

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03655

研究課題名(和文) 心筋リモデリングにおけるスルフィレドキシンによるミトコンドリアレドックス制御機構

研究課題名(英文) Regulation of mitochondrial redox by sulfiredoxin in cardiac remodeling

研究代表者

筒井 裕之 (Tsutsui, Hiroyuki)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70264017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：圧負荷により心筋のスルフィレドキシン(Sulfiredoxin: SRX)発現の一過性の上昇と慢性期の低下、タンパクカルボニル化の増加を認めた。SRX-KOマウスでは左室リモデリングが進行し、タンパクカルボニル化が増加した。また、細胞死のシグナルであるcleaved caspase 3の増加を認めた。培養心筋細胞においてSRXノックダウンにより、過酸化水素による酸化ストレス刺激によりミトコンドリア呼吸能の低下を来していた。一方で、心筋特異的SRX過剰発現マウスでは圧負荷モデルにおける心肥大、心機能障害が軽減した。さらに、その変化には酸化ストレス、細胞死シグナルの改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からSRXは心不全の進展過程において相対的に低下をきたし、その低下により心筋細胞の酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、アポトーシスを引き起こして心筋リモデリングの発症・進展に与与することが示された。SRXが新たな心不全治療ターゲットになるうことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sulfiredoxin was transiently increased and decreased in chronic phase after pressure overload, accompanied by an increase in protein carbonylation. SRX knockout mice showed development of LV remodeling and an increase in protein carbonylation and cleaved caspase 3. In cultured cardiomyocytes, SRX knockdown enhanced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial dysfunction. On the other hand, cardiac-specific SRX overexpression mice exhibited attenuation of LV remodeling. Furthermore, these changes were accompanied by suppression of oxidative stress and cell death signaling.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 スルフィレドキシン 酸化ストレス ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

あらゆる心疾患の終末像である心不全の生命予後は極めて不良であり、心不全の病態解明と新たな治療戦略の開発は循環器領域において最も重要な研究課題である。心不全の病態基盤は心筋細胞肥大・細胞死・間質線維化からなる心筋リモデリングであるが、その形成・進展にはレドックス(酸化還元)制御異常およびミトコンドリア機能障害が密接に関与している。我々は、現在まで一貫して心筋リモデリング・心不全の形成・進展におけるミトコンドリア機能障害およびレドックス制御異常の役割を解明する研究に取り組んできた。特に心不全に陥った心筋ではミトコンドリア DNA が酸化されミトコンドリア機能が低下することで、心筋リモデリングが引き起こされることを明らかにした(Circ Res 2000, 2001, Circulation 2001)。また、NADPH oxidase 4 が心筋の主要な酸化ストレスの産生源であり、心筋リモデリングの進展に深く関与することを報告した(Circ Res 2013, J Clin Invest 2016)。しかしながら、レドックス制御による心不全治療はいまだ確立していない。心筋リモデリングにおけるレドックス制御の中心的な蛋白を同定し、新たなレドックス制御機構を解明することで、現在の標準治療を上回る効果的・効率的な新規心不全治療法を確立することが求められる。

スルフィレドキシシン(SRX)は、ATP を利用して抗酸化酵素であるペルオキシレドキシシン(Prx)のシステインを還元する酵素であり、心臓に多く発現することが知られている。特に、SRX はミトコンドリア内で発生する活性酸素の約 90%の除去を担う Prx3 の抗酸化活性の制御を介してミトコンドリアのレドックス維持において中心的な役割をはたす基盤分子 key molecule である。我々は Prx3 がミトコンドリアの酸化ストレスを軽減することで、心筋リモデリングを抑制する主要な抗酸化酵素であることを報告した(Circulation 2006)。また、Prx3 はレドックスのみならず、ミトコンドリア機能、ミトコンドリア生合成、アポトーシスを制御して細胞機能維持において重要な役割を担っている。酸化された Prx3 のシステインであるスルフェン酸(Prx-SOH)は、チオレドキシシン(Trx)により容易に還元されるが、過剰酸化されたスルフィン酸(Prx-SO<sub>2</sub>)は活性酸素が減少しても Trx では還元されず、SRX のみで還元される。したがって、SRX は Prx3 を介してミトコンドリアのレドックス制御において極めて重要な役割をはたしていると想定される。さらに、SRX は酸化的な蛋白翻訳後修飾の 1 つである蛋白グルタチオン化を直接的に抑制することで細胞機能を維持する。グルタチオン化は、酸化ストレスに応答してチオールタンパク質の活性や機能を制御する重要なレドックスメカニズムの 1 つと考えられている。特に、ミトコンドリア複合体はグルタチオン化によりその活性が低下することが報告されている。不全心筋において複合体の活性は低下することから、その活性制御にグルタチオン化が関与している可能性が示唆される。さらにミトコンドリア機能に重要な複合体 complex である supercomplex 形成に関与する可能性がある。また、SRX はミトコンドリア蛋白を含めた様々な蛋白のグルタチオン化をコントロールしているが、我々は予備実験で心筋細胞の SRX がミトコンドリアダイナミクスおよび機能に密接に関連する Drp1 の活性を負に制御することを見出した。このような知見は「SRX が Prx3 のみならずミトコンドリア機能に関わる様々な蛋白のレドックス制御においても重要な役割をはたし、その障害は心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する」という本研究計画の着想の正当性を支持するものである。しかしながら、心筋リモデリングにおける SRX に関する研究は今まで取り組まれていないため、SRX の役割や病態における意義は不明である。また、SRX 機能の保持が心筋リモデリング・心不全に対して予防・治療効果をもたらすのかもあきらかでない。

## 2. 研究の目的

あらゆる心疾患の終末像である心不全の病態基盤は、心筋細胞肥大・細胞死や間質線維化からなる心筋リモデリングであるが、その形成・進展には心筋細胞のミトコンドリアでの活性酸素の過剰状態である酸化ストレスが密接に関与している。ミトコンドリア内に発生する活性酸素のほぼ全ての除去を担っているのが抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 3(Prx3)である。さらに、スルフィレドキシシン(SRX)は、不活性型 Prx のシステイン-スルフィン酸を還元する酵素であり、Prx3 および SRX は心臓に多く発現しており、心筋細胞のミトコンドリアレドックス制御のみならずミトコンドリア機能やアポトーシス制御の基盤分子と考えられる。また、SRX は蛋白の酸化的な翻訳後修飾であるグルタチオン化を直接的に制御している。本研究の目的は、『SRX の機能低下に起因する Prx3 活性低下および蛋白グルタチオン化亢進による細胞内レドックス制御の破綻が、酸化ストレスの亢進とミトコンドリア機能異常を引き起こし、心筋リモデリング・心不全の形成・進展に関与する』という仮説を検証するとともに、SRX 機能安定化によるレドックス適正化を介したミトコンドリア機能の保持という独自のパラダイムに基づく新たな心不全の予防・治療法を開発を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### 3-1. SRX による心筋細胞 Prx3 活性・蛋白グルタチオン化制御機構の解析

心筋 SRX の Prx3 活性および蛋白グルタチオン化制御機構をあきらかにするため、ラット培養心

筋細胞に si-RNA を導入して SRX をノックダウンし、Prx3 活性、蛋白グルタチオン化、酸化ストレス、ミトコンドリア機能への影響を評価する。また、Prx3 ノックダウンによりグルタチオン化が変化するかを検証する。

1) SRX 蛋白の発現 (ウエスタンブロット法 (WB 法)) 2) Prx3 発現・機能解析: Prx3、酸化型 Prx3 (Prx3-SO<sub>2</sub>) 発現 (WB 法) 3) グルタチオン化評価: 全分画・ミトコンドリア分画における蛋白グルタチオン化 (WB 法)、Complex I、Dpr1 のグルタチオン化 (免疫沈降法) 4) ミトコンドリア機能の評価: 電子伝達系複合体酵素活性 (生化学アッセイ)、Supercomplex 形成 (Blue native-page 法)、ミトコンドリア呼吸能: state 3、state 4、RCI (O<sub>2</sub> flux analyzer)、TCA サイクル酵素活性 (クエン酸合成酵素)、ミトコンドリア膜電位 (JC-1 染色)、アポトーシス (TUNEL 染色)、Caspase-3 (WB 法)、ミトコンドリア生合成: TFAM、PCG-1 (WB 法) 5) 酸化ストレスの評価: 心筋細胞内活性酸素測定 (Amplex red 法)、TBARS、HNE、Carbonyl 化解析 (WB 法)

### 3-2. 心筋細胞障害モデルにおける SRX およびミトコンドリア機能の解析

in vitro でミトコンドリア機能障害、酸化ストレスにより細胞障害をきたすことが知られている培養心筋細胞モデルを用いて SRX の役割を解析する。さらに、SRX 遺伝子のノックダウンと SRX 遺伝子の導入実験により、心筋細胞障害に対する効果をあきらかにし、Prx3 活性、蛋白グルタチオン化、酸化ストレス、ミトコンドリア機能に対する影響も合わせて解析する。

### 3-3. 心筋細胞 SRX 遺伝子発現修飾による心筋細胞障害制御の解析

ラット培養心筋細胞に si-RNA を導入して、心筋細胞 SRX 遺伝子をノックダウンし、上記 2) の細胞障害マーカーを検討することによって、心筋細胞障害が増強するかどうか評価する。また、ラット培養心筋細胞にアデノウイルスにより SRX 遺伝子導入し、上記 2) の細胞障害マーカーを検討することによって、心筋細胞障害が抑制されるかどうかを検討する。同時に 4) Prx3 発現・機能、5) 蛋白グルタチオン化、6) ミトコンドリア機能、7) 酸化ストレスを評価する。

### 3-4. 心不全における心筋 SRX および酸化ストレス・ミトコンドリア機能の検討

心不全モデルマウスを用いて、SRX 蛋白発現量の変化と心不全の重症度、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害との関連について検討する。

### 3-5. SRX の心筋リモデリングおよび酸化ストレス・ミトコンドリア機能に対する作用

SRX 遺伝子欠損マウスを用いた検討

上記 1 と同様に、SRX 欠損マウス、過剰発現マウスの心筋リモデリングおよび酸化ストレス・ミトコンドリア機能を解析する。

SRX 欠損マウスマウスに、上記 1 と同様の方法で、心不全モデルを作成し、野性型マウスに比し、心筋リモデリング・心不全の発症・進展が促進されるかを検討する。

## 4. 研究成果

野生型マウスに大動脈縮窄 (TAC) による圧負荷モデルを作成し、心筋におけるサルフィレドキシ (Sulfiredoxin: SRX) 発現の一過性の上昇および慢性期の低下を確認した。また、それに伴い酸化ストレスの指標であるタンパクカルボニル化が増加した。SRX の病態での役割を評価するために、野生型マウスおよび SRX ノックアウト (SRX-KO) マウスに TAC による圧負荷モデルを作成し、心筋リモデリング、心不全の評価を行った。SRX-KO マウスでは左室が拡大し、左室壁厚が増加、左室駆出率 (LVEF) が低下した。この変化には酸化ストレスの指標であるタンパクカルボニル化の増加を伴っていた。さらに、組織学的に心筋細胞肥大、間質線維化、アポトーシスの増大を伴っており心筋リモデリングの悪化が認められた。また、細胞死のシグナルである cleaved caspase 3 の増加を認めた。培養心筋細胞において siRNA により SRX をノックダウンすると、SRX が低下することが確認された。この状態では、過酸化水素による酸化ストレス刺激によりフラックスアナライザーによる評価でミトコンドリア呼吸能の低下を来していた。さらに、心筋組織においてアポトーシスシグナルである cleaved caspase 3 の増加が増加した。一方で、心筋特異的 SRX 過剰発現マウスでは圧負荷モデルにおける心肥大、心機能障害が軽減した。さらに、その変化には酸化ストレス、細胞死シグナルの改善を認めた。

これらの知見から SRX は心不全の進展過程において相対的に低下をきたし、その低下により心筋細胞の酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、アポトーシスを引き起こして心筋リモデリングの発症・進展に関与することが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishikita A, Matsushima S, Ikeda S, Okabe K, Nishimura R, Tadokoro T, Enzan N, Yamamoto T, Sada M, Tsutsui Y, Miyake R, Ikeda M, Ide T, Kinugawa S, Tsutsui H.	4. 巻 24
2. 論文標題 GFAT2 mediates cardiac hypertrophy through HBP-0-GlcNAcylation-Akt pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience .	6. 最初と最後の頁 103517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103517.	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 Okabe Kosuke, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Ikeda Masataka, Ishikita Akihito, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Deguchi Hiroko, Shinohara Keisuke, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 75
2. 論文標題 DPP (Dipeptidyl Peptidase)-4 Inhibitor Attenuates Ang II (Angiotensin II)?Induced Cardiac Hypertrophy via GLP (Glucagon-Like Peptide)-1?Dependent Suppression of Nox (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase) 4-HDAC (Histone Deacetylase) 4 Pathwa	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 991-1001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14400.	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 Furihata T, Takada S, Kakutani N, Maekawa S, Tsuda M, Matsumoto J, Mizushima W, Fukushima A, Yokota T, Enzan N, Matsushima S, Handa H, Fumoto Y, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Tanaka S, Tsutsui H, Sabe H, Kinugawa S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Cardiac-specific loss of mitoNEET expression is linked with age-related heart failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol .	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01675-4.	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 Tomonori Tadokoro, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Hiroko Deguchi, Soichiro Ikeda, Kosuke Okabe, Akihito Ishikita, Shouji Matsushima, Tomoko Koumura, Ken-Ichi Yamada, Hirotaka Imai, Hiroyuki Tsutsui	4. 巻 5
2. 論文標題 Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e132747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.132747.	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 Okabe Kosuke, Matsushima Shouji, Ikeda Soichiro, Ikeda Masataka, Ishikita Akihito, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Deguchi Hiroko, Shinohara Keisuke, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 75
2. 論文標題 DPP (Dipeptidyl Peptidase)-4 Inhibitor Attenuates Ang II (Angiotensin II)-Induced Cardiac Hypertrophy via GLP (Glucagon-Like Peptide)-1-Dependent Suppression of Nox (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase) 4-HDAC (Histone Deacetylase) 4 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 991 ~ 1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14400	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 -

1. 著者名 Ikeda Soichiro, Matsushima Shouji, Okabe Kosuke, Ikeda Masataka, Ishikita Akihito, Tadokoro Tomonori, Enzan Nobuyuki, Yamamoto Taishi, Sada Masashi, Deguchi Hiroko, Morimoto Sachio, Ide Tomomi, Tsutsui Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Blockade of L-type Ca <sup>2+</sup> channel attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy via suppression of CaMKII-NF- $\kappa$ B pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46367-6	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0件

〔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
研究分担者	康 東天  (Kang Dongchon)  (80214716)	九州大学・医学研究院・教授   (17102)	
研究分担者	松島 将士  (Matsushima Shouji)  (80552869)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	
研究分担者	井手 友美  (Ide Tomomi)  (90380625)	九州大学・医学研究院・准教授   (17102)	
研究分担者	西村 明幸  (Nishimura Akiyuki)  (00457152)	九州大学・薬学研究院・講師   (17102)	

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
---------	---------