

研究課題別評価書

1. 研究課題名

代謝産物の変化動態に基づく心筋ストレス応答機構の解明

2. 氏名

佐野 元昭

3. 研究のねらい

心不全(心機能低下)は心筋梗塞をはじめとするすべての心臓病の終末像でありその生命予後は不良である。心不全の発症頻度は加齢とともに増加する。高齢者では加齢に伴う高血圧、糖・脂質代謝異常などのリスクの集積によって心筋梗塞や心不全を煩う頻度も増加してくる。高齢者では様々な「ストレス応答の低下」から若年者と比して心不全に陥りやすくまた一度心不全を発症するとその生命予後も不良である。最近の薬物療法や非薬物療法の進歩によって心筋梗塞、心不全の患者の生命予後は改善されてきてはいるもののまだまだ社会的要望を満たしているとは言えず(unmet need) 治療法のさらなる改善の余地が残されている。私たちは心筋細胞内代謝や新規の心臓生理活性物質の探索を介して、心筋保護による新規心臓病治療法の開発をめざして研究を続けている。

4. 研究成果

4. 1 ミトコンドリア酸化ストレスに対する心筋細胞代謝リモデリング

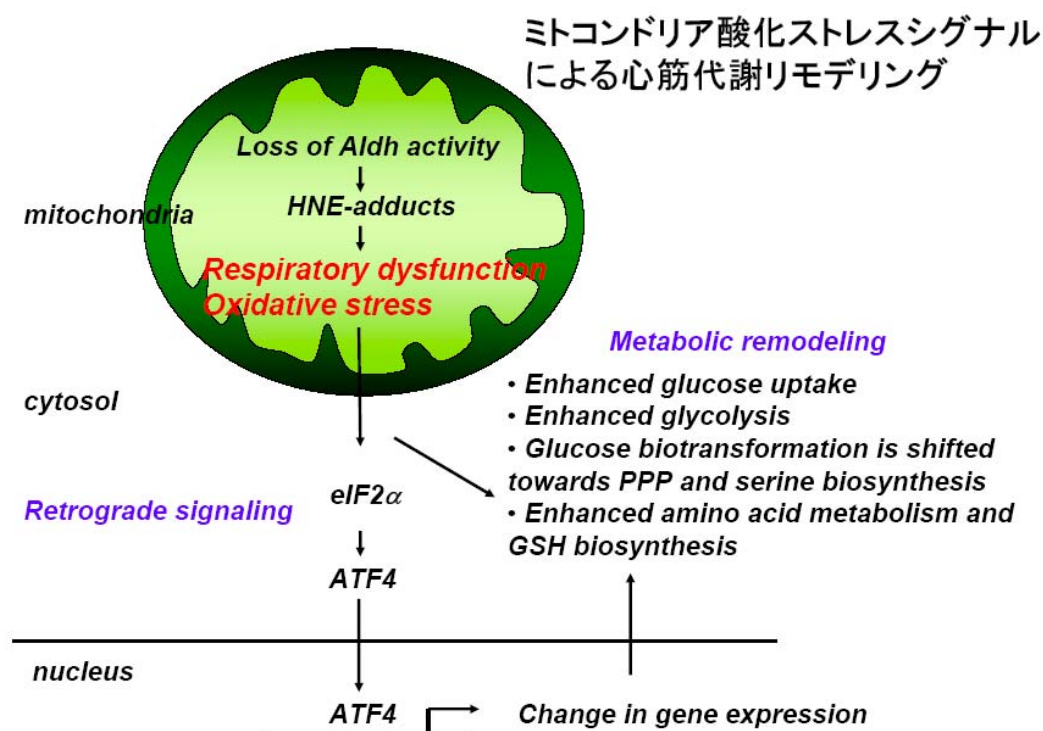
心筋細胞は終末分化した細胞である細胞周期から逸脱している。グルコースや脂肪酸をミトコンドリアでの酸化的リン酸化によって CO₂ まで完全に燃焼させ効率よくエネルギーを(ATP)産生している。一方で心臓に血行力学的負荷(高血圧による圧負荷、心筋梗塞による作業心筋の喪失など)が加わると脂肪酸の・酸化とミトコンドリアでの酸化的リン酸化が抑制され、かわりにグルコースの心筋細胞内への取り込みが亢進する。このメタボリックリモデリングは心不全への進行を予防するための適応現象なのか、反対に心不全への進行を加速させる有害な反応なのか、これまで議論的であった。心不全を発症した心筋細胞内はエネルギー飢餓状態にある。ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の低下は ATP 産生効率の低下をもたらす。一方で、特に障害をうけたミトコンドリアでの酸化的リン酸化の亢進は過剰な活性酸素の産生を招き、脂質過酸化、酸化的 DNA 障害を介してミトコンドリアのさらなる障害や細胞死を誘導して心不全の発症を招く。

脂質過酸化反応の終末代謝産物であるアルデヒドは酸化ストレス性障害の実行分子と考えられる。心不全患者の心筋細胞ミトコンドリア内にはアルデヒドが蓄積している。ミトコンドリア内でアルデヒドを無毒化する主要な代謝酵素であるアルデヒド脱水素酵素 ALDH2 を不活性化した遺伝子操作マウスでは、ミトコンドリア内にアルデヒドが蓄積して、ミトコンドリア内における酸化ストレス状態が亢進している。この遺伝子操作モデルマウスにおける心筋細胞内代謝応答を網羅的に検討したところ、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の低下し、グルコースの取り込みは亢進していた。しかし、この酸化ストレスモデルマウスの心筋細胞内エネルギー貯蔵レベルの指標であるクレアチンリン酸や ATP の低下はなく心筋収縮力も正常に維持されていた。さらに驚いたことに冠動脈結紮(虚血)・再灌流障害による急性の酸化ストレスによる心筋障害に対しても正常野生型マウスよりむしろ抵抗性を示した。

キャピラリー電気泳動質量分析装置を用いたメタボローム解析の結果、解糖系の亢進に伴ってペントースリン酸経路やアミノ酸合成経路が活性化され、結果的に細胞内還元型グルタチオン濃度が高いレベルに維持されていることが分かった。還元型グルタチオンは抗酸化ストレス応答を担う鍵分子であり、転写因子 ATF4 をノックダウンして還元型グルタチオン濃度を低下させると冠動脈結紮(虚血)・再灌流障害による急性の酸化ストレスに対する抵抗性が抑制された〔図〕。

以上の結果から、ストレスをかけられた心筋細胞における代謝リモデリングはミトコンドリアでの酸化的リン酸化を抑えて、活性酸素の発生を抑えるという意味においては生体にとって有利に働

く適応現象である可能性が示唆された。また、心筋収縮機能維持に必要なエネルギー産生は解糖系の亢進によってミトコンドリアでの酸化的リン酸化の低下を補える可能性が示唆された。



4. 2 グルココルチコイドによる心筋保護効果とプロスタグランジンD₂

グルココルチコイドは臨床の場で抗炎症・抗免疫作用を期待して汎用されている。例外的に心筋梗塞、心筋炎には臨床経験上、グルココルチコイドの使用は推奨されていない。むしろ禁忌と考えられている。しかし、グルココルチコイドが心筋細胞にどのような影響を与え、また病的状態下でのグルココルチコイド投与は心筋細胞に対して保護的に働くのか、障害促進性に働くのかはこれまで全く明らかにされてこなかった。

我々はグルココルチコイドがマウス心筋虚血再灌流障害やウイルス性心筋炎による心筋細胞死に対して心筋保護的に働くことを確認した。DNA gene chip解析を行い心筋細胞におけるグルココルチコイドの標的遺伝子を網羅的にスクリーニングした結果、グルココルチコイドは心筋細胞において例外的にphospholipase A2 (PLA2), cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現を誘導してアラキドン酸代謝を活性化させることが明らかになった。このグルココルチコイドの作用はグルココルチコイド受容体GRを介していた。グルココルチコイドによる心筋保護効果はCOX-2 阻害剤で消失することからアラキドン酸代謝の活性化が心筋保護効果に直接関与していると考えられた。液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法を用いた酸化脂質の半定量解析の結果、グルココルチコイドで刺激された心臓からはPGD₂が優位に産生させることを見出した。PGD₂合成酵素の中では、グルココルチコイドによってリポカリン型PGD₂合成酵素 (L-PGDS)が誘導されていた。

以上の結果は、心筋細胞に対してグルココルチコイド治療は細胞保護的に作用するがその効果は COX-2 依存性であることを示している。臨床の現場でしばしば解熱鎮痛剤として投与されるCOX-2 阻害剤との併用によってグルココルチコイドの心筋細胞保護効果がマスクされている可能性が示唆された。

5. 自己評価

何よりもさががけ研究を通じて分野を超えた友達の輪、共同研究の輪が広がったことが大きな財産となった。メタボローム解析は慶應義塾大学の末松誠先生、東京大学の田口良先生との共同研究によって成し得たものでこの場を借りて厚く御礼申し上げたい。メタボローム技術を応用して「心筋細胞内代謝の病態生理学的意義を明らかにする。」「新規の心臓生理活性物質の探索を介して、心筋保護による新規心臓病治療法の開発をめざす。」という当初の課題に関してはこの4年間で一定の成果が得られつつある。医学研究におけるメタボローム解析の有用性を世界に向けて発信するという「代謝と機能制御」の研究領域全体としての目的にも少しは貢献できたのではないかと思う。

6. 研究総括の見解

心臓のストレスに対する恒常性維持機構に関し、メタボローム解析手法等により eIF2 α のリン酸化シグナルを介した代謝応答によりグルタチオンレドックスサイクルを活性化させて還元状態にすることに基づくことなど明らかにし、研究は目的に沿って順調に進められた。国際学会での招待講演も行い、国際的にも高く評価されている。心不全の治療や予防への発展が期待される。

7. 主な論文等

A. さががけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K, Endo J, Katayama T, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Hattori F, Tanaka H, Fukuda K. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem.* 2007; 282(35): 25970-80.
2. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373(1):30-5.
3. Sano M, Fukuda K. Mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ Res.* 2008; 103:1191-3.
4. Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsushashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K. Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *J Clin Invest.* 2009; 119(6):1477-88.
5. Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, Matsushashi T, Katsumata Y, Zhang Y, Ito H, Nagahata Y, Marchitti S, Nishimaki K, Wolf AM, Nakanishi H, Hattori F, Vasiliou V, Adachi T, Ohsawa I, Taguchi R, Hirabayashi Y, Ohta S, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart. *Circ Res.* 2009; 105(11):1118-27.

②特許

研究期間累積件数:1件(出願公開前)

③受賞

1. 慶應義塾大学医学部三四会賞(北里賞) (2008年6月12日)
2. 慶應義塾大学医学部三四会奨励賞 (2010年1月5日)

④著書

1. 佐野元昭. 第1章「循環器の生物学」PGC-1と心機能、心筋代謝. *Annual Review 循環器* 2008年版 16-22(中外医学社)
2. 佐野元昭. ミトコンドリアエネルギー代謝. *Heart Review* Vol. 12 No. 7 (2008) p.776-781

(Medical Review 社)

3. 佐野元昭, 菱木貴子, 末松 誠, 中西広樹, 田口 良. 第1章「循環器の生物学」メタボローム. Annual Review 循環器 2009 年版 25-28(中外医学社)
4. 佐野元昭, 横尾〔徳留〕さと. 遺伝子医学MOOK16 号「メタボロミクスと最新分子バイオマーカー研究」ステロイドホルモンの心筋障害抑制作用とプロスタグランジンD₂ (株式会社メディカルドゥ)
5. 佐野元昭. 心筋ミトコンドリアの酸化的障害に対する代謝応答. 医学のあゆみ「心不全—研究と臨床の最前線」 Vol. 232 No. 5 (2010) p.359-364 (医歯薬出版株式会社)