

活性硫黄を標的とした心血管病予防治療法の開発

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター
(兼 生理学研究所) 心循環シグナル研究部門
西田 基宏

1. はじめに

生活習慣に起因する心血管疾患の病態・成因において、細胞内の酸化還元(reduction/oxidation:レドックス)バランスの破綻が示唆されている。酸素呼吸の過程で生成される活性酸素種(ROS)が細胞内酸化を促進する主要物質であると古くから考えられてきたが、その多くの反応は可逆的であり、むしろROSと生体分子との反応で形成される親電子性の2次生成物(親電子物質)による不可逆的な修飾反応が慢性的な酸化を引き起こす主因になることが近年明らかにされつつある。我々は最近、循環血液中の活性硫黄分子(Reactive Sulfur Species: RSS)が親電子物質を消去する求核物質として働くことを見出した(1)。しかし、内因性RSSの分子実体およびRSSの生理学的・病態生理学的役割についてはよくわかっていない。本研究では、RSSの分子実体の同定を第一の目的とした。第二に、心不全時に生成される内因性親電子物質を心血管病の実態を反映する生体物質と捉え、心臓においてRSSが、いつ、どこで形成または消費され、心筋老化にどう影響するのか個体レベルで明らかにすることを目的とした。さらに、個体レベルで得られた心臓の形態変化や機能変化を指標に、RSS枯渇を模倣する病態心筋モデル細胞を作成し、国が安全性を保証している既承認薬を用いたスクリーニングを実施することで、心不全治療薬への適応拡大につながる既承認薬の同定を目指した。

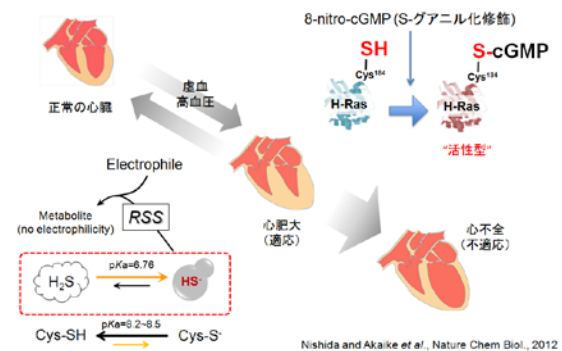


図1 活性硫黄 (RSS) による H-Ras の親電子修飾 (S-グアニル化) を介した心筋老化の抑制

2. 方法

大腸菌からヒト組換えH-Rasタンパク質を精製し、内因性親電子物質の一つである8-nitro-cGMP(東北大学医学部・赤池孝章教授より供与)を処置することで誘発される親電子修飾(S-グアニル化)を、S-グアニル化抗体(東北大学医学部・赤池孝章教授より供与)を用いてウェスタンブロット法により検出した。ポリ硫黄の検出は、ポリ硫黄と特異的に反応する蛍光指示薬(SSP2;東北大学医学部・赤池孝章教授より供与)を用いて間接的に評価した(2)。

C57BL/6J雄性マウス(8週齢)をインフルランの吸入麻酔した後、人工呼吸下で開胸し、心臓の左前下行枝(LAD)を結紮し、心筋梗塞モデルを作成した。心筋梗塞後の心機能は心エコー法により経時的に観察し、心筋梗塞4週間後にミラーカテーテルを挿入することで左心室内圧を測定することで評価した。心筋梗塞1週間後および4週間後のマウスを安楽死させ、心臓を取り出し、real time PCR解析、タンパク発現解析、免疫染色による形態観察(心筋細胞面積およびコラーゲン陽性領域の測定)ならびに透過型電子顕微鏡を用いたミトコンドリア形態観察に用いた。心臓組織中のポリ硫黄量およびATP量については、摘出後すぐにSSP2およびATP検出蛍光指示薬(九州大学大学院薬学研究院・王子田彰夫教授より供与)と反応させることで、心筋老化については老化特異的βガラクトシダーゼ染色法により間接的に測定した。

ラット新生児心筋細胞は常法により単離し、初代培養を行った。培養4日目の細胞を低酸素インキュベーター(1% O₂)内で16時間培養し、その後普通の酸素空気分圧下で12時間培養することで再酸化刺激を行った。ミトコンドリアの形態観察はMitotracker Green試薬を処置することでを行い、細胞内ATP濃度は市販のルシフェラーゼ定量キットを用いて測定した。活性酸素の生成は、MitoSOXおよびdichlorofluorescein diacetate (DCF)を用いて蛍光法により評価した。

Dynamin related protein 1 (Drp1)活性は、アガロースビーズを融合させたGTPを細胞懸濁液と混ぜ、ブルダウンしたタンパクをDrp1抗体を用いてウェスタンブロットすることで評価した。さらに、Drp1は活性化によ

り多量体を形成することから、GFPを融合させたDrp1をHela細胞に一過的に発現させ、Drp1-GFPの凝集塊形成を共焦点レーザー顕微鏡下で観察することにより評価した。

Drp1のジスルフィド形成は、非還元条件下でウェスタンブロットを行い、2量体のバンド強度を定量することにより評価した。その後、タンパクサンプルに強還元剤(2-メルカプトエタノール)を加えて煮沸処理したサンプルも同時にウェスタンブロット解析することにより、得られた2量体バンドがジスルフィド形成によるものであることを確認した。

3. 結果 研究成果

RSSの分子実体の同定

赤池孝章教授との共同研究の中で、①H₂S/HS⁻は高い求核性をもつにもかかわらず親電子物質とは直接反応せず、重金属などの触媒が必須であること、②H₂S生成酵素をほとんど発現していない心臓にイオウ置換された親電子物質(8-SH-cGMP)が数μM存在すること、なども明らかとなり、H₂S/HS⁻自身が心臓のレドックス恒常性を維持する制御因子とは考えにくくなってきた。これに加えて、赤池教授らが新たに考案したチオール検出試薬(プロモビマン)を用いた活性硫黄種の質量分析の結果、正常マウスの心臓にはグルタチオン(GSH)やシステイン(CysSH)の硫黄付加体(GSnH, CysSnH)が数十μM存在することがわかり、これら硫黄付加体を実際に親電子物質を直接消去したことから、循環血液中に存在するGSnHやCysSnHがレドックス恒常性を制御する分子実体である可能性が見えてきた(2)。そこで、H-Rasもポリ硫黄をもつかどうか、組換えヒトH-Rasタンパク質を用いて検証した。その結果、H-RasのS-グアニル化修飾が2-メルカプトエタノール処置により約50%阻害されることがわかった。さらに、試験管内にH-Rasタンパク質とSSP2試薬を混ぜてインキュベートするだけで蛍光強度の増大が起こったことから、H-Rasタンパク質は自身のレドックス活性の高いシステイン(Cys-184)にポリ硫黄鎖を形成している可能性が強く示唆された。

マウス心筋梗塞モデルにおける心臓中ポリ硫黄の蓄積と心筋老化との関連についての解析

心臓にはポリ硫黄を生成する酵素(シスタチオニンβ-シターゼとシスタチオニンγ-リアーゼ)がほとんど発現しておらず、ポリ硫黄は循環血液中から供給されるものと考えられる。我々は以前、心臓における親電子シグナル活性化のリードアウトが心筋老化であることを明らかにしている(1)。そこで最初に、左心室のどの領域の心筋細胞が老化しているかを調べた。心筋梗塞4週間後の左心室切片において、心筋梗塞巣の周辺領域において顕著な心筋細胞老化が観察された。そこで次に、心筋老化の前段階で何が起きているのか、心筋梗塞1週間後の左心室切片を用いて解析した。電子顕微鏡で梗塞周辺領域の心筋細胞の形態を観察したところ、ミトコンドリアが著しく分裂していることに気付いた(図2)。ミトコンドリア分裂とエネルギー産生の関係を調べたところ、驚いたことに、梗塞周辺領域ではむしろエネルギー

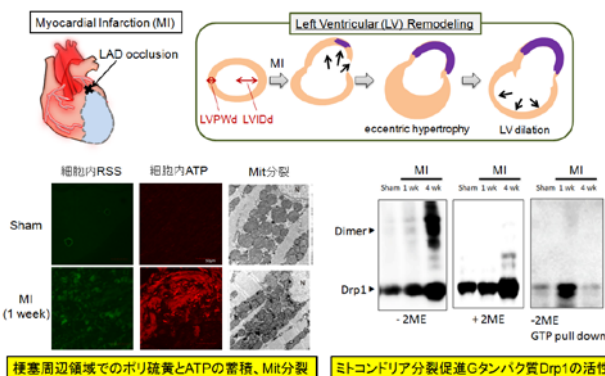


図2 心筋梗塞モデルマウスの心臓におけるポリ硫黄の蓄積と心筋冬眠化を伴うエネルギー消費低下。低酸素刺激により一過的な Drp1 活性化によるミトコンドリア分裂も観察された。

(ATP) 量が増加していた。そこで、SSP2試薬を用いて調べた結果、梗塞周辺領域にポリ硫黄が多く蓄積していることも明らかになった。ミトコンドリア電子伝達系の構成タンパク質量や呼吸能そのものは低下していなかったことから、梗塞周辺領域では心筋細胞が冬眠化(hibernation)している可能性が示された。

一方、ミトコンドリアの分裂はミトコンドリア移行性のGTP結合タンパク質Drp1の活性によって制御されている。そこで、Drp1の活性を調べたところ、心筋梗塞1週間後の心臓ではDrp1が顕著に活性化しているものの、4週間後では完全に活性が低下していることが明らかとなった。さらに、Drp1の不活性化に伴ってDrp1の2量体化が促進することもわかった。この2量体化は還元剤により消失したことから、Drp1はジスルフィド結合を形成することで、自身の活性を低下させる可能性が示された。

ラット新生児心筋細胞を用いた心筋老化モデルの作成

梗塞周辺領域では低酸素マーカータンパク質の発現が著しく上昇しており、心筋梗塞4週間後の心臓では元のレベルに戻っていた。このことは、梗塞周辺領域の心筋細胞に低酸素/再酸素化ストレスがかかっている可能性を示している。そこで、ラット新生児心筋細胞に低酸素/再酸素化刺激を行ったところ、確かに低酸素依存的にミトコンドリア分裂が誘導され、再酸素化により細胞老化が誘導されることがわかった。再酸素化後の心筋細胞内ATP量を測定したところ、やはりATP量の増加が観察されたことから、心筋細胞

が冬眠化している可能性が示された。細胞内ATP量の増加および心筋細胞老化は市販のDrp1阻害剤Mdivi-1 (10 μM)処置によりほぼ完全に抑制されたことから、Drp1の活性化が心筋の冬眠化や老化誘導の引き金となることが示唆された。

ラット新生児心筋細胞を用いた心筋老化モデルの作成

低酸素／再酸素化後の心筋ATP量の蓄積が非常に再現性良く、SN比も良かったことから、ATP量増加を指標に、国が安全性を保証している既承認薬を用いて心筋冬眠化／老化を抑制する化合物のスクリーニングを行った。当部門にある約200種類の既承認薬を処置した結果、興味深いことにジドロピリジン系のCa²⁺拮抗薬であるシルニジピン(商品名:アテレック)がATP蓄積を改善することを見出した。シルニジピンは、低酸素刺激によるDrp1活性化とミトコンドリア分裂、および再酸素化後のATP蓄積や活性酸素生成、細胞老化を顕著に抑制した。In vivoにおいても、シルニジピンは心筋梗塞後の心筋細胞老化および心機能低下を著しく改善することが明らかとなった(4)。

4. 考察 まとめ

本研究により、心筋梗塞後の左心室リモデリングにおいて、低酸素誘発性Drp1活性化によるミトコンドリア分裂と、再酸素化後のDrp1ジスルフィド結合によるDrp1不活性化が梗塞周辺領域における心筋老化誘導に深く関与することが明らかとなった。また、in vitroで本病態モデルを模倣できる実験系を構築し、既承認薬の中からDrp1を抑制する薬(シルニジピン)を新たに同定した。シルニジピンは、高血圧治療薬として臨床現場で活躍している一方で、腎保護作用や糖尿病改善作用など、多面的効果が明らかにされている。ミトコンドリア分裂抑制を主眼とする創薬研究を展開することにより、第二・第三の循環器疾患

治療薬のシード発掘が期待できる。さらに、ミトコンドリア分裂を伴う疾患には、筋萎縮性側索硬化症(ALS)やアルツハイマー病、パーキンソン病などといった難治性疾患も含まれる。本研究成果が難治性疾患の予防・治療にも貢献できる可能性があり、今後の課題としたい。

一方、硫化水素ガスが人工的に冬眠を誘発することが最近報告され、注目を集めている(3)。本研究成果だけではポリ硫黄の生理的意義の解明にたどり着けないものの、上記の報告と合わせて考察すると、本成果は内因性求核物質の分子実体であるポリ硫黄が心筋冬眠化を誘導する可能性が考えられる。今後、冬眠動物の心臓組織中のRSS動態を調べることで、自然冬眠の分子機構としてのRSSの生理的意義を明らかにすることができるかもしれない。

最後に、本研究を御支援下さったアステラス病態代謝研究会ならびに選考委員の先生方に、この場をかりて深く感謝致します。

5. 発表論文、参考文献

- (1) Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, Suematsu M, Kurose H, van der Vliet A, Freeman BA, Shibata T, Uchida K, Kumagai Y and Akaike T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chem. Biol.* 8: 714-724 (2012).
- (2) Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 May 27;111(21):7606-11. doi: 10.1073/pnas.1321232111.
- (3) Blackstone EI, Morrison M, Roth MB. H2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science.* 2005 Apr 22;308(5721):518.
- (4) 「Drp1重合阻害剤」(特許整理番号:J92628A1、発明者:西田基宏、石川達也)

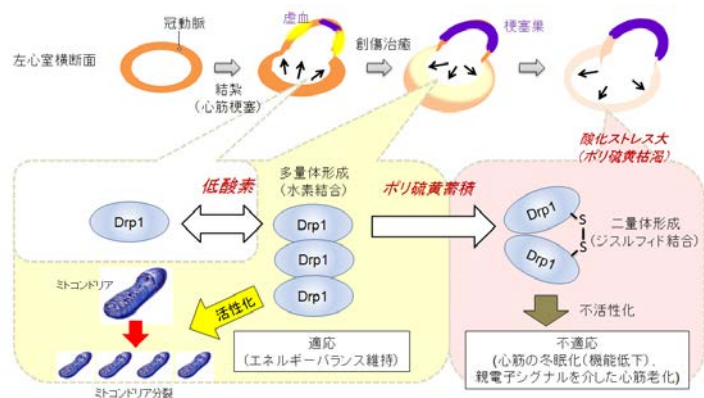


図3 心筋梗塞後リモデリングにおけるポリ硫黄の役割とその枯渇による老化誘導のメカニズム