



β -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes

Nagao, Manabu

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6773号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006773>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

β -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes

心筋細胞において β ヒドロキシ酪酸は酸化ストレスに対して
代償性に上昇する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
循環器内科学
(指導教員・平田健一教授)

長尾 学

背景)

ケトン体は飢餓時に脂肪酸の β 酸化を通して肝臓で合成され、代替エネルギー源として骨格筋、心筋、脳をはじめとした肝外臓器で利用される。一方、ケトン体の一つである β ヒドロキシ酪酸はエネルギー源としてのみでなく、ヒストン脱アセチル化酵素の抑制により抗酸化酵素の発現を亢進させるなど、様々な細胞機能の制御にも関与することが近年、明らかになってきた。

心筋は多量にATPを消費する臓器の一つであり、そのエネルギー源として主に脂肪酸を利用しているが、心不全時にはATP合成は脂肪酸酸化から解糖系にシフトすることが知られている。他方、以前より心不全において血中や呼気中のケトン体濃度が上昇することが知られている。その機序として心不全時に過剰に分泌されたカテコラミンが脂肪融解を引き起こし、ケトン体の原料となる遊離脂肪酸が血中で増加することで、それを利用した肝臓でのケトン体合成が上昇するためと考えられてきた。しかしながら、不全心筋におけるケトン体の病態生理学的意義についてはいまだ不明である。

目的)

心不全における β ヒドロキシ酪酸の代謝制御機構および生理機能を解明する。

方法)

C57BL/6J マウスに対し、上行大動脈縮窄術を行い、圧負荷モデルを作成した。心臓超音波で左室肥大・リモデリングが進行していることを確認した後、術後2週間で心臓、肝臓、血漿をサンプリングし、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry) にて β ヒドロキシ酪酸を測定した。また、in vitro の実験では生後1-3日の新生児ラットの心筋の初代培養を行った。酸化ストレスとして過酸化水素を用いてラット培養心筋細胞を刺激し、GC-MSによって細胞中の β ヒドロキシ酪酸を定量した。

続いてケトン体の肝外組織での利用に必須の酵素である succinyl-CoA 3-oxoacid CoA transferase (SCOT, 遺伝子名, Oxc1) の発現をマウス心臓、ラット培養心筋細胞においてウエスタンブロット、リアルタイムPCR法を用いて評価した。

β ヒドロキシ酪酸の抗酸化作用を評価するため、forkhead box O3a (FOXO3a)、superoxide dismutase 2 (SOD2)、catalase といった抗酸化酵素・転写因子の発現をウエスタンブロットで評価し、活性酸素種の検出にはジヒドロエチジウム染色を行った。さらに β ヒドロキシ酪酸の心筋保護効果について Cell survival assay 及び、TUNEL染色により評価した。

結果)

Sham 群に比し、圧負荷モデル群の心臓では有意に組織中の β ヒドロキシ酪酸濃度が上昇していた。一方、同マウスの肝臓、血漿中の β ヒドロキシ酪酸は両群で有意差を認めなかった。この結果は心不全時には脂肪酸融解が亢進し、血中の遊離脂肪酸上昇に起因する肝臓でのケトン体合成が増加する、という従来の考えと矛盾するものであった。我々は心臓での β ヒドロキシ酪酸の由来を特定するため、ラット培養心筋細胞に過酸化水素で酸化ストレスを加えた。初代培養の行程で得られる非心筋細胞では β ヒドロキシ酪酸の増加は認めなかったが、心筋細胞では酸化ストレスにより β ヒドロキシ酪酸は増加した。以上の実験結果から圧負荷モデルの心臓で上昇していた β ヒドロキシ酪酸の由来は肝臓でのケトン体合成の亢進によるものではなく、心筋組織そのものであることが示唆された。

続いて酸化ストレス下での心筋 β ヒドロキシ酪酸上昇のメカニズムを明らかにするため、同物質の合成ならびに代謝酵素の発現をウエスタンブロット・リアルタイムPCR法にて検討した。前者の3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2)は酸化ストレスにより発現の変化を認めなかった。一方、後者のSCOTについては圧負荷モデルの心筋および酸化ストレス刺激下のラット培養心筋細胞の双方で蛋白発現、mRNAともに有意な減少を認めた。以上より不全心筋における β ヒドロキシ酪酸の上昇はその代謝酵素であるSCOTの発現低下に伴う現象であることが示唆された。

次に β ヒドロキシ酪酸の心筋への生理作用を解明するため、ラット培養心筋細胞を β ヒドロキシ酪酸で前処理した後、酸化ストレスを加える実験をおこなった。非処理群では酸化ストレスによってフォークヘッド型転写因子に属するFOXO3aとその下流に位置する抗酸化酵素であるSOD2およびcatalaseの発現が低下していた。しかし、前処理群ではこれらの転写因子・抗酸化酵素の低下は認めず、 β ヒドロキシ酪酸によって発現量が維持されることがわかった。また、ジヒドロエチジウムを用いて活性酸素種の定性を行ったところ、 β ヒドロキシ酪酸によって酸化ストレスによる活性酸素種の産生が抑制されることも確認した。

最後に β ヒドロキシ酪酸の心筋保護効果について検討した。 β ヒドロキシ酪酸でラット培養心筋細胞を前処理した後、過酸化水素で刺激し cell survival assay ならびにTUNEL染色を行った。 β ヒドロキシ酪酸を前処理することにより心筋細胞の生存率が上昇し、アポトーシス細胞の割合も減少することを明らかにした。

考察)

不全心筋ではケトン体の代謝に必須の酵素であるSCOTの発現が低下し、心筋細胞内の β ヒドロキシ酪酸が蓄積することがわかった。また β ヒドロキシ酪酸は抗酸化酵素を誘導することで心筋細胞に保護的に作用することを明らかにした。従来、心不全時には交感神経の活性化に伴い血中の遊離脂肪酸が増加し、肝臓でのケトン体合成が

亢進すると考えられていた。しかし、本研究では圧負荷モデルマウスの肝臓および血中での β ヒドロキシ酪酸濃度の上昇は認めず、心臓組織での β ヒドロキシ酪酸の増加は必ずしも肝臓での合成亢進を伴わなくても起こりうるということがわかった。我々は不全心において β ヒドロキシ酪酸が上昇する機序としてSCOTの発現が低下していたことよりケトン体の利用が抑制されるのではと推察している。ただし、SCOTの活性や発現についての調節機構については本研究では検討していない。これまでにグルコースのトランスポーターであるGLUT1を心臓で過剰発現させるとSCOTのmRNA発現が低下したとの報告がある。心不全ではATP産生経路の依存度が脂肪酸酸化から解糖系へシフトすることがSCOTの発現に影響を与えている可能性があるが、さらなる検討が必要である。

一方、SCOTを心臓特異的にノックアウトしたマウスでは心筋リモデリングが亢進することや、心移植を要するような重症心不全患者の心筋ではケトン体を代替エネルギーとして利用する経路が活性化していることが近年、報告されており、慢性的なケトン体の利用障害は、むしろ心筋にとっては有害である可能性がある。興味深いのは後述の報告ではケトン体の利用亢進は末期心不全に陥った段階でのみ生じており、代償性心肥大期では認めていなかった点である。本研究のリミテーションのひとつとしてケトン体の利用自体について評価を行っていないことが挙げられるが、もしかすると心不全でも重症度によりケトン体の役割が代替エネルギー源、もしくは抗酸化作用を介した心保護効果のどちらに重点をおくかシフトするのかもしれない。この点についても今後の検討課題である。

結語)

心不全では必ずしも肝臓でのケトン体合成が亢進していなくても、心筋内の β ヒドロキシ酪酸が増加しうることを明らかにした。その機序として不全心筋ではSCOTの発現低下が起これ、 β ヒドロキシ酪酸が蓄積することが示唆された。さらに β ヒドロキシ酪酸は心筋細胞に対し抗酸化作用を介して保護効果を発揮することが分かった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2633 号	氏 名	長尾 学
論文題目 Title of Dissertation	β -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes 心筋細胞において β ヒドロキシ酪酸は酸化ストレスに対して代償性に上昇する		
審査委員 Examiner	主 査 月川 秀 Chief Examiner 副 査 西 慎一 Vice-examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

ケトン体は飢餓時に脂肪酸の β 酸化を通して肝臓で合成され、骨格筋、心筋、脳をはじめとした肝外臓器で利用される。一方、ケトン体の一つである β ヒドロキシ酪酸はエネルギー源としてのみでなく、ヒストン脱アセチル化酵素の抑制により抗酸化酵素の発現を亢進させるなど、様々な細胞機能の制御にも関わることが明らかになってきた。以前より心不全において血中や呼気中のケトン体濃度が上昇することが知られている。しかし、不全心筋におけるケトン体の病態生理学的意義についてはいまだ不明である。そこで、本研究は心不全における β ヒドロキシ酪酸の代謝制御機構および生理機能を解明することを目的として行われた。

C57BL/6J マウスに上行大動脈縮窄術による圧負荷モデルを作成し、心臓、肝臓、血漿をサンプリングし、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) にて β ヒドロキシ酪酸を測定した結果、Sham 群に比し、圧負荷モデル群の心臓では有意に組織中の β ヒドロキシ酪酸濃度が上昇することが明らかとなった。一方、肝臓、血漿中の β ヒドロキシ酪酸は両群で有意差を認めなかった。また、ラット培養心筋細胞に過酸化水素で酸化ストレスを加えたところ、 β ヒドロキシ酪酸は増加した。以上の結果から圧負荷モデルの心臓で上昇していた β ヒドロキシ酪酸の由来は肝臓でのケトン体合成の亢進によるものではなく、心筋組織そのものであることが示唆された。酸化ストレス下での心筋 β ヒドロキシ酪酸上昇のメカニズムを明らかにするため、同物質の合成ならびに代謝酵素の発現をウエスタンブロット・リアルタイム PCR 法にて検討した。3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (HMGCS2)は酸化ストレスにより発現の変化を認めなかったが、SCOT は圧負荷モデルの心筋および酸化ストレス刺激下のラット培養心筋細胞の双方で有意な発現減少を認めた以上より不全心筋における β ヒドロキシ酪酸の上昇はその代謝酵素である SCOT の発現低下に伴う現象であることが示唆された。 β ヒドロキシ酪酸の心筋への生理作用を解明するため、ラット培養心筋細胞を β ヒドロキシ酪酸で前処理した後、酸化ストレスを加える実験をおこなったところ、非処理群では酸化ストレスによってフォークヘッド型転写因子に属する FOXO3a とその下流に位置する抗酸化酵素である SOD2 および catalase の発現が低下したが、前処理群ではこれらの転写因子・抗酸化酵素の低下は認めなかった。また、ジヒドロエチジウムを用いて活性酸素種の定性を行ったところ、 β ヒドロキシ酪酸によって酸化ストレスによる活性酸素種の産生が抑制されることも確認した。さらに、 β ヒドロキシ酪酸でラット培養心筋細胞を前処理した後、過酸化水素で刺激し cell survival assay ならびに TUNEL 染色を行ったところ、 β ヒドロキシ酪酸の前処理により心筋細胞の生存率が上昇し、アポトーシス細胞の割合も減少することが明らかとなった。

本研究は、心不全時に産生されるケトン体の産生機序及びその生理的・病理的意義を検討したものであるが、従来知られていなかった代謝酵素の発現低下によるケトン体産生のメカニズムやケトン体による心筋保護作用のメカニズムについての新規な知見を得たものとして学術的価値が高いと考えられる。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。