

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670031

研究課題名(和文) 親電子シグナルを機軸とした心筋レドックス恒常性制御基盤の構築と心不全治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of the molecular basis underlying regulation of cardiac redox homeostasis by electrophilic signaling and its therapeutic application for heart failure

研究代表者

西田 基宏 (Nishida, Motohiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90342641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は硫化水素(H₂S/HS⁻)が心筋梗塞後に生成される親電子物質を求核置換反応により直接消去し、慢性心不全を抑制する可能性を明らかにした。しかし、H₂S/HS⁻が求核シグナルとして働く分子実体がどうかについては不明であった。本研究では、内因性活性硫黄の分子実体を明らかにし、硫黄蓄積を主眼とした慢性心不全治療の有効性を確立させることを目的とした。その結果、タンパク質などに含まれるシステインのポリ硫黄鎖が活性硫黄の分子実体として働くことが明らかとなった。さらに、ポリ硫黄を多く含む食品をマウスに摂取させることで、H₂S/HS⁻よりもはるかに強い心筋保護効果が得られることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We have reported the possibility that hydrogen sulfide anion (H₂S/HS⁻) protects against chronic heart failure via nucleophilic elimination of endogenous electrophiles in mouse hearts after myocardial infarction. However, it is still obscure whether H₂S/HS⁻ acts as a molecular entity of reactive nucleophile in hearts. In this study, we aim to identify the molecular entity of nucleophilic reactive sulfur species (RSS) in hearts and establish an innovative strategy based on the to treat chronic heart failure. We found that proteins containing cysteine persulfide or polysulfide acts as RSS, and accumulation of RSS by taking a polysulfur (garlic)-containing diet dramatically suppresses cardiac risk after myocardial infarction in mice. These results strongly suggest that preservation of RSS in heart will be a novel strategy to reduce cardiac risk.

研究分野：薬理学

キーワード：活性酸素 硫黄 循環 心不全

1. 研究開始当初の背景

高血圧や虚血などの負荷が慢性的に心臓に加わった際に生じる活性酸素は、細胞内の核酸や脂質と反応し、親電子性の高い2次生成物(親電子物質)を形成する。申請者は心筋梗塞モデルマウスを用いて、親電子物質が心臓の老化(筋力の低下や間質結合組織の脆弱化)を誘発する原因物質であること、外因性の硫化水素($\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$)が親電子物質を消去することで、早期老化を伴う慢性心不全を改善させることを見出した(Nature Chem Biol, 8, 714-724, 2012)。その過程で、 $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ 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、 H_2S 生成酵素を発現しない心臓にSH求核置換された親電子物質が数 μM 存在することなどがSH感受性色素を用いた質量分析から新たに発見され、 $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ が心臓の酸化還元(レドックス)バランスを維持する直接の制御因子とは考えにくい知見が集まってきている。これに加えて、正常マウスの心臓にグルタチオン(GSH)の硫黄化物(GSSH)が数十 μM 存在すること、および試験管レベルでGSSHが親電子物質を直接消去することも明らかにされ、循環血液中に存在するGSSHがレドックスバランスを制御する実体である可能性が見えてきた。

2. 研究の目的

本研究では、心臓がGSHを硫黄取り込みのキャリアとして利用すること、心臓に蓄積されたポリ硫黄が親電子物質を直接消去することを示すことで、硫黄循環による心筋レドックス恒常性の新たな制御基盤を構築することを目的とする。さらに、硫黄含有食品を用いて心臓でのポリ硫黄含量を増加させた際に、酸化ストレスを基盤病態とする慢性心疾患が改善されることを動物レベルで実証する。これにより、心臓の硫黄リザーブを主眼とした慢性心不全治療法の有効性を確立させる。

3. 研究の方法

細胞内のポリ硫黄鎖をもつ活性イオウ分子実体の同定は、東北大学医学部・赤池孝章教授らが開発したビオチン付加させたシアン(CN-biotin)を利用したTag-switch-tag法およびポリ硫黄蛍光検出指示薬(SSP2)を用いて探索する。活性イオウ分子の細胞内外輸送については、SSP2を用いて細胞内ポリ硫黄量を増やす化合物のスクリーニングアッセイを行う。得られた化合物の情報をもとに標的輸送体(アニオンチャネルまたはトランスポーター)を予測し、まずはこれらが心臓特異的に発現するものが否か確認する。心臓特異的に発現していそうな輸送体遺伝子に対するsiRNAオリゴを作成し、これをノックダウンさせた際のポリ硫黄量の変動および細胞応答を解析する。

一方、これまでに親電子物質の標的分子が

低分子量G蛋白質H-Rasであり、H-RasのCys184残基が親電子修飾を受けることでH-Rasの細胞内局在が変化し、下流のエフェクター分子との相互作用が増大することを見出している。そこで、H-RasのCys184のチオール基についてもGSHと同様にポリ硫黄化されるかどうか検討する。ポリ硫黄化は、不可逆的な親電子修飾が機能性食品の摂取により可逆的になる(還元剤で親電子修飾が消える)かどうかによって評価する。3つ以上の硫黄を含むポリ硫黄化物あるいはGSSGそのものを食餌に含ませ、心筋梗塞モデルマウスや拡張型心不全モデルに経口投与し、酸化ストレスに起因する心筋老化(心臓リモデリング)や心機能不全が改善されるかどうか検討する。また、心臓組織中に蓄積する親電子物質(8-NO₂-cGMPや4-hydroxy-2-nonenalなど)を定量評価し、酸化ストレスの軽減率と心機能の維持ことを確認する。慢性心不全に対する有効性が確認できた機能性素材については速やかに特許を取得し、機能性食品の開発を展開する。

4. 研究成果

SSP2試薬を試験管に入れ、様々な試薬との反応性を確認した。SSP2はNa₂S₄により蛍光増加するものの、NaHSとは全く反応しないことを確認した。さらに、SSP2はヒト組み換えH-Rasタンパク質と混ぜるだけで蛍光増強することもわかった。H-Rasタンパク質に8-nitro-cGMPを反応させると不可逆的な親電子修飾(S-グアニル化)が起こると予想される。しかし、S-グアニル化されたH-Rasタンパク質の約半分がメルカプトエタノールなどの還元剤によって切断されることがわかった。以上の結果から、タンパク分子レベルで親電子修飾にかかわるシステインチオール基がポリ硫黄鎖を形成していることが明らかとなった。

次に、SSP2試薬を用いた細胞内ポリ硫黄蓄積のスクリーニングを行った。約1000種類の既承認薬を心筋細胞に処置し、SSP2蛍光増加させる薬を探索したところ、NaHS処置した細胞では顕著なSSP2蛍光増加が観察できたものの、蛍光値を顕著に増加させる薬は残念ながら得られなかった。そこで次に、食品成分に含まれる含硫物質に着目した。ニンニク成分のアリシンや、アブラナ科野菜に含まれるイソチオシアネートは細胞内ポリ硫黄量をわずかながら増加させることがわかった。そこでマウスにニンニク成分を含めた食餌を1週間摂取し、冠動脈結紮による心筋梗塞を誘導したところ、心筋梗塞後の突然死および新機能低下が有意に抑制されることがわかった。さらに、内因性親電子物質である8-nitro-cGMP量もニンニク摂取により劇的に減少することが明らかとなった。

ところで、親電子性の高い環境汚染物質としてメチル水銀(MeHg)が知られている。水俣病の主症状である神経毒性を起こさない

MeHg 用量をマウスに 1 週間曝露したところ、マウスの循環機能に全く影響を及ぼさなかったものの、大動脈狭窄誘発性の圧負荷による心不全が著しく悪化することがわかった。通常、圧負荷による心不全は内膜肥厚(肥大)した心臓に圧負荷が持続的にかかり、結果的に心拡張を起こすことで心不全に至るとされている。しかし、MeHg 曝露マウスの心不全は心拡張を伴わない肥大したままの機能不全を呈することが明らかとなった。また、MeHg の標的タンパク分子が dynamin-related protein 1 (Drp1) であり、Drp1 の Cys-624 が S-水銀化修飾を受けることでミトコンドリア分裂が誘導されること、ミトコンドリア分裂により、心筋細胞が機械的伸展に対して脆弱性を示すことなどがわかってきた。さらに、心筋細胞に NaHS を処置することで Drp1 の Cys-624 チオール基のポリ硫黄化が亢進し、MeHg による修飾が有意に抑制されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Nishida M, Toyama T, Akaike T. Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Aug 73: 10-7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.003. 査読有

Nishida M, Toyama T, Kumagai Y, Numaga-Tomita T. (2014) Establishment of a novel therapeutic strategy for heart failure based on the mechanism underlying maintenance of redox homeostasis by reactive sulfur species. *Yakugaku Zasshi.* 134(12):1239-1243.

<http://doi.org/10.1248/yakushi.14-00209-1> 査読無

Yamada Y, Kinoshita H, Kuwahara K, Nakagawa Y, Kuwabara Y, Minami T, Yamada C, Shibata J, Nakao K, Cho K, Arai Y, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Kamakura S, Nishida M, Kiyonaka S, Mori Y, Kimura T, Kangawa K, Nakao K. (2013) Inhibition of N-type Ca²⁺ channels ameliorates an imbalance in cardiac autonomic nerve activity and prevents lethal arrhythmias in mice with heart failure. *Cardiovasc Res.* 2014 Oct 1;104(1):183-93. doi: 10.1093/cvr/cvu185. 査読有

Watari K, Nakaya M, Nishida M, Kim KM, Kurose H. β -arrestin2 in infiltrated macrophages inhibits excessive inflammation after

myocardial infarction. *PLoS One.* 8(7):e68351, 1-12 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0068351. 査読有

Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nature Commun.* 4, 1532, 1-11 (2013). doi: 10.1038/ncomms2540. 査読有

Nishida M, Ishikawa T, Saiki S, Sunggip C, Aritomi S, Harada E, Kuwahara K, Hirano K, Mori Y, Kim-Mitsuyama S. Voltage-dependent N-type Ca²⁺ channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434(2), 210-216 (2013). doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.040. 査読有

Chen W, Oberwinkler H, Werner F, Gasner B, Nakagawa H, Feil R, Hofmann F, Schlossmann J, Dietrich A, Gudermann T, Nishida M, Del Galdo S, Wieland T, Kuhn M. Atrial natriuretic peptide-mediated inhibition of microcirculatory endothelial Ca²⁺ and permeability response to histamine involves cGMP-dependent protein kinase I and TRPC6 channels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33(9), 2121-2129 (2013). doi: 10.1161/ATVBAHA.113.001974. 査読有

西田基宏(2013)酸化ストレスによるレドックス恒常性異常と心筋リモデリング、医学のあゆみ特集「活性酸素 - 基礎から病態解明・制御まで - 」企画 赤池孝章・末松誠、医歯薬出版株式会社 東京 Vol. 247, No. 9, pp 875-878. 査読無

西田基宏、澤智裕(2013)硫化水素アニオンによるレドックス恒常性制御とその臨床応用、生化学 Vol. 85, No. 11, pp 996-999. 査読無

[学会発表](計 4 件)

Nishida M. Covalent modification of H-Ras

by nitric oxide-derived reactive species underlies development of chronic heart failure in mice. 17th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology (WCP2014), 13-18 July, 2014, Cape Town, South Africa.
外山喬士、西田基宏(2013.12.6)含硫機能性食品を用いた心不全治療 シンポジウム「次世代心不全治療の新機軸」第23回日本循環薬理学会(福岡大学、福岡県福岡市)
Nishida M. (2013.9.12-15) Invited symposium: Role of TRPC channels in mechano-chemo transduction in the heart. 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias (MEC2013), Oxford, UK.
Kitajima N, Tomita-Numaga T, Nishida M. (2013.9.12-15) poster presentation: Role of TRPC3 channels in mechanical stress-induced cardiac fibrosis. 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmias (MEC2013), Oxford, UK.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: Drp1 重合阻害剤
発明者: 西田基宏、石川達也
権利者: 自然科学研究機構
種類: 特許
番号: 特願 2014-236941
出願年月日: 2014年11月21日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

URL: <http://www.nips.ac.jp/circulation/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 基宏(Nishida, Motohiro)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター教授
研究者番号: 90342641

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし