78　心臓エネルギー代謝の変換機序と病態生理的意義の解明	倉林　正彦

【目的】心臓エネルギー代謝の調節メカニズムの解析は心不全の病態解明と新規治療法の開発にとって有効なアプローチである。心臓は、血行動態上の負荷に対して、心筋細胞肥大や間質線維化などの構造的なリモデリングとともに、エネルギー基質の変換を特徴とする代謝リモデリングを起こす。そして、心臓エネルギー基質は脂肪酸から糖へ、さらには、ケトン体へとシフトする。しかし、こうしたエネルギー基質変換の分子メカニズムや病態生理的意義は未解明である。本研究では、ケトン体による代謝リモデリングの調節メカニズムと病態生理的意義を解明することで、心不全の新たな予防法と治療法の開発に繋げることを目的とする。

【方法】1. ケトン体による FGF21 発現誘導の有無

ラット培養心筋細胞にβヒドロキシ酪酸（βOHB）を 0～5 mM の種々の濃度で添加し、心筋および培養上清中の FGF21 の発現をそれぞれウエスタンブロットおよび ELISA にて解析した。

2. ケトン体による AMPK、Sirt1、PGC1α、および PPARαの活性化の有無

βOHB を培養心筋細胞に添加し、ミトコンドリア産生やミトコンドリア機能の制御に重要な AMPK、Sirt1、PGC1α および PPARαの発現をウエスタンブロットにて解析した。AMPK に関しては Thr172 のリン酸化の有無を検討した。また、AMPKα1 siRNA をトランスフェクトし、βOHB による FGF21 の発現誘導が起こるか否かを解析した。

3. ケトン体が FGF21 プロモーター活性に及ぼす影響

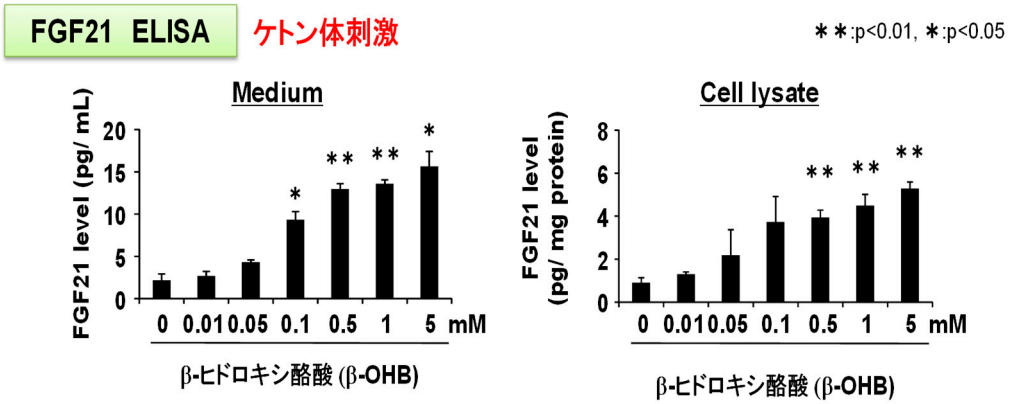
マウス FGF21 遺伝子のプロモーター領域 1.5 kb を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクトしたラット培養心筋細胞を 1 mM のβOHB に 24 時間暴露し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 心不全患者における血清βOHB と FGF21 濃度との関連

急性心不全にて入院した心不全患者 140 名において、退院時のβOHB、FGF21、NT-proBNP および遊離脂肪酸（FFA）の濃度を調べ、相互の相関関係を解析した。

【結果】βOHB は心筋細胞で用量依存的に FGF21 の発現、ミトコンドリア産生およびミトコンドリア機能の調節に重要なシグナル分子であるリン酸化 AMPK、PGC1αSirt1、および PPARαの発現を誘導した。また、βOHB による FGF21 の誘導は転写レベルで制御されていた。さらに、心不全患者で血清βOHB と FGF21 との濃度には有意な相関が認められた。ケトン体は心筋のエネルギー基質として利用されるだけでなく、AMPK の活性化を介してミトコンドリア機能維持を促進するシグナル分子として機能する可能性が示唆された。

培養心筋細胞においてケトン体は FGF21 の発現を誘導する



78. 心臓エネルギー代謝の変換機序と病態生理的意義の解明

倉林　正彦

群馬大学 大学院医学系研究科 循環器内科学

Key words：心不全，エネルギー代謝，心肥大，ミトコンドリア，FGF21

緒　言

不全心筋は燃料の枯渇したエンジンである（The Failing heart- An Engine Out of Fuel、NEJM 2007）というコンセプトが提唱され、心臓エネルギー代謝の異常が心不全の主要な病態であると理解されている。心臓は、生体の中で単位重量当たりの ATP 消費量および産生量が最も多い臓器であり、1 日に 6 kg もの ATP を産生し、利用している。産生される ATP の 70～90%は脂肪酸の酸化、10%～30%は糖や乳酸の酸化、ケトン体やアミノ酸の酸化に由来する。基質の選択性は発生段階で異なる他、心肥大や心不全でも大きく変化する。私たちはこれまで、脂肪酸の取り込みに関与する遺伝子 FABP4／5 や CD36 の欠損マウスを用いて、代償的に増加する糖取り込みの増加は、ATP 産生に利用されるよりも優先的に肥大心の形成に利用されることを明らかにした［1～3］。しかし、こうした、代謝的リモデリングの分子メカニズムと病態生理的意義については不明の点が多い。最近までの研究で、代謝リモデリングとミトコンドリア機能の変化が心肥大や心不全の進行前に起こることが示され、代謝リモデリングのメカニズムを解明することが心不全治療に繋がる可能性がある。

心不全患者では、血中ケトン体濃度が上昇し、このケトン体は心筋ミトコンドリアで酸化され、ATP 産生に利用される。ケトン体酸化を触媒する酵素 SCOT（succinyl-CoA：3-oxoacid CoA transferase）の欠損は心機能不全を増悪させる。さらに、心不全患者でケトン体が増加すること、そして、心不全患者にケトン体を投与すると心機能が改善することから、心臓エネルギー基質がケトン体へシフトすることは、心機能低下に対する適応と考えられる。ケトン体が心機能を改善するメカニズムとして、これまで、追加エネルギー基質としての役割が注目されてきたが、最近、βヒドロキシ酪酸（βOHB）は Class Ⅰ、Ⅱのヒストン脱アセチル化（HDAC）酵素を阻害することによって抗酸化作用をもつことが報告された。

本研究においては、ケトン体が心筋細胞のエネルギー代謝に重要な役割をもつ AMPK／FGF21 経路に及ぼす影響を明らかにする。

方　法

1. ケトン体による FGF21 発現誘導の有無

ラット培養心筋細胞にβヒドロキシ酪酸（βOHB）を 0～5 mM の種々の濃度で添加し、心筋および培養上清中の FGF21 の発現をそれぞれウエスタンブロットおよび ELISA にて解析した。

2. ケトン体による AMPK、Sirt1、PGC1α，および PPARα の活性化の有無

βOHB を培養心筋細胞に添加し、ミトコンドリア産生やミトコンドリア機能の制御に重要な AMPK、Sirt1、PGC1α および PPARα の発現をウエスタンブロットにて解析した。AMPK に関しては Thr172 のリン酸化の有無を検討した。また、AMPKα1 の siRNA をトランスフェクトし、βOHB による FGF21 の発現誘導が起こるか否かを解析した。

3. ケトン体が FGF21 プロモーター活性に及ぼす影響

マウス FGF21 遺伝子のプロモーター領域 1.5 kb を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクトしたラット培養心筋細胞を 1 mM の βOHB に 24 時間暴露し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 心不全患者における血清 βOHB と FGF21 濃度との関連

急性心不全にて入院した心不全患者 140 名において、退院時の βOHB、FGF21、NT-proBNP および遊離脂肪酸（FFA）の濃度を調べ、相互の相関関係を解析した。

結　果

1. ケトン体による FGF21 発現誘導の有無

FGF21 は主に肝臓にて産生、分泌され、インスリン感受性を改善するホルモンである。マウスにおいては、肝臓における FGF21 の発現は飢餓に対する応答反応として PPARα 依存性に増加し、肝臓でのケトン産生を促進する。これまでに、FGF21 は、エネルギー代謝だけでなく、心肥大抑制作用、抗酸化作用や抗炎症作用など心筋保護作用をもつホルモンであると報告されている。私たちは、培養ラット心筋細胞に βOHB（生体中で最も多いケトン体）を添加し、FGF21 の発現を誘導する作用があるか否かを検討した（図 1）。

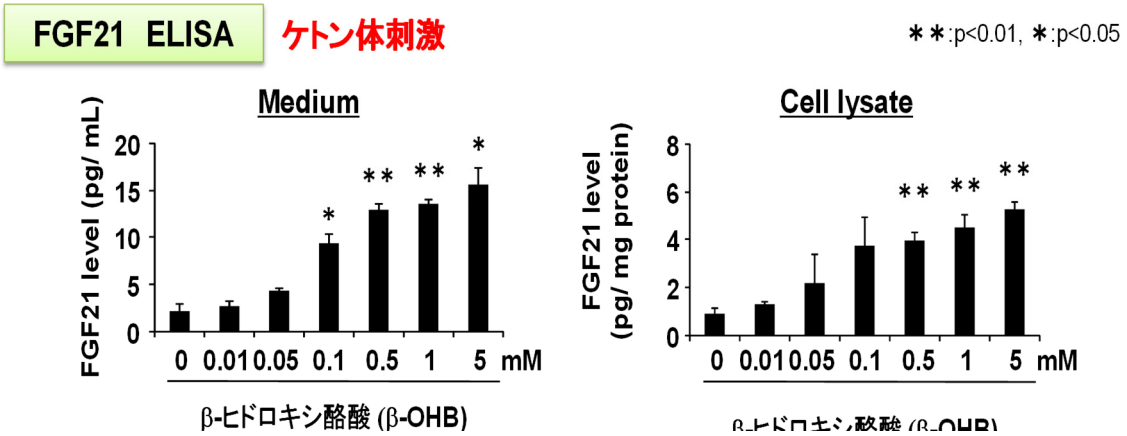


図 1. ラット培養心筋細胞におけるケトン体による FGF21 産生誘導

培養ラット心筋細胞に βOHB を添加すると用量依存的に培養上清中、および細胞抽出物中の FGF21 の発現量が上昇した。統計処理は unpaired Student's t-test で行った。

2. ケトン体による AMPK、Sirt1、PGC1α、および PPARα の活性化の有無

βOHB を培養心筋細胞に添加し、ミトコンドリア産生やミトコンドリア機能の制御に重要な AMPK、Sirt1、PGC1α および PPARα の発現をウエスタンブロットにより解析した。AMPK に関しては Thr172 のリン酸化の有無を検討した（図 2）。

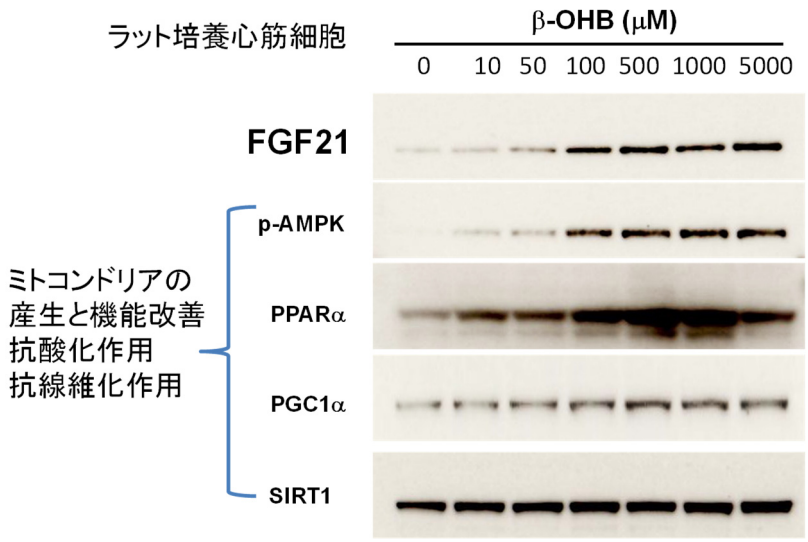


図2. ラット培養心筋細胞におけるケトン体によるミトコンドリア産生因子の発現誘導
ラット培養心筋細胞に βOHB を添加すると用量依存的に FGF21 とともに、リン酸化 AMPK、PPARα、PGC1 の発現量が上昇した。

3. ケトン体が FGF21 プロモーター活性に及ぼす影響

マウス FGF21 遺伝子のプロモーター領域 1.5 kb を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクトしたラット培養心筋細胞を 1 mM の βOHB に 24 時間暴露し、ルシフェラーゼ活性化を測定した（図 3）。

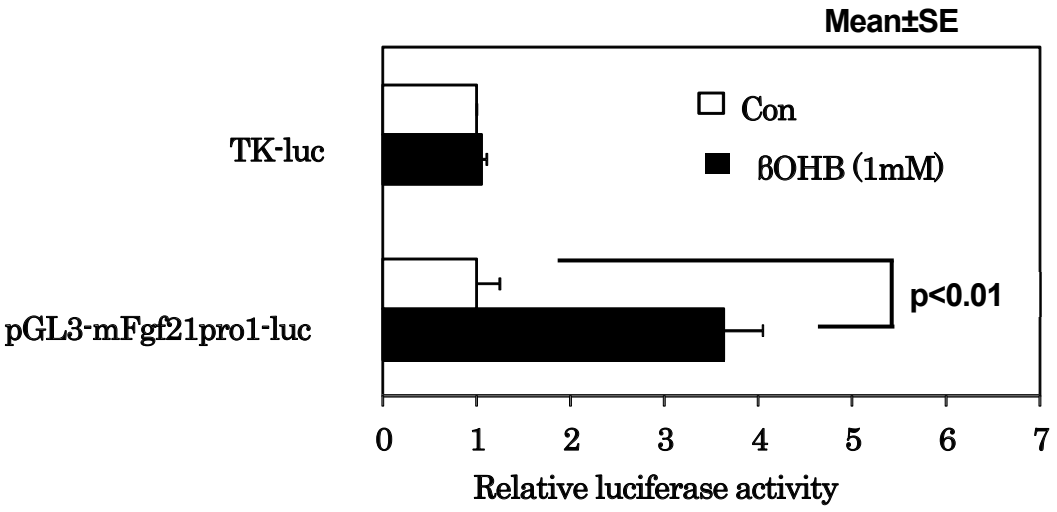


図 3. βOHB による FGF21 プロモーター活性の増加
βOHB（1 mM）はマウス FGF21 プロモーター活性を 3.6 倍（$p<0.01$）増加させた。また、PPAE（PPAR 反応エレメント）×3-Luc を顕著に増加させた。FGF21 プロモーターは PPRE を 2 か所（−1,093／−1,057、−98／−53）含むことが報告されている。これらのことは、βOHB が FGF21 発現を誘導させるメカニズムとして βOHB による PPARα 活性化が少なくとも一部に関与していることを示している。統計処理は unpaired Student's t-test で行った。

4. 心不全患者における血清 bOHB と FGF21 濃度の関連

急性心不全にて入院した心不全患者 140 名において、退院時のβOHB、FGF21、NT-proBNP および遊離脂肪酸（FFA）の濃度を調べ、相互の相関関係を解析した。結果は表 1 に示す。

表 1. 心不全患者におけるβOHB と FGF21、FFA、NT-proBNP との間の関連

	βOHB	FGF21	FFA
βOHB			
FGF21	r = 0.3175, p < 0.0001		
FFA	r = 0.20 ,p = 0.015	r = 0.007, p = 0.934	
NT-proBNP	r = 0.05, p = 0.539	r = 0.282, p = 0.0004	r = 0.0009, p = 0.992

βOHB は FGF21 と有意な相関があったが、NT-proBNP との関連は認められなかった。
統計処理は univariate linear regression analyses で行った。

考　察

本研究で、心筋細胞において、ケトン体（βOHB）が FGF21 の発現を誘導することを明らかにした。FGF21 は心肥大を抑制する作用があることから、βOHB は FGF21 を介して心肥大抑制作用を持つことが推測される。FGF21 は、主に肝臓で産生され、脂肪組織でのインスリン感受性を亢進させる作用をもつホルモンとして 2000 年に同定された。その後、肥大刺激で心筋細胞でも産生・分泌され、心肥大抑制作用をもつことが報告された。私たちは最近、急性心筋梗塞患者で血中 FGF21 濃度がカテコラミンや脂肪酸の濃度上昇を介して著増すること、マウス心筋梗塞モデルで心筋での FGF21 発現と分泌が増加すること、および、FGF21 は AMPK によって調節される遺伝子であるとともに、AMPK の活性化を強力に誘導することを観察し、心筋における FGF21-AMPK の positive feedback loop を同定した（投稿準備中）。また、FGF21 はミトコンドリアの分裂や融合に関与する Parkin の発現を誘導することを観察した。したがって、心筋細胞での AMPK-FGF21 経路の誘導は、心筋細胞がもつ、ストレスに対するオートクラインの細胞防御機構であることを示している。

また、本研究で、ケトン体は PPARα を活性化することを見出した。また、FGF21 の siRNA を用いて、心筋細胞で FGF21 をノックダウンすると、βOHB による AMPK と PPARα の活性化が著明に抑制されることも見出した。これまで、PPARαのリガンドとしては、長鎖脂肪酸やエイコサノイドが報告されているが、βOHB が PPARαのリガンドであることが判明し、興味深い。心肥大では PPARα の発現と転写活性化能が低下し、脂肪酸酸化に関与する遺伝子群の発現が低下する。このことが、ATP 産生低下、心収縮力低下の大きな要因になることから、心機能低下症例へのβOHB 補充は、心機能の改善に有効であるかも知れない。

さらに、強調すべきは、心不全において、血中のβOHB と FGF21 濃度が相関し、βOHB と FGF21 が循環動態を反映するバイオマーカーとなる可能性があることである。βOHB と FGF21 をとおして心不全の病態生理を明らかにする研究は、新たな心不全治療薬の開発の糸口となると期待でき、さらに、発癌や老化など細胞生物学の根幹に関わるメカニズムの解明にも繋がり、広く生命科学研究への波及効果も期待できる。*FGF21* の欠損マウスや AAV-FGF21 を用いて、βHOB の心臓への作用が FGF21 を介するか否かを解析する研究を行っている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、群馬大学大学院医学研究科循環器内科学研究室の磯達也、須永浩章、小板橋紀通、保健学研究科検査科学研究室の松井弘樹、横山知行である。

文　献

1) Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Koitabashi N, Obinata H, Yamaguchi A, Hanaoka H, Hishiki T, Hayakawa N, Sano M, Sunaga H, Matsui H, Tsushima Y, Suematsu M, Kurabayashi M, Iso T. Myocardial fatty acid uptake through CD36 is indispensable for sufficient bioenergetic metabolism to prevent progression of pressure overload-induced heart failure. Sci Rep. 2018 Aug 13;8(1):12035. doi: 10.1038/s41598-018-30616-1.

2) Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Koitabashi N, Yamaguchi A, Hanaoka H, Hishiki T, Nagahata-Naito Y, Obinata H, Sano M, Sunaga H, Matsui H, Tsushima Y, Suematsu M, Kurabayashi M, Iso T Glucose is preferentially utilized for biomass synthesis in pressure-overloaded hearts: Evidence from fatty acid binding protein-4 and -5 knockout mice. Cardiovasc Res. 2018 Jul 1;114(8):1132-1144. doi: 10.1093/cvr/cvy063.

3) Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Obinata H, Yamaguchi A, Sunaga H, Matsui H, Hishiki T, Matsuura T, Koitabashi N, Obokata M, Hanaoka H, Haque A, Kunimoto F, Tsushima Y, Suematsu M, Kurabayashi M, Iso T. Robust suppression of cardiac energy catabolism with marked accumulation of energy substrates during lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in mice. Metabolism. 2017 Dec;77:47-57. doi: 10.1016/j.metabol.2017.09.003.