

肺動脈性肺高血圧症ラットモデルにおける右室心筋の代謝リモデリング

研究分担者 坂尾 誠一郎

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器内科学 准教授

研究要旨

肺高血圧症(PH)における肥大した右心室(RV)では、解糖系の亢進があり、そのためトリカルボン酸(TCA)サイクルを介した糖の酸化が抑制されている。最近の研究で我々は、脂肪酸(FA)と糖が PH 患者の RV に蓄積することを報告したが、その詳細は不明である。本研究の目的は、メタボロームによる PH ラット RV における代謝リモデリングを評価することにある。

雄ラットを血管内皮成長因子受容体遮断薬 SU5416 で処理し、続いて 3 週間の低酸素環境下、さらに 5 週間室内環境下で飼育する肺動脈性肺高血圧症モデルラット(Su/Hx ラット)を作成した。その後、血行動態を確認し、代謝リモデリング評価のため RV を採取した。

メタボローム解析では、対照と比較して Su/Hx ラット RV では、アラニン、アルギニノコハク酸、およびフマル酸およびリンゴ酸を含む TCA サイクル下流の中間体が減少傾向を示し、分岐鎖アミノ酸(BCAA)は増加傾向にあった。しかし、解糖系に明らかな傾向は認められなかった。また FA 解析では、細胞質からミトコンドリアに FA を輸送し、ベータ酸化に不可欠である、長鎖アシルカルニチンの減少傾向があった。

本研究では、アデニルコハク酸およびアルギニノコハク酸発現レベルに影響する可能性のあるフマル酸およびリンゴ酸発現の減少傾向のため、TCA サイクル活性が抑制されることが示された。さらに BCAA 代謝の調節不全および FA 酸化の減少が、TCA サイクル活性の抑制に寄与する可能性が示された。

共同研究者：

川上英良、東海林寛樹、内藤亮、三輪秀樹、須田理香、重城喬行、田邊信宏、巽浩一郎

A. 研究目的

遺伝的背景や生物学的環境など様々な因子が、肺高血圧症(PH)の多くの形態で肺血管系における肺動脈の血管収縮および細胞増殖を誘導することが示唆されている。これは肺動脈(PA)圧の上昇をもたらし、それに応じて右心機能が低下し、最終的に予後因子となる右心不全につながる。

肺動脈性高血圧症 (PAH)における代謝リモデリングは、肺動脈を構成する細胞だけでなく、右心室心筋細胞においても報告されている。ミトコンドリアが不活性化され、TCA サイクルを介した糖の酸化抑制および正常酸素分圧下での解糖系の亢進などである。

脂肪酸(FA)酸化は、特に左心室においてエネルギー生産の主要な供給源であることが示唆される。実際、ATP 合成の 60%-90%を担っている。PH 患者の肥大右室心筋における FA 代謝の詳細は不明であるが、ポジトロン放出断層撮影(PET)および ^{123}I - β メチルヨードフェニル・ペンタデカノ酸(BMIPP)取り込みイメージングを用いた我々の研究では、慢性血栓塞栓性肺高血圧症患者の RV におけるグルコースだけでなく、FA の蓄積を報告した。しかし、これらの研究は細胞質における FA の蓄積のみを示し、また、ミトコンドリアにおける TCA サイクルを通じて FA 酸化が実際に生じているかは不明である。

PH 患者における肥大化した右室心筋における FA 酸化は、いまだ明らかにされていない。右心室における FA 酸化の増加は、PA バンディングモデルで示されている。また、ストレス心筋への FA 輸送障害は、血管

内皮成長因子受容体遮断薬 SU5416 で処理し、続いて 3 週間の低酸素環境下、さらに 5 週間室内環境下で飼育する PAH モデルラット(Su/Hx ラット)において示されている。

メタボロミクスは、タンパク質の作用によって生体内で誘導される代謝産物を総合的に解析することができる。この分析は、タンパク質の活性を明らかにすることができ、生命現象の直接モニタリングを可能にする。本研究では、PAH モデルラット(Su/Hx ラット)の RV における糖および FA の代謝リモデリングを、メタボローム解析を用いて調べた。

B. 研究方法

雄ラットを血管内皮成長因子受容体遮断薬 SU5416 で処理し、続いて 3 週間の低酸素環境下、さらに 5 週間室内環境下で飼育する肺動脈性肺高血圧症モデルラット(Su/Hx ラット)を作成した。その後、血行動態を確認し、代謝リモデリング評価のため RV を採取した。

代謝産物の抽出および解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社(HMT)に依頼した。メタボローム解析は、同社の C-SCOPE、LC-MS パッケージを用いた。

血行動態は、スチューデント t-test によりグループ間で比較検討を行った。メタボローム解析では、グループ間の代謝産物濃度を Brunner-Munzel 検定を用いて比較した。p 値<0.05 は統計的に有意であると考えた。メタボローム分析では、SampleStat ソフトウェアプログラム ver. 3.14 が使用された(HMT)。

C. 研究結果

CE-TOFMS および CE-MS/MS を使用したカチオンおよびアニオン分析

メタボローム解析は、先に説明した方法に基づくセオチオン分析と、アニオン解析に CE-MS/MS を用いて行った。イソロイシン、ロイシン、バリンを含む分岐鎖アミノ酸(BCAA)は、Su/Hx ラットで増加し、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、アデレオスコク酸およびアルギノソハク酸を含む代謝産物は、Su/Hx ラットにおいて現象傾向を示した。TCA サイクル関連のアミノ酸アラニンは、Su/Hx ラットで低値を示した。

ピアソン相関係数に基づく階層クラスタリング解析(HCA)を用いて、代謝産物の 6 つの主要なクラスターを同定した。同化反応における捕因子である CoA、NADPH、および NADP+と共に、リンゴ酸、フマル酸、アデニルコハク酸、アルギニノコハク酸およびアラニンが同じクラスターに含まれていたため、これらの代謝産物に関連する代謝経路が Su/Hx ラットでは影響されている可能性が示唆された。一方、BCAA は別のクラスターに入り、クラスター 1 と強い負の相関を示し、BCAA が Su/Hx ラットで協調的に調節される可能性が示唆された。

Su/Hx と対照ラットの代謝経路における解糖と TCA サイクルの代謝マップ

代謝産物間の関係を理解するために、代謝産物を代謝経路マップにマッピングした。その結果、すべての中間体に統計学的有意差はなく、解糖系代謝経路は 2 群間で異なっていないことを示唆した。

TCA サイクルマップは、Su/Hx ラットにおけるフマル酸、リンゴ酸、クエン酸を含む TCA サイクルでのアラニン、アルギノコク酸および中間体レベルの減少傾向を示した。これらの結果は、TCA サイクルが Su/Hx ラット RV において活性が低いことを示唆した。

BCAA はコントロールと比較して Su /Hx ラットで明らかに増加傾向を示した。

LC-TOFMS における HCA

LC-TOFMS を用いて長鎖 FA および長鎖アシルカルニチンを評価するメタボローム解析を行った。FA はエネルギー産生に不可欠な気質であり、アシルカルニチンは細胞質からミトコンドリアへの FA 輸送を担い、さらにベータ酸化に不可欠である。LC-TOFMS で得られた 49 化合物のうち、7 つの化合物は Su/Hx と対照ラットの間で有意に異なっていた。AC(14:1)-1 及び AC(14:1)-2 を含む 2 つのアシルカルニチンに加え、レオイルエタノールアミン、リノレイルエタノールアミド、パルミトイルエタノールアミドおよびフィトスフィンゴシンは、対照ラットよりも Su/Hx ラットにおいて有意に減少していた。長鎖 FA および長鎖アシルカ

ルニチンは、ピアソン相関係数に基づく HCA を有する 5 つのクラスターにグループ化された。最大のクラスターであるクラスター 2 には、一般的な規則を示す長鎖アシルアルニチンが含まれていた。レオイルエタノールアミン、リノレイルエタノールアミド、パルミトイルエタノールアミドおよびフィトスフィンゴシンがクラスター 5 で隣接して存在したことから、これらの代謝産物が同様の経路に関与していたことが示唆された。

Su/Hx および対照ラットにおける長鎖アシルカルニチンおよび FA プロファイル

15 の長鎖アシルカルニチンの中で、FA メタボロミクスは、対照ラットと比較した Su / Hx ラットの AC (14 : 1) -1 および AC (14 : 1) -2 の統計的差異を示し、さらに長鎖アシルカルニチンレベルの減少傾向を明らかにした。長鎖 FA はミトコンドリアのアシル CoA シンターゼによってアシル CoA に加水分解され、その後カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 (CPT1) がアシル CoA を長鎖アシルカルニチンに変換する。Su / Hx ラットと対照ラットの間で長鎖 FA の細胞質濃度に顕著な違いは見られなかった。それにもかかわらず、Su / Hx ラットの RV における長鎖アシルカルニチンレベルが低下していることで、調節不全のβ酸化を反映している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、解糖系代謝経路にほとんど差異は無かったが、TCA 回路活性は、コントロールに比し Su / Hx ラット RV で低い傾向があった。さらに、Su / Hx ラット RV における長鎖アシルカルニチンのレベルは低い傾向があった。これらの結果から、解糖系および脂肪酸代謝経路が調節不全になっている可能性が示唆され、Su / Hx ラットの RV 障害が FA 代謝のマルチレベル障害の結果であることを支持した。しかし、Su / Hx ラットとコントロールラットの間で長鎖 FA の濃度に明らかな差異は見られなかった。

フマル酸、リンゴ酸、クエン酸のレベルが低下する傾向にあるため、TCA 回路活性が低下したのは明らかである。ただし、シス-アコニット酸とコハク酸がグループ間でほとんど違いを示さなかったことも重要である。今回の解析では、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸の代謝経路に関与し、フマル酸に変換されるアデニルコハク酸とアルギニノコハク酸のレベルが低下していることが示された。フマル酸のレベル低下は、アデニルコハク酸およびアルギニノコハク酸の発現レベルに起因する可能性があると考えられた。

本研究は、フマル酸とリンゴ酸を含む下流の TCA 回路中間体のレベルが低下したことを示した。これらの代謝物は、CE-TOFMS および CE-MS / MS データに基づく HCA 分析で同じクラスターに分類された。定量的メタボローム解析により、フマル酸 (Su / Hx vs コントロール; $p < 0.05$) およびリンゴ酸 (Su / Hx vs コントロール; $p < 0.05$) のレベルの低下と、ロイシン (Su / Hx vs コントロール; $p < 0.05$)、バリン (Su / Hx vs コントロール; $p < 0.05$) およびイソロイシン (Su / Hx vs コントロール; $p < 0.05$) のレベル上昇が明らかになった。最終的にスクシニル CoA に変換されるバリンとイソロイシンは Su / Hx ラットで増加したが、スクシニル CoA 下流にある TCA 回路中間体は、減少傾向を示した。本結果から、BCAA から TCA 回路への流れが抑制される可能性が示唆された。

定量的メタボローム解析では、アデニルコハク酸やアルギニノコハク酸などの代謝物レベルが、コントロールよりも Su / Hx ラットで有意に低いことを示した。最近、アルギニノコハク酸がフマル酸から直接合成されることが示され、アルギノコハク酸レベルの低下は、TCA 回路の中間体であるフマル酸レベルの低下と関連している可能性がある。アルギノコハク酸は尿素回路の代謝中間体であり、本研究の結果は、Su / Hx ラットの RV において TCA 回路と尿素回路が抑制される可能性を示唆した。ただし、アデニルコハク酸が RV リモデリングの進行に関与しているかどうかは未だ明らかでない。

E. 結論

本研究では、フマル酸、リンゴ酸、クエン酸の発現が減少する傾向が示され、TCA 回路の活性低下が示唆された。これは、アデニルコハク酸とアルギニノコハク酸の発現レベルに起因する可能性があり、さらに BCAA

代謝の調節不全と FA の酸化が TCA 回路反応の減少に寄与する可能性を示唆した。

F. 研究発表

1. 論文

Sakao S, Kawakami E, Shoji H, Naito A, Miwa H, Suda R, Sanada TJ, Tanabe N, Tatsumi K. Metabolic remodeling in the right ventricle of rats with severe pulmonary arterial hypertension. *Mol Med Rep.* 2021 Apr;23(4):1-1.

Metabolic remodeling in the right ventricle of rats with severe pulmonary arterial hypertension

SEIICHIRO SAKAO¹, EIRYO KAWAKAMI², HIROKI SHOJI¹, AKIRA NAITO¹, HIDEKI MIWA¹, RIKI SUDA¹, TAKAYUKI JUJO SANADA¹, NOBUHIRO TANABE¹ and KOICHIRO TATSUMI¹

¹Department of Respiriology (B2) and ²Artificial Intelligence Medicine, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670, Japan

Received March 19, 2020; Accepted October 13, 2020

DOI: 10.3892/mmnr.2021.11866

Abstract. It is generally considered that there is an increase in glycolysis in the hypertrophied right ventricle (RV) during pulmonary hypertension (PH), which leads to a decrease in glucose oxidation through the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Although recent studies have demonstrated that fatty acid (FA) and glucose accumulated in the RV of patients with PH, the details of this remain to be elucidated. The purpose of the current study was to assess the metabolic remodeling in the RV of rats with PH using a metabolic analysis. Male rats were treated with the vascular endothelial growth factor receptor blocker SU5416 followed by 3 weeks of hypoxic conditions and 5 weeks of normoxic conditions (Su/Hx rats). Hemodynamic measurements were conducted, and the RV was harvested for the measurement of metabolites. A metabolomics analysis revealed a decreasing trend in the levels of alanine, argininosuccinic acid and downstream TCA cycle intermediates, including fumaric and malic acid and an increasing trend in branched-chain amino acids (BCAAs) in Su/Hx rats compared with the controls; however, no trends in glycolysis were indicated. The FA metabolomics analysis also revealed a decreasing trend in the levels of long-chain acylcarnitines, which transport FA from the cytosol to the mitochondria and are essential for beta-oxidation. The current study demonstrated that the TCA cycle was less activated because of a decreasing trend in the expression of fumaric

acid and malic acid, which might be attributable to the expression of adenylosuccinic acid and argininosuccinic acid. These results suggest that dysregulated BCAA metabolism and a decrease in FA oxidation might contribute to the reduction of the TCA cycle reactions.

Introduction

Various factors, such as the genetic background and biological environment, are suggested to induce vasoconstriction of the pulmonary arteries and cell proliferation in pulmonary vasculature in many forms of pulmonary hypertension (PH) (1-3). This leads to stenosis and obstruction of the vascular lumen, resulting in an increase in the pulmonary arterial (PA) pressure (4). In accordance with the increase in pressure, the right heart function decreases, leading to right heart failure, which eventually becomes a prognostic factor in these patients (5,6).

Metabolic remodeling has been described not only in pulmonary artery vascular cells but also in the right ventricle cardiomyocytes of pulmonary arterial hypertension (PAH) (7). The metabolic alterations include mitochondrial inactivation, which leads to the suppression of glucose oxidation through the tricarboxylic acid (TCA) cycle and upregulation of normoxic glycolysis (8,9).

Fatty acid (FA) oxidation is suggested to be the major source of energy production, especially in the left ventricle. Indeed, it is responsible for 60-90% of ATP synthesis (10). Although the details of FA metabolism in the hypertrophied RV in PH remain unclear, our recent studies using positron emission tomography (PET) and ¹²³I-β-methyl iodophenyl pentadecanoic acid (BMIPP) uptake imaging have revealed the accumulation of not only glucose but also FA in the RV of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) (11,12). However, these studies only showed the accumulation of FA in the cytoplasm, and whether or not FA oxidation actually occurs through the TCA cycle in mitochondria has remained unclear.

FA oxidation in the hypertrophied RV in PH is still controversial. An increase in FA oxidation in the RV was shown in the PA banding model (13). However, a reduction in FA oxidation was noted in both the adaptive and maladaptive RV in the monocrotaline rat model and the PA banding model (14-16). In addition, impaired FA transport into the

Correspondence to: Professor Seichiro Sakao, Department of Respiriology (B2), Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan
E-mail: sakaos@faculty.chiba-u.jp

Abbreviations: BCAAs, branched-chain amino acids; BMIPP, ¹²³I-β-methyl iodophenyl pentadecanoic acid; CTEPH, chronic thromboembolic pulmonary hypertension; FA, fatty acid; HCA, Hierarchical cluster analysis; PA, pulmonary arterial; PAH, pulmonary arterial hypertension; PCA, principal component analysis; PH, pulmonary hypertension; RV, right ventricle; RVSP, RV systolic pressure; TCA cycle, the tricarboxylic acid cycle

Key words: metabolic remodeling, right ventricle, pulmonary hypertension, SU5416

