



Title	心不全における分岐鎖アミノ酸の役割に関する研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14098
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94589
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuma_Yamanashi.pdf



学位論文

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)

2020 年 3 月

北海道大学

山梨 克真

学位論文

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)

2020 年 3 月

北海道大学

山梨 克真

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1 項
要旨.....	2 項
略語表.....	5 項
全体の緒言.....	7 項
第 1 章（研究 1）BCKDK-KO マウスを用いた，心筋梗塞後心不全心筋，骨格筋における BCAA 代謝の役割に関する研究	
1. 1. 緒言	14 項
1. 2. 方法	
1. 2. 1. 実験動物.....	15 項
1. 2. 1. 1. 筋特異的 BCKCK-KO マウスの作製	15 項
1. 2. 1. 2. 筋特異的 BCKCK-KO マウスの表現型	16 項
1. 2. 2. MI 手術	17 項
1. 2. 3. 実験プロトコル.....	19 項
1. 2. 4. 生存率の評価.....	19 項
1. 2. 5. 心エコー検査.....	19 項
1. 2. 6. 組織学的解析.....	20 項
1. 2. 7. ウェスタンブロット.....	21 項
1. 2. 8. 身体活動計.....	25 項
1. 2. 9. 統計学的解析.....	25 項
1. 3. 結果	
1. 3. 1. 生存率.....	26 項
1. 3. 2. 動物特性.....	27 項
1. 3. 3. MI 後不全心筋の組織学的評価	29 項
1. 3. 4. BCAA 代謝酵素の発現に関する評価	30 項
1. 3. 5. mTOR, S6 kinase の発現に関する評価	31 項
1. 3. 6. 骨格筋重量の比較検討.....	32 項
1. 4. 考察	
1. 4. 1. 心筋リモデリングと心筋エネルギー代謝.....	33 項
1. 4. 2. mTOR のリン酸化と心筋リモデリング	33 項

1. 4. 3. mTOR シグナルとオートファジー	34 項
1. 4. 4. BCAA 代謝と骨格筋	35 項

第2章 (研究2) アンジオテンシン II 誘発性骨格筋萎縮に対する, 分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 補充治療法に関する研究

2. 1. 緒言	36 項
2. 2. 方法	
2. 2. 1. 実験動物	37 項
2. 2. 2. 3%BCAA 水溶液の調整	37 項
2. 2. 3. Ang II 充填ポンプの埋没術	38 項
2. 2. 4. 実験プロトコル	39 項
2. 2. 5. 血圧測定	39 項
2. 2. 6. 心エコー検査	39 項
2. 2. 7. トレッドミル	39 項
2. 2. 8. 組織学的解析	40 項
2. 2. 9. ウェスタンブロット	41 項
2. 2. 10. 統計学的解析	42 項
2. 3. 結果	
2. 3. 1. 動物特性	43 項
2. 3. 2. 骨格筋萎縮に対する BCAA 投与の有効性の評価	44 項
2. 3. 3. 骨格筋におけるタンパク合成・分解に関わるシグナルの評価	45 項
2. 3. 4. 運動能力の評価	46 項
2. 3. 5. 骨格筋部位別の BCAA の有効性に関する評価	47 項
2. 3. 6. 速筋線維と遅筋線維に対する BCAA の有効性と mTOR の関連性の 評価	48 項
2. 4. 考察	
2. 4. 1. Ang II 誘発性骨格筋萎縮に対する BCAA のタンパク合成効果に ついて	50 項
2. 4. 2. 筋線維タイプによる BCAA 有効性の違いについて	50 項
2. 4. 3. BCAA の圧負荷誘発性心肥大に対する影響について	51 項
2. 4. 4. 心血管疾患における BCAA 補充治療の臨床容量に関する検討	51 項
2. 4. 5. 概略図	52 項

第3章 総括および結論

- 3.1. 得られた新知見 53 項
- 3.2. 新知見の意義と今後の研究展開 53 項

謝辞..... 55 項

利益相反..... 56 項

引用文献..... 56 項

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

- 1) Katsuma Yamanashi, Shintaro Kinugawa, Arata Fukushima, Naoya Kakutani, Shingo Takada, Kuniyoshi Obata, Ippei Nakano, Takashi Yokota, Yasuyuki Kitaura, Yoshiharu Shimomura, Toshihisa Anzai. Branched-chain amino acid supplementation ameliorates angiotensin II-induced skeletal muscle atrophy.

要旨

【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、間質の線維化、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 (branched-chain amino acid (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 (mammalian target of rapamycin (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 (branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex (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 (branched-chain ketoacid chain dehydrogenase kinase (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 (myocardial infarction (MI)) 後心不全を作製し、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 (angiotensin 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 週齢の雄性野生型マウス (Control) および筋特異的 BCKDK 欠損マウス (knock out (KO)) の左冠動脈を結紮して MI を作製した (MI 群)。対照として偽手術 (Sham 群) を作した。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、ウエスタンブロットでタンパク発現量を評価した。

(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、ウエスタンブロットでタンパク発現量を評価した。

【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-S6 kinase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-S6 kinase)が低下し、分解(muscle RING-Finger protein-1(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-S6 kinase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-S6 kinase 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-S6 kinase 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.

略語表

Ang II	: angiotensin II ; アンジオテンシン II
Atg5	: autophagy related gene 5 ; オートファジー関連遺伝子 5
ATP	: adenosine triphosphate ; アデノシン 3 リン酸
BCAA	: branched-chain amino acid ; 分岐鎖アミノ酸
BCAT2	: branched-chain aminotransferase 2 ; 分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素
BCKA	: branched-chain α -ketoacid ; 分岐鎖 α -ケト酸
BCKDC	: branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex ; 分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体
BCKDK	: branched-chain ketoacid chain dehydrogenase kinase ; 分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素キナーゼ
BSA	: bovine serum albumin ; 牛血清アルブミン
Ckmm	: creatine kinase mm ; クレアチンキナーゼ MM 型
CoA	: coenzyme A ; コエンザイム A
ES cell	: embryonic stem cell ; 胚性幹細胞
Fbx32	: f box protein 32 ; F ボックスタンパク質 32
FOXO	: forkhead box 0 ; フォークヘッド転写因子 サブタイプ 0
FLT	: flippase ; フリッパーゼ
FRT	: flippase recognition target ; フリッパーゼ認識ターゲット
HE	: hematoxylin and eosin ; ヘマトキシリン・エオジン
HRP	: horseradish peroxidase ; 西洋ワサビペルオキシダーゼ
IGF-1	: inslin-like growth factor-1 ; インスリン様成長因子 1
IgG	: immnoglobulin G ; 免疫グロブリン G
IL-1 β	: interleukin-1 β ; インターロイキン-1 β
KO	: knock out ; ノックアウト (欠損)
LVAWT	: left ventricular anterior wall thickness ; 左室前壁厚
LVDd	: left ventricular end-diastolic diameter ; 左室拡張末期径
LVDs	: left ventricular end-systolic diameter ; 左室収縮末期径
LVPWT	: left ventricular posterior wall thickness ; 左室後壁厚
MI	: myocardial infarction ; 心筋梗塞
mTOR	: mammalia target of rapamycin ; ラパマイシン標的タンパク質
MuRF-1	: muscle RING-Finger Protein-1 ; 筋肉 RING-Finger 蛋白-1
NADH	: nicotinamide-adenine dinucleotide ; 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

p70S6K : ribosomal protein S6 kinase ; リボソームタンパク質 S6 キナーゼ
PP2Cm : protein phosphatase 2Cm ; プロテインフォスファターゼ 2Cm
PVDF : polyvinylidene difluoride ; ポリフッ化ビニリデン
QOL : quality of life ; 生活の質
RAA : renin-angiotensin-aldosterone ; レニン-アンジオテンシン-アルドステロン
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis ; ポリアクリルアミドゲル電気泳動
TAC : transverse aortic constriction ; 横行大動脈縮窄術
TBST : tris buffered saline with polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate ;
ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレートを含むトリス緩衝生理食塩水
TNF- α : tumor necrosis factor- α ; 腫瘍壊死因子- α
WT : wild type ; 野生型

全体の緒言

心不全とは「なんらかの心臓機能障害，すなわち，心臓に器質的および/あるいは機能的異常が生じて心ポンプ機能の代償機転が破綻した結果，呼吸困難・倦怠感や浮腫が出現し，それに伴い運動耐容能が低下する臨床症候群」と定義される（日本循環器病学会/日本心不全学会合同ガイドライン，2017年改訂版より引用）．心不全の病因は，心筋虚血，高血圧，弁膜疾患など多岐にわたるが，近年の食の欧米化に伴う虚血性心疾患の増加や，高齢化に伴う高血圧や弁膜症患者の増加を背景に，我が国の心不全患者は増加傾向にある（Okura et al., 2008）．日本における死因別死亡総数の順位では，心疾患は悪性新生物に次いで二番目に多い．その中でも心不全による死亡は，心疾患の内訳の中でも36%と最も多い疾患となっている（厚生労働省2014）．

心不全は，様々な循環器疾患（高血圧，虚血性心疾患，弁膜症，心筋症など）により心筋障害が起こると，心ポンプ機能障害が進展する．この心ポンプ機能障害の急性期では，心拍出量や血圧維持のために種々の代償機転が作動する．この中心を担っているのが，レニン・アンジオテンシン・アルドステロン（renin-angiotensin-aldosterone (RAA)）系や，交感神経系の賦活化である．一方で，これらの神経体液性因子の慢性的な活性化は，心筋リモデリングと呼ばれる心筋の構築変化（心筋細胞肥大，間質線維化，アポトーシス）を引き起こし，更なる心筋障害および心ポンプ機能障害をもたらす．このような悪循環サイクルから心不全は進展すると考えられている（図1-1）．実際，RAA系抑制薬や β 遮断薬は心不全患者の心筋リモデリングを抑制し，予後を改善することが大規模臨床試験で証明されている（Colucci et al., 2007; McKelvie et al., 1999）．

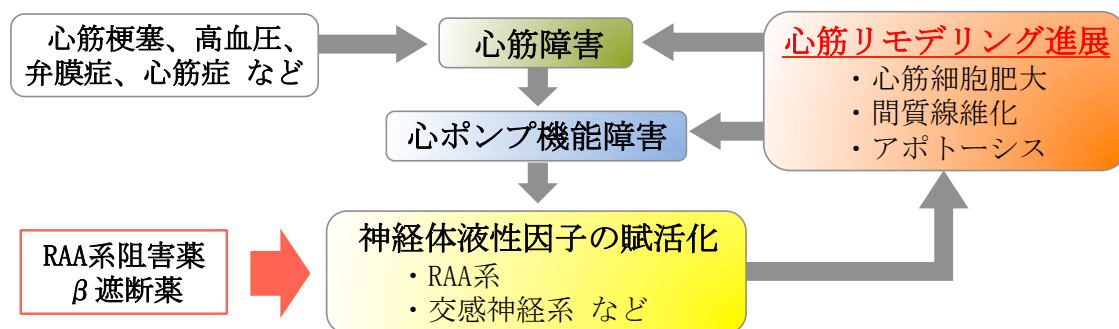


図1-1. 心不全の病態の形成，進展の機序

(Braunwald E, Briston MR. Circulation 2000;102 iIV 14-23 より改変引用)

しかしながら、これらの薬剤が有効でなかったり、一時有効であってもその後悪化したりする症例も多く、新たな機序の解明が待たれており、心筋リモデリングの進展の分子機序の解明は、心不全領域において重要な研究課題である。

心筋は、全身に血液を送り出すポンプとして絶え間なく収縮と拡張を繰り返していることから、大量のエネルギー‘アデノシン 3 リン酸 (adenosine triphosphate (ATP))’の供給を必要としている。健常心筋では、主にグルコース、脂肪酸、乳酸をエネルギー基質として利用する。その中でも脂肪酸は酸化的リン酸化を介して効率的かつ大量の ATP 産生を担い、エネルギー全体の 70-90%を占める (De Jong and Lopaschuk, 2017)。しかし、不全心筋では、心筋酸素需要の低下に反応して、脂肪酸代謝からグルコースを基質とした解糖系の割合が増加する。この心不全によって引き起こされる代謝の変化は‘metabolic remodeling’と言われ、健常心筋と比較して不全心筋の ATP 産生量は 30%近く損なわれる (Nascimben et al., 1996)。このような不全心筋におけるエネルギー代謝障害が、心筋リモデリングの進展に関わっていると考えられる。したがって、エネルギー代謝障害は心不全治療において新たな治療方法確立の重要な介入点になり得ると考えられている。

一方で、アミノ酸代謝は、心不全にどのような働きを担っているのか未だに明らかになっていない点が多い。しかし、近年の報告で、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid (BCAA)) の役割が注目されている。BCAA は、分子内の側鎖に分岐構造をもつアミノ酸の総称で、ロイシン、イソロイシン、バリンの 3 つが含まれる。BCAA は必須アミノ酸の一つで、食物から摂取を要する栄養素である (図 1-2)。BCAA は、食物タンパク質の必須アミノ酸の 50%に含まれ、摂取後は多くが骨格筋などの筋タンパク質の構成要素として体内に保有される。その割合は筋タンパク質の必須アミノ酸の 35%を占めており、筋肉にとって重要な成分である (Harper et al., 1984)。

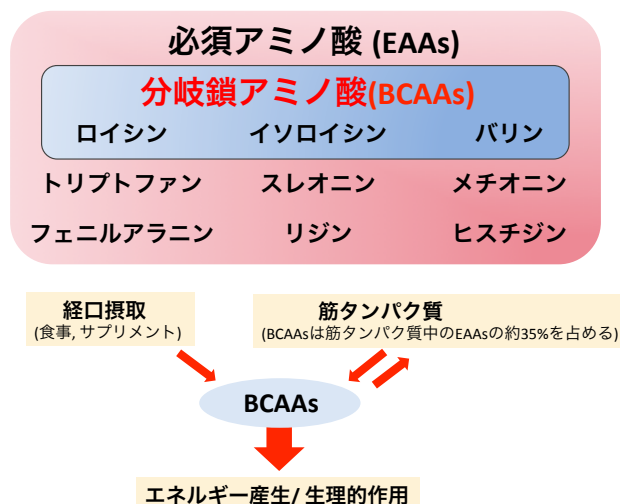


図 1-2. 分岐鎖アミノ酸の分類と働き

BCAA は筋肉にとってエネルギー基質としての役割も持ち、ミトコンドリア内の独自の経路で代謝され、大きく 2 段階のステップに分けられる (図 1-3)。このステップは 3 つの BCAA に共通で、①分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (branched-chain aminotransferase 2 (BCAT2))、②分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素複合体 (branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex (BCKDC)) という 2 つの酵素により触媒されている。第 1 ステップは BCAT2 で触媒される可逆的なアミノ基転位反応で、中間代謝物に分岐鎖 α -ケト酸 (branched-chain α -ketoacid (BCKA)) が生成される。第 2 ステップでは、BCKDC で触媒され、BCKA から不可逆的な酸化脱炭酸反応により CoA 化合物 (coenzyme A (CoA)) が生成される。この不可逆的なステップが BCAA 代謝経路を律速している。BCKDC の酵素活性はリン酸化反応によって調整を受ける。リン酸化によって BCKDC を不活性化する酵素が分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素キナーゼ (branched chain ketoacid chain dehydrogenase kinase (BCKDK)) で、逆に脱リン酸化によって活性化させる酵素が特異的ホスファターゼ 2Cm (protein phosphatase 2Cm (PP2Cm)) である。しかし、心臓全体のエネルギーに対して BCAA が占める割合は少なく、ロイシンでは心筋酸素需要の 3-5% にしか満たないため (Ichihara et al., 1980)、脂肪酸やグルコースと比較してエネルギー基質としての役割は小さいとされている。

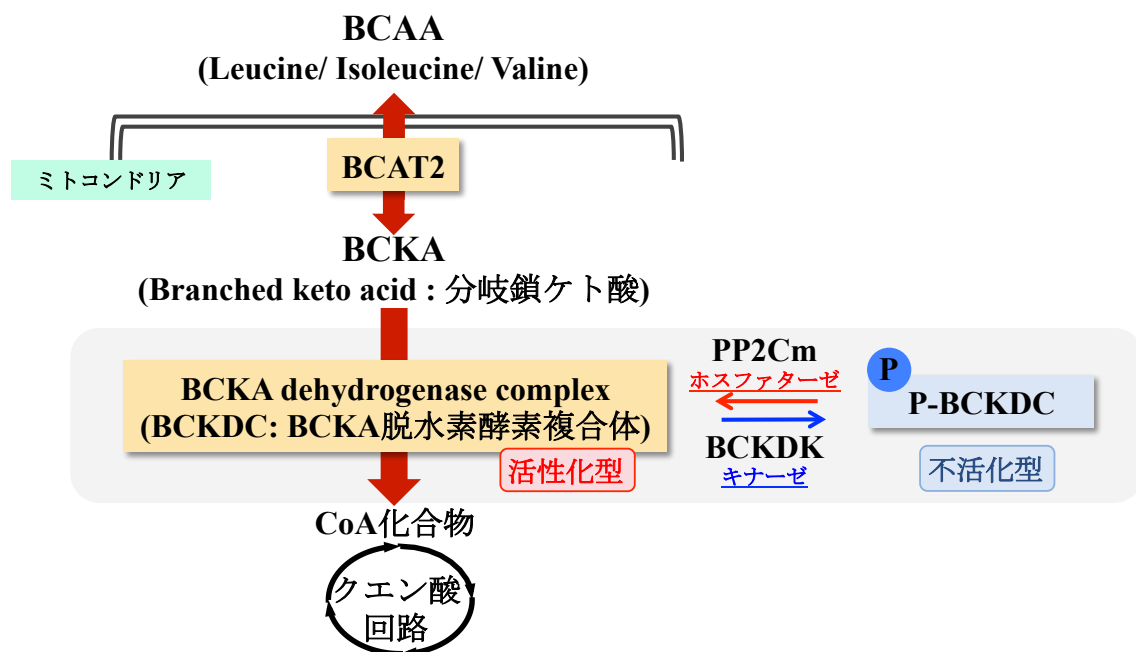


図 1-3. BCAA 代謝経路について

BCAA には、他の栄養素にはない生理的特徴を有しており、特にロイシンはラパマイシン標的タンパク質 (mammalian target of rapamycin (mTOR)) を強力に活性化することで知られている (Nair and Short, 2005). mTOR は、哺乳類などの動物で細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質キナーゼの一種で、酵母を用いたスクリーニングでラパマイシンの標的分子として発見された複合体タンパクである. mTOR は栄養状態などに反応して、リン酸化修飾を受けることで活性化し、様々な細胞内プロセスを高める働きを持つ主要な調節因子の一つである. 特に強力なタンパク合成シグナルであることで知られ、主要な経路にリボソームタンパク質 S6 に対するキナーゼ (protein S6 kinase (S6 kinase)) のリン酸化によって、翻訳を促進させる (図 1-4) .

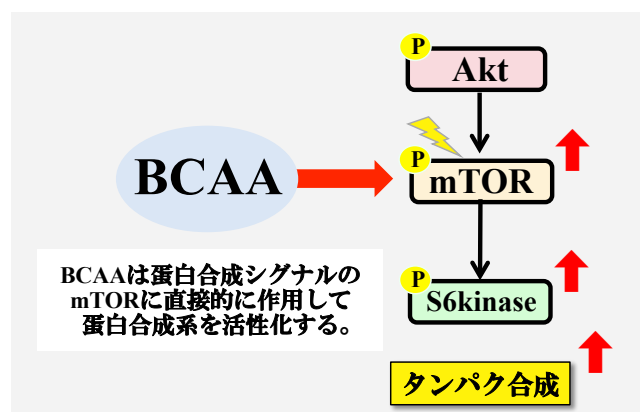


図 1-4. BCAA の mTOR に対する働き

正常心筋における mTOR の役割は、組織の発達や恒常性の維持に重要で、心筋特異的に mTOR をノックアウト (knock out (KO)) したマウスは、出生後に心拡大や心不全が生じ、短命である (Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2013). 一方、横行大動脈縮窄術 (transverse aortic constriction (TAC)) によって圧負荷誘発性心肥大を生じた心不全モデルマウスを用いた研究では、ラパマイシンの投与で mTOR を拮抗した結果、心肥大が抑制され、心機能が改善した報告 (McMullen et al., 2004) や、腹部大動脈-静脈作製による容量負荷モデルの遠心性心肥大が、mTOR の阻害によって軽減した報告がある (Ikeda et al., 2015). これらの結果から、過剰な mTOR の活性化は、心筋リモデリングを悪化させ、心機能悪化に寄与していると考えられ、心不全における mTOR の活性化を抑制することが有効な治療手段になり得ると考えられる. したがって、mTOR の活性化と關連する BCAA 代謝は、心筋リモデリングに重要な役割を果たしている可能性がある.

Sun らは、マウスの TAC 後不全心筋において BCAA 代謝障害が生じ、PP2Cm-KO マウス（潜在的に BCAA 代謝障害を悪化させたモデル）では、心筋リモデリングが増悪した（Sun et al., 2016a）。また、Wang らは、心筋梗塞（Myocardial infarction (MI)）後不全心筋で BCAA 代謝障害によって、組織中に BCAA が蓄積することを明らかにし、心不全マウスに BCAA を補充すると、BCAA の更なる蓄積が mTOR の活性化を介して、心筋リモデリングを助長することを示した（Wang et al., 2016）。したがって、心不全における BCAA 代謝障害の改善は、心筋リモデリングの軽減に有効な治療手段になり得ると考えられる。

心不全では、運動耐容能が低下している。運動耐容能は心不全患者における活動能力の評価や重症度を反映し、生活の質（quality of life (QOL)）の悪化と密接に関係するだけでなく、独立した予後規定因子として重要な指標である（図 1-5）。したがって、運動耐容能の改善は、心不全治療の主要な目的の一つとされている（Anker and Coats, 1999; Anker et al., 1997; Mancini et al., 1991）。運動耐容能の規定因子は複数考えられるが、その中で骨格筋は中心的な役割を果たしている。

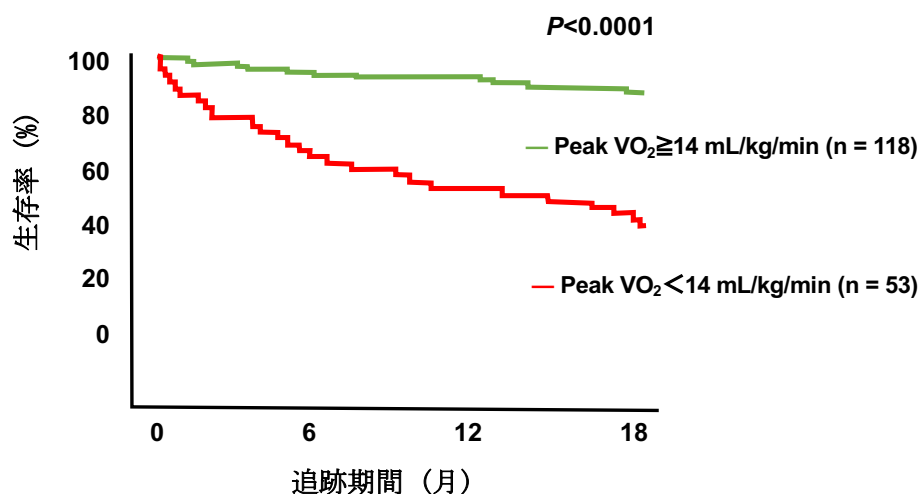


図 1-5. 運動耐容能と予後の関連

Peak VO₂, 最高酸素摂取量, 運動耐容能の指標である。

(Anker and Coats, 1999 より引用改変)

心不全において骨格筋機能異常が生じる事が報告されている（Kinugawa et al., 2015）。骨格筋異常は、①形態学的変化（骨格筋萎縮）、②組織学的変化（筋線維の変化、ミトコンドリア異常など）、③生化学的变化（酸化酵素の減少、解糖系酵素の減少など）が挙げられる。特に骨格筋萎縮によって身体機能が低下した状態は、サルコペニアと定義される（Cruz-Jentoft et al., 2010）。サルコペニアを合併した

心不全患者では、運動耐容能が有意に低下し、転倒リスクの増加、フレイルの進行、手術リスクの上昇、生存率低下などにも影響すると報告されている（Anker et al., 1997; Landi et al., 2013; Sepehri et al., 2014）。しかし、骨格筋に対する有効な治療手段は運動療法しかなく、サルコペニアを有する症例では、十分な運動療法が導入できない場合があり、新たな骨格筋治療法の開発が必要と考えられる。

昨今、栄養療法によって骨格筋に対する治療効果を高めることを目的とした「リハビリテーション栄養」という概念が提唱され、BCAA 補充治療が着目されている。一般的にサルコペニアは、骨格筋におけるタンパク合成と分解シグナルの不均衡が生じることが病因として考えられている（図 1-6）。心血管疾患においては RAA 系の過剰な活性化や Interleukin-1 β (IL-1 β) や Tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの炎症性サイトカインが複合的に作用し、mTOR の抑制がシグナルの不均衡の一因となっている（Kinugawa et al., 2015; Yoshida et al., 2013）。

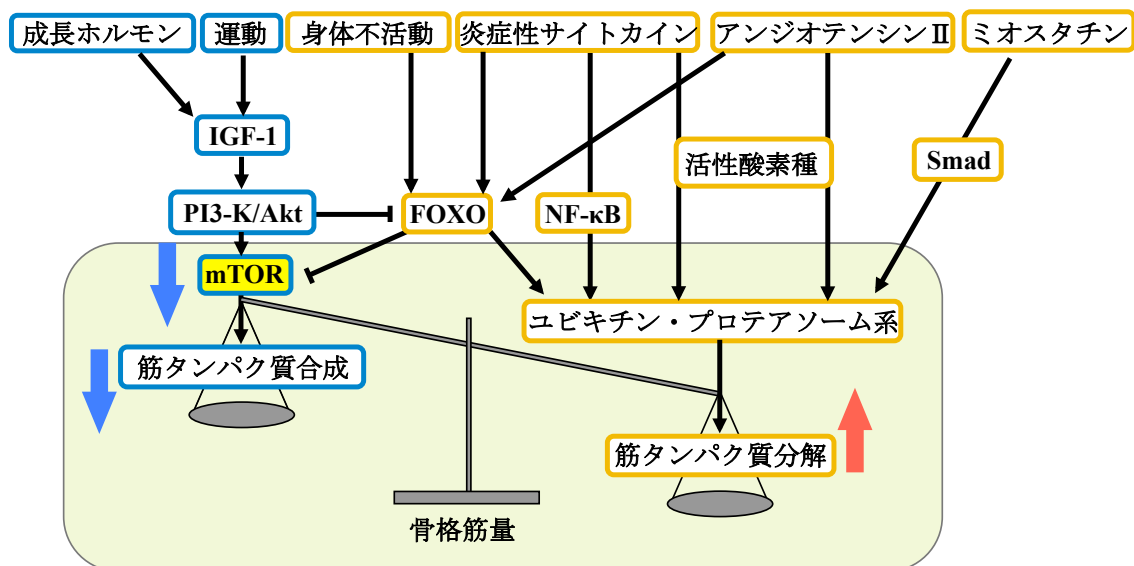


図 1-6. タンパク質合成・分解シグナルの不均衡について

(Ali S et al: Sarcopenia, cachexia and aging: diagnosis, mechanisms and therapeutic options - a mini-review. Gerontology 2014; 60: 294-305 より引用して改変)

そこで、BCAA 補充治療は、mTOR の活性化を介してシグナルの不均衡を是正し、サルコペニアの進展を抑制する効果が期待されている。しかし、循環器疾患における BCAA の有効性については、明らかにされていない。前述した通り、BCAA 補充治療は、心不全の心筋リモデリングに対して悪影響となる可能性が考えられる（Wang et al., 2016）。また、BCAA 代謝の改善治療は、心筋リモデリングに対しては有効であ

るが、骨格筋ではBCAAの消費や筋タンパク質の分解を促進させ、サルコペニアを助長する可能性が懸念される。

これらを踏まえ、我々は、「不全心筋におけるBCAA代謝の活性化はmTORの活性化を抑制し、心筋リモデリングを予防できる」と仮説を立て検証した。同時に、BCAA代謝の活性化によって骨格筋萎縮が増悪するかどうかを評価した。次に「BCAA補充治療によって、Ang II誘発性骨格筋萎縮を軽減する」と仮説を立て検証した。

これらを検証するために、第1章において筋特異的BCKDK-KOマウス(心臓, 骨格筋)を用い、心不全心筋リモデリングに与える効果と、骨格筋に与える影響について評価を行った。また第2章において、循環器領域で骨格筋萎縮モデルとして確立しているAng II誘発性骨格筋萎縮マウスを用いて、BCAA補充治療の有効性を検証し、新たな治療法の開発に繋げることを目的とした。

第1章（研究1） BCKDK-KO マウスを用いた、心筋梗塞後心不全心筋、骨格筋における BCAA 代謝の役割に関する研究

1.1. 緒言

心不全の病態は、神経体液性因子の活性化と心筋リモデリングによって特徴づけられている。心筋リモデリングの分子機序の解明は重要な研究課題である。心筋におけるエネルギー代謝障害、特に脂肪酸代謝から糖代謝への移行 ‘metabolic remodeling’ が、心筋リモデリングと関連することが知られている。一方、心臓全体のエネルギー産生におけるアミノ酸代謝の役割が小さいこともあり、アミノ酸代謝の心筋リモデリングにおける役割についてはあまり知られていない。

近年、心筋における BCAA 代謝の役割が注目されている。Sun らは、マウスの不全心筋における BCAA 代謝酵素の変化を測定した結果、正常心筋と比較して、活性化型の BCKDC の発現が低下し、不活性化型のリン酸化した BCKDC のホスファターゼである PP2Cm の発現が低下した (Sun et al., 2016a)。また、中間代謝産物である BCKA が心筋組織に蓄積していた。したがって、不全心筋において BCAA 代謝障害が出現していることを示した。そこで Sun らは、PP2Cm-KO マウスを用いて、BCAA 代謝障害が心筋リモデリングに与える影響を観察した。PP2Cm-KO マウスに TAC を施術した結果、野生型マウス (wild type; WT) の TAC と比較して、BCAA 代謝障害が高度に出現し、心室リモデリング（代償性心肥大、左室内腔の拡大、左室収縮能の低下）が悪化した。

Wang らは、MI 後心不全モデルマウス (MI 群) と偽手術後マウス (Sham 群) の心筋を比較し、BCKDC の酵素活性が低下すること、心筋組織中に BCAA が蓄積することを報告した (Wang et al., 2016)。また、MI 群に経口的に BCAA を補充 (MI+BCAA 群) させたところ、MI 群と比較して、MI+BCAA 群では組織中の BCAA 蓄積が更に増加し、mTOR のリン酸化が亢進し、心筋リモデリングが悪化した。

以上の結果から、心不全において BCAA 代謝酵素の発現や活性の変化によって BCAA 代謝が障害され、代謝効率を上回った BCAA の蓄積によって、mTOR のリン酸化が亢進し、心筋リモデリングが悪化することが示唆される。したがって、BCAA 代謝を活性化させることは、心筋リモデリングの軽減に寄与し、心不全に対する新たな治療方法になり得ると考えられた。Wang らは、MI 群に BCKDK 抑制薬であるジクロロベンゾ [B] チオフェン-2-カルボン酸メチル塩化物を全身投与することで、BCAA 代謝障害を軽減した結果、心筋リモデリングが部分的に改善することを明らかにした (Wang et al., 2016)。

本研究では、筋特異的 BCKDK-KO マウスを用いることで、BCKDK のリン酸化を強力に抑制し (Ishikawa et al., 2017), 恒常的に BCAA 代謝を活性化した実験モデルで MI 後心筋リモデリングに与える影響を評価した。一方このマウスは、骨格筋でも BCKDK が欠損しており、骨格筋の BCKDK が活性化し、BCAA 代謝が亢進した結果、タンパク合成に関する mTOR のリン酸化の低下が起こり、骨格筋萎縮が出現する可能性がある。本研究では、この点を同時に評価した。

1.2. 方法

以下に本研究で用いた実験材料の由来および調整法を示した。

1.2.1. 実験動物

18-20 週齢の野生型マウスおよび筋特異的 BCKDK-KO マウスは名古屋大学大学院生命農学研究科 応用生命科学専攻 栄養生化学研究室から譲受し、本研究は北海道大学大学院医学研究院における倫理委員会の承認を得て行なった。本研究は 1.2.1.1 に筋特異的 BCKDK-KO マウスの作製、1.2.1.2 に表現型を示す。

マウスは、12 時間の明暗サイクル、室温 23~25℃の環境下で飼育した。餌は一般的なマウス飼育に用いる固形飼料（タンパク含有量 23.1%, (MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan)）で飼育し、24 時間あたりの食餌摂取量を記録した。全ての動物実験手技並びに飼育保管は、「北海道大学動物実験に関する規程」を遵守して実施した。

1.2.1.1. 筋特異的 BCKDK-KO マウスの作製

共同研究施設である名古屋大学大学院生命農学研究科 応用生命科学専攻 栄養生化学研究室で作製した(図 1-2-1)。マウスの遺伝的バックグラウンドは C57BL/6 マウスを用いた。

- 1) BCKDK 蛋白をノックアウトするため、BCKDK 遺伝子をゲノムライブラリーの情報に基づき、スクリーニングした。
- 2) BCKDK 遺伝子のあるエクソン 9 の上流にネオマイシン耐性カセット、その両端に flippase recognition target (FRT) 配列を配置した。
- 3) ネオマイシン耐性カセット内、エクソン 9-12 の上流および下流に lox p 配列を挿入し、ターゲティングベクターとした。

- 4) ターゲティングベクターを、胚性幹細胞 (embryonic stem cell (ES cell)) に導入し、相同組換えが起きた細胞をクローン化した。
 - 5) クローン化した ES 細胞を胚盤胞にインジェクションした。
 - 6) 胚盤胞をマウスの子宮に着床させ、キメラマウスを作製した。
 - 7) キメラマウスと野生型マウスより、ヘテロマウスを作製した。
 - 8) ヘテロマウスと flippase (FLP) 発現マウスにより、ネオマイシン配列を除去した flox ヘテロマウスを作製した。
 - 9) flox ヘテロマウスにより、flox ホモマウスを作製した。
- flox ホモマウスとクレアチンキナーゼ MM 型 (Ckmm) 特異的に Cre リコンビナーゼを発現させた Ckmm-Cre 発現マウス (Bruning et al., 1998) により、Cre 配列を除去し、flox ヘテロ・Ckmm-Cre (+) マウスを作製した。
- 10) flox ホモマウスと flox ヘテロ・Ckmm-Cre (+) マウスより、flox ホモ・Ckmm-Cre (+) マウス、すなわち筋特異的 BCKDK-KO マウスを得た。また、flox ホモ・Ckmm-Cre (-) マウスを Control マウスとした。

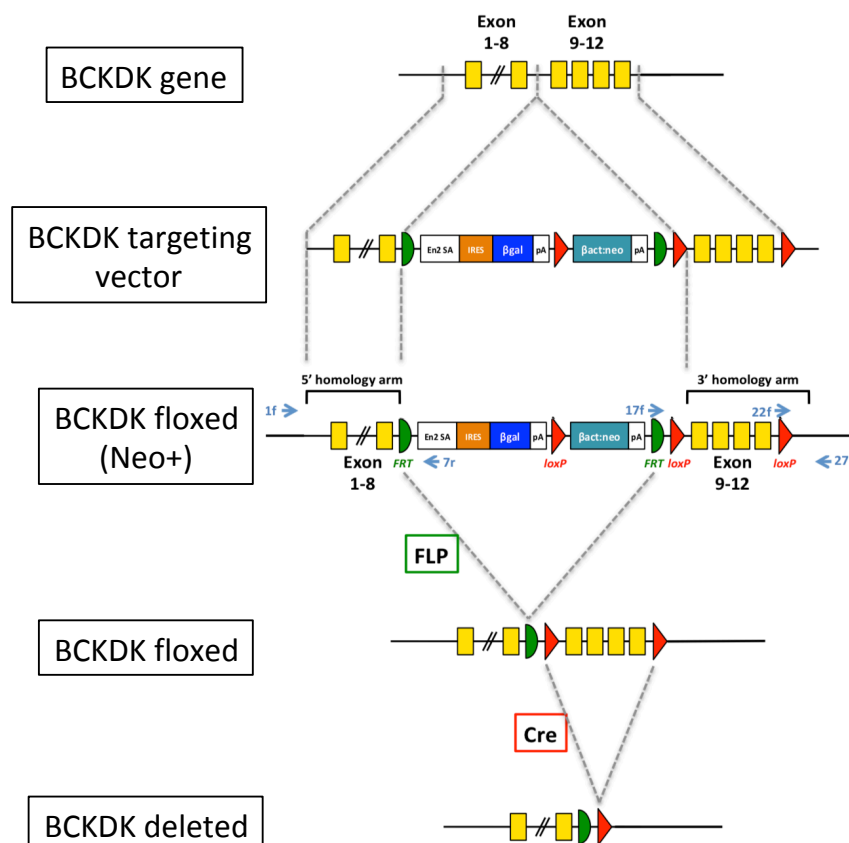


図 1-2-1. 筋特異的 BCKDK-KO マウスの設計図

(Ishikawa et al., 2017 より引用して改変)

1.2.1.2. 筋特異的 BCKDK-KO マウスの表現型

BCKDK-KO マウスは、心筋および骨格筋の BCKDK を特異的に欠損し、潜在的に BCAA 代謝が活性化し、組織中の BCAA 濃度が低下したモデルである (図 1-2-2). 一般的なマウス飼育に用いるタンパク含有量 (約 20%) の食餌で、体重および骨格筋重量に変化がないことが確認されている (Ishikawa et al., 2017).

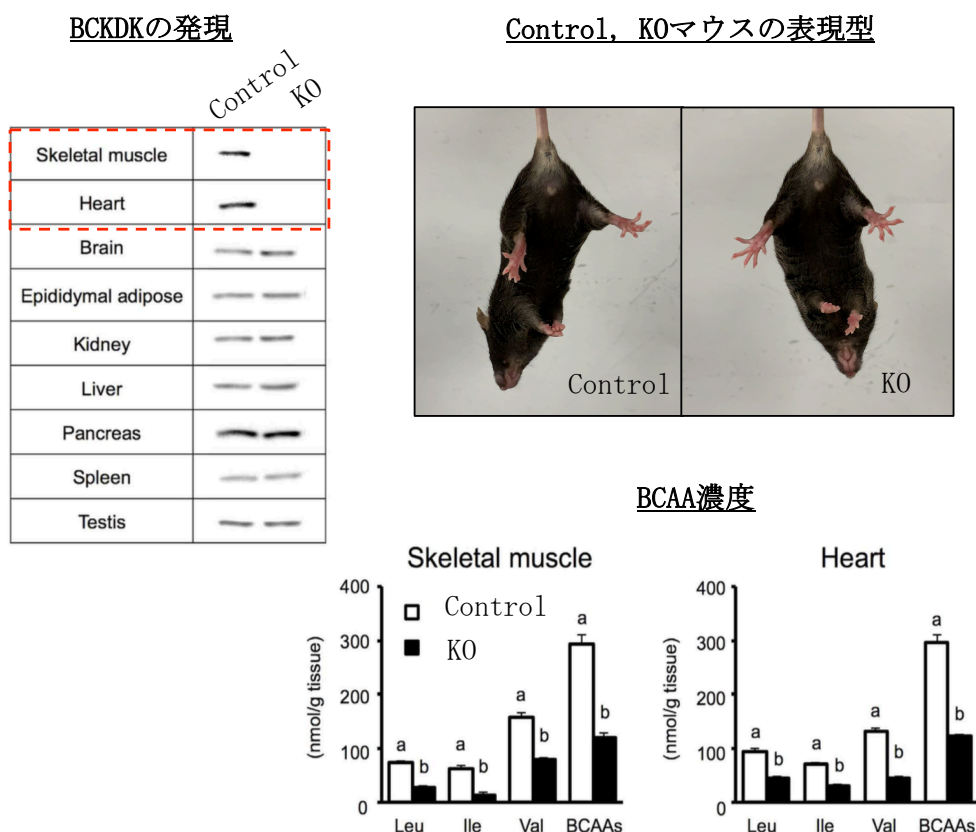


図 1-2-2. 筋特異的 BCKDK-KO マウスの表現型
(Ishikawa et al., 2017 より引用して改変)

1.2.2. MI 手術

雄 18 週～20 週齢の Control マウスおよび KO マウスの左冠動脈を結紮して MI を作製した. 術前にマウスの体重を測定し、塩酸メデトメジン 0.3 mg/kg 体重 (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan), ミダゾラム 4.0 mg/kg 体重 (Astellas Pharma, Tokyo, Japan), 酒石酸ブトルファノール 5.0 mg/kg 体重 (Meiji Seika Co., Ltd., Tokyo, Japan) の 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与し (Kawai et al., 2011), 十分な麻酔深度になったことを確認した. 手術台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、気管挿管のために切歯を絹糸で牽引し頸部を伸展位で固定した. 頸部正中より皮膚切開の後に、顎下腺と気管前筋を展開し、気管の直線形状を保ちながら 23 ゲージのポリ

エチレンチューブが半透明の気管軟骨を通過することを直視下で確認した（図 1-3A）. その後, 従量式実験動物人工呼吸器 (SN-480-7x2T (Shinano, Tokyo, Japan)) に接続し, 毎回 110 回, 1 回換気量 0.4 ml で人工呼吸を開始し, 送気時に前胸部が良好に挙上していることを確認した.

70%アルコールで消毒を行い, 光源 (LG-PS2 (Olympus, Tokyo, Japan)) と実体顕微鏡 ((SZ61 (Olympus, Tokyo, Japan)) 下で手術を行った. 左前胸部を皮切した後に, 大胸筋と小胸筋を牽引して温存し, 肋間筋を露出した (図 1-3B). 第 4 肋間で肋間筋を切開した後に (図 1-3C) 開胸器で視野を展開して心臓を確認した (図 1-3D). 心膜を切開した後に心臓を半時計方向に旋回させて左冠動脈の走行を確認し, 左心耳下縁から 0.5 mm 程度遠位で 8-0 シルク縫合糸 (ELP M6-80B2 (Akiyama-seisakusyo. Co., Ltd., Tokyo, Japan)) を使用して器械結びを行った (図 1-3E). 冠動脈結紮後に結紮部遠位の心筋が赤から白色へ色調変化を確認することで, MI の作製を確認した. 4-0 シルク縫合糸 (Sofsilks™ VS-709 (Covidien, Dublin, Ireland)) で閉創し (図 1-3F) 手術を終了した.

術後は麻酔からの回復が得られるまで 37℃の保温パッドで保温を継続しながら待機した. 抜管までの時間は, 十分に覚醒して自発呼吸が安定して再開し, 術後の急性期死亡が少ない4時間とした. 手術時間は15分, 開胸時間は5分前後であった. 上記一連の手技から左冠動脈結紮術を除いた偽手術を行った Sham 群を設定した.

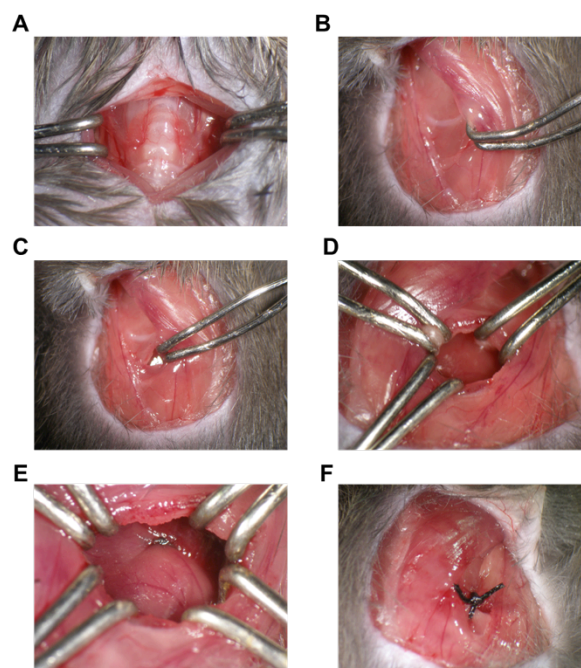


図 1-3. 心筋梗塞手術の術中写真

- (A) 気管軟骨の露出 (B) 肋間筋の露出 (C) 肋間筋の切開
(D) 開胸器による開窓 (E) 冠動脈の確認 (F) 閉創

1.2.3. 実験プロトコル

雄18週～20週齢のControl マウスおよびBCKDK-KO マウスに対して、MI 手術と Sham 手術を施行し、Control+Sham 群 (n=8), Control+MI 群 (n=12), KO+Sham 群 (n=8), KO+MI 群 (n=12) の4群を作製し、術後4週目に評価を行なった。方法1.2.2に用いた3種混合麻酔を腹腔内投与して十分な麻酔深度を得た後に、下大静脈からの血液採取で安楽死させ、速やかに心臓、肺、下肢骨格筋(四頭筋(Quadriceps femoris)、腓腹筋(Gastrocnemius)、ヒラメ筋(Soleus)、長趾伸筋(Extensor digitorum longus))を採取した。湿重量を測定し、組織は後で行われる解析のために保存した。組織重量は体重で補正した。

1.2.4. 生存率の評価

MI 手術および Sham 手術施行日を0日目、術翌日を術後1日目とし、術後28日目までの生存日数を評価した。飼育ゲージは毎朝確認し、死亡したマウスをカウントした。生存率は、各群において手術を施した全体数に対して、術後28日目で生存している数の割合を算出した。生存曲線は GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) を用いて Kaplan-Meier 法で作図した。

1.2.5. 心エコー検査

心エコー法は非侵襲的な検査であるが、実験動物の場合には安静を保つことが難しいために麻酔薬を用いることがある。しかし、麻酔薬によって心抑制が生じて正しく心機能の評価できないことが報告されており、手技に習熟していれば無麻酔下での心エコー法が推奨されている (Pachon et al., 2015)。今回は無麻酔下で心エコー法を行った。検査台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、除毛クリームでマウスの前胸壁を除毛した。超音波診断装置 (Aplio 300 (Toshiba Medical Systems, Otawara, Japan)) および 12 MHz リニアプローブを用いて、2D 胸骨傍短軸像乳頭筋レベルで最適な像を描出した。M モード法に切り替え、記録紙スピード 40 mm/sec で記録の上、心拍数、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室前壁厚、左室後壁厚、左室内径短縮率を計測した (図 1-4)。

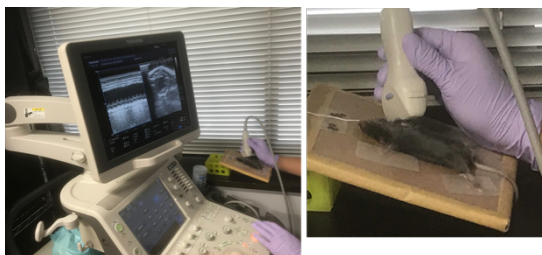


図 1-4. 心エコー検査の写真

1. 2. 6. 組織学的解析

心臓は組織学的分析のため 10%ホルマリン溶液（10%中性緩衝ホルマリン液（062-01661, Wako Chemical, Tokyo, Japan））で灌流固定した後にパラフィン包埋した。心臓切片は心室中隔を含む左室を基部，中部および心尖部の3横断面で標本を作製し，ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin and eosin (HE)）染色とマッソン・トリクローム染色を行った。

・ HE 染色

切片を脱パラフィン後にアセトン（Wako chemicals, Tokyo, Japan）とエタノールの等量混合溶液に3分間浸透させた。

その後、蒸留水で3分間洗浄し、ヘマトキシリン溶液(Kanto Chemical, Tokyo, Japan)に2分間浸透させた。蒸留水で2分間洗浄し、0.5% HCl（Wako chemicals, Tokyo, Japan）+ 70%エタノール溶液に浸透させた。蒸留水で1分間洗浄後、0.5% HCl+ 70%アルコール溶液，エオジン溶液（Kanto Chemical, Tokyo, Japan），100%エタノール，キシレン（Wako chemicals, Tokyo, Japan）の順に浸透させ，透徹した。

・ マッソン・トリクローム染色

切片を脱パラフィン後に蒸留水で洗浄し，第1媒染液^{*1}に15分間浸透させた。その後，蒸留水で5分間洗浄し，ワイゲルトの鉄ヘマトキリン液（298-21741, Wako chemicals, Tokyo, Japan）に5分間浸透させた。その後，蒸留水で軽く洗浄し，0.5% HCl + 70%アルコール溶液に浸透させた。蒸留水で10分間洗浄し，第2媒染液^{*2}に45秒間浸透させ，蒸留水で洗浄した。ポンソーキシリジン酸フクシン液（Wako chemicals, Tokyo, Japan）に45分間浸透させ，1%酢酸2分間→2.5%リントングステン酸10分間→1%酢酸2分→アニリン青溶液5分間→1%酢酸2分間の順で浸透させた後，100%エタノール，キシレンの順に浸透させ，透徹した。

^{*1} : 10%重クロム酸カリウム（7778-50-9, Wako chemicals, Tokyo, Japan）と10%トリクロロ酢酸（76-03-9, Wako chemicals, Tokyo, Japan）の等量混合溶液

^{*2} : 2.5%リントングステン酸（12501-23-4, Wako chemicals, Tokyo, Japan）と2.5%リンモリブデン酸（1313-30-0, Wako chemicals, Tokyo, Japan）の等量混合溶液

標本は、蛍光顕微鏡 (BZ-X700 (Keyence, Tokyo, Japan)) で観察の上、写真撮影を行い、梗塞サイズ、心筋間質の線維化率、筋横断面積の測定をした (Matsushima et al., 2009).

梗塞サイズの測定は、マッソン・トリクローム染色標本を用いて、基部、中部および心尖部の3断面において、心内膜および心外膜に沿って測定した梗塞領域の長さの合計を平均し、全周囲長に対する割合 (%) を用いた。

非梗塞部の間質の線維化率の測定は、マッソン・トリクローム染色標本を用いて、対物レンズ20倍で拡大撮影を行い、各検体あたり7~8視野をランダムに選択した。デジタルパッドを用いマニュアルで各視野の非梗塞部における線維化部分と心筋部分を選択し、面積を測定した。線維化率は線維化面積のみと線維化面積と心筋細胞面積の和の比として算出した。心筋細胞内を走行する血管周囲は除外した。

筋横断面積の測定は、HE染色標本を用いて、対物レンズ40倍で拡大撮影を行い、1切片あたり20個の心筋細胞を撮像した。1検体あたり7~8視野撮像した上でデジタルデータとして解析した。核が中央に位置し、正円形に観察される心筋細胞を選択しコンピューター上でトレースの上、筋横断面積を測定した。各検体あたり約100個の心筋細胞面積を測定の上平均値として算出した。

1.2.7. ウェスタンブロット

・ タンパク抽出

- 1) マウスから摘出された心筋を液体窒素で凍結し-80℃で保存した。凍結保存したサンプルを氷上で解凍した。氷冷した10 × Cell Lysis Buffer (98035, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を蒸留水で10倍希釈し、Complete protease inhibitor cocktail (04693124001, Roche, Mannheim, Germany), 1 mM Phenylmethyl- sulfonyl fluoride (P7626, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (P2850, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (P5726, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加して1×Cell Lysis Buffer を作製した。
- 2) 1×Cell Lysis Buffer に組織サンプルを入れ、ダウンス型ホモジナイザー (Nippi, Tokyo, Japan) でホモジナイズした。ホモジナイズしたサンプルを微量高速冷却遠心器 (MX-307 (Tomy Digital Biology Co., Ltd., Tokyo, Japan)) で遠心分離し (15,000 g, 10分, 4℃), ペレットを拾わないように上清を新しいマイクロチューブに移した。長期保存する場合は、-80℃で冷凍保存した。

・ **タンパク濃度測定**

- 1) CELLSTAR 96 穴マイクロプレート (Greiner Bio-One International, Monroe, NC, USA) に Pierce BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, IL, USA) の Reagent A と Reagent B を 50:1 の割合で混合した working reagent を作製し, 各ウェルに 200 μ l ずつ分注した.
- 2) ブランクとして 1 ウェル空白を置き, 2 mg/ml のアルブミンスタンダード (23209, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ l ずつウェルに混合した.
- 3) 測定するサンプルは各 2 μ l ずつウェルに注入した.
- 4) 37°C で 30 分間インキュベート (NOD-700 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)) した.
- 5) マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, San Jose, California, USA) および Multiskan™ GO マイクロプレートスペクトロフォトメータ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 562 nm 波長の吸光度を計測した.
- 6) スタンダードの吸光度から得られる検量線を元にしてサンプルのタンパク濃度を算出した.
- 7) 上記のタンパク濃度測定は, スタンダード, サンプルとも同一サンプルを二重で各ウェルに置き, 2 つの平均値を採用した.

・ **サンプルの調製**

- 1) 上記サンプルを 1×Cell Lysis Buffer を用いて, 8 μ g/ μ l となるように調製した. 2-メルカプトノールを添加した Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) サンプル緩衝液: SDS-PAGE 用プレミックスタンパク質サンプルバッファー (#161-0737, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) と等量加え, 4 μ g/ μ l のサンプル溶液を作製.
- 2) ボルテックスミキサー (VORTEX-GENIE 2 Mixer (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)) で溶液を攪拌 (PowerMasher II (Nippi, Tokyo, Japan)) した. ヒートブロック (MULTI HEATER TYPE MH-36 (WAKAMORI CO., LTD, Tokyo, Japan)) を用いて, 100°C で 5 分間加熱した.
- 3) 短時間遠心してマイクロチューブの蓋に付着した水滴を落とし, ボルテックスミキサーでサンプル溶液を攪拌した.

- **SDS-PAGE**（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）

- 1) 電気泳動用のタンパク質ゲルは Criterion TGX プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) を使用した。使用するゲルの種類は泳動するサンプル数や標的タンパクによって適宜選択し、25-75 kDa のタンパク質を標的とする際は主に AnyKD の濃度ゲルを、75 kDa 以上の高分子量タンパク質を標的とする際は主に 7.5% の濃度ゲルを使用した。
- 2) 電気泳動槽（Criterion セル (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)）に SDS-PAGE 泳動緩衝液（25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS）を注入し、タンパク質ゲルをセットした。サンプルを標的タンパクに応じて各ウェルに 5-10 μ l（20-40 μ g）を注入し、サンプルレーンの端に分子量マーカー（#161-0377, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA）を注入した。
- 3) パワーサプライ（パワーパック 300 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)）に接続し、60 V の定電圧で 30 分間、引き続いて 120 V の定電圧でおよそ 1 時間 30 分泳動し、サンプルがゲルの先端まで移動するのを確認して泳動を終了した。

- **転写**

ウェット式転写を用いた。

- 1) Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜（Trans-Blot Turbo™ PVDF 転写パック (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)）をあらかじめメタノールで 1-2 分間浸した後に、転写緩衝液（25 mM Tris, 0.192 mM Glycine, 10% Methanol）に濾紙と共に浸した。
- 2) タンパク質ゲルをタンク式ブロッキング装置（Criterion™ ブロッター (1704070JA, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)）の陽極から順に、スポンジ→濾紙→PVDF 膜→ゲル→濾紙→スポンジとなるように重ね、20V の定電圧で 16 時間転写した。

- **ブロッキング～1 次抗体反応～2 次抗体反応**

ブロッキング後の PVDF 膜を 1×tris-buffered saline with polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (TBST) ^{*1} で振とうした後、ブロッキング溶液に移して、室温で 1 時間振とうした。ブロッキング溶液には 5% スキムミルク^{*2} もしくは 5% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin (BSA)) ^{*3} を用いた。

- 1) 1×TBST で振とうしながら洗浄（10 分間×3 回）した。

- 2) 1次抗体希釈液（ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈）に浸し、4℃で1晩抗体反応を行った。
- 3) 1×TBST で振とうしながら洗浄（10 分間×3 回）した。
- 4) 2次抗体希釈液（ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈）に浸し、室温で1時間抗体反応を行った。
- 5) 1×TBST で振とうしながら洗浄（10 分間×3 回）した。

*1:20×TBS を純水で 20 倍に希釈し、0.05%となるように Tween 20(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を加えた。

*2:5%スキムミルクの組成：5g スキムミルク, 100 ml 1×TBST.

*3:5%BSA の組成：5 g BSA (Nacalai Tesque, Tokyo, Japan) , 100 ml 1×TBST.

1次抗体, 2次抗体反応には以下を用いた。

ウサギ抗 BCKDHA ポリクローナル抗体 (1:1000, #138460, abcam, Cambridge, UK)

ウサギ抗 BCKDHA (phosphor S293) ポリクローナル抗体 (1:1000, #200577, abcam, Cambridge, UK)

ウサギ抗 BCAT2 ポリクローナル抗体 (1:1000, #95976, abcam, Cambridge, UK)

ウサギ抗 BCKDH kinase ポリクローナル抗体 (1:1000, #128935, abcam, Cambridge, UK)

ウサギ抗 PPM1K ポリクローナル抗体 (1:1000, #135286, Abcam, Cambridge, UK)

ウサギ抗 mTOR ポリクローナル抗体 (1:1000, #2972, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 phospho mTOR ポリクローナル抗体 (Ser2448) (1:1000, #2971, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 p70S6 kinase ポリクローナル抗体 (1:1000, #9202, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 phospho p70 S6 kinase ポリクローナル抗体 (Thr389) (1:1000, #9234, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 GAPDH モノクローナル抗体 (HRP Conjugate) (1:5000, #3683, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

HRP 標識ヤギ抗ウサギ標識 IgG (H+L) 二次抗体 (1:5000, ab97051, Abcam, Cambridge, UK)

- ・ 検出

- 1) PVDF 膜の全面を覆うように検出試薬をかけ、3 分間室温で静置した。検出試薬には ECL Prime (RPN2232, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) もしくは SuperSignal West Dura (34075, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用した。ウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステム (ChemiDoc XRS+ System (1708265J1NPC, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)) で可視化されたバンドを検出した。
- 2) 画像解析ソフト Image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて集積光濃度を定量して解析した。リン酸化抗体については、非リン酸化抗体で目的タンパクの発現量を標準化した。

1.2.8. 身体活動計

自発的身体活動量は、ケージ内（測定範囲は 30 cm × 20 cm）のマウスを赤外線ビームセンサーで測定する運動量測定装置（ACTIMO-10 (Shintech, Fukuoka, Japan)）を用いて測定した。20 mm 間隔の赤外線センサー（14 個 × 7 個）を 0.5 秒に 1 回スキャンし、マウスの移動をカウントし、連続 2 光軸遮蔽 1 カウントとした。24 時間の総カウント数を計測した。

1.2.9. 統計学的解析

統計処理は、GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。データは、平均値±標準誤差で示した。2 群間の平均値の差の検定はスチューデントの t 検定で行った。多群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い、有意差があった場合は Tukey 法による多重比較検定を行った。

1.3. 結果

1.3.1. 生存率

生存率は Control+Sham 群と KO+Sham 群は 100%, Control+MI 群は 50% (6/12), KO+MI 群は 58.3% (7/12) だった. Control+MI 群と KO+MI 群の間に有意差はなかった (図 1-3-1).

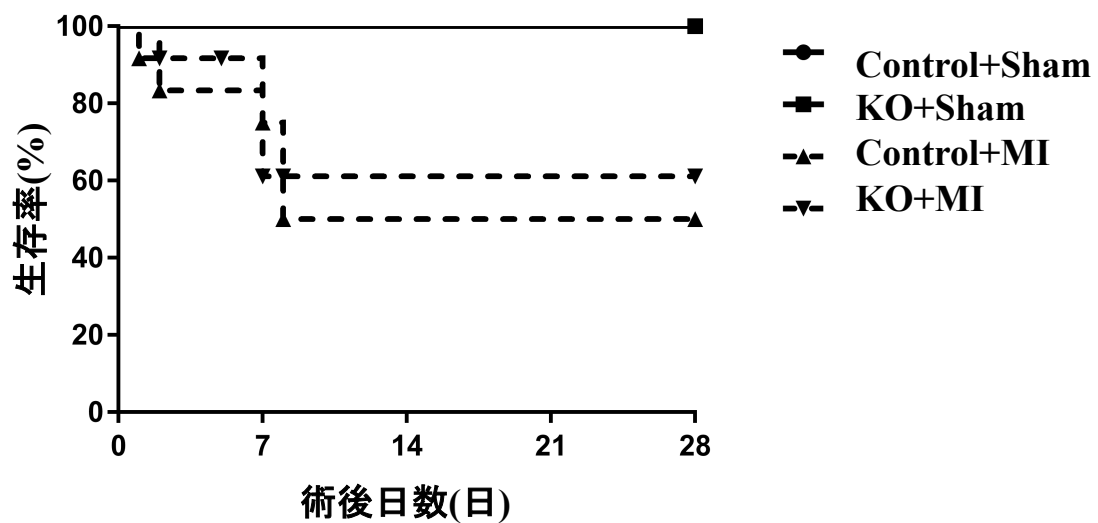


図 1-3-1. 術後 4 週目までの生存率

Control+Sham (n=8), KO+Sham(n=8), Control+MI (n=12), KO+MI (n=12).

以下の解析は生存したマウスで行った.

(Control+Sham (n=8), KO+Sham(n=8), Control+MI (n=6), KO+MI (n=7))

1.3.2. 動物特性

表 1 に体重, 心重量, 肺重量, 心エコー指標, 食餌摂取量の結果を示す. 代表的な心エコー画像を図 1-3-2 に示す.

体重, 食餌摂取量に各群で差はなかった. 心臓重量, 左室重量, 肺重量は Control+Sham 群と比較し Control+MI 群で有意に増加した. 心エコーで評価した左室内径や左室後壁厚は Control+Sham 群と比較し Control+MI 群で有意に増加し, 左室短縮率は有意に低下した. 心拍数は群間に差はなかった. 以上から, Control+MI 群は心室リモデリング及び心不全を呈した.

KO+MI 群で, Control+MI 群と比較して, 心臓重量, 左室重量, 肺重量が有意に低下した. また, 左室内径短縮率が有意に高く, 左室拡張末期径および収縮末期径が縮小した. 左室後壁厚に差はなかった. したがって, KO マウスにおいて, 心室リモデリングおよび心不全が軽減した.

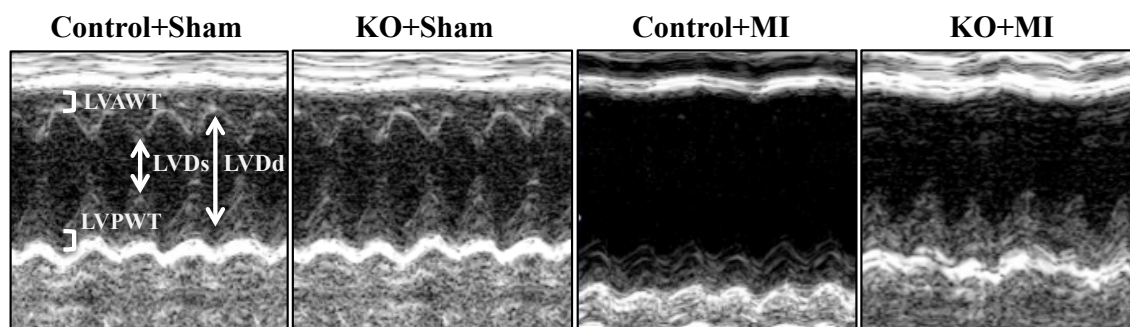


図 1-3-2. 代表的な心エコー画像

LVAWT : left ventricular anterior wall thickness ; 左室前壁厚

LVPWT : left ventricular posterior wall thickness ; 左室後壁厚

LVDd : left ventricular end-diastolic diameter ; 左室拡張末期径

LVDs : left ventricular end-systolic diameter ; 左室収縮末期径

表 1. 体重, 臓器重量, 心エコー指標, 食餌摂取量, 身体活動量の評価

	Control+ Sham	KO+ Sham	Control+ MI	KO+ MI
n	8	8	6	7
体重および臓器重量				
体重, g	26.7 ± 1.1	27.4 ± 1.3	28.4 ± 1.2	28.2 ± 1.3
心臓重量/体重, mg/g	5.0 ± 0.3	4.7 ± 0.4	6.4 ± 0.3*	5.3 ± 0.3 [†]
左室重量/体重, mg/g	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2*	3.7 ± 0.2 [†]
肺重量/体重, mg/g	5.8 ± 0.4	5.7 ± 0.5	8.1 ± 0.4*	5.9 ± 0.5 [†]
心エコー指標				
左室拡張末期径, mm	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.2	6.1 ± 0.2*	5.4 ± 0.2 [†]
左室収縮末期径, mm	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	5.3 ± 0.2*	4.1 ± 0.2 [†]
左室内径短縮率, %	72.1 ± 1.9	72.6 ± 2.6	14.1 ± 2.1*	24.7 ± 2.1 [†]
左室前壁厚, mm	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*
左室後壁厚, mm	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1*	1.1 ± 0.1*
心拍数, beats min ⁻¹	689 ± 16	696 ± 22	675 ± 13	689 ± 13
食餌摂取量, g/24 h	3.3 ± 0.4	3.6 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.5 ± 0.4
身体活動量, count/24 h	1552 ± 317	2617 ± 693	1092 ± 137	1339 ± 474

データは平均値±標準誤差.

* $p < 0.05$ vs. Control+Sham, [†] $p < 0.05$ vs. Control+MI.

1.3.3. MI 後不全心筋の組織学的評価

Control+MI 群と KO+MI 群の梗塞サイズに有意差はなく，同等の MI モデルが作製されていた(図 1-3-3 上段)．筋横断面積(Cross-sectional area)は，Control+MI 群と比較して KO+MI 群で有意に小さかった(図 1-3-3 中段)．また，間質の線維化は Control+MI 群と比較して KO+MI 群で有意に線維化率が減少した(図 1-3-3 下段)．

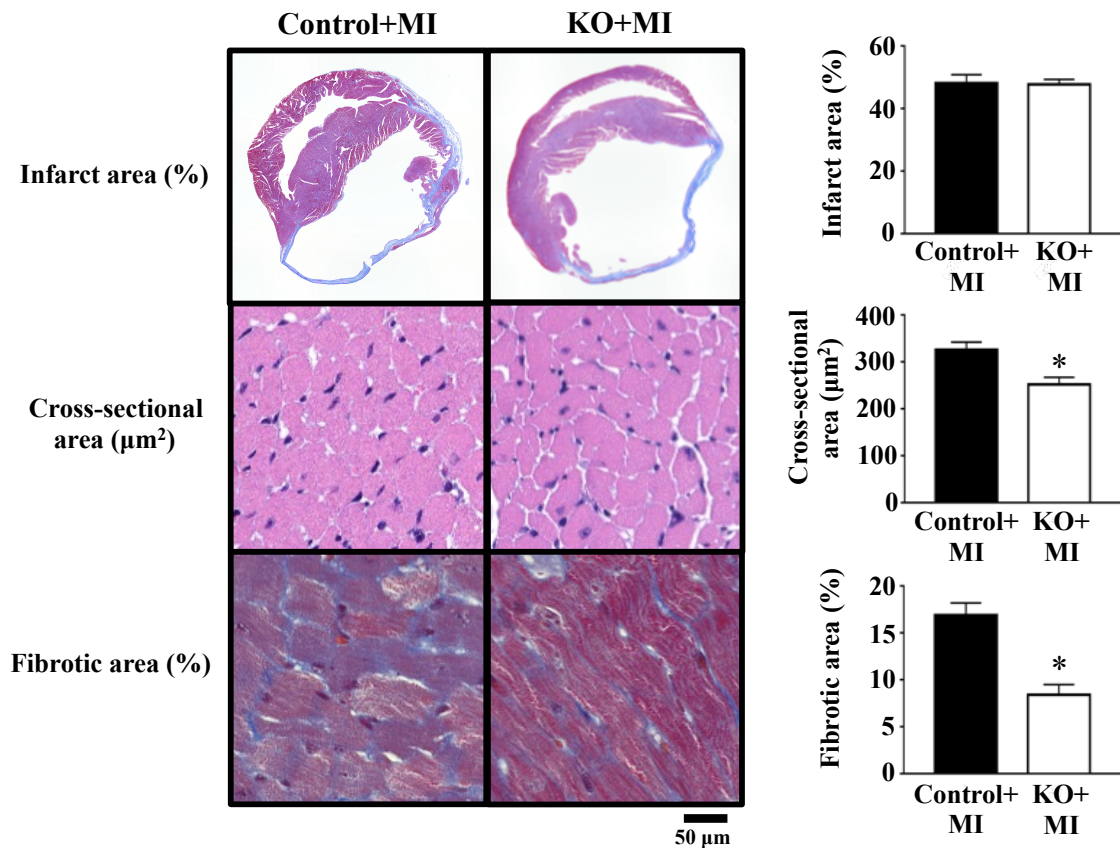


図 1-3-3. MI 後不全心筋の組織学的評価に関する代表的な画像と評価

上段：マッソン・トリクローム染色画像と梗塞領域の評価.

中段：HE 染色画像と心筋組織の筋横断面積の評価.

下段：マッソン・トリクローム染色画像と間質の線維化率に関する評価.

Control+Sham (n=5), Control+MI (n=5), KO+Sham (n=5), KO+MI (n=5).

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Control+MI.

1.3.4. BCAA 代謝酵素の発現に関する評価

図 1-3-4A に代表的なウエスタンブロットのバンドを示す. リン酸化した BCKDC の発現は Control+Sham 群と比較して, Control+MI 群で有意に増加し, KO+Sham 群, KO+MI 群では有意に減少した (図 1-3-4B). BCAT2 は群間で差はなかった (図 1-3-4C).

BCKDK は, 期待した通り, KO+Sham 群, KO+MI 群で発現はなく, Control+Sham 群と Control+MI 群で違いがなかった (図 1-3-4D).

PP2Cm は, Control+MI 群, KO+MI 群ともに, いずれの Sham 群と比較して有意に低下した. また, Control+Sham 群より KO+Sham 群の方が低値であった (図 1-3-4E).

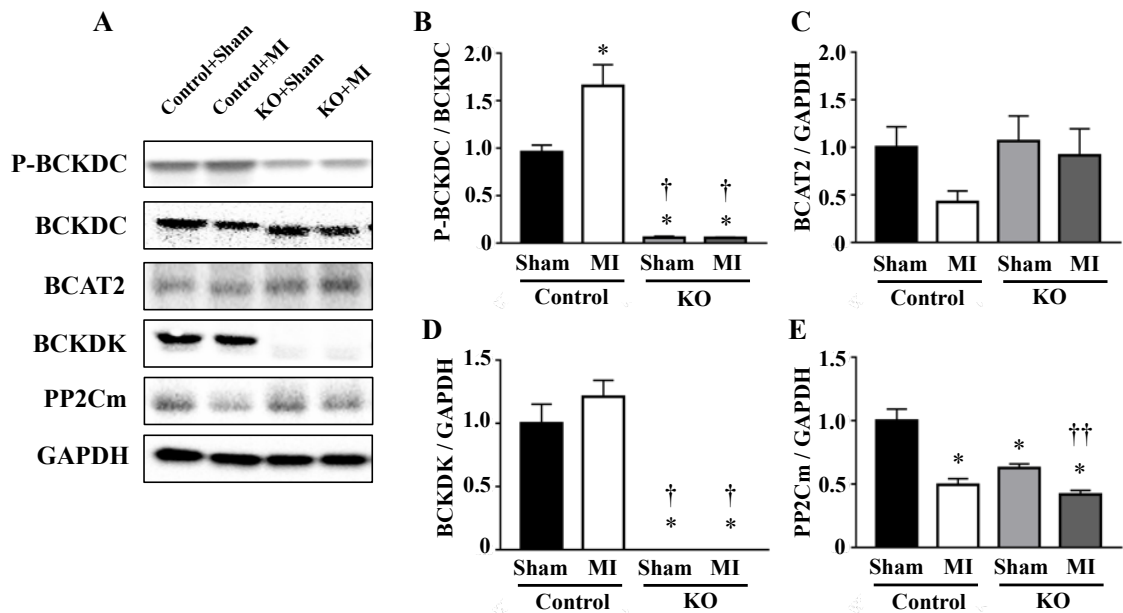


図 1-3-4. BCAA 代謝酵素の発現に関する評価

A : 代表的なウエスタンブロットのバンド. B : リン酸化した BCKDC の定量評価.

C : BCAT2 の定量評価. D : BCKDK の定量評価. E : PP2Cm の定量評価.

Control+Sham (n=5), Control+MI (n=6), KO+Sham (n=6), KO+MI (n=6).

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Control+Sham, † $p < 0.05$ vs. Control+MI,

†† $p < 0.05$ vs. KO+Sham.

1.3.5. mTOR, S6 kinase の発現に関する評価

続いて、mTOR と mTOR によって調整を受けるタンパク合成シグナルの S6 kinase を評価した。図 1-3-5A に代表的なウエスタンブロットのバンドを示す。リン酸化した mTOR の発現は、Control+Sham 群と比較して、Control+MI 群で有意に増加した (図 1-3-5B)。一方、KO+MI 群では、Control+MI と比較してリン酸化した mTOR の発現が有意に低下した。リン酸化した S6 kinase は、Control+MI 群と比較して、KO+MI 群で有意に低下し、Control+MI 群と比較して、KO+Sham 群および KO+MI 群で有意に低下した (図 1-3-6C)。

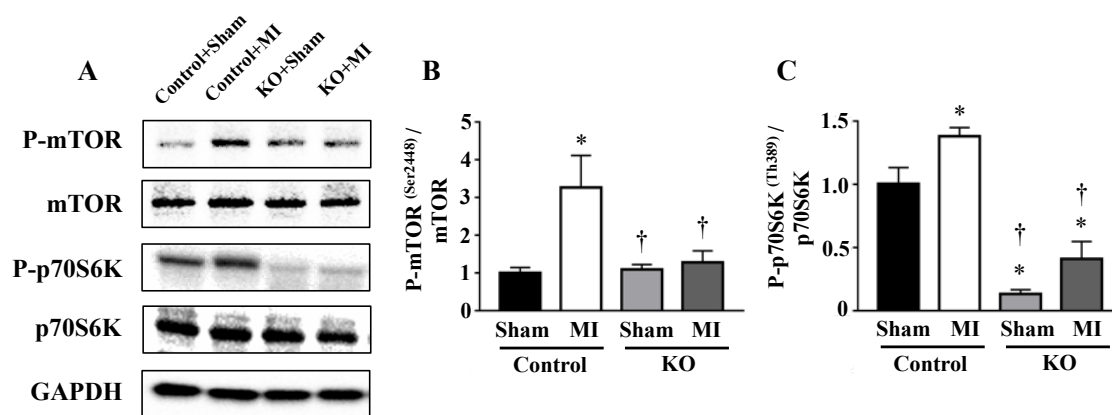


図 1-3-5. mTOR, S6 kinase の発現の評価

A : 代表的なウエスタンブロットのバンド. B : リン酸化した mTOR の定量評価.

C : リン酸化した S6 kinase の定量評価.

Control+Sham (n=5), Control+MI (n=6), KO+Sham (n=4), KO+MI (n=6).

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Control+Sham, † $p < 0.05$ vs. Control+MI.

1.3.6. 骨格筋重量の比較検討

図 1-3-6 に四頭筋(Quadriceps femoris), 腓腹筋(Gastrocnemius), ヒラメ筋(Soleus)および長趾伸筋(Extensor digitorum longus)および下肢骨格筋総重量(Skeletal muscle weight)を示す. 総重量およびいずれの骨格筋重量においても 4 群間に有意差はなかった.

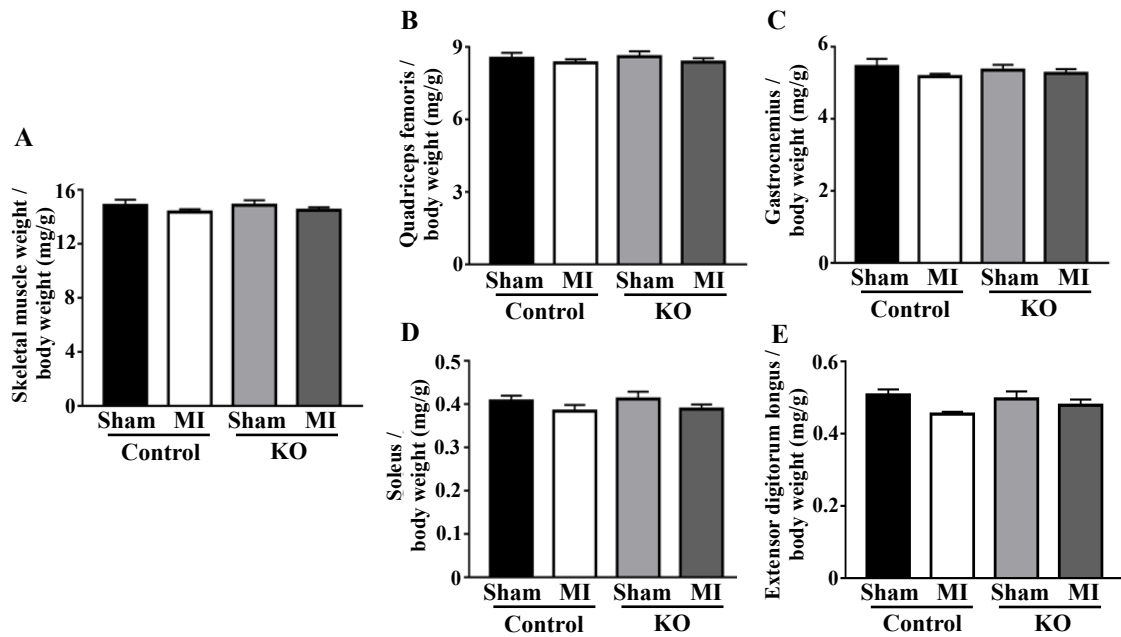


図 1-3-6. 骨格筋重量に関する評価

A: 下肢骨格筋総重量/体重. B: 四頭筋/体重. C: 腓腹筋/体重. D: ヒラメ筋/体重. E: 長趾伸筋/体重.

Control+Sham (n=7), Control+MI (n=5), KO+Sham (n=5), KO+MI (n=6).

データは平均値±標準誤差.

1. 4. 考察

本研究において、MI 後不全心筋で、BCAA 代謝の律速酵素である BCKDC のリン酸化（不活性型）と mTOR のリン酸化が有意に増加した。このことは不全心筋において、BCAA 代謝が障害されていることを意味しており、先行研究の結果を支持するものであった。さらに、筋特異的 BCKDK-KO マウスでは、BCKDC のリン酸化および mTOR のリン酸化が低下し、心室および心筋リモデリングが改善した。これらの知見より、BCKDK の特異的な抑制は心不全の BCAA 代謝障害を改善し、心筋リモデリングに対して有用な治療法となる可能性が示された。一方、BCKDK 欠損による骨格筋への影響はなかった。

1. 4. 1. 心筋リモデリングと心筋エネルギー代謝

MI 後の心筋リモデリングの形成・進展には様々な分子機序が関わっている。代表的な分子機序として、RAA 系や交感神経系などの神経体液性因子の活性化が挙げられる（日本循環器病学会/日本心不全学会合同ガイドライン，2017 年改訂版より引用）。これらの抑制薬は臨床応用されており、心不全治療の中心を担っている。酸化ストレスの亢進や炎症性サイトカインの上昇などの慢性炎症も機序の一つと考えられている (Levine et al., 1990; Tsutamoto et al., 1998)。一方、不全心筋においては metabolic remodeling と呼ばれる代謝基質の利用能の変化が示されている (De Jong and Lopaschuk, 2017)。一般的に心臓は糖代謝と比較して脂肪酸代謝優位にエネルギー産生が行われており、大量の ATP 産生により効率よく心臓のポンプ機能を維持している。不全心筋において、脂肪酸の利用能が低下し、糖代謝へシフトしている。この metabolic remodeling は心臓におけるエネルギー効率を低下させるが、これは不全心筋における代償機構の一つとも考えられている。アミノ酸の心筋代謝での役割の相対的な小ささからあまり研究は進んでいないが、最近、BCAA 代謝障害と mTOR リン酸化の影響が知られる様になり注目されている。

1. 4. 2. mTOR のリン酸化と心筋リモデリング

アミノ酸、特に必須アミノ酸である BCAA はミトコンドリア内の律速酵素で代謝されエネルギー基質として用いられる。心筋は豊富なミトコンドリアを有しており、エネルギー代謝の中心である (Bayeva et al., 2013)。不全心筋では様々なレベルでのミトコンドリア障害が起こっていることが知られている (Marin-Garcia and Goldenthal, 2008; Tsuburaya, 2017)。例えば、電子伝達系機能の障害、クエン酸回路の障害、ミトコンドリア量の減少、脂肪酸酸化障害などである。最近の報告では、これらのミトコンドリア障害とともに不全心筋において BCAA 代謝の律速酵素で

ある BCKDC が不活化され、結果として心筋において BCAA が蓄積していることが示されている (Wang et al., 2016). BCAA 代謝障害がどのように心筋障害に影響するかはエネルギー代謝の観点より、過剰な mTOR リン酸化によって説明される. mTOR は心筋において極めて重要な役割を果たしていると報告されている. mTOR の阻害によって、TAC 後の圧負荷肥大心および腹部大動脈—大静脈瘻後の求心性肥大が抑制された (Ikeda et al., 2015; McMullen et al., 2004). このことは肥大シグナルである mTOR-S6 kinase の抑制およびタンパク合成の抑制が関わっていた. また、S6 kinase の選択的阻害によって、MI 後の心筋リモデリングが抑制されることが報告されている (Di et al., 2012). 今回の我々の研究でも BCKDK の欠損により、mTOR のリン酸化が抑制され、結果として S6 kinase のリン酸化も抑制された. したがって、本研究における心筋リモデリング改善にはこのタンパク合成経路の抑制が関わっていると考えられる. 今回のモデルにおける mTOR の抑制と心筋リモデリング改善の間の因果関係は明らかにできておらず、今後の研究課題である. また、BCKDK 欠損による心筋組織中の BCAA 蓄積は共同研究者である名古屋大学大学院生命農学研究科で測定を進めている.

1.4.3. mTOR シグナルとオートファジー

mTOR 活性化のもう一つの重要な役割はオートファジーを抑制する点である. オートファジーは心筋を保護する働きが知られている. オートファジーは、心筋細胞における細胞内タンパク質の品質管理の維持や心筋細胞内の危険シグナルの除去を行っていると考えられている. TAC 後の不全心においてオートファジー空砲が観察され、オートファジー活性が増加している (Nishida et al., 2009). 一方、心筋特異的 Autophagy related gene 5 (Atg5) 欠損マウスでは、オートファジーが抑制され、心筋リモデリングが進展した (Nakai et al., 2007). さらに、オートファジーを抑制する Mst1 の欠損によって、MI 後の心筋リモデリングが改善したとの報告がある (Maejima et al., 2013). したがって、mTOR の活性化はオートファジーを抑制することによって、心筋リモデリングを悪化させる可能性がある. 今回我々が観察した BCKDK 欠損による MI 後心筋リモデリングの改善に、mTOR リン酸化抑制とオートファジーの活性の変化を介した機序が関わっているかもしれない. 今回の研究ではこの点を明らかにすることができておらず、今後の研究課題である.

1. 4. 4. BCAA 代謝と骨格筋

BCKDK 欠損による BCAA 代謝の亢進は、骨格筋における BCAA の減少をもたらし、骨格筋萎縮の原因となるかもしれない。心筋リモデリングで有用な BCKDK 欠損による BCAA 代謝の亢進が、骨格筋では不利益をもたらす可能性が考えられた。今回の我々の検討では、BCKDK 欠損によって MI 後心不全マウスの骨格筋萎縮は導かれなかった。今後、骨格筋萎縮が存在する心不全モデルの確立や、詳細な分子学的機序の検討が必要と考えられるが、本研究における骨格筋萎縮に対する BCAA 補充治療の有効性に関する検討は、アンジオテンシン誘発性骨格筋萎縮モデルを用いて第 2 章で検証した。

第2章（研究2）アンジオテンシン II 誘発性骨格筋萎縮に対する，分岐鎖アミノ酸(BCAA)補充治療法に関する研究

2.1. 緒言

世界的な高齢者人口の増加とともに，サルコペニアに対する関心が高まっている．サルコペニアは骨格筋萎縮によって特徴付けられる病態で，成因は加齢だけでなく，身体活動量の低下（不活動），低栄養，悪性疾患，心血管疾患や内分泌疾患などの慢性疾患，臓器不全を背景に生じる（図 2-1-1）．実際，心不全をはじめとする心血管疾患では，サルコペニアの有病率は増加傾向にあることが報告されており，臨床的にも大きな問題となっている（Dos Santos et al., 2017）．

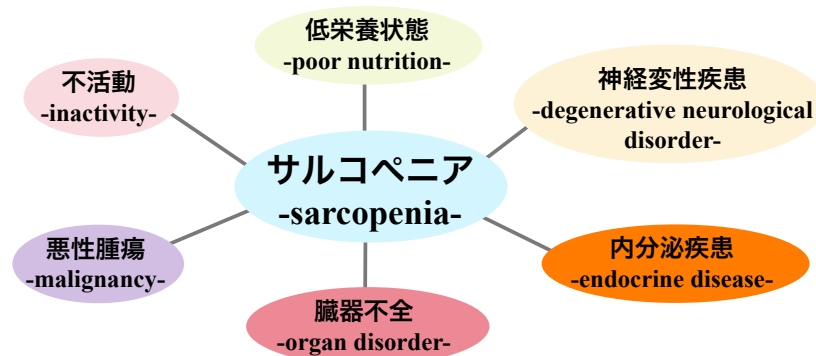


図 2-1-1. サルコペニアの成因について

一般的に，骨格筋萎縮の原因は，タンパクの合成と分解の不均衡によって生じることが報告されている（Kinugawa et al., 2015）．この不均衡には様々な誘因が存在する．慢性炎症は骨格筋萎縮の代表的な機序の一つであり，TNF- α ，IL-1 β などの炎症性サイトカインの活性化がユビキチン-プロテアソーム系を介して，タンパク分解系を亢進させる（Yoshida et al., 2013）．また，RAA系の過剰な活性化，特にアンジオテンシン II（Ang II）の過剰発現が，タンパク分解を亢進させるだけでなく，mTORのリン酸化抑制を介して，骨格筋萎縮を進行させる（Basso et al., 2007; Dai et al., 2011; Fukushima et al., 2014; Harada et al., 1999; Takada et al., 2013）．

実際に我々は，浸透圧ポンプを用いて，持続的に Ang II を皮下投与したマウスにおいて，投与4週目で有意な体重および骨格筋重量が低下し，筋横断面積が縮小するとともに，運動能力が低下することを報告した（Kadoguchi et al., 2018）．この時 Ang II によって，骨格筋の mTOR に関連するタンパク合成シグナルである Akt と S6 kinase のリン酸化が抑制され，タンパク分解シグナルである Atrogin-1 と MuRF-1

(Muscle RING-Finger Protein-1 (筋肉 RING-Finger 蛋白-1)) が亢進した結果、タンパク合成・分解の不均衡が生じ、骨格筋萎縮が引き起こされたと考えられた。

BCAA は、筋タンパク質の構成成分として重要な栄養素であると共に、特にロイシンは mTOR のリン酸化を促進し、タンパク合成を高める働きを持つことが広く知られている (Nair and Short, 2005)。過去の研究では、加齢ラット (72 週齢) に対する BCAA 投与が骨格筋萎縮を有意に抑制したとする報告 (Pansarasa et al., 2008) や、MAC16 腫瘍マウスへの BCAA 投与が骨格筋重量の低下を有意に抑制する報告 (Eley et al., 2007) がある。臨床研究では、肝硬変患者への BCAA 投与が骨格筋萎縮を抑制し、生命予後を改善させることが報告されている (Hanai et al., 2015)。

昨今、循環器領域においても、BCAA 投与による骨格筋萎縮の抑制と運動能力の改善効果が期待されているが、心不全をはじめとする心血管疾患における BCAA の有効性について十分な検証はなされていない。

本研究の実験モデルには、第 1 章における MI 後心不全モデルを用いて骨格筋萎縮を評価し、BCAA 投与の有効性について検証を行うことが望ましかったが、4 週間の経過では、骨格筋萎縮が観察されなかった。今後、心不全骨格筋萎縮モデルの確立が必要であるが、第 2 章では心血管疾患の代表的な機序によって骨格筋萎縮が確立した Ang II 誘発性骨格筋萎縮モデルを用いて検証を行った。このモデルは、心不全の原因の一つである心肥大の確立したモデルでもある。

本研究では、「BCAA 補充治療は、Ang II 誘発性骨格筋萎縮に対して保護的に作用し、運動能力を改善させる」という仮説を立て検証を行なった。

2.2. 実験方法

以下に本研究で用いた実験材料の由来および調整法を示した。

2.2.1. 実験動物

10-12 週齢の雄マウス (C57BL/6J) はホクド株式会社から購入した。第 2 章の方法 2.2.1 と同様の環境と餌で飼育し、食餌摂取量を記録した。BCAA 投与群には、3%BCAA 水溶液を自由飲水で摂取させた。本研究は北海道大学大学院医学研究院における倫理委員会の承認を得て行い、全ての動物実験手技並びに飼育保管は、「北海道大学動物実験に関する規程」を遵守して実施した。

2.2.2. 3%BCAA 水溶液の調整

ロイシン、イソロイシン、バリンを 2:1:1 の比率で調合し、3% (v/w) (3g の調

合した BCAA が水 100 ml 中に入っている)の濃度で溶解して、3%BCAA 水溶液を作製した。

L-ロイシン (128-00855, Wako Chemical, Tokyo, Japan)

L(+)-イソロイシン (125-00865, Wako Chemical, Tokyo, Japan)

L-バリン (222-00085, Wako Chemical, Tokyo, Japan)

2.2.3. Ang II 充填ポンプの埋没術

・ ポンプの準備

- 1) Ang II (Angiotensin II human A9525-10MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を生理食塩水に溶解し、1000 ng/kg/min の濃度に調製した。
- 2) 溶解した Ang II 溶液を 1 ml シリンジと付属の針 (円筒型) を用いて、浸透圧ポンプ (ALZET MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004, DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA) へ 200 μ l 注入し蓋をした。Ang II 溶液の代わりに生理食塩水を注入したポンプを Vehicle 用とした。
- 3) 生理食塩水を満たした 5 ml コニカルチューブ (352063, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 内に Ang II 溶液あるいは生理食塩水を注入したポンプを浸し、37°C 環境下にて 24~48 時間インキュベートした。

・ ポンプの埋没方法

- 1) 第 2 章方法 2.2.2 に用いた 3 種混合麻酔を用いて麻酔導入後、マウスを伏臥位に固定した。
- 2) 後頸部 (図 2-1-2 赤矢印) にハサミで切開を加え、背部～尻尾の皮下に、鉗子を用いて鈍的に剥離を行い、ポンプを埋没するスペースを作製した (図 2-1-2 灰色部分)。
- 3) コニカルチューブからポンプを取り出し、蓋側が頭側になるようにピンセットでスペースに収納した。4-0 シルク縫合糸で後頸部の切開を縫合した。

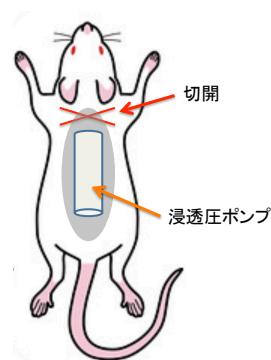


図 2-1-2. 浸透圧ポンプ埋没方法

2.2.4. 実験プロトコル

10-12 週齢の C57BL/6J マウスに浸透圧ポンプを皮下に植え込み、無作為に 2 群に分け、Ang II (1000ng/kg/min) あるいは同容量の生理食塩水 (Vehicle) を 4 週間投与し、それぞれ Ang II 群、Vehicle 群とした。さらに、それぞれのマウスを BCAA (ロイシン：イソロイシン：バリン=2:1:1, 3%水溶液) 投与あるいは非投与群に分け、植え込み術当日より飲水投与し、実験は、Vehicle 群 (n=8)、Vehicle+BCAA 群 (n=8)、Ang II 群 (n=9)、Ang II+BCAA 群 (n=9) の 4 群を作製した。4 週間後に、血圧測定、心エコー検査、運動能力評価を行った。

第 2 章の方法 2.2.2 に用いた 3 種混合麻酔で十分な麻酔深度を得た後に、下大静脈からの血液採取で安楽死させ、速やかに心臓、肺、下肢骨格筋（四頭筋(Quadriceps femoris)、腓腹筋(Gastrocnemius)、ヒラメ筋(Soleus)および長趾伸筋(Extensor digitorum longus)）を採取した。組織は湿重量を測定し、後に行われる解析のため保存した。組織重量は、前脛骨長 (Tibial length) で補正した。

2.2.5. 血圧測定

マウス固定装置 (ICN-3, ICM, Tokyo, Japan) を用いてマウスを固定し、非観血血圧測定装置 (BP-98A-L, Softron, Tokyo, Japan) のセンサーを尾にセットし、保温しながら尾動脈に十分な血流量が流れ、血管内が体内動脈圧と同じ圧になるのを待った。マウスの体動、その他ノイズが混入しないように注意して 3 回測定し、その平均値をその個体の収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧、脈拍数とした。

2.2.6. 心エコー検査

第 1 章の方法 1.2.5 に準じて実施した。

2.2.7. トレッドミル

運動能力は小動物用トレッドミル (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) (図 2-1-3A) を用いた漸増負荷運動での持久能力を評価した (Takada et al., 2015; Takada et al., 2016; Yokota et al., 2009)。トレッドミル上にマウスを置き、トレッドミル傾斜角度を 0 度として 10 分間の安静の後に、速度 6 m/分でウォーミングアップ運動を開始した。10 分後にトレッドミルの傾斜角度を 10 度として、2 分毎に 2 m/分の速度を漸増した (図 2-1-3B)。漸増運動負荷中にマウスが途中で休まないようにトレッドミル後方のショッカープレートで電気刺激を与えた。その際、最大の電気刺激を与えても 10 秒以上電気刺激板から動かなくなった時点をマウスが「疲労困憊」に至ったと定義して測定を終了した。指標として、走行時間と速

度の積から走行距離を算出した。また、マウスの体重を考慮した垂直方向の仕事量(=体重×重力加速度×垂直方向の走行距離)を算出した。

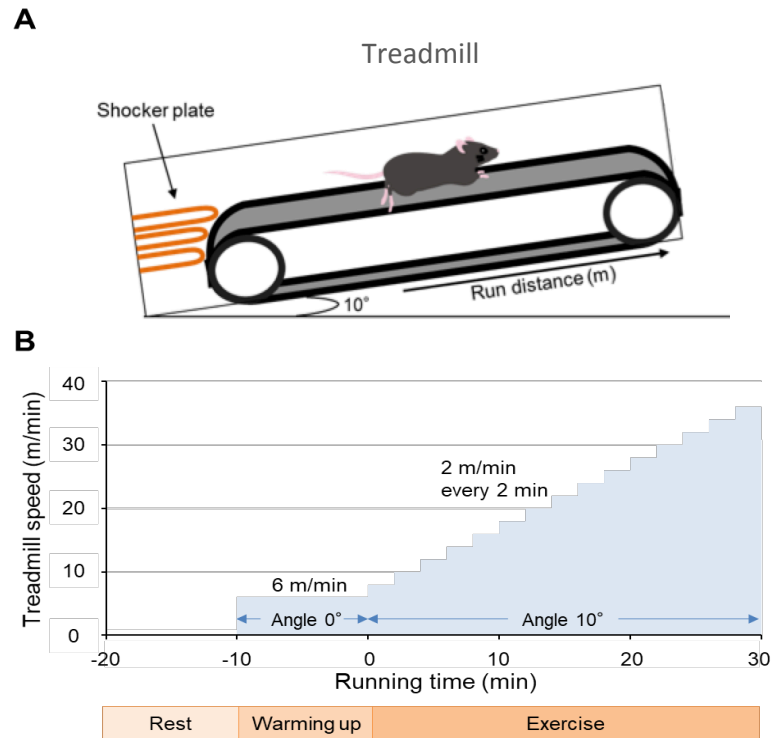


図 2-1-3. 小動物用トレッドミル (A) と運動プロトコル (B)

2.2.8. 組織学的解析

マウスの安楽死後、直ちに下肢骨格筋を摘出して速やかに周囲組織をトリミングした。OCT コンパウンド (Tissue-Tek O.C.T. コンパウンド (4583, Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)) に試料を一度なじませた後、OCT コンパウンドが満たされたクリオモルドプラスチック包埋皿 (4566, Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) に試料を入れた。イソペンタンを注いだ容器を液体窒素に浮かべ、イソペンタンが十分に冷えた後に試料が入った包埋皿をイソペンタンの上に浮かべて瞬間凍結により包埋した。凍結された下肢骨格筋組織は、クリオスタット HM500-OM (MICROM, Walldorf, Germany) を用いて 12 μ m の厚さで連続横断切片を作製し、HE 染色および Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 染色を行なった。

・ HE 染色

凍結切片を風乾させた後、第 1 章の方法 1.2.6 に準じて実施した。

• NADH 染色

凍結切片を風乾させた後、切片を 1.6 mg/ml の NADH (Wako chemicals, Tokyo, Japan) と 2 mg/ml の Nitro blue tetrazolium (298-83-9, Wako chemicals, Tokyo, Japan) を含む 0.05 M Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) で 37°C, 30 分間インキュベートした. 30%→60%→90%→60%→30%アセトン液に入れ, 3 回水洗後にグリセリンゼリーにて封入した.

染色された切片は蛍光顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE, Osaka, Japan) の明視野モードで観察した. なお NADH 染色により得られる結果は, ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I (Complex I) の活性を反映するとされており, 染色像の濃い部分はミトコンドリア活性が高いことを示す. 骨格筋組織でミトコンドリアは遅筋線維である I 線維に多いことから, I 線維は II 線維より強く濃染される.

2.2.9. ウェスタンブロット

第 1 章の方法 1.2.7 に準じて実施した.

1 次抗体, 2 次抗体は以下を用いた.

ウサギ抗 Akt ポリクローナル抗体 (1:1000, #9272, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 phospho Akt ポリクローナル抗体 (Thr473) (1:1000, #9271, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 mTOR ポリクローナル抗体 (1:1000, #2972, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 phospho mTOR ポリクローナル抗体 (Ser2448) (1:1000, #2971, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 p70 S6 kinase ポリクローナル抗体 (1:1000, #9202, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 phospho p70 S6 kinase ポリクローナル抗体 (Thr389) (1:1000, #9234, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

ウサギ抗 MuRF-1 モノクローナル抗体 (1:5000, ab172479, Abcam, Cambridge, UK)

ウサギ抗 Fbx32 (Atrogin-1) モノクローナル抗体 (1:5000, ab168372, Abcam, Cambridge, UK)

ウサギ抗 GAPDH モノクローナル抗体 (HRP Conjugate) (1:5000, #3683, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)

HRP 標識ヤギ抗ウサギ標識 IgG (H+L) 二次抗体 (1:5000, ab97051, Abcam, Cambridge, UK)

2.2.10. 統計学的解析

統計処理は, GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った. データは, 平均値±標準誤差で示した. 多群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い, 有意差があった場合に Tukey 法による多重比較検定を行った.

2.3. 結果

2.3.1. 動物特性

表 2 に血圧, 心重量, 心エコー指標, 食餌摂取量の結果を示す.

血圧は, Ang II 投与群 (Ang II, Ang II+BCAA) において, Vehicle 群 (Vehicle, Vehicle+BCAA) と比較して有意に上昇した. Ang II 投与群で心重量は有意に増加し, 左室内径は有意に縮小し, 左室壁厚は増加した. したがって Ang II 誘発性の高血圧によって求心性左室肥大が生じた. 一方, BCAA 投与は, いずれの指標においても影響はなかった. さらに食餌摂取量は 4 群間で有意差はなかった.

表 2. 血圧, 心重量, 心エコー指標, 食餌摂取量の評価

	Vehicle	Vehicle + BCAA	Ang II	Ang II + BCAA
n	8	8	9	9
収縮期血圧, mmHg	106 ± 7	105 ± 7	158 ± 14*	159 ± 10*
拡張期血圧, mmHg	78 ± 7	78 ± 8	112 ± 9*	114 ± 11*
平均血圧, mmHg	87 ± 6	88 ± 7	127 ± 9*	128 ± 7*
心臓重量/前脛骨長, mg/mm	5.2 ± 0.2	5.3 ± 0.2	6.4 ± 0.3*	6.4 ± 0.5*
左室重量/前脛骨長, mg/mm	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1	5.0 ± 0.3*	5.2 ± 0.4*
左室拡張末期径, mm	3.8 ± 0.3	3.7 ± 0.2	2.9 ± 0.3*	2.6 ± 0.3*
左室収縮末期径, mm	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2*	0.6 ± 0.1*
左室内径短縮率, %	67.1 ± 2.9	65.7 ± 2.6	78.5 ± 5.0*	78.6 ± 4.3*
左室前壁厚, mm	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1*	1.2 ± 0.1*
左室後壁厚, mm	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1*	1.4 ± 0.1*
心拍数, beats min ⁻¹	667 ± 28	666 ± 27	623 ± 53	654 ± 25
食餌摂取量, g/24 h	3.1 ± 1.5	3.4 ± 0.6	3.9 ± 1.5	3.6 ± 0.8

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Vehicle.

2.3.2. 骨格筋萎縮に対する BCAA 投与の有効性の評価

図 2-3-1C に代表的な腓腹筋の HE 染色画像を示す. Ang II 群では, Vehicle 群と比較して, 体重, 下肢骨格筋重量および筋横断面積は有意に低下した(図 2-3-1A, B, D). 以上から, Ang II 誘発性骨格筋萎縮が生じた.

着目すべきは, Ang II+BCAA 群では, Ang II 群と比較して, いずれの指標においても有意に増加した. したがって, BCAA 投与によって, Ang II 誘発性骨格筋萎縮が軽減することが明らかとなった.

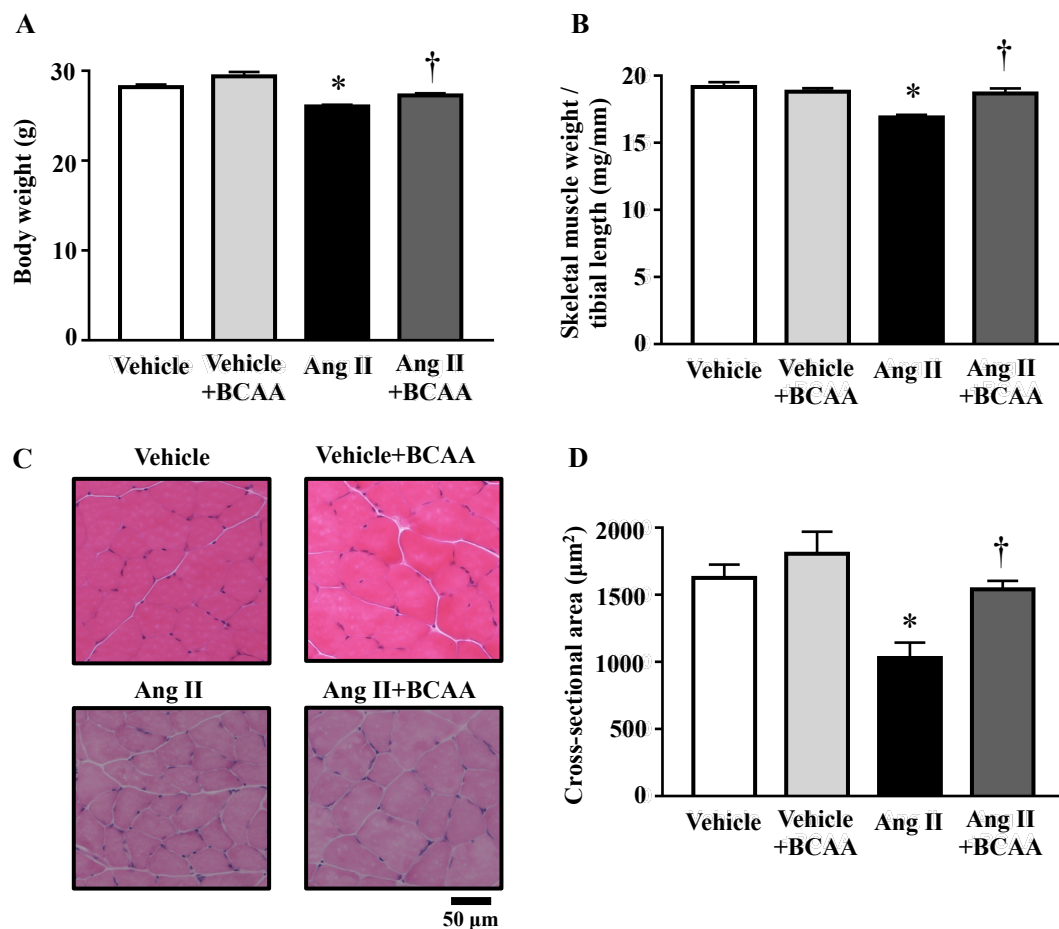


図 2-3-1 体重, 骨格筋萎縮の評価

A: 体重. B: 骨格筋重量/前脛骨長. C: 代表的な腓腹筋の HE 染色画像.

D: 腓腹筋の筋横断面積.

Vehicle (n=8), Vehicle+BCAA (n=8), Ang II (n=9), Ang II+BCAA (n=9).

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Vehicle, † $p < 0.05$ vs. Ang II.

2.3.3. 骨格筋におけるタンパク合成・分解に関わるシグナルの評価

図 2-3-2A に骨格筋におけるタンパク合成・分解に関わるシグナルの代表的な Western blot バンドを示す。タンパク合成に関わるシグナルとしては、Akt, mTOR および S6 kinase を評価し、タンパク分解に関わるシグナルとして、MuRF-1, Atrogin-1 を評価した。Ang II 群では、Vehicle 群と比較して、リン酸化した Akt, mTOR および S6 kinase の発現が有意に低下し (図 2-3-2B-D), MuRF-1 および Atrogin-1 の発現が有意に増加した (図 2-3-2E, F)。したがって、Ang II によってタンパク合成・分解の不均衡が生じていた。

Ang II+BCAA 群については、Ang II 群と比較して、リン酸化した Akt の発現に変化はなく、リン酸化した mTOR および S6 kinase が有意に増加した (図 2-3-2B-D)。一方で、MuRF-1 および Atrogin-1 は両群で変化がなかった (図 2-3-2E, F)。したがって、BCAA 投与によって、タンパク合成に関するシグナルが活性化し、このことが Ang II 誘発性骨格筋萎縮の軽減と関わっていると考えられた。

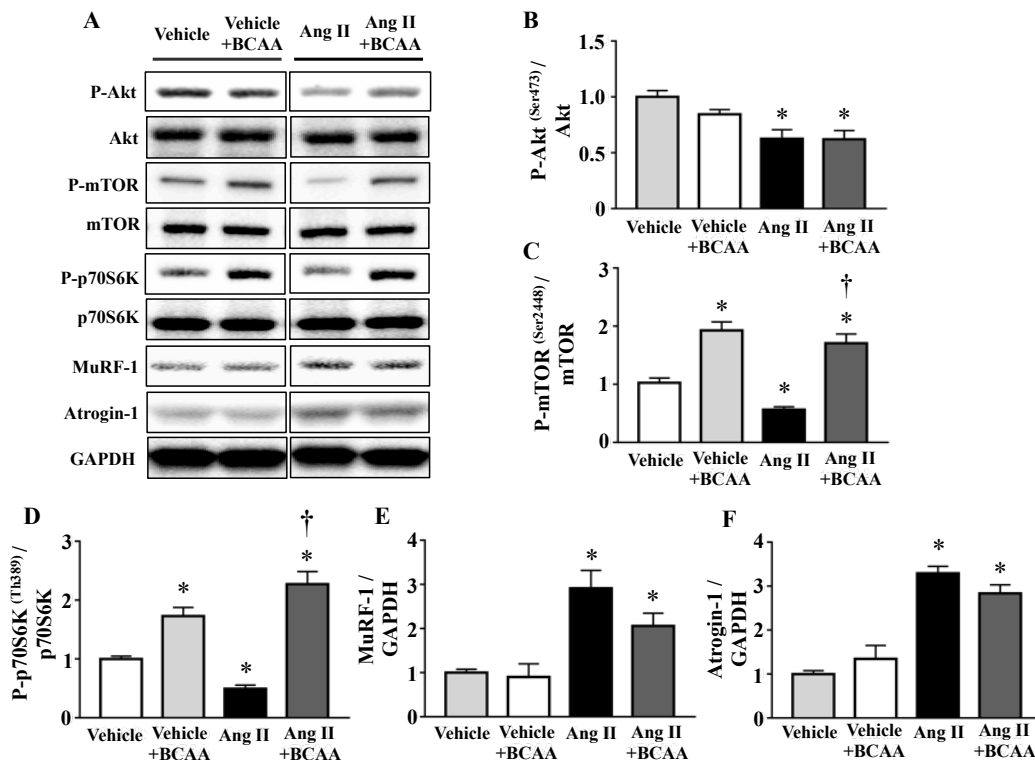


図 2-3-2. 骨格筋におけるタンパク合成・分解に関わるシグナルの評価

A: 代表的なウエスタンブロットのバンド。B: リン酸化した Akt の定量評価。
C: リン酸化した mTOR の定量評価。D: リン酸化した p70 S6 kinase の定量評価。
E: MuRF-1 の定量評価。F: Atrogin-1 の定量評価。
Vehicle (n=8), Vehicle+BCAA (n=5), Ang II (n=8), Ang II+BCAA (n=6)。
データは平均値±標準誤差。* $p < 0.05$ vs. Vehicle, † $p < 0.05$ vs. Ang II。

2.3.4. 運動能力の評価

仕事量, 走行距離, 走行時間は, Vehicle 群と比較して Ang II 群で有意に低下した (図 2-3-3A-C). Ang II+BCAA 群では, AngII と比較して, 走行距離および走行時間は増加傾向があり, 仕事量は有意に増加した (図 2-3-3A). したがって, BCAA 投与によって Ang II 誘発性骨格筋萎縮の軽減を介して, 運動能力が改善することが示唆された.

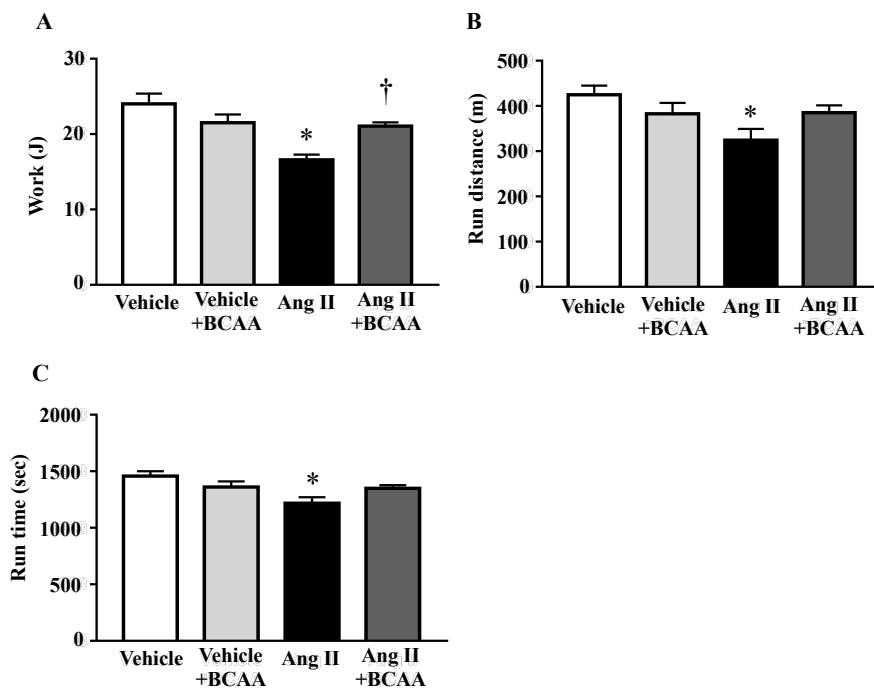


図 2-3-3. トレッドミルによる運動能力の評価

トレッドミルで評価した仕事量 (A), 走行距離 (B), 走行時間 (C).

Vehicle (n=8), Vehicle+BCAA (n=6), Ang II (n=7), Ang II+BCAA (n=7).

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Vehicle, † $p < 0.05$ vs. Ang II.

2.3.5. 骨格筋部位別の BCAA の有効性に関する評価

骨格筋は、複数の筋肉群で構成されているため、Ang II の作用と BCAA の有効性について骨格筋部位別に評価を行なった。筋線維は、速筋線維と遅筋線維に大別され、長趾伸筋は速筋線維、ヒラメ筋は遅筋線維優位の筋で、大腿四頭筋と腓腹筋は混合線維である。

Ang II 群では、Vehicle 群と比較して、いずれの筋肉群の重量も有意に低下した (図 2-3-4A-D)。Ang II+BCAA 群では、Ang II 群と比較して、大腿四頭筋と長趾心筋で有意に増加し (図 2-3-4A, C)、腓腹筋とヒラメ筋の重量は有意な変化がなかった (図 2-3-4B, D)。したがって、Ang II の作用によって骨格筋萎縮は、いずれの筋肉群にも生じる一方、BCAA の有効性は、遅筋線維より速筋線維に対して効果的である可能性が示唆された。

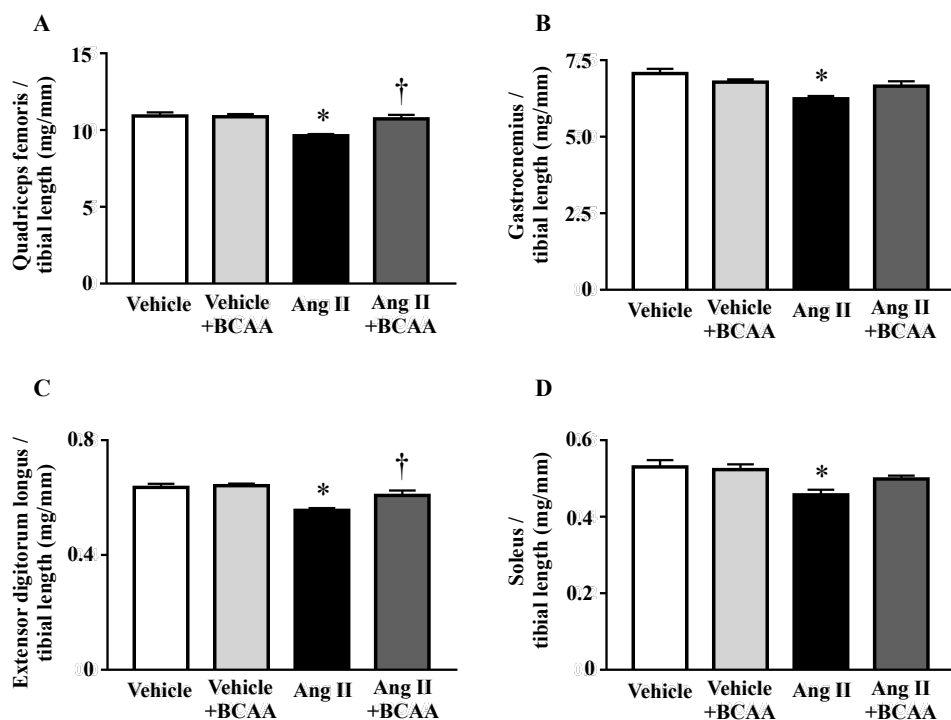


図 2-3-4. 骨格筋部位別の評価

A : 大腿四頭筋/前脛骨長. B : 腓腹筋/前脛骨長. C : 長趾伸筋/前脛骨長.

D : ヒラメ筋/全脛骨長.

vehicle (n=8), vehicle+BCAA (n=8), Ang II (n=7), Ang II+BCAA (n=8).

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. vehicle, † $p < 0.05$ vs. Ang II.

2.3.6. 速筋線維と遅筋線維に対するBCAAの有効性とmTORの関連性の評価

続いて筋線維別にBCAAの効果を検討するために、混合線維である腓腹筋のNADH染色標本を用いて、筋線維をIIb線維、IIa線維、I線維の3つに分類し、それぞれの筋横断面積を測定し比較した。図2-3-5Aに代表的な腓腹筋のNADH染色切片を示す。Ang II群では、vehicle群と比較して、いずれの筋線維でも有意に筋横断面積が縮小し(図2-3-5B-D)、一方Ang II群と比較して、Ang II+BCAA群において、IIb線維の筋横断面積のみが有意に増加した(図2-3-5B)。

また、長趾伸筋(速筋線維)とヒラメ筋(遅筋線維)サンプルを用いて、mTORのリン酸化を評価し、BCAA投与との関連性について検討した。BCAA投与群(Vehicle+BCAA群, Ang II+BCAA群)におけるmTORのリン酸化は、非投与群(vehicle群, Ang II群)と比較して、長趾心筋(速筋線維)で有意に増加し(図2-3-6A)、ヒラメ筋(遅筋線維)では変化しなかった(図2-3-6B)。

したがって、BCAAは、速筋線維のmTORのリン酸化を亢進させる事から、速筋の特性が強い骨格筋群の萎縮を効果的に軽減することが示唆された。

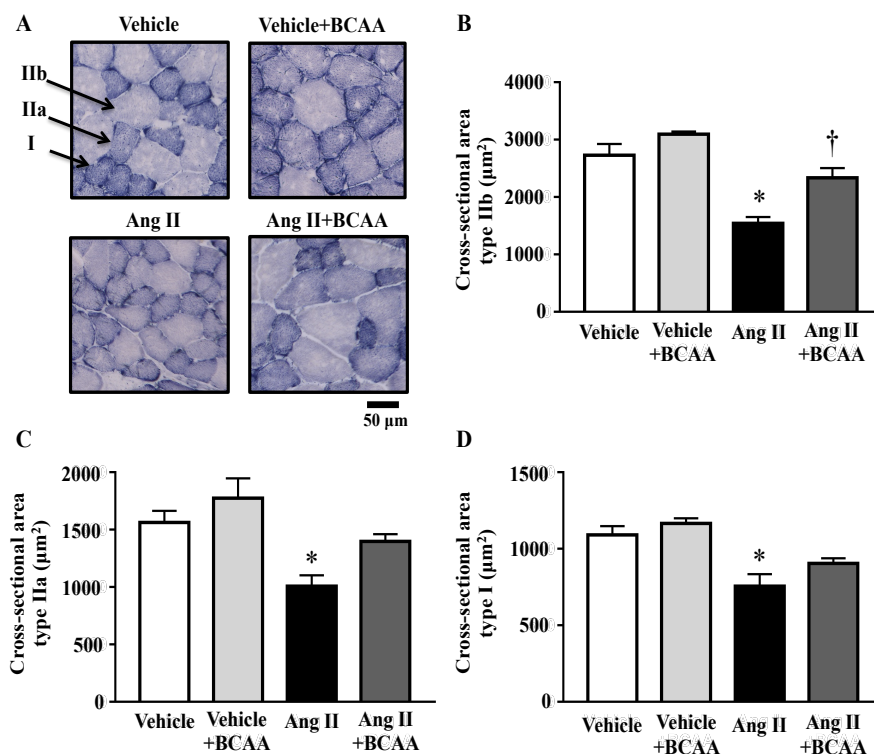


図2-3-5. 腓腹筋における速筋線維、遅筋線維の評価

A: 代表的な腓腹筋のNADH染色画像. B: IIb線維の筋横断面積.

C: IIa線維の筋横断面積. D: I線維の筋横断面積.

Vehicle (n=8), Vehicle+BCAA (n=5), Ang II (n=8), Ang II+BCAA (n=6).

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Vehicle, † $p < 0.05$ vs. Ang II.

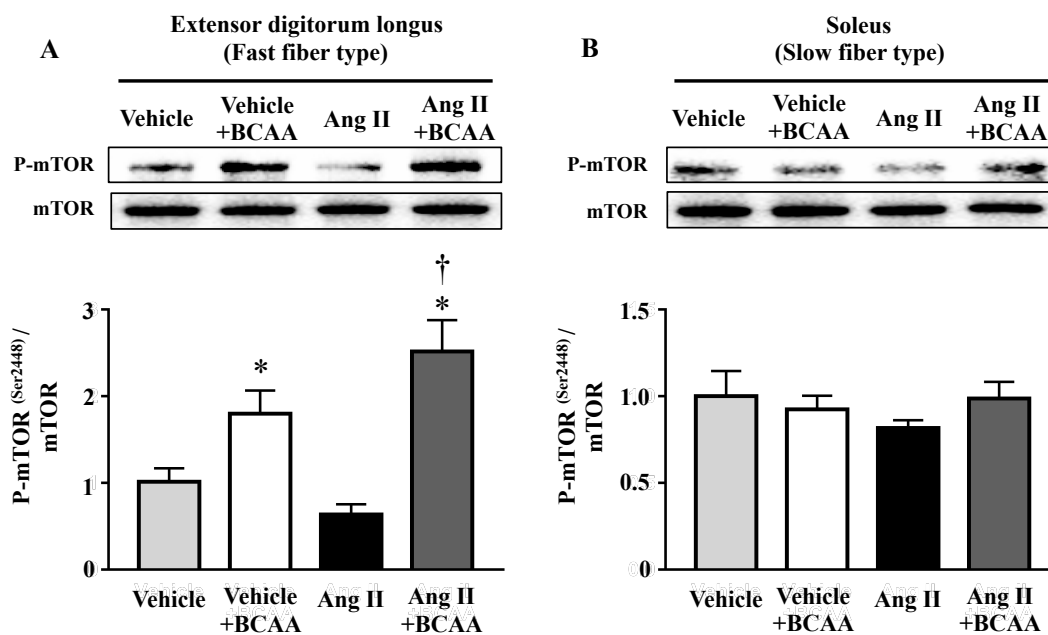


図 2-3-6. 長趾伸筋（速筋線維）とヒラメ筋（遅筋線維）における mTOR のリン酸化の評価

長趾伸筋（A）およびヒラメ筋（B）のリン酸化した mTOR の代表的なバンドと定量評価.

Vehicle (n=5), Vehicle+BCAA (n=5), Ang II (n=7), Ang II+BCAA (n=5).

データは平均値±標準誤差. * $p < 0.05$ vs. Vehicle, † $p < 0.05$ vs. Ang II.

2.4. 考察

本研究において、Ang II 誘発性骨格筋萎縮モデルへの BCAA 投与が、骨格筋萎縮を軽減し、運動能力を改善させることが示された。また、BCAA の有効性は遅筋線維より速筋線維に対して効果的に作用していることが明らかとなった。臨床的に、BCAA 補充治療が心血管疾患をはじめとする骨格筋萎縮に対して有効である可能性が示唆された。

2.4.1. Ang II 誘発性骨格筋萎縮に対する BCAA のタンパク合成効果について

BCAA は骨格筋の重要な栄養素で、特にロイシンは mTOR のリン酸化を促進することでタンパク同化作用をもつことは広く知られている (Kimball and Jefferson, 2006; Lynch et al., 2002)。本研究で、Ang II 誘発性骨格筋萎縮モデルへの BCAA 投与は、Akt を介さず、直接 mTOR を活性化させ、タンパク合成シグナルに対して特異的に作用することが示された。

一方で、過去の研究では、C2C12 細胞への BCAA 添加による mTOR のリン酸化が、タンパク分解シグナルである MuRF-1 や Atrogin-1 の発現を有意に抑制した報告 (Herningtyas et al., 2008) や、後肢非荷重による廃用性骨格筋萎縮モデルラットへの BCAA 投与がタンパク分解シグナルを抑制し、骨格筋萎縮を軽減したとする報告がある (Herningtyas et al., 2008)。

本研究で用いた Ang II 誘発性筋萎縮モデルでは、BCAA 投与によって MuRF-1 と Atrogin-1 に有意な変化は観察されなかったが、これらのタンパク分解シグナルは mTOR だけでなく、炎症性サイトカインや活性酸素種などの多彩な因子によって調整を受けていることが影響したと考えられる (Fanzani et al., 2012; Kinugawa et al., 2015)。実際、当研究室では、Ang II 誘発性骨格筋萎縮モデルにおいて、NAD(P)H オキシダーゼによって産生される活性酸素種が、タンパク分解シグナルの活性化に関与することを報告しており、関連性が考えられる (Kadoguchi et al., 2018)。

2.4.2. 筋線維タイプによる BCAA 有効性の違いについて

骨格筋萎縮に対する BCAA の効果を骨格筋部位によって評価した結果、腓腹筋とヒラメ筋の筋重量は増加傾向であったが有意差はなかった。一方、大腿四頭筋および長趾伸筋の重量では有意に増加した。また、BCAA は速筋の特性が強い IIb 線維の筋横断面積を有意に増加させ、速筋優位な長趾伸筋において mTOR のリン酸化が観察され、遅筋優位であるヒラメ筋では mTOR のリン酸化において有意な変化はなかった。

これらの結果から、BCAA が遅筋より速筋に対して有効に作用することが示唆され

た. BCAA は, mTOR のリン酸化によるタンパク合成を促進させるだけでなく, ミトコンドリア内のエネルギー基質として代謝される. したがって, ミトコンドリアが豊富に存在する I 線維では, BCAA の分解が盛んに行われ, mTOR を活性化するために十分な BCAA 量に達しにくい可能性が考えられる. 長趾伸筋とヒラメ筋の組織サンプルを用いて, 組織中の BCAA および中間代謝産物である BCKA の評価を, 共同研究施設である名古屋大学大学院生命農学研究科栄養生化学研究室で進めており, 関連性について検討を行う.

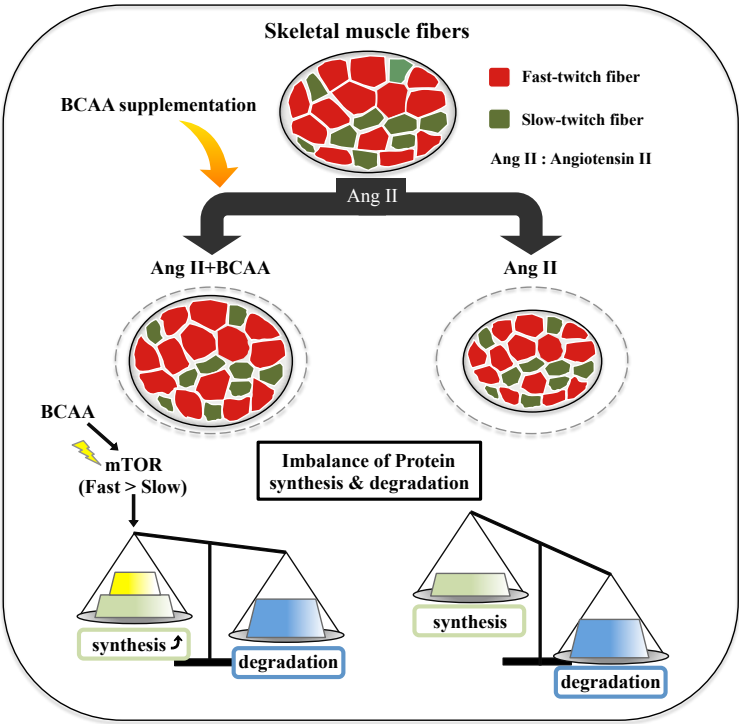
2.4.3. BCAA の圧負荷誘発性心肥大に対する影響について

過去の研究で, MI 後心不全モデルや TAC 後心不全モデルの心筋では, BCAA 代謝の低下によって, 心筋に BCAA が蓄積し (Sun et al., 2016a; Sun and Wang, 2016b; Wang et al., 2016), BCAA 投与によって更に BCAA が蓄積した結果, mTOR を活性化を介して, 心筋リモデリングおよび心不全を悪化させることが報告されている (Wang et al., 2016). 一方, 本研究で用いた Ang II 持続投与による圧負荷誘発性心肥大では, BCAA 投与によって心肥大は悪化しなかった. 各臓器における BCAA 代謝に関する報告では, 心筋は骨格筋よりも BCAA 代謝が活発であることが知られている (Suryawan et al., 1998). したがって, 本研究における BCAA 投与では, 心筋の BCAA 分解が優位にあり, mTOR の活性化に影響する十分な BCAA 蓄積が生じなかった可能性が考えられる.

2.4.4. 心血管疾患における BCAA 補充治療の臨床容量に関する検討

本研究において, 3%BCAA 水溶液を作製し, マウスに自由飲水で投与する方法を用いた (Ishikawa et al., 2017). 飲水量から BCAA 摂取量を算出した結果, 約 4-6 g/kg body weight/day であった. 体表面積からヒト等価用量を算出した結果, 0.32-0.48 g/kg body weight /day がヒトで同等の用量と考えられる (Nair and Jacob, 2016). 肝硬変患者を対象とした臨床研究データでは, BCAA 0.24 g/kg body weight /day が臨床用量として用いられている (Marchesini et al., 1990). 齧歯類はヒトと比較して酵素活性が高く, BCAA 分解が活発であることから (Suryawan et al., 1998), 本研究で用いられた BCAA 臨床用量は, 臨床的に応用できるものと考えられる.

2. 4. 5. 概略図



3 章：総括および結論

3. 1. 得られた新知見

- BCKDK-KO による BCAA 代謝の活性化は、MI 後不全心筋において BCAA 代謝障害を改善させ、mTOR のリン酸化を抑制し、心筋リモデリングを抑制した。
- BCAA 代謝の活性化は、MI 後心不全骨格筋に萎縮を生じさせなかった。
- BCAA 補充治療は、mTOR の活性化を介して Ang II 誘発性骨格筋萎縮を軽減した。
- Ang II 誘発性骨格筋萎縮の軽減が、運動能力の改善に寄与した。
- BCAA 補充治療は、遅筋線維より速筋線維に対して有効であった。
- BCAA 補充治療は、Ang II による圧負荷誘発性の心肥大を悪化させなかった。

3. 2. 新知見の意義と今後の研究展開

BCKDK 欠損による BCKDC の活性化は、BCAA 代謝の亢進を導き、心筋リモデリングを改善させた。過去の報告でも、種々の心不全モデルにおいて、BCAA 代謝障害が心筋リモデリングと関連していることが示されており、我々の今回の結果は、心不全全般に応用できると考える。

BCKDC を活性化する方法として、BCKDK を抑制する方法と、PP2Cm を増加させる方法が考えられる。しかし、不全心筋ではにおける BCKDC 活性の低下には、PP2Cm の低下が第一義的に示されており、PP2Cm の低下を抑制させたり、PP2Cm を増加させる治療法の開発が、より心筋リモデリングの進展抑制に有効である可能性が考えられる。したがって、心不全における PP2Cm 低下の機序を明らかにする研究が重要である。さらに、PP2Cm を特異的に増加させる薬剤の開発が待たれる。

BCKDK 欠損は、MI 後心不全モデルの骨格筋萎縮を導かなかった。上述の如く、BCKDC の活性化は心筋リモデリングに有効であるかもしれないが、それに反して、骨格筋に対しては、有害であるかもしれない。骨格筋萎縮が導かれなかった我々の知見は、BCKDC 活性化に基づく、心筋リモデリング治療の開発を勇気付けるかもしれない。一方で、今回の 4 週間の観察では、MI 後心不全において、骨格筋萎縮がなく、そのことが、BCKDC 活性化によって、骨格筋萎縮が導かれなかった原因かもしれない。したがって、より長期の観察による検証が必要と考える。また、第 3 章で用いた Ang II 誘発性骨格筋萎縮モデルでの検討も必要と考える。

BCAA 投与は、Ang II 誘発性骨格筋萎縮を改善した。これまでの報告で、他の骨格筋萎縮を来すモデルにおいて、BCAA の有効性が示されている。実際に、臨床応用も可能であり、近年問題となっている心血管病患者のサルコペニア予防あるいは治療に BCAA は有効かもしれない。一方、臨床的に最も問題なのは、心不全患者における

サルコペニアであり、心不全モデルを用いた BCAA の骨格筋萎縮への抑制効果に関する検証が必要である。

我々は、BCAA が遅筋より速筋で、より有効性を発揮することを示した。このことは、BCAA と筋力トレーニングの併用の有効性を示唆している。さらに、心不全において、遅筋が減少し、相対的に速筋が増加していること、その速筋が萎縮していることを考えると、BCAA は有効である可能性が高い。今後、心不全患者を対象とした BCAA の有効性を検証する臨床研究が必要と考える。

謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するに当たり、本研究の機会を与えて頂くとともに、多くの御指導と御支援を賜りました北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 絹川真太郎講師、安斉俊久教授に深謝申し上げます。また福島新前助教には博士課程での研究全般・学位論文作成に、御多忙の中、多くの御指導をして頂き大変感謝しております。

本研究に当たり、日頃より多くの御指導・御助力を頂きました北海道大学大学院医学研究院 循環病態内科学教室の角谷尚哉先生、仲野一平先生、萩原光先生、尾畑嘉一先生、南部秀雄先生、前川 聡先生、中島孝之先生、白川亮介先生、片山貴史先生、松本純一先生、津田正哉先生、降旗高明先生、齋藤晶理先生、横田 卓先生に感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者としてガスクロマトグラフィー質量分析を用いた測定、分岐鎖アミノ酸代謝酵素の測定に御助力頂きました中部大学応用生物学部食品栄養科学科 下村吉治教授、名古屋大学大学院生命農学研究科応用生命科学専攻栄養生化学研究室 北浦靖之講師に深く感謝申し上げます。

本研究の実験遂行にあたり、多大な御助力を頂きました循環病態内科学講座実験助手の山根美和子様、木村友紀様、また秘書室の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

最後に、私をここまで育てていただいた両親と、忙しい研究生生活を陰ながら支えてくれた妻と2人の息子に心より感謝いたします。

2020年3月
山梨 克真

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Anker, S.D., and Coats, A.J. (1999). Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest* 115, 836-847.
- Anker, S.D., Ponikowski, P., Varney, S., Chua, T.P., Clark, A.L., Webb-Peploe, K.M., Harrington, D., Kox, W.J., Poole-Wilson, P.A., and Coats, A.J.S. (1997). Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 349, 1050-1053.
- Basso, N., Cini, R., Pietrelli, A., Ferder, L., Terragno, N.A., and Inserra, F. (2007). Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H1351-1358.
- Bayeva, M., Gheorghiade, M., and Ardehali, H. (2013). Mitochondria as a therapeutic target in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61, 599-610.
- Bruning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J., and Kahn, C.R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell* 2, 559-569.
- Colucci, W.S., Koliass, T.J., Adams, K.F., Armstrong, W.F., Ghali, J.K., Gottlieb, S.S., Greenberg, B., Klibaner, M.I., Kukin, M.L., and Sugg, J.E. (2007). Metoprolol reverses left ventricular remodeling in patients with asymptomatic systolic dysfunction: the REversal of VEntricular Remodeling with Toprol-XL (REVERT) trial. *Circulation* 116, 49-56.
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F.C., Michel, J.P., Rolland, Y., Schneider, S.M., *et al.* (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39, 412-423.
- Dai, D.F., Johnson, S.C., Villarin, J.J., Chin, M.T., Nieves-Cintrón, M., Chen, T., Marcinek, D.J., Dorn, G.W., 2nd, Kang, Y.J., Prolla, T.A., *et al.* (2011). Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circ. Res.* 108,

837–846.

De Jong, K. A., and Lopaschuk, G. D. (2017). Complex Energy Metabolic Changes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Can. J. Cardiol.* *33*, 860–871.

Di, R., Wu, X., Chang, Z., Zhao, X., Feng, Q., Lu, S., Luan, Q., Hemmings, B. A., Li, X., and Yang, Z. (2012). S6K inhibition renders cardiac protection against myocardial infarction through PDK1 phosphorylation of Akt. *Biochem. J.* *441*, 199–207.

Dos Santos, M. R., Saitoh, M., Ebner, N., Valentova, M., Konishi, M., Ishida, J., Emami, A., Springer, J., Sandek, A., Doehner, W., *et al.* (2017). Sarcopenia and Endothelial Function in Patients With Chronic Heart Failure: Results From the Studies Investigating Comorbidities Aggravating Heart Failure (SICA-HF). *J. Am. Med. Dir. Assoc.* *18*, 240–245.

Eley, H. L., Russell, S. T., and Tisdale, M. J. (2007). Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem. J.* *407*, 113–120.

Fanzani, A., Conraads, V. M., Penna, F., and Martinet, W. (2012). Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* *3*, 163–179.

Fukushima, A., Kinugawa, S., Takada, S., Matsushima, S., Sobirin, M. A., Ono, T., Takahashi, M., Suga, T., Homma, T., Masaki, Y., *et al.* (2014). (Pro)renin receptor in skeletal muscle is involved in the development of insulin resistance associated with postinfarct heart failure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *307*, E503–514.

Hanai, T., Shiraki, M., Nishimura, K., Ohnishi, S., Imai, K., Suetsugu, A., Takai, K., Shimizu, M., and Moriwaki, H. (2015). Sarcopenia impairs prognosis of patients with liver cirrhosis. *Nutrition* *31*, 193–199.

Harada, K., Sugaya, T., Murakami, K., Yazaki, Y., and Komuro, I. (1999). Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* *100*, 2093–2099.

Harper, A. E., Miller, R. H., and Block, K. P. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* *4*, 409–454.

Herningtyas, E. H., Okimura, Y., Handayaningsih, A. E., Yamamoto, D., Maki, T., Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H., and Chihara, K. (2008). Branched-chain amino

acids and arginine suppress MaFbx/atrogen-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1115–1120.

Ichihara, K., Neely, J.R., Siehl, D.L., and Morgan, H.E. (1980). Utilization of leucine by working rat heart. *Am. J. Physiol.* 239, E430–436.

Ikeda, M., Ide, T., Fujino, T., Matsuo, Y., Arai, S., Saku, K., Kakino, T., Oga, Y., Nishizaki, A., and Sunagawa, K. (2015). The Akt-mTOR axis is a pivotal regulator of eccentric hypertrophy during volume overload. *Sci. Rep.* 5, 15881.

Ishikawa, T., Kitaura, Y., Kadota, Y., Morishita, Y., Ota, M., Yamanaka, F., Xu, M., Ikawa, M., Inoue, N., Kawano, F., *et al.* (2017). Muscle-specific deletion of BDK amplifies loss of myofibrillar protein during protein undernutrition. *Sci. Rep.* 7, 39825.

Kadoguchi, T., Takada, S., Yokota, T., Furihata, T., Matsumoto, J., Tsuda, M., Mizushima, W., Fukushima, A., Okita, K., and Kinugawa, S. (2018). Deletion of NAD(P)H Oxidase 2 Prevents Angiotensin II-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Biomed. Res. Int.* 2018, 3194917.

Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S., and Kurosawa, T. (2011). Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.* 60, 481–487.

Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2006). Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.* 136, 227s–231s.

Kinugawa, S., Takada, S., Matsushima, S., Okita, K., and Tsutsui, H. (2015). Skeletal Muscle Abnormalities in Heart Failure. *Int. Heart J.* 56, 475–484.

Landi, F., Cruz-Jentoft, A.J., Liperoti, R., Russo, A., Giovannini, S., Tosato, M., Capoluongo, E., Bernabei, R., and Onder, G. (2013). Sarcopenia and mortality risk in frail older persons aged 80 years and older: results from ilSIRENTE study. *Age Ageing* 42, 203–209.

Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H.M., and Packer, M. (1990). Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 323, 236–241.

Lynch, C.J., Hutson, S.M., Patson, B.J., Vaval, A., and Vary, T.C. (2002). Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 283, E824–835.

- Maejima, Y., Kyoi, S., Zhai, P., Liu, T., Li, H., Ivessa, A., Sciarretta, S., Del Re, D.P., Zablocki, D.K., Hsu, C.P., *et al.* (2013). Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *Nat. Med.* *19*, 1478–1488.
- Mancini, D.M., Eisen, H., Kussmaul, W., Mull, R., Edmunds, L.H., Jr., and Wilson, J.R. (1991). Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* *83*, 778–786.
- Marchesini, G., Dioguardi, F.S., Bianchi, G.P., Zoli, M., Bellati, G., Roffi, L., Martines, D., and Abbiati, R. (1990). Long-term oral branched-chain amino acid treatment in chronic hepatic encephalopathy. A randomized double-blind casein-controlled trial. The Italian Multicenter Study Group. *J. Hepatol.* *11*, 92–101.
- Marin-Garcia, J., and Goldenthal, M.J. (2008). Mitochondrial centrality in heart failure. *Heart Fail. Rev.* *13*, 137–150.
- Matsushima, S., Kinugawa, S., Yokota, T., Inoue, N., Ohta, Y., Hamaguchi, S., and Tsutsui, H. (2009). Increased myocardial NAD(P)H oxidase-derived superoxide causes the exacerbation of postinfarct heart failure in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *297*, H409–416.
- McKelvie, R.S., Yusuf, S., Pericak, D., Avezum, A., Burns, R.J., Probstfield, J., Tsuyuki, R.T., White, M., Rouleau, J., Latini, R., *et al.* (1999). Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation* *100*, 1056–1064.
- McMullen, J.R., Sherwood, M.C., Tarnavski, O., Zhang, L., Dorfman, A.L., Shioi, T., and Izumo, S. (2004). Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* *109*, 3050–3055.
- Nair, A.B., and Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy* *7*, 27–31.
- Nair, K.S., and Short, K.R. (2005). Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. *J. Nutr.* *135*, 1547s–1552s.
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M.,

Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., *et al.* (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* *13*, 619–624.

Nascimben, L., Ingwall, J.S., Pauletto, P., Friedrich, J., Gwathmey, J.K., Saks, V., Pessina, A.C., and Allen, P.D. (1996). Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* *94*, 1894–1901.

Nishida, K., Kyo, S., Yamaguchi, O., Sadoshima, J., and Otsu, K. (2009). The role of autophagy in the heart. *Cell Death Differ.* *16*, 31–38.

Okura, Y., Ramadan, M.M., Ohno, Y., Mitsuma, W., Tanaka, K., Ito, M., Suzuki, K., Tanabe, N., Kodama, M., and Aizawa, Y. (2008). Impending epidemic: future projection of heart failure in Japan to the year 2055. *Circ. J.* *72*, 489–491.

Pachon, R.E., Scharf, B.A., Vatner, D.E., and Vatner, S.F. (2015). Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *308*, H1525–1529.

Pansarasa, O., Flati, V., Corsetti, G., Brocca, L., Pasini, E., and D'Antona, G. (2008). Oral amino acid supplementation counteracts age-induced sarcopenia in elderly rats. *Am. J. Cardiol.* *101*, 35E–41E.

Sepehri, A., Beggs, T., Hassan, A., Rigatto, C., Shaw-Daigle, C., Tangri, N., and Arora, R.C. (2014). The impact of frailty on outcomes after cardiac surgery: a systematic review. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *148*, 3110–3117.

Sun, H., Olson, K.C., Gao, C., Prosdocimo, D.A., Zhou, M., Wang, Z., Jeyaraj, D., Youn, J.Y., Ren, S., Liu, Y., *et al.* (2016a). Catabolic Defect of Branched-Chain Amino Acids Promotes Heart Failure. *Circulation* *133*, 2038–2049.

Sun, H., and Wang, Y. (2016b). Branched chain amino acid metabolic reprogramming in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* *1862*, 2270–2275.

Suryawan, A., Hawes, J.W., Harris, R.A., Shimomura, Y., Jenkins, A.E., and Hutson, S.M. (1998). A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am. J. Cl. Nutr.* *68*, 72–81.

Takada, S., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Suga, T., Yokota, T., Takahashi, M., Fukushima, A., Homma, T., Ono, T., Sobirin, M.A., *et al.* (2013). Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *J. Appl. Physiol.* (1985) *114*, 844–857.

Takada, S., Kinugawa, S., Matsushima, S., Takemoto, D., Furihata, T., Mizushima,

W., Fukushima, A., Yokota, T., Ono, Y., Shibata, H., *et al.* (2015). Sesamin prevents decline in exercise capacity and impairment of skeletal muscle mitochondrial function in mice with high-fat diet-induced diabetes. *Exp. Physiol.* *100*(11), 1319–1310.

Takada, S., Masaki, Y., Kinugawa, S., Matsumoto, J., Furihata, T., Mizushima, W., Kadoguchi, T., Fukushima, A., Homma, T., Takahashi, M., *et al.* (2016). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of glucagon-like peptide-1 receptor signalling. *Cardiovasc. Res.* *111*, 338–347.

Tsuburaya, R. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Left Ventricular Structural Remodeling After Acute Myocardial Infarction– Usefulness of Leukocyte Mitochondrial Copy Number. *Circ. J.* *81*, 1772–1773.

Tsutamoto, T., Hisanaga, T., Wada, A., Maeda, K., Ohnishi, M., Fukai, D., Mabuchi, N., Sawaki, M., and Kinoshita, M. (1998). Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* *31*, 391–398.

Wang, W., Zhang, F., Xia, Y., Zhao, S., Yan, W., Wang, H., Lee, Y., Li, C., Zhang, L., Lian, K., *et al.* (2016). Defective branched chain amino acid catabolism contributes to cardiac dysfunction and remodeling following myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *311*, H1160–H1169.

Yokota, T., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Matsushima, S., Inoue, N., Ohta, Y., Hamaguchi, S., Sobirin, M.A., Ono, T., Suga, T., *et al.* (2009). Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *297*, H1069–1077.

Yoshida, T., Tabony, A.M., Galvez, S., Mitch, W.E., Higashi, Y., Sukhanov, S., and Delafontaine, P. (2013). Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 2322–2332.

Zhang, D., Contu, R., Latronico, M.V., Zhang, J., Rizzi, R., Catalucci, D., Miyamoto, S., Huang, K., Ceci, M., Gu, Y., *et al.* (2010). MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 2805–2816.

Zhu, Y., Pires, K.M., Whitehead, K.J., Olsen, C.D., Wayment, B., Zhang, Y.C., Bugger, H., Ilkun, O., Litwin, S.E., Thomas, G., *et al.* (2013). Mechanistic target of rapamycin (Mtor) is essential for murine embryonic heart development and growth. PLoS One 8, e54221.

厚生労働省 (2014). 平成 26 年 (2014) 人口動態統計 (確定数) の概況.

日本循環器学会 (2017). 急性・慢性心不全診療ガイドライン (2017 年改訂版) .