

## 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

勝俣良紀

慶應義塾大学医学部 スポーツ医学総合センター

### 【研究の背景】

細胞は細胞内外にシグナルを伝達することで、細胞の恒常性を維持する。例えば、酸化ストレスや還元ストレスなどの大きな細胞ストレス時には、代謝産物を放出して細胞外に警告シグナルを伝え、恒常性を維持しようとする。これまでに、メタボローム解析技術とマイクロダイアリス法を組み合わせ、同一個体での心筋細胞外間質の代謝変化を連続的に測定する技術を開発し、虚血時に抗酸化代謝物のグルタチオンを積極的に放出する現象を発見した。

### 【目的】

本研究では、虚血再灌流障害時のグルタチオンの病理学的意義やメカニズムについて検証を行い、虚血再灌流障害の新たな治療戦略の開発を目的とした。

### 【方法】

ラットの心臓の虚血再灌流モデル(IR)を作成し、虚血および再灌流中の細胞内外で変動する代謝物を *in vivo* マイクロダイアリスと組織メタボローム解析により探索した。また、虚血再灌流後の虚血/梗塞部位を TTC/Evans blue stain を用いて評価した。酸化脂質生成を核にするために、スファチジルコリン類は液体クロマトグラフィー-高分解能質量分析計を用いて評価した。初代心筋培養細胞を用いて、無酸素再酸素化モデルを作成し、*in vitro* での細胞内外で変動する代謝物をメタボローム解析により探索した。また、その細胞内メカニズムを検証するために、阻害薬や siRNA によるノックダウンを行った。

### 【結果】

マイクロダイアリスと組み合わせたメタボローム解析により、*in vivo* での虚血中および再灌流後の虚血領域におけるグルタチオンの著しい細胞外放出が明らかになった。*In vitro* 心筋細胞モデルにおいて、無酸素-再灌流時に細胞外グルタチオン放出とそれに伴う細胞内グルタチオン濃度の減少が観察された。この細胞外グルタチオン放出は、multidrug resistance protein 1 (MRP1) を中心とするグルタチオントランスポーターの阻害や発現抑制により阻止された。さらに、MRP1 阻害剤処理により、細胞内の活性酸素レベルや脂質過酸化が減少し、細胞死が抑制された。その後、IR 後の内因性酸化リン脂質を *in vivo* で評価したところ、再灌流 12 時間後に虚血領域で複数の酸化ホスファチジルコリン (ox-PC) レベルが有意に上昇し、フェロトーシスの関与が示された。また、MRP1 トランスポーターの阻害は、*in vivo* での細胞内グルタチオン枯渇を抑制し、ox-PCs の生成を有意に減少させることが確認された。最後に、MRP1 阻害剤による細胞内グルタチオン保持および ox-PC 生成の抑制は、IR 傷害を有意に減弱させた。

### 【考察】

本研究から、グルタチオンは IR 中に主に MRP1 依存的に持続的に放出され、フェロトーシスを誘導した。また、グルタチオ

ン放出の抑制はフェロトーシスを減衰させ、心筋 IR における心筋細胞死を抑制した。虚血再灌流障害の治療は、活性酸素の発生を抑えるための前処置(虚血プレコンディショニング)や、アポトーシスを抑制する薬剤の投与が心臓虚血再灌流モデル動物で試みられてきた。これらは一定の有効性は示したものの、いずれも心筋梗塞の発生後なるべく早期の処置が必要であった。一方、我々は Redox 代謝の破綻に伴う過酸化脂質の生成時相を調べたところ、IR 後 12 時間以降で酸化脂質が大幅に増加することを発見した。この生成機序を特定し、これを除去する手法を開発すれば、心筋梗塞の発生後の遠隔期であっても虚血再灌流障害を軽減できる可能性がある。

### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

現在、カテーテルインターベンションの進歩により心筋梗塞の予後は改善した。しかし、インターベンションにより再灌流障害を十分に抑制できないため、結果的に心不全患者が急増し、社会問題となっている。これまで、再灌流障害のターゲットは、再灌流直後に生じる過剰活性酸素産生やミトコンドリア機能障害などであり、実臨床における治療薬での介入が困難であった。しかし、我々の発見した現象は、再灌流後遅発性に生じる過酸化脂質をターゲットとした(フェロトーシスなど)治療法であり、実臨床でも十分に再灌流障害を予防できうる薬剤の開発につながる事が期待される。

### 【参考・引用文献】

- Goto S, Ichihara G, Katsumata Y, Ko S, Anzai A, Shirakawa K, Endo J, Kataoka M, Moriyama H, Hiraide T, Kitakata H, Kobayashi T, Fukuda K, Sano M. Time-Series Transcriptome Analysis Reveals the miR-27a-5p-Ppm1l Axis as a New Pathway Regulating Macrophage Alternative Polarization After Myocardial Infarction. *Circ J*. 2021 Mar 3.
- Shirakawa K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y, Anzai A, Moriyama H, Kitakata H, Hiraide T, Ko S, Goto S, Ichihara G, Fukuda K, Minamino T, Sano M. MerTK Expression and ERK Activation Are Essential for the Functional Maturation of Osteopontin-Producing Reparative Macrophages After Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 2020 Sep 15;9(18):e017071.
- Isobe S, Kataoka M, Endo J, Moriyama H, Okazaki S, Tsuchihashi K, Katsumata Y, Yamamoto T, Shirakawa K, Yoshida N, Shimoda M, Chiba T, Masuko T, Hakamata Y, Kobayashi E, Saya H, Fukuda K, Sano M. Endothelial-Mesenchymal Transition Drives Expression of CD44 Variant and xCT in Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019 Mar 21.
- Shirakawa K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y, Yoshida N, Yamamoto T, Isobe S, Moriyama H, Goto S, Kitakata H, Hiraide T, Fukuda K, Sano M. IL (Interleukin)-10-STAT3-Galectin-3 Axis Is Essential for Osteopontin-Producing Reparative Macrophage Polarization After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2018 Oct 30;138(18):2021-2035.
- Shirakawa K, Yan X, Shinmura K, Endo J, Kataoka M, Katsumata Y, Yamamoto T, Anzai A, Isobe S, Yoshida N, Itoh H, Manabe I, Sekai M, Hamazaki Y, Fukuda K, Minato N, Sano M. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue. *J Clin Invest*. 2016 Dec 1;126(12):4626-4639.
- Sugiura Y, Katsumata Y (equally first), Sano M, Honda K, Kajimura M, Fukuda K, Suematsu M. Visualization of in vivo metabolic flows reveals accelerated utilization of glucose and lactate in penumbra of ischemic heart. *Sci Rep*. 2016 Sep 1;6:32361.