

【総説】

## 心不全におけるコリン由来代謝物質の意義

吉田 陽子<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>順天堂大学大学院医学研究科 先進老化制御学講座

<sup>2</sup>順天堂大学大学院医学研究科 循環器内科学

### 要約

これまでの研究で、心不全患者における低体温がその予後と関連していることが報告されているが、その機序については明らかにされていない。今回我々は、心不全時の褐色脂肪機能不全に伴って増加した代謝物質が心臓の代謝リモデリングを惹起し、心不全をさらに増悪させることを見出だした。大動脈縮窄術による心不全モデルマウスでは、熱産生能などの褐色脂肪機能が低下した。心不全モデルにおいて褐色脂肪機能を増強すると心機能が改善し、反対に褐色脂肪機能不全モデルマウスでは圧負荷時の心機能低下や心臓の線維化が悪化した。メタボローム解析により、心不全時には Trimethylamine N-oxide (TMAO) が心臓や血液中で増加すること、TMAOの前駆代謝物質であるコリンが不全褐色脂肪において増加することがわかった。さらに詳細な検討により、TMAOが心筋細胞の代謝リモデリング、特にミトコンドリア障害を来すことにより、心不全の病態の進行に寄与していることが示唆された。これらの結果より TMAO が心不全の新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

キーワード：褐色脂肪、心不全、代謝産物

### 1. 研究の背景

我が国では65歳以上の老年人口が28%を超え、既に超高齢社会に突入している。よく知られているように糖尿病や心不全、慢性腎障害や癌などは加齢とともに増加する疾患であり、ますます高齢化が進行することが予想される我が国においてはこれらの加齢関連疾患の病態解明や新たな治療法の開発が重要となってくる。

循環器疾患、特に心不全の分野においては、従来高いエビデンスをもって治療に使われてきた薬剤に加えて、新規治療薬やデバイスも含めた治療が行われるようになり、心不全治療は近年、新たな局面を迎えつつある。しかしながら重症心不全の予後は未だに不良であり、心不全の発症・進展の機序の解明や新たな治療の開発は現在なお喫緊の課題である。

ヒトの体内には6500種以上もの代謝産物が存在し、その変化が心不全の病態と密接な関連があると言われている<sup>[1]</sup>。コリンやその代謝産物であるトリメチルアミン N-オキシド (Trimethylamine N-Oxide, TMAO) は

ヒトの心不全患者の血液中で増加し、心不全の重症度分類であるNYHA (New York Heart Association) 分類と正の相関をするということが報告されている<sup>[2]</sup>。コリンはメチル基を有する4級アンモニウムカチオンで、生体内においては細胞膜の構造の維持に重要な役割を果たしている他、アセチルコリンなどの神経伝達物質の前駆体としての役割やメチル基を供給する代謝サイクルにおいても重要な役割を果たしていることが知られている。これらの働きは、内因性代謝経路の中でコリンが様々な形のコリン代謝物に形を変えることでその作用を発揮するが、外因性の代謝経路としては、食餌由来のコリンは腸内細菌によって中間代謝物トリメチルアミン (Trimethylamine, TMA) へ代謝された後、肝臓でTMAOへ変換されると考えられている。TMAOは動脈硬化巣へのコレステロールの蓄積を促進することにより、TMAOは動脈硬化の病態を進行させると言われているが<sup>[3]</sup>、TMAOの心不全の病態における役割や意義は不明のままである。

脂肪組織は白色脂肪と褐色脂肪に大別される。褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue, BAT) はかつては乳幼児と齧歯類にのみ存在する熱産生組織であると考えられていたが、近年、ヒトの成人にも存在し、全身の代謝を制御する活発な代謝臓器であることがわかってきた<sup>[4-6]</sup>。食餌誘導性肥満モデルマウスでは褐色脂肪が機能不全に

連絡先：吉田 陽子

〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1

TEL : 03-3813-3111 FAX : 03-5689-0627

E-mail : yohkoyoshida@juntendo.ac.jp

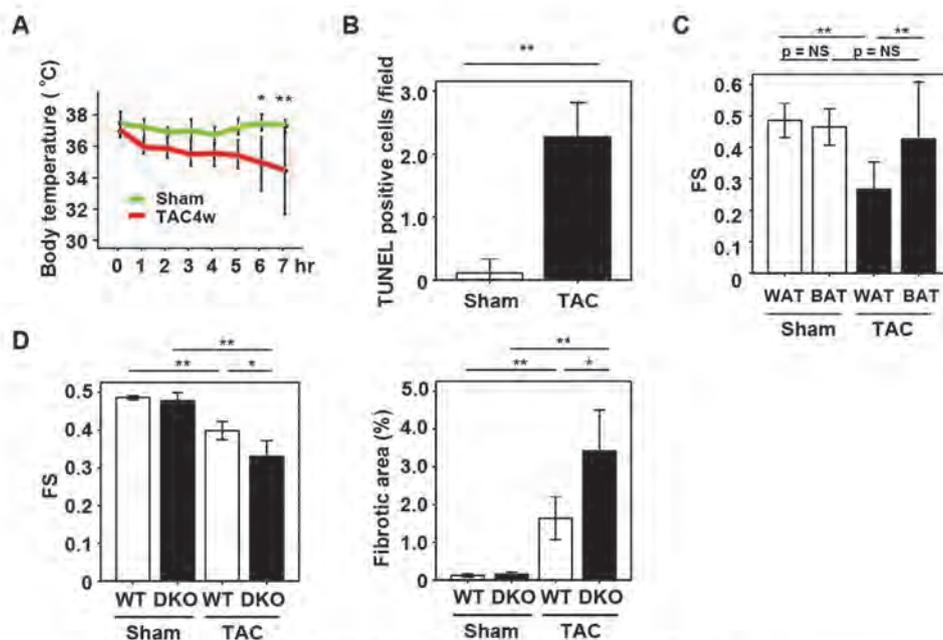


図1 圧負荷時に褐色脂肪の機能不全が生じる

A: TACモデルマウスにおける急性寒冷刺激試験 B: TACモデルマウスの褐色脂肪組織におけるアポトーシス  
 C: 褐色脂肪移植マウスにおける左室収縮能 D: 遺伝的褐色脂肪機能不全マウスにおける心機能(左)および心臓線維化(右)  
 TAC; 大動脈縮索術、Sham; 偽手術、WAT; 白色脂肪移植群、BAT; 褐色脂肪移植群、FS; Fractional Shortening(左室収縮能)  
 WT; 野生型、DKO; 褐色脂肪特異的Mfn1/Mfn2ダブルノックアウトマウス(遺伝的褐色脂肪機能不全マウス)  
 (Sci Rep 2022 (文献22)より引用改変)

陥り、全身のインスリン抵抗性を引き起こすこと<sup>[7]</sup>、心機能が保たれた心不全(Heart failure with preserved ejection fraction, HFpEF)モデルマウスでは褐色脂肪の機能低下が報告されている<sup>[8]</sup>。また体温の低い心不全患者は予後不良であるという報告もあり<sup>[9]</sup>、褐色脂肪機能と心不全の病態には何らかの密接な関連性があることが示唆されるが、その詳細については未解明のままである。

今回我々は、心不全の病態において褐色脂肪が機能不全に陥ることでコリン代謝が変容し、その結果、体内で増加したTMAOが心筋ミトコンドリアの機能を低下させることで心機能を負に制御することを明らかにした。

## 2. 左室圧負荷時の褐色脂肪機能不全が心機能を悪化させる

横行大動脈縮索(Transverse Aortic Constriction, TAC)による左室圧負荷モデルを作製すると、TAC4週後には心機能低下とともに、体表温度の低下や急性寒冷刺激試験時の熱産生能の低下が見られた(図1A)。その際の褐色脂肪組織はHypoxic probeを用いた免疫組織学的手法による解析により低酸素状態となっており(data not shown)、熱産生に重要な働きをするUncoupling protein-1(UCP-1)の発現の低下やアポトーシスの増加が見られたことから(図1B)、左室圧負荷時には心不全に起因する全身の循環不全(虚血)に伴う低酸素ストレスにより褐色脂肪細胞の細胞死(アポトーシス)が増加し、褐色脂肪の機能不全が生じていることが示唆された。

健康なマウスの褐色脂肪組織をレシピエントマウスの腹腔内に移植し、褐色脂肪機能を増強したマウスにTACを

行うと、熱産生能の回復とともに圧負荷時の心機能低下が改善した(図1C)。反対に遺伝的褐色脂肪機能不全マウスである褐色脂肪特異的Mfn1/Mfn2ダブルノックアウトマウスでは、圧負荷時の心機能がさらに低下し心臓の線維化がさらに悪化すると共に、TAC後の死亡率も増加した(図1D)。同様に、褐色脂肪組織を外科的に切除(BATectomy)した褐色脂肪機能不全マウスモデルにおいても圧負荷時の心機能がさらに悪化した。

心不全時には種々の経路により慢性的な過剰な交感神経活性化が生じ、これが心機能を悪化させることが知られている<sup>[10, 11]</sup>。我々のTACモデルマウスにおいても検証したところ、TACモデルの褐色脂肪組織ではノルエピネフリンレベルが上昇していることがわかった。そこで、褐色脂肪組織に投射する交感神経を外科的に除神経したところ、圧負荷時の心機能低下が改善することがわかった。

これらの結果から、圧負荷時には低酸素ストレスや過剰な交感神経の活性化を介して褐色脂肪細胞のアポトーシスが生じ、褐色脂肪機能不全が引き起こされること、褐色脂肪機能不全が何らかの機序により圧負荷時の心機能低下を惹起することが示唆された。

## 3. 圧負荷時に増加するTMAOが心機能低下を引き起こす

褐色脂肪機能不全が心不全を引き起こす分子メカニズムを明らかにするため、TACモデルマウスの様々な組織を用いて、網羅的なメタボロミクス解析を行った。その結果、TACマウスの褐色脂肪組織ではコリンが増

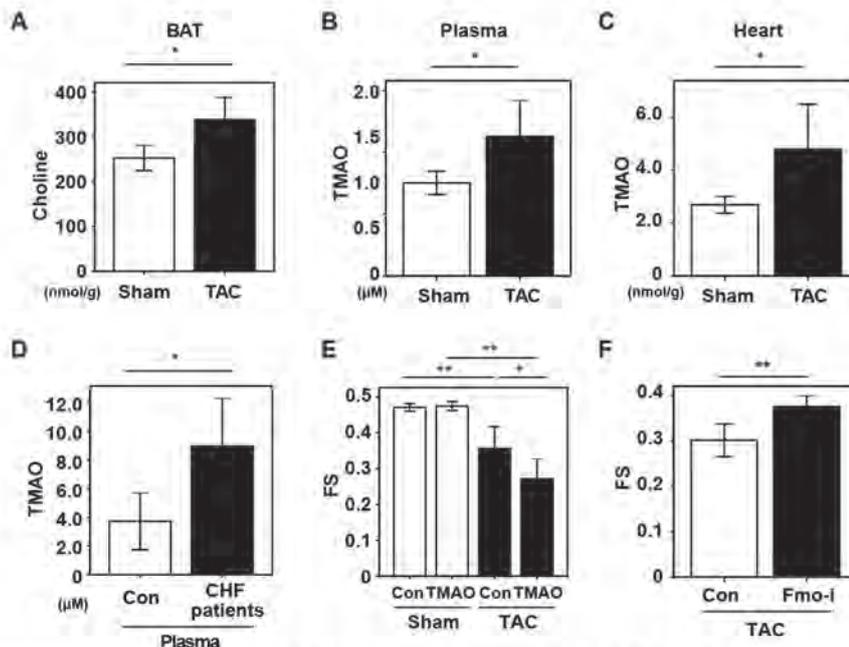


図2 圧負荷時に増加するTMAOが心機能を低下させる

A: TACモデルマウスの褐色脂肪におけるコリンレベル B, C: TACモデルマウスの血漿(B)および心臓組織(C)におけるTMAOレベル  
D: 心不全患者の血中TMAOレベル E: TMAO投与下のTACモデルマウスにおける心機能  
F: FMO阻害薬投与下のTACモデルマウスにおける心機能  
TAC; 大動脈縮窄術、Sham; 偽手術、CHF; うっ血性心不全、FS; Fractional Shortening(左室収縮能)、Fmo-i; FMO阻害薬  
(Sci Rep 2022 (文献22)より引用改変)

加すること (図 2 A)、また血漿と心臓においてコリンの代謝産物である TMAO が増加することが明らかになった (図 2 B, C)。さらに BAT を腹腔内に移植したモデルにおいては、血中コリンレベルが低下することがわかった。以前に心不全患者の血液中ではコリンや TMAO レベルが上昇し、これは心不全の重症度とも相関することが報告されている<sup>[2]</sup>。また我々が行った心不全患者における調査においても、健康な成人と比較して心不全患者では血液中的コリンや TMAO レベルが上昇しており (図 2 D)、我々の心不全モデルマウスでのメタボロミクス解析の結果はヒト心不全患者のデータとも一致するものであると考えられた。さらに上述の外科的に BAT を切除した BATectomy モデルマウスでは圧負荷時に血液中心臓においてさらに TMAO レベルが上昇することがわかった。これらの結果から、圧負荷時に生じる褐色脂肪機能不全により正常に代謝されなくなったコリンが、TMAO へと変換され、血液中心臓において増加していることが示唆された。

そこで、圧負荷時に増加する TMAO の病的意義を検証するために、TAC による心不全モデルマウスに TMAO の持続投与を行った。TAC を行った 2 週間から 2 週間、浸透圧ポンプを用いて TMAO を持続投与したところ、圧負荷時の心機能低下や心臓組織の線維化が TMAO 投与群でさらに悪化することがわかった (図 2 E)。同様に、食餌によるコリン負荷 (高コリン食) を TAC モデルに行った際にも、血中や心臓での TMAO レベルが上昇すると共に、圧負荷時の心機能低下や心臓線維化が悪化することがわかった。

次に、中間代謝産物 TMA から TMAO への変換を触媒する酵素である Flavin-containing monooxygenase (FMO) の阻害により TMAO の産生を抑制し、心不全モデルにおける TMAO の病的意義の検証を行った。哺乳類では FMO1~5 の 5 つのアイソザイムが存在することが知られている。メチマゾールは一般的には抗甲状腺薬として使用されるが、低用量で FMO1~FMO5 全ての酵素活性を抑制する FMO 阻害剤として作用することが知られている<sup>[12-14]</sup>。そこで心不全モデルマウスに低用量のメチマゾールを投与したところ、圧負荷時の血中 TMAO レベルの上昇が抑制されるとともに、心機能低下や心臓の線維化が改善した (図 2 F)。さらに我々はバイオインフォマティクスの手法で FMO2 が雄マウスの TMAO 産生に重要であることを同定し、FMO2 ノックアウトマウスにおいても同様に検証を行った。CRISPR-Cas9 システムにより作出した全身 FMO2 ノックアウトマウスにおいて TAC を行うと、圧負荷時の心臓での TMAO レベルが低下するとともに、心機能の低下や心臓線維化が改善することがわかった。以上の結果から、FMO、特に FMO2 が圧負荷時の TMAO 増加に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 4. TMAO はミトコンドリア障害を介して心筋代謝リモデリングを引き起こす

次に我々は詳細な機序を検証するため、TMAO を持続投与したマウスを用いて解析を行った。浸透圧ポンプを用いて TMAO を 2 週間持続投与したマウスの心臓を用いてメタボロミクス解析を行ったところ、TMAO 投

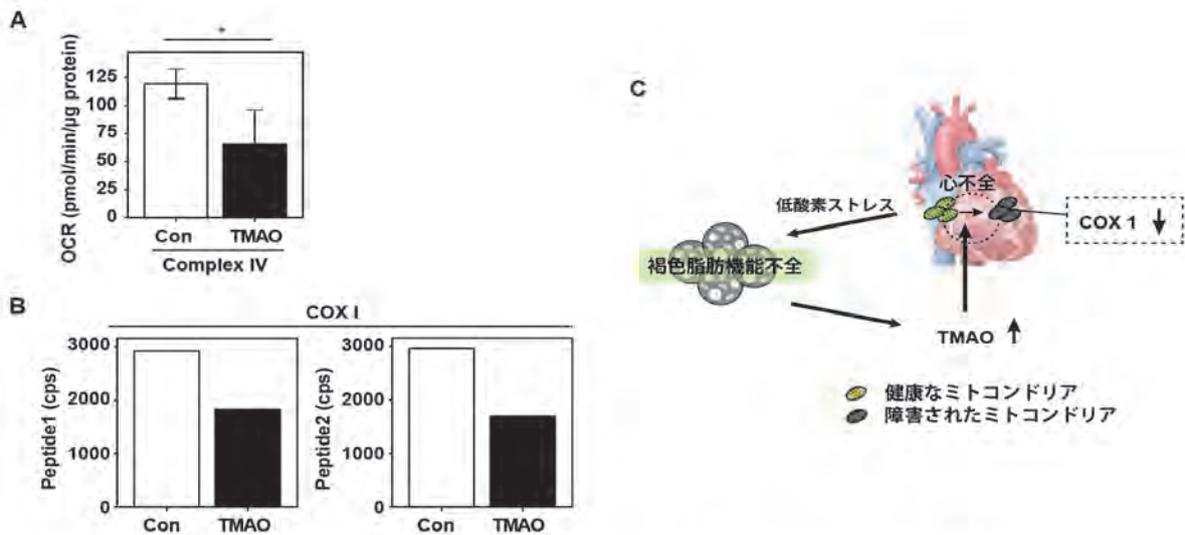


図3 TMAOはミトコンドリア障害を介して心筋代謝リモデリングを引き起こす

A: TMAO投与マウスの単離心臓ミトコンドリアにおけるComplex IV機能(細胞外フラックスアナライザー)  
 B: TMAO投与マウスの単離心臓ミトコンドリアにおけるCOX Iレベル(プロテオミクス解析) C: 本研究のサマリー  
 OCR; Oxygen consumption rate (Sci Rep 2022 (文献22)より引用改変)

与により心臓でのATP産生やリン酸化クレアチンレベルが低下していることがわかった。さらに電子顕微鏡にて詳細な観察を行うと、TMAOを投与したマウスの心臓ではミトコンドリアの膨化・腫大やクリステ構造の破壊が見られ、細胞外フラックスアナライザーにより解析するとミトコンドリア酸化的リン酸化経路のうちのComplex IVの機能が低下していることが示唆された(図3A)。以上の結果よりTMAOの投与により心筋においてミトコンドリア、特にComplex IVの機能が傷害を受けていると考えられた。

さらに詳細に解析するため、TMAO投与マウスの心臓を用いてRNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析および単離ミトコンドリアの網羅的プロテオミクス解析を行った。その結果、RNA-seq解析では心臓においてTMAO投与により代謝リモデリングが生じていることが示唆され、またプロテオミクス解析ではミトコンドリアComplex IVのコンポーネントであるCOX I (Cytochrome C oxidase I) のレベルが低下していることがわかった(図3B)。COX IをコードするMT-CO1の発現レベルには変化がなかったことから、TMAOは翻訳後修飾によりタンパクレベルでCOX Iの発現を制御しているものと考えられた。

以上の結果から、TMAOがCOX Iの発現抑制を介して心筋のミトコンドリア機能を抑制し、本来、脂肪酸を主な基質としたミトコンドリア呼吸によって心筋収縮に必要なATPを大量に産生している心筋細胞において、その代謝経路を障害していること、すなわち心筋の代謝リモデリングを生じさせていること、このことにより、圧負荷時の心機能をさらに低下させていることが示唆された。

## 5. 考察

本研究において我々は、心不全モデルマウスにおいて褐色脂肪が機能不全に至り、コリン代謝に異常を生じること、その結果、TMAO産生が増加し褐色脂肪機能不全が心不全をさらに悪化させることを明らかにした。TMAO産生酵素であるFMOは従来、そのアイソザイムの一つであるFMO3がよく研究されてきた。FMO3はメスでは肝臓において多く発現し、TMAO産生に重要であることが知られているが、オスではその発現は低いことが知られている<sup>[15]</sup>。我々の検討においてもオスの肝臓ではFMO3の発現は低く、一方でバイオフィォマティクスの手法によりFMO2がオスのTMAO産生に重要であることが示唆された。実際に、FMO2のノックアウトマウスを用いた検討により、FMO2が圧負荷時のTMAO産生に重要な役割を果たすこと、TMAOはミトコンドリアのComplex IVの機能抑制を介して心筋代謝を負に制御することが明らかとなった。コリンは腸内細菌の働きにより中間代謝産物TMAへ代謝され、肝臓のFMOによりTMAOへと変換されると広く受け入れられている<sup>[16]</sup>。しかしながら、我々の検討において、褐色脂肪機能不全がどのようにTMAOの増加を制御しているか、あるいは心不全がどのようにFMOの酵素活性に影響を与えているかについては、未だ明らかではなく、今後の検討が必要である。

これまでの報告により心不全患者では腸内細菌のバランスの変化(dysbiosis)が生じていることが知られている<sup>[17]</sup>。Pasiniらは心不全時にはCandidaやCampylobacter、Shigella、Salmonella、Yersinia enterocoliticaといった病原性を有する種属の腸内細菌が増加することを報告している<sup>[18]</sup>。また心不全患者ではFaecalibacterium prausnitziiが減少しRuminococcus gnavusが増加する

こと、これらの変化は TMA 産生酵素である TMA-lyase の増加と相関していることが報告されている<sup>[19]</sup>。Hayashi らは *Escherichia/Shigella* 属と TMAO レベルが正の相関を示すことを報告している<sup>[20]</sup>。これらの知見は心不全時の腸内細菌の変化 (dysbiosis) が TMA-lyase の活性レベルの変化を介して TMAO レベルを制御している可能性を示しており、今後の詳細な検討が期待される。

Tahara らは FDG-PET を用いた検討により心不全患者で体温の低下とともに BAT の検出率が低下し、心不全において BAT による熱産生が低下していることを示唆する報告をしている<sup>[21]</sup>。我々の検討においては、心不全マウスの体温の低下や熱産生能の低下が見られたが、その際の BAT は低酸素状態であるとともにアポトーシスが増加し、さらに BAT 組織中のノルエピネフリンレベルが増加していた。さらにカテコラミン投与により心機能が低下するよりも以前から熱産生能が低下していることが明らかとなったことから、圧負荷時には持続的かつ過剰な交感神経の活性化が褐色脂肪の機能不全を誘導し、TMAO の産生増加を介して心機能をさらに悪化させる悪循環が存在していることが示唆された (図 3C)<sup>[22]</sup>。心不全時には TMAO は血液中でも増加しており、心臓以外にもミトコンドリアが多く存在する臓器、例えば骨格筋などにおいても影響を及している可能性が考えられる。心不全時の他臓器における TMAO の役割も検討していくことで、心不全に伴う様々な病態への理解が深まり、より効果的な心不全治療を創出できる可能性があると考えられた。

#### 引用文献

1. Ikegami R, Shimizu I, Yoshida Y, et al. Metabolomic analysis in heart failure. *Circ. J.* 82 : 10-16, 2017.
2. Troseid M, et al. Microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure. *J. Intern. Med.* 277 : 717-726, 2015.
3. Koeth RA, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat.Med.* 19 : 576-585, 2013.
4. Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The common and distinct features of brown and beige adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* 29 : 191-200, 2018.
5. Sacks H, Symonds ME. Anatomical locations of human brown adipose tissue : Functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 62 : 1783-1790, 2013.
6. van der Lans AA, et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases non shivering thermogenesis. *J.Clin.Investig.* 123 : 3395-3403, 2013.
7. Shimizu I, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J.Clin.Investig.* 124 : 2099-2112, 2014.
8. Valero-Munoz M, et al. Heart failure with preserved ejection fraction induces beigeing in adipose tissue. *Circ.HeartFail.* 9 : e002724, 2016.
9. Ahmed A. et al. Decreasing body temperature predicts early rehospitalization in congestive heart failure. *J.Card.Fail.* 14 : 489-496, 2008.
10. Cohn JN, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N.Engl.J.Med.* 311 : 819-823, 1984.
11. Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N.Engl.J.Med.* 341 : 577-585, 1999.
12. Collins HL, et al. L-Carnitine intake and high trimethylamine N-oxide plasma levels correlate with low aortic lesions in ApoE (-/-) transgenic mice expressing CETP. *Atherosclerosis* 244 : 29-37, 2016.
13. Osman AM, Nemnem MM, Abou-Bakr AA, et al. Effect of methimazole treatment on doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Food Chem. Toxicol.* 47 : 2425-2430, 2009.
14. Li B et al. Flavin-containing monooxygenase, a new clue of pathological proteins in the rotenone model of parkinsonism. *Neurosci. Lett.* 566 : 11-16, 2014.
15. Janmohamed A, Hernandez D, Phillips IR, et al. Cell-, tissue-, sex-and developmental stage-specific expression of mouse flavin-containing monooxygenases (Fmos). *Biochem. Pharmacol.* 68 : 73-83, 2004.
16. Cho CE, Caudill MA. Trimethylamine-N-oxide : Friend, foe, or simply caught in the cross-fire?. *Trends Endocrinol. Metab.* 28 : 121-130, 2017.
17. Anderson KM, et al. The heart and gut relationship : a systematic review of the evaluation of the microbiome and trimethylamine- N-oxide (TMAO) in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 27 : 2223-2249, 2022.
18. Pasini E, et al. Pathogenic gut flora in patients with chronic heart failure. *JACC Heart Fail.* 4 : 220-227, 2016.
19. Cui X, et al. Metagenomic and metabolomic analyses unveil dysbiosis of gut microbiota in chronic heart failure patients. *Sci. Rep.* 8 : 635, 2018.
20. Hayashi T, et al. Gut microbiome and plasma microbiome-related metabolites in patients with decompensated and compensated heart failure. *Circ. J.* 83 : 182-192, 2018.
21. Tahara A, et al. Brown adipose tissue activation in severe heart failure. *Eur. Heart J.* 41 : 2415, 2020.
22. Yoshida Y, Shimizu I, Minamino T, et al. Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism. *Sci Rep.* 12 : 14883, 2022.

# Choline-derived metabolite as a novel therapeutic target for heart failure

Yohko Yoshida<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Department of Advanced Senotherapeutics, Juntendo University Graduate School of Medicine

<sup>2</sup>Department of Cardiovascular Biology and Medicine, Juntendo University Graduate School of Medicine

## Abstract

Low body temperature predicts poor clinical outcomes in patients with heart failure, however, underlying mechanisms and pathological implications are largely unknown. Brown adipose tissue (BAT) was initially characterized as a heat generating organ, and studies suggest it has crucial roles for maintaining systemic metabolic health. Here, we demonstrate that alteration of BAT function contributes to development of heart failure through disorientation in choline metabolism. Thoracic aortic constriction (TAC) reduced the thermogenic capacity of BAT in mice, leading to significant reduction of body temperature under cold exposure. BAT became hypoxic with TAC, and hypoxic stress induced apoptosis of brown adipocytes. Cardiac function was impaired in a mouse model of genetic BAT dysfunction, in association with a low survival rate after TAC. Metabolomic analyses showed that BAT dysfunction led to an increase of choline and its downstream metabolite, trimethylamine N-oxide (TMAO), promoting metabolic dysfunction in the failing heart. TMAO administration resulted in a significant reduction in phosphocreatine or ATP level in cardiac tissues via suppression of mitochondrial complex IV activity. Inhibition of TMAO production ameliorated cardiac dysfunction during left ventricular pressure overload. These results suggest that maintenance of BAT homeostasis and reducing TMAO production could be potential next-generation therapies for heart failure.

**Keywords :** Brown adipose tissue, Heart failure, Metabolites