

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08038

研究課題名(和文) 心臓における、警告シグナルとしてのグルタチオンの新たな機能の解明

研究課題名(英文) A new function of glutathione as a warning signal in the heart

研究代表者

勝俣 良紀 (KATSUMATA, YOSHINORI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：80464832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：虚血及び再灌流(IR)早期に、還元型グルタチオンが、MRP1を通して積極的に細胞外に放出され、逆に細胞内のグルタチオンは再灌流後早期に枯渇し、連鎖的脂質過酸化反応の防御機構として働くGPX4の活性が急速に低下した。さらに、心臓では、IR6時間以降と遅発性のタイミングで、フェロトーシスにつながる脂質アルコキシルラジカルが蓄積することが確認された。一方、フェロトーシス阻害薬を、IR後3時間という遅れたタイミングで投与してもIR障害が抑えられることが明らかになった。この効果は、MRP1の薬理的な阻害によって、細胞内還元型グルタチオンの細胞外への放出を抑えることでも観察できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓という代謝産物の分解が急速に進む臓器における正確な代謝の状態の空間的かつ時間的把握を確立するために、マイクロ波によるサンプル処理やマイクロダイアリス法の開発を進めてきた。高分解能質量分析を組み合わせることで、虚血再灌流という、代謝変化が瞬時に代わる病態における代謝を正確に評価することができ、そのメカニズムの解明を進めることができた。特に、これまで不明であった、虚血時、再灌流時の代謝産物の放出、遅延相にのみ起こる酸化脂質の蓄積などから、新しい治療標的の同定に成功した(図4)。これらの成果を踏まえ、臨床現場で実現可能な治療となりうる薬物または医療機器の開発につながる研究の加速が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms underlying the disruption of the glutathione-mediated reduction system related to ferroptosis during IR and developed intervention strategies to suppress ferroptosis. The extracellular glutathione release during IR was prevented by chemical inhibition or genetic suppression of glutathione transporters, mainly multidrug resistance protein 1 (MRP1). Treatment with MRP1 inhibitor reduced the intracellular reactive oxygen species levels and lipid peroxidation, thereby inhibiting cell death. Subsequent in vivo evaluation of endogenously oxidized phospholipids following IR demonstrated the involvement of ferroptosis, as levels of multiple ox-PCs were significantly elevated in the ischemic region 12 h after reperfusion. Inhibition of the MRP1 transporter also alleviated intracellular glutathione depletion in vivo and significantly reduced the generation of ox-PCs. Administration of MRP1 inhibitors significantly attenuated infarct size after IR injury.

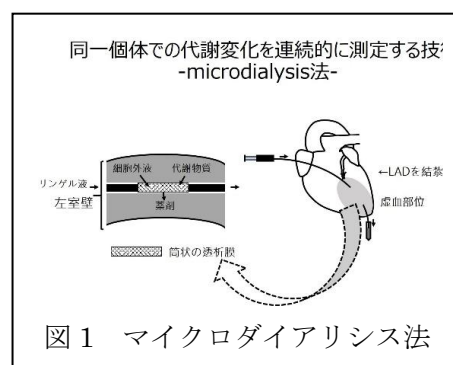
研究分野：循環器

キーワード：グルタチオン 虚血再灌流 フェロトーシス 脂質酸化 MRP1

1. 研究開始当初の背景

Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS)の開発やimaging mass spectrometry (imaging MS)の登場で、組織内の網羅的かつ空間的な低分子代謝産物の解析が可能となった (Anal. Chem., 74, 2233 (2002), Mass Spectrom. Rev. 26, 606 (2007))。我々は、これらの技術とマイクロ波を用いたマウス心臓サンプルの処理技術を組み合わせることで、マウス心臓における高い空間解析度の代謝イメージング技術を開発することに成功した (Sci Rep. 2016 Sep 1;6:32361.)。しかし、心筋障害部位での超急性期の代謝の継時的な変化については、代謝

がドラスティックかつ急速に変化するため、不明な部分が多い。特に、*in vivo*での同一個体の局所の代謝変化を連続的に解析することは困難であった。そこで、我々は、透析膜を用いた同一個体での細胞外の代謝変化を連続的に測定する技術を開発した。心臓マイクロダイアリシス法は、半透膜の特性を利用して、心筋間質に存在する低分子生体内物質を、中空糸状透析膜を介して灌流液中に分離採取する方法である (図1)。



Wistar ラットの心筋内に透析膜を中央に配したカテーテルを留置し、冠動脈閉塞・再灌流中の、細胞外の代謝産物を経時的に質量分析器にかけ、冠動脈閉塞前、閉塞中、閉塞後での各種代謝産物を網羅的に解析する。この手法により、局所の心筋代謝の変化を *in vivo*で網羅的かつ連続的に評価することが可能となる。このデータから、volcano plotなどのデータマイニングを用いて、虚血時または再灌流時に大きくかつ有意に変化した代謝産物を検証すると、細胞外のグルタチオン関連物質 (GSH、GSSG、シスチン等) の有意な変動が明らかになった。グルタチオンは細胞内では活性酸素の除去、細胞外では他の細胞へのシス테인供給源としての役割が知られている。近年、アポトーシスというプログラム細胞死に加え、フェロトーシスという細胞死の概念が虚血再灌流障害の1つの機序と考えられており (J Clin Invest. 2019;129(6):2293-2304.)、その防御因子としての主要な役割を果たしているのがグルタチオンと考えられている。そのため、虚血再灌流時のグルタチオンの放出は、心筋細胞の品質保持にとって不利な現象と考えられる。したがって、グルタチオンを細胞内に保持するメカニズムの解明は、虚血再灌流障害の軽減に重要な因子となりうる。これまでにグルタチオントランスポーターは多く発見されているが、心臓における細胞内外におけるグルタチオンの輸送メカニズムに関しては不明な点が多い。一方、細胞内レドックス状態の解析も、質量分析計を用いた過酸化脂質の研究やミトコンドリア ROS の定量化などの技術は進んだが、どのタイミングの細胞ストレスにより、どこに活性酸素や過酸化脂質が生じているのかに関する時空間的解析の報告は乏しい。心臓における細胞内レドックス状態の動的な解析を実現させ、グルタチオンの細胞内外の輸送との関連を明らかにすることで、虚血再灌流障害におけるグルタチオン放出の生理的意義を解明し、虚血再灌流障害の新たな治療戦略の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、心臓におけるグルタチオンの虚血再灌流障害時の細胞外放出のメカニズムの検証と新たな治療戦略の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 心臓におけるグルタチオンの虚血再灌流障害時の細胞外放出のメカニズムの検証

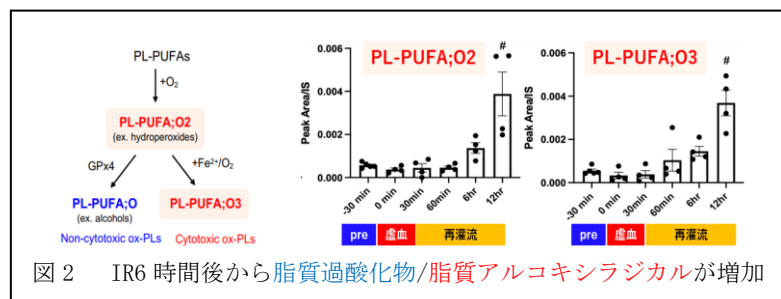
これまでに、細胞内外のグルタチオンの輸送をつかさどるトランスポーター (multidrug resistance-associated protein (MRP) など) がいくつか知られている。各種トランスポーターの心筋細胞での発現を確認するとともに、inhibitor や siRNA などを用いて、ラットの初代心筋培養による *in vitro* 研究及び *in vivo* 代謝時間イメージングを行い、細胞内外のグルタチオン関連物質の動態に関して質量分析計で評価する。また、*in vivo* で、これらトランスポーターの制御が、虚血再灌流障害を抑制するかを検証する。

(2) 虚血再灌流時のグルタチオンの細胞外放出に注目した新たな治療戦略の開発

①の成果をもとに、グルタチオンの放出を抑えた際の、虚血再灌流障害の程度を、TCC/Evans blue を用いた area at risk で評価する。また、グルタチオンの放出に伴う細胞死の機序に関して、細胞膜を構成する脂肪酸の酸化をターゲットに高分解能質量分析(HRMS)や Liperflu を用いた解析を進める。最後に、フェロトシスとの関係を、薬物的阻害を用いて検証する。

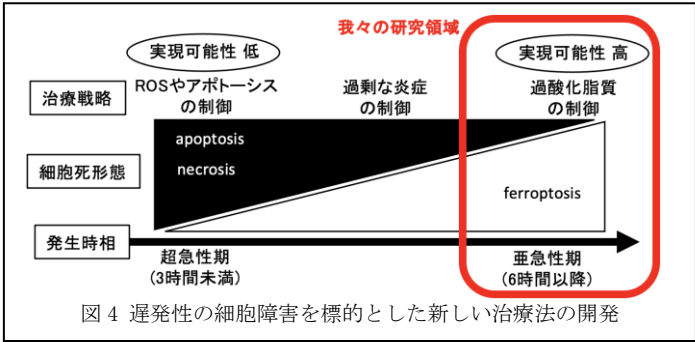
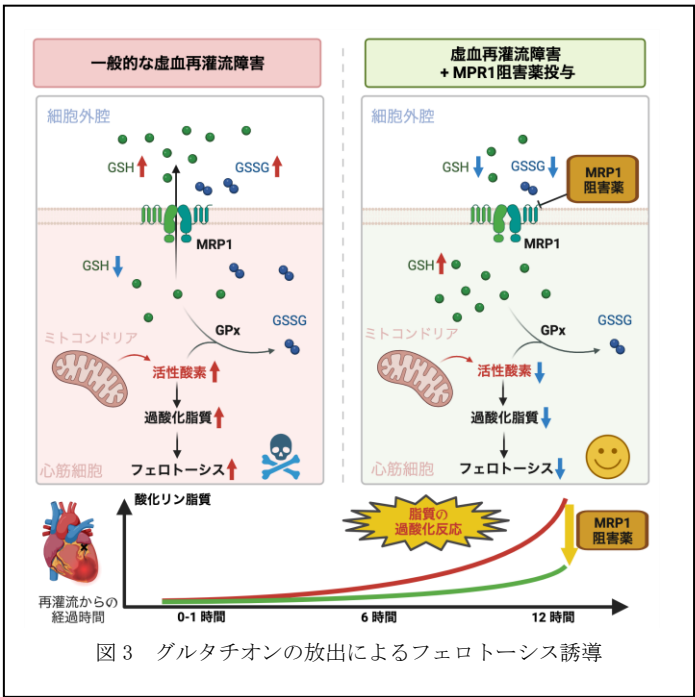
4. 研究成果

虚血及び IR 早期に、還元型グルタチオンが、MRP1 (Multidrug resistance-associated Protein 1) を通して積極的に細胞外に放出されていることが判明した。逆に細胞内のグルタチオンは再灌流後早期に枯渇し、連鎖的脂質過酸化反応の防御機構として働く GPX4 の活性が急速に低下し、Liperflu を用いた酸化脂質の蓄積は確認された。さらに、我々が保有する 465 種の酸化脂質ライブラリを用いて、虚血再灌流障害の過程でどのような種類の酸化脂質が、どの時相で、どれほどの量生成し、心筋細胞死にどの程度寄与するのかを高分解能質量分析 (HRMS) により包括的に解析した。その結果、心臓では、IR6 時間以降と遅発性のタイミングで、フェロトシスにつながる脂質アルコキシルラジカル (図 22 : PL-PUFA;O3) が蓄積することが確認された。一方、Fer-1 というフェロトシスを抑制することが知られている物質を、IR 後 3 時間という遅れたタイミングで投与しても IR 障害が抑えられることが明らかになった。さらに、この効果は、MRP1 の



薬理的な阻害によって、細胞内還元型グルタチオンの細胞外への放出を抑えることでも観察できた (図 3)。

心臓という、代謝産物の分解が急速に進む臓器における正確な代謝の状態の空間的かつ時間的把握を確立するために、マイクロ波によるサンプル処理やマイクロダイアリス法の開発を進めてきた。これらの方法と、高分解能質量分析を組み合わせることで、虚血再灌流という、代謝変化が瞬時に代わる病態における代謝を正確に評価することができ、そのメカニズムの解明を進めることができた。特に、これまで不明であった、虚血時、再灌流時の代謝産物の放出、遅延相にのみ起こる酸化脂質の蓄積などから、新しい治療標的の同定に成功した(図 4)。これらの成果を踏まえ、臨床現場で実現可能な治療となりうる薬物または医療機器の開発につなげる研究の加速が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Hirano M, Sugai K, Fujisawa M, Kobayashi E, Katsumata Y, Hakamata Y, Sano M	4. 巻 17
2. 論文標題 Pharmacokinetics of hydrogen administered intraperitoneally as hydrogen-rich saline and its effect on ischemic neuronal cell death in the brain in gerbils.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0279410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0279410.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama H, Endo J, Kataoka M, Shimanaka Y, Kono N, Sugiura Y, Goto S, Kitakata H, Hiraide T, Yoshida N, Isobe S, Yamamoto T, Shirakawa K, Anzai A, Katsumata Y, Suematsu M, Kosaki K, Fukuda K, Arai H, Sano M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Omega-3 fatty acid epoxides produced by PAF-AH2 in mast cells regulate pulmonary vascular remodeling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 3013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30621-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama H, Endo J, Ikura H, Kitakata H, Momoi M, Shinya Y, Ko S, Ichihara G, Hiraide T, Shirakawa K, Anzai A, Katsumata Y, Sano M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Qualitative and Quantitative Effects of Fatty Acids Involved in Heart Diseases.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites.	6. 最初と最後の頁 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo12030210.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shirakawa K, Kobayashi E, Ichihara G, Kitakata H, Katsumata Y, Sugai K, Hakamata Y, Sano M.	4. 巻 7
2. 論文標題 H2 Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci	6. 最初と最後の頁 146-161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2021.11.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitakata H, Endo J, Ikura H, Moriyama H, Shirakawa K, Katsumata Y, Sano M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Therapeutic Targets for DOX-Induced Cardiomyopathy: Role of Apoptosis vs. Ferroptosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031414.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama Hidenori, Endo Jin, Ikura Hidehiko, Kitakata Hiroki, Momoi Mizuki, Shinya Yoshiki, Ko Seien, Ichihara Genki, Hiraide Takahiro, Shirakawa Kohsuke, Anzai Atsushi, Katsumata Yoshinori, Sano Motoaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Qualitative and Quantitative Effects of Fatty Acids Involved in Heart Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 210 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo12030210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirakawa Kohsuke, Kobayashi Eiji, Ichihara Genki, Kitakata Hiroki, Katsumata Yoshinori, Sugai Kazuhisa, Hakamata Yoji, Sano Motoaki	4. 巻 7
2. 論文標題 H2 Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 146 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacbts.2021.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitakata Hiroki, Endo Jin, Ikura Hidehiko, Moriyama Hidenori, Shirakawa Kohsuke, Katsumata Yoshinori, Sano Motoaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Therapeutic Targets for DOX-Induced Cardiomyopathy: Role of Apoptosis vs. Ferroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1414 ~ 1414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichihara Genki, Katsumata Yoshinori, Moriyama Hidenori, Kitakata Hiroki, Hirai Akeo, Momoi Mizuki, Ko Seien, Shinya Yoshiki, Kinouchi Kenichiro, Kobayashi Eiji, Sano Motoaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Pharmacokinetics of hydrogen after ingesting a hydrogen-rich solution: A study in pigs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08359 ~ e08359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e08359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitakata Hiroki, Endo Jin, Matsushima Hirokazu, Yamamoto Shoichi, Ikura Hidehiko, Hirai Akeo, Koh Seien, Ichihara Genki, Hiraide Takahiro, Moriyama Hidenori, Shirakawa Kohsuke, Goto Shinichi, Katsumata Yoshinori, Anzai Atsushi, Kataoka Masaharu, Tokuyama Takeshi, Ishido Satoshi, Fukuda Keiichi, Sano Motoaki	4. 巻 161
2. 論文標題 MITOL/MARCH5 determines the susceptibility of cardiomyocytes to doxorubicin-induced ferroptosis by regulating GSH homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 116 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2021.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitakata Hiroki, Endo Jin, Hashimoto Shun, Mizuno Erika, Moriyama Hidenori, Shirakawa Kohsuke, Goto Shinichi, Katsumata Yoshinori, Fukuda Keiichi, Sano Motoaki	4. 巻 572
2. 論文標題 Imeglimin prevents heart failure with preserved ejection fraction by recovering the impaired unfolded protein response in mice subjected to cardiometabolic stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 185 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goto Shinichi, Ichihara Genki, Katsumata Yoshinori, Ko Seien, Anzai Atsushi, Shirakawa Kohsuke, Endo Jin, Kataoka Masaharu, Moriyama Hidenori, Hiraide Takahiro, Kitakata Hiroki, Kobayashi Takayasu, Fukuda Keiichi, Sano Motoaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Time-Series Transcriptome Analysis Reveals the miR-27a-5p-Ppm1 Axis as a New Pathway Regulating Macrophage Alternative Polarization After Myocardial Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 929 ~ 938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-0783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinya Yoshiki, Hiraide Takahiro, Momoi Mizuki, Goto Shinichi, Suzuki Hisato, Katsumata Yoshinori, Kurebayashi Yutaka, Endo Jin, Sano Motoaki, Fukuda Keiichi, Kosaki Kenjiro, Kataoka Masaharu	4. 巻 10
2. 論文標題 TNFRSF13B c.226G>A (p.Gly76Ser) as a Novel Causative Mutation for Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.120.019245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichihara G, Katsumata Y*, Sugiura Y, Matsuoka Y, Maeda R, Endo J, Anzai A, Shirakawa K, Moriyama H, Kitakata H, Hiraide T, Goto S, Ko S, Iwasawa Y, Sugai K, Daigo K, Goto S, Sato K, Yamada KI, Suematsu M, Ieda M, Sano M.	4. 巻 27
2. 論文標題 MRP1-Dependent Extracellular Release of Glutathione Induces Cardiomyocyte Ferroptosis After Ischemia-Reperfusion.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Circ Res.	6. 最初と最後の頁 861-876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.123.323517.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Genki Ichihara, Junichi Hata, Daisuke Nakashima, Yawara Haga, Kyohei Daigo, Kazuhisa Sugai, Yuji Iwasawa, Yoshinori Katsumata, Jin Endo, Motoaki Sano, Eiji Kobayashi, Kazuki Sato, Masaya Nakamura, Keiichi Fukuda
2. 発表標題 Quantitative measurement of the myocardial infarction area using Q-space magnetic resonance imaging
3. 学会等名 第86回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yohinori Katsumata, Genki Ichihara, Yuki Sugiura, Shinichi Goto, Seien Ko, Takahiro Hiraide, Hiroki Kitakata, Hidenori Moriyama, Kohsuke Shirakawa, Atsushi Anzai, Jin Endo, Masaharu Kataoka, Motoaki Sano, Keiichi Fukuda
2. 発表標題 Continuous analysis of local in vivo metabolic changes using micro-dialysis technique
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Genki Ichihara, Yoshinori Katsumata, Yuki Sugiura, Yuta Matsuoka, Shinichi Goto, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda, Motoaki Sano.
2. 発表標題 Multidrug resistance protein 1 dependent extracellular release of glutathione induces cardiomyocyte ferroptosis after ischemia-reperfusion.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------