

184. グルタミン代謝を標的とした糖尿病性心筋症の病態解明

長尾 学

神戸大学 大学院医学研究科 内科学講座 立証検査医学分野

Key words : 糖尿病性心筋症, グルタミノリシス, 心不全

緒言

2型糖尿病は心不全の独立した危険因子であることが報告され、その原因として“糖尿病性心筋症”という病態が知られている。同病態は冠動脈疾患や高血圧に起因しない心室機能障害と定義され、心筋の肥大・線維化といった心リモデリングの進展により、最終的に心不全を発症することがわかっている。糖尿病患者の心不全発症リスクは、非糖尿病患者に比べ、男性で2倍、女性で5倍を超えると報告されており、2型糖尿病に限れば、75歳未満では心不全のリスクは約3倍、75歳～84歳では2倍となるという報告もある。また、心不全を合併する2型糖尿病患者は非患者群にくらべてQOLが低く、心不全もより重症になる傾向にある。このように2型糖尿病と心不全は密接な関係にあり、合併した場合は予後を相加的に増悪させる。

本研究では2型糖尿病における心筋でのグルタミン代謝に注目した。グルタミンは血中に最も豊富に存在するアミノ酸で、細胞増殖に必要な核酸や脂質の合成に利用される他、“グルタミノリシス”と呼ばれる代謝経路を通して、生体の主要なエネルギー産生系であるTCAサイクルへ、 α -ケトグルタル酸を補填している。腫瘍学分野ではグルタミノリシスは精力的に研究され、細胞増殖能の高い癌細胞は、グルタミンをエネルギー源としてのみでなく、細胞増殖に必要な核酸や脂質・タンパク質合成のための炭素・窒素の供給源として利用するため、グルタミンに強く依存することがわかっている。一方、インスリン抵抗性により、糖利用が障害された心筋におけるグルタミン代謝機構や役割については明らかにされていない。そこで本研究ではグルタミン代謝制御機構に着眼し、糖尿病性心筋症の病態を解明することを目的とした。

糖尿病性心筋症のモデル動物として、インスリンによる代謝作用の発現に中心的な役割を担う分子である3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ (PDK1) を脂肪細胞特異的にノックアウトしたマウス (*Adipo-PDK1KO* マウス) を用いた。*Adipo-PDK1KO* マウスの心筋はインスリン抵抗性を示し、糖尿病性心筋症の特徴の一つである心肥大を呈することを確認した。また、血中グルタミンはKO群で有意に増加し、心臓組織中ではグルタミンに加えて、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸もKO群で有意な増加を示した。安定同位体を用いた実験では投与したグルタミンはほぼ心臓には取り込まれなかった。心臓組織中で認めたグルタミンの増加は *de novo* 合成やインスリン抵抗性によるタンパク異化亢進によるものと考えた。本研究の2型糖尿病モデルマウスで認めた心肥大はグルタミノリシスの亢進による心筋への過剰なグルタミン供給が招いた負の側面ではないかと考えている。今後、さらなる研究を通して、糖尿病性心筋症におけるグルタミン代謝の病態生理学的意義を解明していく。

方法

1. 糖尿病性心筋症におけるグルタミン代謝制御機構の解明

本研究ではインスリンシグナルにおいて中心的な役割を担う分子である 3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ (PDK1) を脂肪細胞特異的にノックアウトしたマウス (*Adipo-PDK1* KO マウス) を自施設で作製し、2型糖尿病のモデル動物として用いた。

心臓インスリン抵抗性を評価するため、インスリンシグナル伝達を担う、Akt のリン酸化をウエスタンブロット法によって評価した。

心重量や心臓切片の HE 染色によって *Adipo-PDK1* KO マウスの心臓フェノタイプを観察した。

液体クロマトグラフィー質量分析計によって *Adipo-PDK1* KO マウスの血漿、心臓組織中の代謝物を定量した。

安定同位体標識されたグルタミン ($^{13}\text{C}_5$ -glutamine) を腹腔内投与し、心臓組織におけるグルタミン利用をトレースした (stable isotope tracing)。

グルタミノリシスの律速酵素であるグルタミナーゼ (glutaminase) 阻害薬の一つである bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide (BPTES) を *Adipo-PDK1* KO マウスに離乳後より 6 週間腹腔内投与し (3 mg/kg、週 3 回)、グルタミノリシスの阻害が心臓フェノタイプへ与える影響を観察した。

結果

1. *Adipo-PDK1* KO マウスは心臓インスリン抵抗性および心肥大を呈した

Adipo-PDK1 KO マウスの 10 週令、30 週令時の心重量/体重比、心重量/脛骨長比を測定したところ、いずれもノックアウト群で有意な増加を認めた (図 1a)。また、心臓切片の HE 染色を行い、心筋断面積を定量したところ、ノックアウト群で有意な増加を認めた (図 1b)。続いて、同マウスの心臓インスリン抵抗性を評価するため、Akt のリン酸化をウエスタンブロット法で評価したところ、インスリン投与後の Akt のリン酸化はノックアウト群で著明に低下していた (図 1c)。以上の結果より、*Adipo-PDK1* KO マウスは野生型に比べ、心肥大と心臓インスリン抵抗性を呈することが明らかとなった。

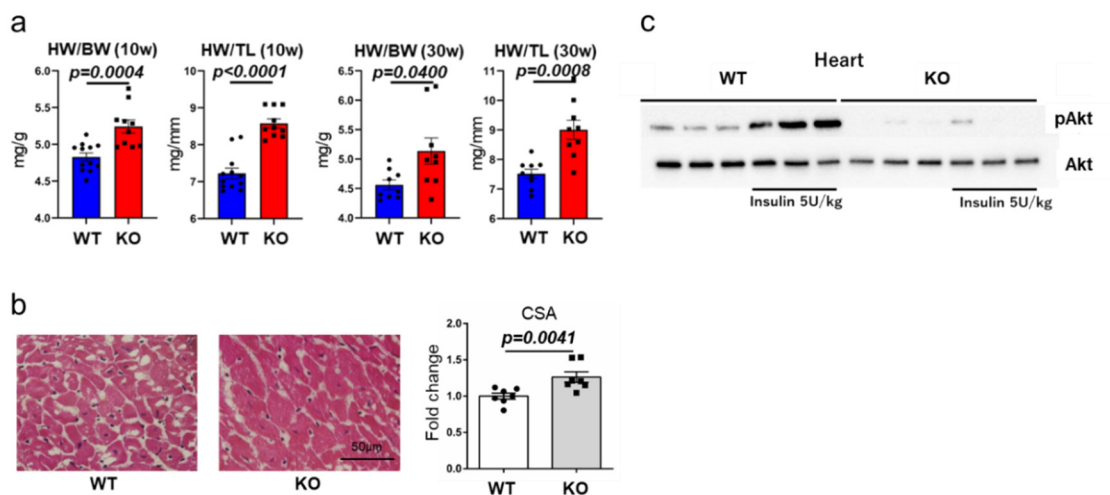


図 1. *Adipo-PDK1* KO マウスは心肥大および心臓インスリン抵抗性を呈した

a) 10、30 週令時の心重量/体重比 (HW/BW)、心重量/脛骨長比 (HW/TL) (n=8)。

b) 心臓切片の HE 染色と定量 (n=7)。

c) Vehicle、もしくは 5 U/kg のインスリン投与後 20 分における心臓組織のウエスタンブロットで Akt のリン酸化を評価した。

Mann-whitney U test. WT : 野生型、KO : ノックアウト。

2. *Adipo-PDK1* KO マウスの心臓組織ではグルタミンおよびその代謝物が野生型に比し、有意に増加していた
Adipo-PDK1 KO マウスの心臓組織のメタボローム解析を行った。グルタミン、グルタミン酸をはじめ、分岐鎖アミノ酸など種々のアミノ酸がノックアウト群で有意に増加していた (図 2a~c)。

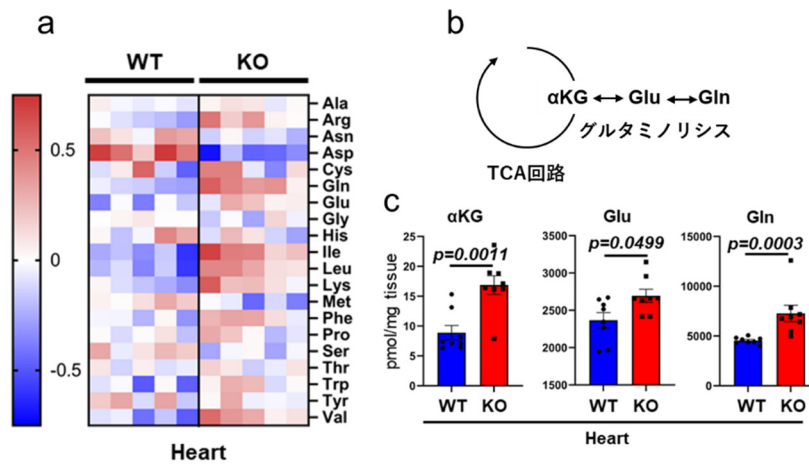


図 2. *Adipo-PDK1* KO マウスの心臓組織中アミノ酸

- 臓組織中のアミノ酸を液体クロマトグラフィー質量分析計で定量し、ヒートマップで示した (n=5)。
- グルタミノリシスの概念図。
- 心臓組織中のグルタミン (Gln)、グルタミン酸 (Glu)、 α -ケトグルタル酸 (α KG)、(n=8)。
Mann- whitney U test、WT : 野生型、KO : ノックアウト。

3. 外因性のグルタミンの心臓への取り込みは野生型群とノックアウト群で差はなかった

インスリン抵抗性を呈する心臓におけるグルタミン代謝を評価するため、安定同位体ラベルされたグルタミンを投与し、stable isotope tracing を行った。外因性に投与されたグルタミンは心臓組織中のグルタミン総量の 10%にも満たないという結果であった (図 3a、b)。

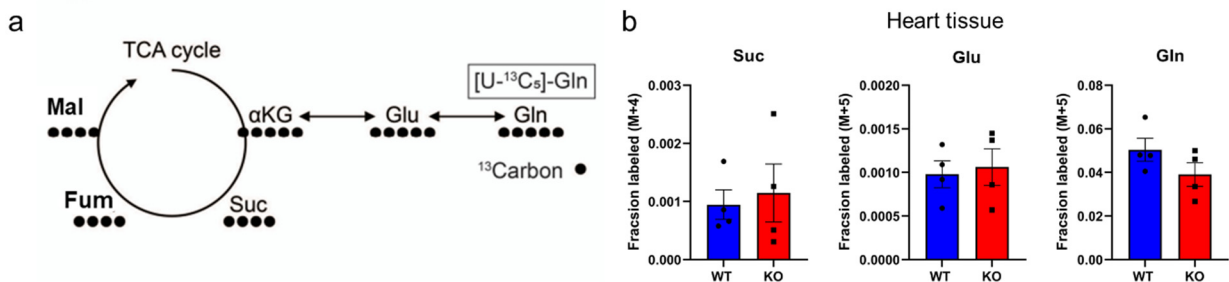


図 3. *Adipo-PDK1* KO マウスへ安定同位体標識グルタミン ($^{13}C_5$ -glutamine) を投与し、グルタミン由来代謝物の追跡を行った (stable isotope tracing)

- 安定同位体標識グルタミン ($^{13}C_5$ -glutamine) 投与時の代謝図。
- $^{13}C_5$ -glutamine に由来するグルタミン (Gln)、グルタミン酸 (Glu)、コハク酸 (Suc) の分画 (n=4)。
Mann- whitney U test、WT : 野生型、KO : ノックアウト。

4. グルタミノリシスの阻害は *Adipo-PDK1* KO マウスの心肥大を抑制する傾向を示した

Adipo-PDK1 KO マウスに離乳後より 6 週間、グルタミナーゼ阻害薬 (BPTES) を腹腔内投与した。統計上の有意差は認めないものの、心重量/脛骨長比は BPTES 投与群で低下する傾向を示した。

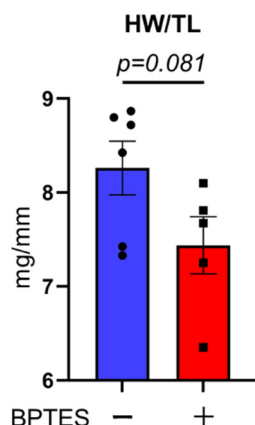


図4. *Adipo-PDK1* KO マウスへグルタミナーゼ阻害薬を投与した際の心重量/脛骨長比
Adipo-PDK1 KO マウスへ離乳後より6週間、BPTES (3mg/kg、週3回) を腹腔内投与
 した際の心重量/脛骨長比 (HW/TL)、(n=5~6)。Student t-test。

考 察

本研究で着目したグルタミン代謝への介入は既にかん研究では治験段階にある薬剤も存在している。その一例として、グルタミンからグルタミン酸への変換酵素であるグルタミナーゼの阻害薬、“CB-839”は乳がん、肺がん、大腸がんをはじめとした種々の固形腫瘍に対して、癌細胞の増殖抑制作用が確認されている [1~3]。また、近年グルタミノリシスの律速酵素であるグルタミナーゼが老化細胞の生存に関わり、その阻害薬が非アルコール性脂肪肝や動脈硬化症の改善に有効であることが報告された [4]。心筋細胞は細胞分裂を行わない細胞であるが、我々は糖尿病性心筋症における“心筋肥大”という病的な表現型の分子メカニズムにおいてもグルタミンが重要な役割を果たしていると考え、本研究を立案した。

Adipo-PDK1 KO マウスは心臓における遺伝子改変を行うことなく、強いインスリン抵抗性と心肥大を呈することや、長期間に及ぶ食餌介入が不要なことから、糖尿病性心筋症のモデル動物として非常に有用であると考えた。心臓組織のメタボローム解析ではグルタミンやグルタミン酸をはじめとした種々のアミノ酸が上昇した。予想に反し、外因性に投与したグルタミンの取り込みは野生型とノックアウト群で差は認めず、心臓組織中の90%以上は内因性のグルタミンであったことから、インスリン抵抗性下の心筋におけるグルタミン利用については正確に評価できなかった。一方、グルタミノリシスの律速酵素であるグルタミナーゼを阻害することで心重量の低下傾向を示したことから、グルタミンの利用は糖尿病性心筋症における心肥大に寄与している可能性が疑われた。今後、培養細胞における tracing 実験を通じて、心筋グルタミン代謝の flux を評価するとともに、グルタミノリシスが糖尿病性心筋症の治療標的となる可能性を検証していく。

心肥大の大部分は遺伝的な要因によるものだけでなく、高血圧等による後天的な因子によって引き起こされることが多く、心肥大は心不全患者の約半数を占める拡張機能障害型心不全 (heart failure with preserved ejection fraction ; HFpEF) の素因となることも知られている。HFpEF の治療に関しては、循環器内科領域で盛んに議論され、新たな治療薬の探索が行われているにも関わらず、有効なものは確立されていない。本研究によって、グルタミノリシスへの介入による心肥大の抑制効果が確認できれば、今後の HFpEF 治療への発展が見込める研究成果となり得る。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院医学研究科立証検査医学分野の杜隆嗣、同疫学分野の篠原正和である。

文 献

- 1) Xia M, Li X, Diao Y, Du B, and Li Y. Targeted inhibition of glutamine metabolism enhances the antitumor effect of selumetinib in KRAS-mutant NSCLC. *Transl Oncol* 14: 100920, 2021. PMID: 33137541 DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100920
- 2) Zhao Y, Feng X, Chen Y, Selfridge JE, Gorityala S, Du Z, Wang JM, Hao Y, Cioffi G, Conlon RA, Barnholtz-Sloan JS, Saltzman J, Krishnamurthi SS, Vinayak S, Veigl M, Xu Y, Bajor DL, Markowitz SD, Meropol NJ, Eads JR, and Wang Z. 5-Fluorouracil Enhances the Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 against PIK3CA-Mutant Colorectal Cancers. *Cancer Res* 80: 4815-4827, 2020. PMID: 32907836 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0600
- 3) Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, Janes JR, Laidig GJ, Lewis ER, Li J, Mackinnon AL, Parlati F, Rodriguez ML, Shwonek PJ, Sjogren EB, Stanton TF, Wang T, Yang J, Zhao F, and Bennett MK. Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* 13: 890-901, 2014. PMID: 24523301 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0870
- 4) Johmura Y, Yamanaka T, Omori S, Wang TW, Sugiura Y, Matsumoto M, Suzuki N, Kumamoto S, Yamaguchi K, Hatakeyama S, Takami T, Yamaguchi R, Shimizu E, Ikeda K, Okahashi N, Mikawa R, Suematsu M, Arita M, Sugimoto M, Nakayama KI, Furukawa Y, Imoto S, and Nakanishi M. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science* 371: 265-270, 2021. PMID: 33446552 DOI: 10.1126/science.abb5916