



Title	心不全における分岐鎖アミノ酸の役割に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山梨, 克真
Description	配架番号 : 2564
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14098号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78093
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuma_Yamanashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 山梨 克真

学 位 論 文 題 名

心不全における分岐鎖アミノ酸の役割に関する研究

(Studies on the role of branched-chain amino acid in heart failure)

【背景と目的】心不全は、多彩な臨床症状と運動耐容能が低下する、予後不良な臨床症候群で、患者数は増加の一途を辿り、効果的な治療法の確立が求められている。心不全の発症、進展に関わる因子として、心筋細胞の肥大、間質の繊維化、アポトーシスで特徴づけられる心筋リモデリングが知られ、心筋リモデリングの抑制が心不全の発症を予防できることが報告されている。これまで、不全心筋ではエネルギー代謝障害が出現し、心筋リモデリングの進展に関与することが報告されており、近年、分岐鎖アミノ酸(BCAA)の代謝障害の関与が着目されている。BCAA は、筋タンパク質の構成要素で、ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)のリン酸化を介してタンパク合成を高め、分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体(BCKDC)を律速酵素として分解され、エネルギー基質に利用される。これまで、不全心筋では、BCKDC 活性の低下が BCAA 代謝障害を惹起し、蓄積した BCAA が mTOR のリン酸化を増加させ心筋リモデリングを進展させること、薬物的に BCAA 代謝を活性化させると、心筋リモデリングが抑制されることが報告された。一方、心不全骨格筋では筋タンパクの合成・分解の不均衡を要因に、骨格筋萎縮が生じ、運動能力の低下を招く。不全心筋に有効な BCAA 代謝の活性化は、骨格筋において筋タンパク質の分解を促進させ、骨格筋萎縮を悪化させることが懸念される。逆に、骨格筋では BCAA のタンパク合成作用に期待し、BCAA 補充治療が検討される。しかし、心血管病における BCAA 補充治療の有効性は、明らかにされていない。以上の知見から、研究 1 として、BCAA 代謝酵素の一つである分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素キナーゼ(BCKDK)が心筋、骨格筋特異的に欠損し、潜在的に BCAA 代謝が活性化したマウスを用いて、心筋梗塞(MI)後心不全を作成し、①「不全心筋における BCAA 代謝の活性化は、mTOR のリン酸化を抑制し、心筋リモデリングを予防できる」ことを検証し、同時に骨格筋萎縮を悪化させるかどうかを評価することを目的とした。また、BCAA 補充治療の有効性については、研究 2 としてアンジオテンシン II(Ang II)誘発性骨格筋萎縮モデルを用いて、②「BCAA 補充治療は、Ang II 誘発性骨格筋萎縮を軽減する」と仮説を立てて検証した。

【材料と方法】(研究 1)18-20 週齢の雄性 Control マウスおよび筋特異的 BCKDK 欠損マウス(KO)の左冠動脈を結紮して MI を作成した(MI 群)。対照として偽手術(Sham 群)を作成した。実験は 4 群(Control+Sham, KO+Sham, Control+MI, KO+MI)で行われた。術後 4 週目に心エコー、組織重量の測定、組織的解析、ウェスタンブロットで蛋白発現を評価した。**(研究 2)**8-12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに Ang II(1000 ng/kg/min)あるいは生理食塩水を充填した浸透圧ポンプを搭載し、それぞれ Ang II 群, Vehicle 群とした。それぞれのマウスを 3%BCAA 水溶液(ロイシン, イソロイシン, バリン=2:1:1)飲水投与群あるいは非投与群

に分け、4群(Vehicle, Vehicle+BCAA, Ang II, Ang II+BCAA)で実験した。術後4週目に血圧測定、心エコー、運動能力、組織重量の測定、組織的解析、ウェスタンブロットで蛋白発現を評価した。

【結果】(研究1) Control+MI 群では Control+Sham 群と比較して心室リモデリング(左室内径の拡大と左室内径短縮率の低下)が進展した。Control+MI 群と KO+MI 群では同等の梗塞サイズで、生存率に差はなかったが、Control+MI 群と比較し KO+MI 群では心筋リモデリングが抑制された。また、心重量、肺重量が低下し、組織学的に筋横断面積の縮小と間質の線維化が減少した。Control+MI 群と比較し KO+MI 群でリン酸化した BCKDC が低下した。BCKDC を脱リン酸化させるホスファターゼは MI 両群で Control+Sham 群と比較して有意に低下した。また、リン酸化した mTOR-S6Kinase の発現も、Control+MI 群と比較し KO+MI 群で有意に低下した。骨格筋重量は、4 群間で有意差はなかった。**(研究2)** Ang II 群では、Vehicle 群と比較して有意な血圧上昇と求心性心肥大があった。Ang II 群と Ang II+BCAA 群の間で心肥大の程度に差はなかった。Ang II 群では、Vehicle 群と比較して、有意に体重および骨格筋重量が低下し、組織学的に筋横断面積が縮小し、Ang II 誘発性骨格筋萎縮が観察された。Ang II 群では、Vehicle 群よりタンパク合成(リン酸化した Akt-mTOR-S6Kinase)が低下し、分解(MuRF-1, Atrogin-1)が増加した。Ang II+BCAA 群では、Ang II 群と比較して、有意に骨格筋重量の増加と筋横断面積が増大し、リン酸化した mTOR-S6Kinase が増加した。また、運動能力ではトレッドミルの仕事量が有意に増加した。骨格筋部位別の評価では、速筋を多く含む長趾伸筋と大腿四頭筋において Ang II 群と比較し Ang II+BCAA 群で有意に重量が増加した。そこで、組織学的に筋線維を 3 タイプ(IIb, IIa, I)に分けて評価したところ、Ang II 群と比較し Ang II+BCAA 群で、IIb 線維の筋横断面積が有意に増大した。IIa 線維および I 線維では増大傾向はあるが有意差はなかった。長趾伸筋(速筋)とヒラメ筋(遅筋)を用いた比較では、長趾伸筋のみ BCAA によりリン酸化した mTOR が増加した。

【考察】(研究1) 本研究の MI 後不全心筋では、先行研究と同様、BCAA 代謝障害を呈したが、筋特異的な BCKDK の抑制が、BCAA 代謝障害を改善し、mTOR の抑制を介して心筋リモデリングを改善した。mTOR の作用の中でも mTOR-S6Kinase 経路を介したタンパク合成の抑制との関与が示唆されたが、mTOR の抑制がオートファジー経路の抑制を介して心筋リモデリングを改善する機序も考えられ、今後の研究課題である。今回のモデルにおいては、BCKDK 欠損による BCAA 代謝の亢進が、骨格筋萎縮を導かなかった。**(研究2)** BCAA 投与は、mTOR の活性化を介したタンパク合成作用で、Ang II 誘発性骨格筋萎縮を軽減し、運動能力を改善した。この作用は、速筋線維に効果的で、遅筋線維は BCAA 代謝の場であるミトコンドリアを豊富に含み、BCAA 分解が盛んに行われることが作用低下に繋がると考えられた。また、BCAA 投与で心肥大が悪化しなかった点も、心筋の活発な BCAA 代謝の影響が示唆された。本研究から算出したヒトに対する BCAA 投与量は 0.32-0.48 g/kg body weight/day で、心血管病をはじめとする骨格筋萎縮に対して臨床応用できる可能性が示された。

【結論】 MI 後心不全における BCAA 代謝障害の改善は、骨格筋萎縮を悪化させる事なく、心筋の mTOR-S6Kinase の活性化を抑制し、心筋リモデリングの抑制に関与した。BCAA 補充治療は Ang II 誘発性骨格筋萎縮を軽減した。