで、本研究では、高脂肪食負荷心不全モデルマウスにおける心筋 Sirt1 の役割に関しても平行して解析を進める。

II 研究計画および材料と方法

代表研究者：佐野元昭

- 代謝調節薬 dichloroacetate (DCA) による圧負荷ストレス応答制御機構の解明
- α MHC-Fv2E-PERK トランスジェニックマウスを用いた心筋虚血ストレス応答機構の解明
- 心筋グルコース代謝のイメージング技術の確立と病態解明への応用
- 代謝調節薬 dichloroacetate (DCA) による圧負荷ストレス応答制御機構の解明

心臓に圧負荷が加わると解糖系とミトコンドリア酸化的リン酸化的のアンカップリングがおこる。私はマウス大動脈縮窄術による圧負荷モデルを用いて pyruvate dehydrogenase (PDH) kinase 阻害剤である dichloroacetate (DCA) の投与を行った。これまでの実験の結果、①圧負荷後 PDH のリン酸化が 20 分後から上昇して、その後、高いリン酸化状態が持続すること、②PDH のリン酸化を抑制する量の DCA 投与によって、圧負荷による心肥大、心筋線維化、心筋収縮力の低下が抑制されること、③解糖系とクエン酸回路カップリングが亢進すること、④解糖系とクエン酸回路カップリングが亢進した結果、クエン酸回路の代謝流速やエネルギー産生には変化がなく、細胞内アセチル CoA プールが著

名に増加すること、⑤DCA 投与によって核内ヒストンのアセチル化が亢進し、遺伝子発現が変化すること、を明らかにした。(代謝解析は、群馬大学磯先生との共同研究で進めた)。本研究では、DCA 投与による心筋細胞内代謝変化が、細胞内アセチル CoA プールを増加させて、エピジェネティクス変化をもたらすことと、DCA が抗肥大、抗線維化効果を発揮して、心不全発症を抑制する現象をつなぐ分子機序を解明することを目的とする。

DCA による抗肥大、抗線維化効果は、細胞内アセチル CoA プールの増加に伴うエピジェネティクス変化を介しているのではないかと仮説を立てた。DCA 投与によって発現が変化している遺伝子群を DNA microarray を用いて網羅的に解析する。

● α MHC-Fv2E-PERK トランスジェニックマウスを用いた心筋虚血ストレス応答機構の解明

研究代表者は、心筋細胞特異的にアルデヒド脱水素酵素 ALDH2 のドミナントネガティブ変異体蛋白質を過剰発現させてマウスを作製した。このマウスは、恒常的にミトコンドリアが酸化ストレスに暴露されているが、心筋代謝のメタローム解析の結果、アミノ酸代謝系（解糖系→セリン合成系→グルタチオン産生経路）を活性化させることによって代償し、虚血再灌流障害に対しても、むしろ、野生型以上に抵抗性を獲得していることを見出した (Endo J & Sano M. *Circ Res.* 2009)。さらに、この代謝リモデリングには、eIF2 α -ATF4 経路が関与していることを見出した。そこで、dimerizer AP20187 を投与することによって、心筋の eIF2 α リン酸化シグナルをさまざまな強度と持続時間で活性化可能な α MHC-Fv2E-PERK トランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスを使って、アミノ酸代謝のストレス応答機構の解明をさらに深化させる。

● 心筋グルコース代謝のイメージング技術の確立と病態解明への応用

最近、慶應大学医化学研究室との共同研究で、代謝産物の局在を 10 μ mX10 μ m の解像度で可視化する質量顕微鏡の技術開発に成功した。本研究期間中に、質量顕微鏡を用いた代謝産物の可視化が、心筋代謝研究にどのように応用できるか探索研究を進める予定である。

共同研究者 1. 磯 達也

● エネルギー基質選択制の重要性と心筋ストレス応答の意義の解明

[これまでの成果] FABP (fatty acid binding protein) は脂肪酸結合タンパクで、これまで細胞内での脂肪酸の貯蔵と輸送に関与する分子と考えられてきた。磯らは、最近この FABP4/5 がまったく新しい機能を有することを明らかにした。FABP4 と FABP5 は心臓の筋型毛細血管内皮細胞に高発現しており、FABP4/5DKO マウスの心臓では ¹²⁵I-BMIPP (脂肪酸アナログ) 取り込みが野生型の約 60% に減少し、相対して ¹⁸F-FDG (グルコースアナログ) 取り込みが野生型の約 20 倍上昇していた。これからの結果は、脂肪酸が毛細血管内皮細胞内を通過の際に FABP4/5 が必須の担体であることを意味する

[研究計画] ① FABP4/5DKO マウスの心臓においてグルコース代謝が著明に亢進する分子機序を明らかにする。これまでの検討で、FABP4/5DKO マウスの心臓の FDG 取り込み亢進がインスリン非依存症であること、グルコース代謝関連遺伝子の mRNA 発現に変化がない(転写制御に依存しない)ことがわかっている。以上より、FABP4/5DKO マウスの心臓でのグルコース代謝亢進はタンパク発現・タンパク修飾・アロステリック調節などによると考えている。この点を、プロテオミクス、メタボロミクスの手法を用いて解析する。

② グルコース代謝が亢進した FABP4/5DKO マウスの心臓は圧負荷心筋の病態を助長する

か、あるいは改善するかを検討する。心臓における主たるエネルギー源は脂肪酸だが、虚血や圧負荷・容量負荷が加わると心筋は代謝基質を脂肪酸からグルコースにスイッチする。グルコース代謝が亢進した FABP4/5DKO マウスの心臓において、心筋に負荷がかかった場合、その病態を助長するのがあるいは改善するのかが検討する。心臓の病態モデルとして大動脈縮窄モデル (Transverse-aortic constriction: TAC) を用いる。圧負荷時の心筋エネルギー代謝の変調を研究代表者、慶應大学佐野との共同研究でメタボローム解析・フラクソーム解析、さらには Ateam ノックインマウス (心筋細胞内 ATP 濃度モニターマウス) を用いた解析で明らかにする。FABP4/5 ダブルノックアウトマウスに加えて、脂肪酸取り込み障害を示すもう一つのマウスモデル FAT (fatty acid translocase) /CD36 KO マウスを用いて同様の検討を行い、この現象をより一般化する。

共同研究者 2. 新村 健

● Sirtuin の心臓代謝調節機構における役割の解明

[研究の目的] 先進諸国において過食と肥満は、深刻な健康問題となっている。日本人における肥満者の割合は、欧米人より少ないが、日本人は欧米人よりも儉約遺伝子を有する割合が 3 倍多いことから、比較的軽度の肥満により健康傷害が生じる可能性が高い。肥満は、心臓、肝臓、膵臓、筋肉、血管等の非脂肪組織への脂肪沈着を引き起こし、脂肪毒性を発揮し、2 型糖尿病、心不全、脂肪性肝炎などの肥満関連疾患を引き起こす。このような代謝ストレス下、長寿遺伝子として注目を浴びている酵母 *SIR2* の哺乳類 homolog、sirtuin family は、代謝調節の key molecule として重要な役割を担うと報告されている。心臓はポンプ機能維持のため多くのエネルギー産出を必要とし、さまざまな代謝ストレスにさらされる標的臓器と考えられるが、代謝ストレス下の心臓 sirtuin の役割に関する報告はほとんど存在しない。そこで本研究では、カロリー制限 (CR)、高脂肪食負荷等のさまざまな代謝ストレス下で、心臓 sirtuin が心臓エネルギー代謝調節に果たす役割を解明していきたい。

[研究計画] 心臓特異的 *sirt1* ノックアウトマウスを用いて、カロリー制限による虚血再灌流障害に対する心筋保護効果に *sirt1* が重要な役割を果たしていることは確認済みである。*sirt1* には、FOXO を介して、抗酸化酵素を誘導することが知られているが、心筋細胞における *sirt1* の新規標的分子の同定とその病態生理学意義の解明をめざす。

sirt1 はこれまでカロリー制限に伴う健康寿命の延長という点で注目を集めてきたが、最近、メタボリック症候群の病態形成における *sirt1* の役割に関しては、まだ、十分解明されていない。心不全のリスク因子は、これまでの、高血圧、虚血性心疾患から、肥満や糖尿病に変わりつつあり、それとともに心不全の病態も心筋収縮力の低下した心不全から心筋収縮力は維持されて拡張機能が低下する心不全にシフトしつつある。そこで、本研究では、高脂肪食負荷心不全モデルマウスにおける心筋 *sirt1* の役割に関しても平行して解析を進める。

III 研究成果

代表研究者：佐野元昭

● 代謝調節薬 dichloroacetate (DCA) による圧負荷ストレス応答制御機構の解明

わが国の心不全の 4 大原因は、高血圧、虚血性心疾患、弁膜症、心筋症だが、心筋症以

外の病態は、「圧負荷→心肥大→心不全」という病態が背景に存在する。心肥大は物理学的には適応現象とみなされる側面もあるが、過度な肥大やそれに伴う間質の線維化は拡張不全さらには収縮不全を引き起こし破綻（心不全）へと導く。

心臓に圧負荷が加わると心筋細胞内代謝は変化するが、私は、解糖系とミトコンドリア酸化のリン酸化のアンカップリングという現象に着目した。圧負荷が加わると心筋細胞へのグルコースの取り込みが亢進し、解糖系が活性化されるが、ミトコンドリア酸化のリン酸化の活性化（エネルギー産生）とは必ずしも連動していないという現象である。グルコースが解糖系によってピルビン酸に代謝されるとミトコンドリアに取り込まれてアセチル CoA に変換される。この変換を触媒している酵素がピルビン酸脱水素酵素（pyruvate dehydrogenase complex: PDH）であり、解糖系とクエン酸回路とをつなぐ、重要な役割を担っている。PDH の活性は、PDH kinase によるリン酸化によって制御されているが、圧負荷が加わると PDH のリン酸化が亢進することが解糖系とクエン酸回路のアンカップリングの原因のひとつとして説明されている。PDH kinase の阻害剤である dichloroacetate (DCA) は、乳酸アシドーシスの治療薬として臨床で使用経験のある薬である。最近では、肺高血圧症患者の治療（肺血管病変と右心不全に対する治療効果を期待して）に対する臨床治験が米国で進行中である。動物実験では、知期間の DCA 投与が虚血心や不全心の心機能を改善させる（*Bersin RM. Am Heart J. 1997;134:841-855*）、長期に投与すると心肥大から心不全への移行を抑制する（*Lewis JF. Clin Cardiol. 1998;21:888-892. Wargovich TJ Am J Cardiol. 1988;61:65-70. Kato T. Circ Heart Fail. 2010;3:420-430*）ことが報告されている。私はマウス大動脈縮窄術による圧負荷モデルを用いて DCA の効果に関して追試を行った。その結果、①圧負荷後 PDH のリン酸化が 20 分後から上昇して、その後、高いリン酸化状態が持続すること、②PDH のリン酸化を抑制する量の DCA 投与によって、圧負荷による心肥大、心筋線維化、心筋収縮力の低下が抑制されること、③解糖系とクエン酸回路カップリングが亢進すること、④解糖系とクエン酸回路カップリングが亢進した結果、クエン酸回路の代謝流速やエネルギー産生には変化がなく、細胞内アセチル CoA プールが著名に増加すること、⑤DCA 投与によって核内ヒストンのアセチル化が亢進し、遺伝子発現が変化すること、⑥DCA 投与によって病的な心肥大を抑制する遺伝子を選択的に増加させることを明らかにした。研究成果は、Matsushashi T, Hishiki T, Zhou H, Ono T, Kaneda R, Iso T, Yamaguchi A, Endo J, Katsumata Y, Atsushi A, Yamamoto T, Shirakawa k, Yan X, Shinmura k, Suematsu M, Fukuda K, Sano M. Activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate has the potential to induce epigenetic remodeling in the heart. J Mol Cell Cardiol. 2015;82:116-24.として、論文に受理された。

● α MHC-Fv2E-PERK トランスジェニックマウスを用いた心筋虚血ストレス応答機構の解明

e1F2α リン酸化は低酸素刺激で最も強く誘導された。低酸素刺激に対する心筋の機能的変化は、低酸素刺激の強度や持続時間によってさまざまである。我々は、e1F2α リン酸化シグナルこそが、低酸素刺激に対する心筋のストレス応答を制御する鍵分子と考え、検証を行った。心臓特異的に e1F2 リン酸化シグナルを活性化させる α MHC-Fv2E-PERK トランスジェニックマウスに dimerizer AP20187 を投与することによって、心筋の e1F2α リン酸化シグナルをさまざまな強度と持続時間で活性化すると予想通り心機能がダイナミックに変

化した。軽度から中等度の e1F2 α リン酸化の活性化は、心機能には影響を与えずに低酸素に対する抵抗性を獲得させた。高度の e1F2 α リン酸化の活性化は心筋主縮力を一過性に低下させた。大変興味深いことに e1F2 α リン酸化シグナルの高度の活性化を解除すると心筋収縮力は完全に回復した。高度かつ持続的な e1F2 α リン酸化の活性化は心不全死を誘導した。以上の結果から e1F2 α リン酸化のダイナミックが、preconditioning、途絶心筋 stunning、心不全 heart failure といった病態を連続的に制御していることが分かった。e1F2 α リン酸化シグナルが心筋収縮を抑制する機序として、e1F2 α リン酸化シグナルが細胞内 Ca ハンドリングを負に制御している現象を見出した（論文執筆中）。

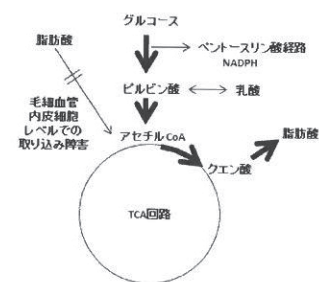
● 心筋グルコース代謝のイメージング技術の確立と病態解明への応用

マイクロウェーブを心臓に直接照射してマウスを瞬殺しかつ代謝産物の分解酵素を失活させ代謝産物の変化を抑制する方法を開発、さらに、マイクロウェーブ法で処理した心臓の切片を用いて代謝産物の空間的分布を可視化する質量分析イメージング法の精度・感度を高めて、心筋梗塞モデルにおける代謝産物の空間分布の可視化に成功した（論文投稿リバイズ中）。

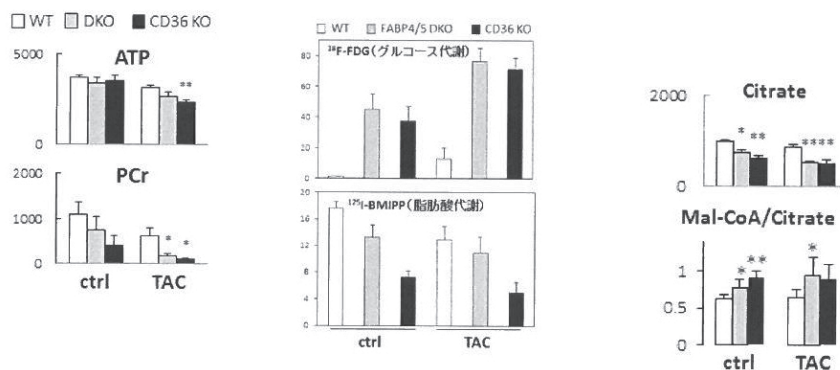
共同研究者 1. 磯 達也

● エネルギー基質選択性の重要性と心筋ストレス応答の意義の解明

脂肪酸輸送が障害される FABP/4DKO マウスの心臓では、エネルギー基質不足を補うために代償的にグルコース代謝が著しく亢進する。この二次的なグルコース代謝亢進はインスリン非依存的であり、アロステリック調整や転写後調整により糖取り込み亢進・解糖系亢進が生じることによる。さらに、脂肪酸取り込み低下を補うため（生体膜構造に必須のリン脂質などに利用するため）、絶食中にもかかわらず取り込まれたグルコースが脂肪酸合成に利用され、それにより心筋の ATP 産生がさらに低下する（グルコースの一部が TCA 回路を介する ATP 産生に利用されない）ことが明らかとなった（右図）。



FABP4/5 DKO マウスと CD36 KO マウスに TAC による圧負荷を作成すると、TAC 後 3 週間で DKO マウスの 20% が、CD36 KO マウスの 50% が死亡した（野生型は 100% 生存）。生存したマウスも、DKO マウス・CD36 KO マウスともに心機能が著明に低下した。



核医学実験では、負荷前後のマウス心臓の¹²⁵I-BMIPP（脂肪酸アナログ）の取り込みが CD36 KO マウスで最も低く、¹⁸F-FDG（グルコースアナログ）の取り込みは、DKO マウスと CD36 KO マウスでほぼ同等だった。メタ

ボローム解析では、DKO マウス、CD36 KO マウスの圧負荷後心臓では PCr が著しく低下し、CD36KO マウスでは ATP 濃度も有意に減少した。このような状況下であっても、脂肪酸合成の前駆体であるマロニル CoA が圧負荷群の DKO マウスと CD36 KO マウスにおいて野生型に

比べて増加傾向にあった。ペントースリン酸経路を介する NADPH 産生量は、脂肪酸取り込みが中等度に減少する DK0 マウスでは増加し、高度に減少する CD36 KO マウスでは野生型の半分以下であった。まとめると、

- (1) 圧負荷に応答して ATP を増産する必要がある状況下でも、DK0 マウスと CD36 KO マウスの心臓では、糖利用予備能を負荷前からすでに大幅に利用しているため、相対的な糖取り込み増加は十分には出来ていない。
- (2) 圧負荷に応答して心筋細胞が肥大するために、構造蛋白だけでなく生体膜成分の増産が必須であると予想される。しかしながら、生体膜の構成因子であるリン脂質は脂肪酸取り込み低下のため十分に補充されず、それを補うために、有意に減少したクエン酸の中からであっても、脂肪酸合成経路に合成材料を供与せざるを得ない。
- (3) 心筋にストレスが生じる際には、活性酸素種 (ROS) を除去するために、ペントースリン酸経路に流入するグルコースが増加し、NADPH を介した還元型 GSH による酸化還元反応を増幅する。中等度に脂肪酸取り込みが低下した DK0 マウスでは、代償的に取り込みが増加したグルコースの一部をペントースリン酸経路にも流用できるが、高度に脂肪酸取り込みが低下した CD36 KO マウスでは、解糖系・TCA 回路・脂肪酸合成にほとんどのグルコースが利用されてしまうため、ペントースリン酸経路に流れこむグルコース量が低下したままではほとんど増加させることができない。

以上、DK0 マウスと CD36 KO マウスは、ともに脂肪酸取り込みが低下する動物モデルであるが、脂肪酸取り込み低下が高度な CD36 KO マウスでは、ATP 産生能がより低下し、細胞膜を増産する原材料も不足し、酸化ストレスに対しても脆弱となる。これら複数の代謝悪化の影響により、CD36 KO マウスの生存率・心機能が DK0 マウスに比べてより強力に悪化すると推測している。

以上の研究成果より、心負荷が加わった際のエネルギー代謝応答のためには、ATP 産生・リン脂質合成のベースとなる恒常的な脂肪酸供給と、負荷に対応したダイナミックな糖代謝負荷 (ATP 産生、ペントースリン酸経路、脂肪酸合成) の両者が必須であり、単純に脂肪酸代謝抑制や糖代謝亢進のみが心保護的に働くとはできない、と理解できる。

(論文執筆中)

共同研究者 2. 新村 健

● Sirtuin の心臓代謝調節機構における役割の解明

心臓 Sirtuin の代謝ストレス時の役割とその標的分子候補

哺乳類においては Sirt1~7 と名付けられた 7 種類の Sirtuin family が存在し、これらの Sirtuin は様々な細胞、臓器においてエネルギー代謝の key molecule であることがわかってきた。一方、心血管系における Sirtuin の代謝ストレス時の役割はこれまで解明されていなかった。

① カロリー制限 (CR) による虚血心保護効果を仲介する心臓 Sirt1

抗老化療法でもある CR は、栄養失調をきたさないレベルでの低栄養による代謝ストレスである。そして CR は多面的な心血管保護効果をもたらす。我々は、CR が心臓において虚血再灌流傷害軽減効果をもたらすことを見出した。この CR による虚血心保護効果は、心筋細胞特異的 Sirt1 ノックアウトマウス (以下 CM-Sirt1 KO) では消失することより、Sirt1 依存的な CR 効果であることが明らかとなった。次に心臓 Sirt1 による虚血心保護効果の

機序の解明を目指した。我々は CR 中 Sirt1 依存的に抗酸化酵素が心臓に誘導されるとともに、補体系カスケードの中心的分子である complement component 3 (C3) の発現が低下していることを見出した。

そこで我々は培養ラット新生児心筋細胞に resveratrol を添付し、C3 の発現レベルを観察した。Resveratrol による心筋 Sirt1 の活性化は、心筋細胞での C3 タンパク発現を確かに低下させた。

虚血再灌流時の補体系の活性化抑制が、CR による虚血心保護効果の本質であるかを確認する目的で、我々は補体 C3 ノックアウトマウス (C3-KO) に CR を行った。C3-KO では、心筋虚血再灌流傷害は野生型マウスと比べ軽度で、CR による相加的な心保護効果は観察されなかった。C3-KO でも CR により心筋 Sirt1 の活性化、抗酸化酵素の誘導が見られていたことから、我々は補体の活性化は酸化ストレスにより引き起こされ、虚血再灌流傷害の進展において極めて重要な役割を担っている可能性が高く、心臓 Sirt1 は虚血再灌流時の補体系活性化を抑制することにより虚血心保護効果を発揮していると推測した (図 1) (論文投稿中)。

② 高脂肪食負荷 (HFD) による心筋障害進展抑制効果を担う心臓 Sirt1

我々は、CM-Sirt1KO に HFD による代謝ストレスを与え、経時的に心機能と心臓での遺伝子発現を観察した。対照マウスでは著明な体重増加に関わらず、心機能や心臓サイズに変化は生じなかった。一方、CM-Sirt1KO では心肥大の進行が顕著で、心臓への中性脂肪の蓄積、線維化の進展が観察され、肥満関連心筋症の病態が観察された。CM-Sirt1KO では HFD 負荷により脂質代謝関連遺伝子の発現が不十分であったことに加え、酸化ストレスを担う MnSOD の発現亢進が見られなかった。Sirt1 の標的転写因子の候補である PPAR γ 、PGC-1 α の発現は対照マウスでは HFD で亢進したが、CM-Sirt1KO ではその亢進も見られなかった (図 2)。以上の結果から HFD による代謝ストレス時の心臓適応現象において心筋 Sirt1 が必須である可能性が示唆された。

次に Sirt1 の HFD による代謝ストレス時の心臓適応現象における役割を解明する目的で、培養ラット新生児心筋細胞にパルミチン酸負荷を行った。siRNA による Sirt1 knock-down はパルミチン酸負荷による心筋細胞 viability 低下を引き起こした。その際、Sirt1 knock-down 群では、エネルギー基質の switching において重要な役割を担う PDK4 と PGC-1 α 発現が抑制され、炎症性サイトカインである TNF α と IL-6 の発現が亢進していた。そして我々は、Sirt1 によるこれら代謝 switching、炎症性サイトカイン発現制御を担う転写因子として、NF- κ B がパルミチン酸負荷時に活性化し、それを Sirt1 が直接的に制御していることを見出した。以上の結果より我々が考える心筋 Sirt1 による心筋代謝応答の機序を図 3 に示す (論文執筆中)。

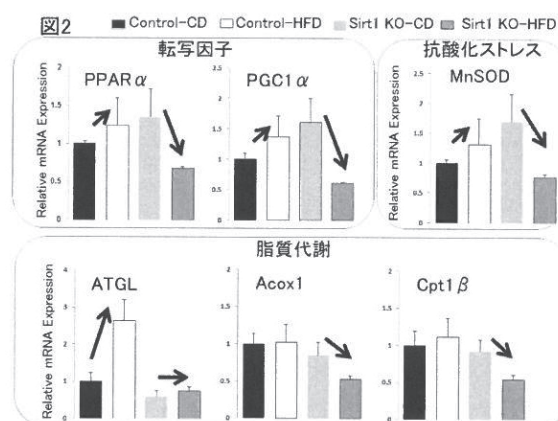
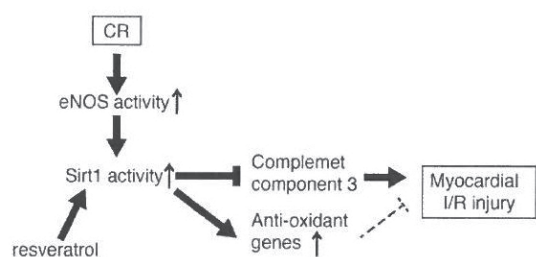
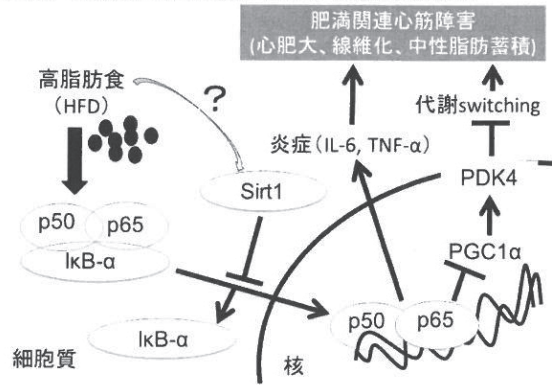


図3. 心筋Sirt1によるHFD時の心筋代謝応答



IV 考察

研究代表者 佐野元昭

- 代謝調節薬 dichloroacetate (DCA) による圧負荷ストレス応答制御機構の解明
- α MHC-Fv2E-PERK トランスジェニックマウスを用いた心筋虚血ストレス応答機構の解明
- 心筋グルコース代謝のイメージング技術の確立と病態解明への応用

心筋細胞の代謝と機能は密接に関連しており、ストレス応答においても重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、代謝解析において近年目覚ましい進歩を遂げている質量分析を駆使した正確な計測技術（メタボローム解析）が非常に強力なツールとなることを改めて示した。心不全は、すべての心臓病の終末像であり、罹患率は増加の一途をたどっている。交感神経系、レニン・アンジオテンシン系などの神経体液性因子の慢性的な活性化を遮断することによって心不全患者の寿命を延長させることは出来るようになったが、心臓リモデリング（左心室の肥大、間質の線維化を指し、心不全の発症や進展の要因となる）の根治的な治療法は存在せず、新規治療法の開発が unmet clinical needs となっている。心筋細胞の代謝と機能は密接に関連しており、ストレス応答においても重要な役割を果たしており、心筋代謝システムの動作機構は、次世代の心不全治療薬として、有望で考えられた。

共同研究者 1. 磯 達也

- エネルギー基質選択性の重要性と心筋ストレス応答の意義の解明

代謝異常症は心機能の悪化を促進するため、心筋代謝と心機能との関連は広く知られている。高脂肪酸血症・高血糖・高インスリン血症などの実験動物モデルでは、心機能が悪化しやすく、そのメカニズムとして脂肪毒性・糖毒性・インスリン毒性などの諸説が提案されている。一方、心臓代謝に薬剤介入することで、心機能を改善する論文も多数報告されている。脂肪酸・酸化を部分的に抑制し、グルコースの取り込みを高めると、ストレス下の心臓に対して保護的にはたらくことと考えられており、心不全の治療薬としての代謝モジュレータの可能性が検討されている。しかしながら、単純に脂肪酸代謝や糖代謝に介入することが、心臓にとって好ましいことであるのかどうか、あるいは、その介入効果がどのようなメカニズムによるのか、など不明な点が多い。本研究において、脂肪酸取り込みがより高度な CD36 KO マウス（代償的グルコース取り込みの増加は同等）では、ATP 産生能がより低下し、細胞膜を増産する原材料も不足し、還元型グルタチオンの低下より酸

化ストレスに対しても脆弱であると推察された。CD36 KO マウスの生存率・心機能が、DKO マウスに比べてよりに悪化するが、これらの現象は複数の代謝悪化の総和として生じている、と推測している。心負荷が加わった際のエネルギー代謝応答のためには、ATP 産生・リン脂質合成のベースとなる恒常的な脂肪酸供給と、負荷に対応したダイナミックな糖代謝増加（ATP 産生、ペントースリン酸経路を介する抗酸化作用、心肥大を促進するための脂肪酸合成）の両者が必須であり、単純に脂肪酸代謝抑制や糖代謝亢進のみが心保護的に働くと考えすることはできない、と考えられた。

共同研究者 2. 新村 健

● Sirtuin の心臓代謝調節機構における役割の解明

上記の通り、心臓 Sirt1 は、さまざまな代謝ストレスへの心臓適応現象において極めて重要な役割を担っていることが本研究により明らかにされた。

今後の展開として、Sirt1 の薬理的活性化により、心臓の代謝ストレス応答が改善するか否かを検討していきたい。今日、Sirtuin-activating compounds (STACs) の開発が盛んに行われており、その臨床応用の対象疾患として糖尿病・メタボリックシンドロームが第一に挙げられている。糖尿病・メタボリックシンドロームでは心血管疾患が合併することが多く、STACs 投与がインスリン抵抗性を改善するばかりか、心血管保護効果を発揮するのであれば、臨床的有用性はより確実となる。そこで今後は、STACs による心血管疾患発症に対する予防効果のみならず、一端発症した肥満関連心筋症の病態を改善するための治療薬としての STACs の可能性も検討したいと考えている。

V 研究成果の発表

代表研究者：佐野元昭

1. Sugiura Y. Katsumata Y. **Sano M.** Honda K. Kajimura M. Fukuda K. and Sucmatsu M. Imaging Mass Spectrometry Combined with Focused Microwave Treatment Reveals Heterogeneity in Carbohydrate Metabolic Fates in Ischemic Heart. Submitted.
2. Matsushashi T. Hishiki T. Zhou H. Ono T. Kaneda R. Iso T. Yamaguchi A. Endo J. Katsumata Y. Atsushi A. Yamamoto T. Shirakawa K. Yan X. Shinmura K. Suematsu M. Fukuda K. **Sano M.** Activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate has the potential to induce epigenetic remodeling in the heart. **J mol Cell Cardiol.** 2015 May;82:116-24. doi: 10.1016/J. yjmcc. 2015.02.021. Epub 2015 Mar 2.
3. Nakano S. Ishii I. Shinmura K. Tamaki K. Hishiki T. Akahoshi N. Ida T. Nakanishi T. Kamata S. Kumagai Y. Akaike T. Fukuda K. **Sano M.** Suematsu M. Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. **J Mol Med (Berl).** 2015 Mar 6. [Epub ahead of print]
4. Shinmura K. Tamaki K. Ito K. Yan X. Yamamoto T. Katsumata Y. Matsushashi T. **Sano M.** Fukuda K. Sucmatsu M. Ishii I. Indispensable role of endothelial nitric oxide synthase in caloric restriction-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2015 Apr

- 15;308(8)H894-903. doi:10.1152/ajpheart. 00333.2014. Epub 2015 Feb 13.
5. Yanagisawa R. Kataoka M. Inami T. Momose Y. Kawakami T. Takei M. Kimura M. Isobe S. Yamakado M. Fukuda K. Yoshino H. **Sano M.** Satoh T. Usefulness of circulating amino acid profile and Fischer ratio to predict severity of pulmonary hypertension. **Am J Cardiol.** 2015 Mar 15;115(6):831-6. doi:10.1016/j.amjcard. 2014. 12. 048. Epub 2015 Jan 7.
 6. Anzai A. Shimoda M. Endo J. Kohno T. Katsumata Y. Matsuhashi T. Yamamoto T. Ito K. Yan X. Shirakawa K. Shimizu-Hirota R. Yamada Y. Ueha S. Shinmura K. Okada Y. Fukuda K. **Sano M.** Adventitial CXCL1/G-CST expression in response to acute aortic dissection triggers local neutrophil recruitment and activation leading to aortic rupture. **Circ Res.** 2015 Feb 13;116(4):612-23. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304918. Epub 2015 Jan 6.
 7. Hemmi N. Tohyama S. Nakajima K. Kanazawa H. Suzuki T. Hattori F. Seki T. Kishino Y. Hirano A. Okada M. Tabei R. Ohno R. Fujita C. Haruna T. Yuasa **Sano M.** Fujita J. Fukuda K. A massive suspension culture system with metabolic purification for human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Stem Cells Transl Med.** 2014 Dec;3(12):1473-83. doi:10.5966/sctm.2014-0072. Epub 2014 Oct 29.
 8. Endo J. **Sano M.** Isobe Y. Fukuda K. Kang JX. Arai H. Arita M. 18-HEPE. an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages. prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling. **J Exp Med.** 2014 Jul 28;211(8):1673-87. doi:10.1084/jem.20132011. Epub 2014 Jul 21.
 9. Katsumata Y. Shinmura K. Sugiura Y. Tohyama S. Matsuhashi T. Ito H. Yan X. Ito K. Yuasa S. Ieda M. Urade Y. Suematsu M. Fukuda K. **Sano M.** Endogenous prostaglandin D2 and its metabolites protect the heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2. **Hypertension.** 2014 Jan;63(1):80-7 doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01639. Epub 2013 Oct 7.
 10. 遠藤仁、佐野元昭：心臓の線維化と炎症－心臓マクロファージと線維芽細胞間の ω -3脂肪酸代謝物を介した心保護機構について－、別冊 **BIO Clinica 慢性炎症と疾患 第4巻第2号**、2015
 11. 山本恒久、佐野元昭、心不全における慢性炎症制御－肥満・糖尿病に伴う二次性心筋症と慢性炎症－、**細胞 2015年4月号**、ニューサイエンス社、2015

共同研究者 磯 達也

1. Syamsunarno MRAA. **Iso T.** Hanaoka H. Yamaguchi A. Koitabashi N. Hishiki T. Matsui H. Sano M. Suematsu M. Tsushima Y. Kurabayashi M. Deletion of fatty acid binding protein-4 and -5 exacerbate cardiac dysfunction because of insufficient ATP production during pressure overload in mice. (投稿準備中)
2. Putri M. Syamsunarno MRAA. **Iso T.** Yamaguchi A. Hanaoka H. Sunaga H. Koitabashi N. Matsui H. Yamazaki C. Kameo S. Tsushima Y. Yokoyama T. Koyama H. Abumrad NA. Kurabayashi M. CD36 is indispensable for thermogenesis under conditions

- offasting and cold stress. **Biochem Biophys Res Commun.** 457(4)520-5. 2015. (corresponding author)
3. 磯達也、倉林正彦、毛細血管内皮細胞を介する心筋・骨格筋の脂肪酸代謝の制御機構と全身代謝への影響、**Annual Review 2015 糖尿病・代謝・内分泌**、中外医学.2015
 4. Syamsunarno MRAA. Iso T. Yamaguchi A. Hanaoka H. Putri M. Obokata M. Sunaga H. Koitabashi N. Matsui H. Endo K. Tsushima Y. Yokoyama T. Kurabayashi M. Fatty Acid binding protein 4 and 5 play a crucial role in thermogenesis under the condition of fasting and cold stress. **PloS One.** 9(3)e90825. 2014. (corresponding author)
 5. 磯達也、倉林正彦、毛細血管内皮細胞を介する脂肪酸代謝の制御機構と PPAR γ の役割、**内分泌・糖尿病・代謝内科**、科学評論社、2014
 6. 磯達也、倉林正彦、筋型毛細血管内皮細胞を介する心筋脂肪酸代謝の制御機構、月刊細胞 46(7), ニューサイエンス社、p303-306. 2014
 7. Sunaga H. Matsui H. Maeno T. **Iso T.** Syamsunarno MRAA. Anjo S. Matsuzaka T. Shimano H. Yokoyama T. Kurabayashi M. Deranged fatty acid composition causes pulmonary fibrosis in Elovl6-deficient mice. **Nature Communications.** 2013. October 11. article number: 2563. doi:10.1038/ncomms3563.
 8. Syamsunarno MRAA. **Iso T.** Hanaoka H. Yamaguchi A. Obokata M. Koitabashi N. Goto K. Hishiki T. Nagahata Y. Matsui H. Sano M. Kobayashi M. Kikuchi O. Sasaki T. Maeda K. Murakami M. Kitamura T. Suematsu M. Tsushima Y. Endo K. Hotamisligil GS. Kurabayashi M. A critical role of fatty acid binding protein 4 and 5 (FABP4/5) in the systemic response to fasting. **PloS One.** 8 (11):e79386. 2013. (corresponding author)
 9. **Iso T.** Maeda K. Hanaoka H. Suga T. Goto K. Syamsunarno MRAA. Hishiki T. Nagahata Y. Matsui H. Arai M. Yamaguchi A. Abumrad NA. Sano M. Suematsu M. Endo K. Hotamisligil GS. Kurabayashi M. ●Capillary Endothelial Fatty Acid Binding Proteins 4 and 5 Play a Critical Role in Fatty Acid Uptake in Heart and Skeletal Muscle. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 33 (11):2549-2557. 2013. (corresponding author)
 10. Goto K. **Iso T** (equal contributor). Hanaoka H. Suga T. Hattori A. Irie Y. Shinagawa Y. Matsui H. Syamsunarno MRAA. Matsui M. Haque A. Arai M. Kunimoto F. Yokoyama T. Endo K. Gonzalez FJ. Kurabayashi M. PPAR γ in Capillary Endothelia Promotes Fatty Acid Uptake by Heart During Long-term Fasting. **J Am Heart Assoc.** 2(1): e004861. 2013. (corresponding author)
 11. 磯達也、Notch シグナル、**血管新生研究の最先端**、医薬ジャーナル社、p119-125. 2013
共同研究者 2. 新村 健
1. Yamamoto T. Sano M. Tamaki K. Yoshida N. Isobe S. Shirakawa K. Ito K. Yan X. Katsumata Y. Anzai A. Matsushashi T. Kataoka M. Endo J. Fukuda K. **Shinmura K.** Protective role of cardiac silent information Regulator I against obesity-associated cardiomyopathy. 2015 (論文作成中)

2. Yamamoto T. Tamaki K. Shirakawa K. Ito K. Yan X. Katsumata Y. Anzai A. Matsuhashi T. Endo J. Inaba T. Tsubota K. Sano M. Fukuda K. **Shinmura K.** Cardiac Sirt1 mediates the cardioprotective effect of caloric restriction by suppressing local complement system activation after ischemia/reperfusion. **PLoS One** 2015 (投稿中)
3. Nakano S. Ishii I. **Shinmura K.** Tamaki K. Hishiki T. Akahoshi N. Ida T. Nakanishi T. Kamata S. Kumagai Y. Akaike T. Fukuda K. Sano M. Suematsu M. Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. **J Mol Med (Berl)** 2015 Mar 6. [Epub ahead print] .
4. **Shinmura K.** Tamaki K. Ito K. Yan X. Yamamoto T. Katsumata Y. Matsuhashi T. Sano M. Fukuda K. Suematsu M. Ishii I. Indispensable role of endothelial nitric oxide synthase in caloric restriction-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**; 308(8):H894-903. 2015 Apr 15
5. **Shinmura K.** Nutritional interventions for cardiovascular aging and age-related cardiovascular diseases. *Healthy Ageing and Longevity*. Vol. 2. Nutrition, Exercise and Epigenetics: Ageing Intervention. (eds. Yu Bp) **Springer International Publishing**. Cham Switzerland. p179-209. 2015
6. 新村 健、心臓老化：バイオマーカーと老化制御、循環器 2014 update & topics, 赤石誠、北風政史編集、医学書院、p106-113, 2014.
7. **Shinmura K.** Cardiac senescence and autophagy. **Tumor Dormancy, Quiescence, and Senescence Vol. 3. Aging, Cancer, and Noncancer Pathologies**. (eds. Hayat MA) Springer Netherlands. Rotterdam Netherlands. p125-137. 2014
8. Katsumata Y. **Shinmura K.** Sugiura Y. Tohyama S. Matsuhashi T. Ito H. Yan X. Ito K. Yuasa S. Ieda M. Urade Y. Suematsu M. Fukuda K. Sano M. Endogenous prostaglandin D2 and its metabolites protect the heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2. **Hypertension** 63(1):80-7. 2014.
9. **Shinmura K.** adipokines as novel biomarkers in aging and heart failure. **Aging and Heart Failure: Mechanisms & Management**. (eds. Jugdutt BI) Springer. Berlin. p411-426. 2014
10. Kawashima M. Ozawa Y. **Shinmura K.** Inaba T. Nakamura S. Kawakita T. Watanabe M. Tsubota K. Calorie restriction (CR) and CR mimetics for the prevention and treatment of age-related eye disorders. **Exp Gerontol** 48(10):1096-1100. 2013.
11. **Shinmura K.** Effects of caloric restriction on cardiac oxidative stress and mitochondrial bioenergetics: potential role of cardiac sirtuins. **Oxid Med Cell Longev** 2013:528935. 2013.
12. **Shinmura K.** Posttranslational modification of mitochondrial proteins by caloric restriction: possible involvement of caloric restriction-induced cardioprotection. **Trends Cardiovasc Med** 23(1):18-25. 2013.

13. Ban N. Ozawa Y. Inaba T. Miyake S. Watanabe M. **Shinmura K.** Tsubota K. Light-dark condition regulates sirtuin mRNA levels in the retina. **Exp Gerontol** 48(11):1212-1217. 2013.