

研究報告書

「硫黄循環・代謝を基軸とした生体恒常性制御基盤の構築」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成25年10月～平成29年3月

研究者: 西田 基宏

1. 研究のねらい

活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)が単なる酸素毒ではなく、細胞内の重要なシグナル仲介分子として働くことが次々と明らかにされ、酸化ストレスと疾患に対する考え方も大きく変わりつつある。化学反応性の高い ROS や活性窒素種(RNS)に加えて、ROS/RNS と生体分子との反応によって生じる親電子物質もまた酸化ストレスの原因物質として働き、慢性心不全を誘導する。これら化学反応性の高い ROS/RNS や親電子物質の生体内不活性化および代謝は、求核性の高い活性イオウ種により制御されることが最近わかってきた。そこで本研究では、主にタンパク質がもつ活性イオウ種の生成・代謝系とその生理機能制御機構を明らかにし、その動作原理を機軸とした新奇な生体レドックス恒常性制御基盤を構築する。この概念に基づき、疾患モデル動物およびヒト患者の血液中で不可逆的に酸化修飾を受ける、疾患の重症度と高い相関性を示すタンパク質を同定し、疾患に依存した酸化修飾の様式を特定する。これを特異的に検出する方法を構築することで、糖尿病合併症の予防診断を可能にする革新的な基盤技術を創出する。また、疾患時の血漿タンパク質で酸化修飾が増えるメカニズムを明らかにすることで、治療につながる分子標的を同定し、新たな創薬ストラテジーを確立する。さらには、筋組織や血管内皮組織における活性イオウの生成・代謝異常の是正が糖尿病合併症の治療に結びつくことを証明するとともに、活性イオウを基盤とするレドックス恒常性維持に寄与する化合物の探索が新たな糖尿病合併症治療薬の開発につながることを示す。

2. 研究成果

(1) 概要

心臓の病態形成に関わるレドックスシグナルを、タンパク質の親電子修飾と求核置換という視点で解析した結果、タンパク質中に含まれるシステインポリ硫黄鎖が ROS/RNS や親電子物質によるタンパク質の酸化的活性化を負に制御する活性イオウの分子実体であることを新たに見出した。その生理学的意義の一つとして、ミトコンドリア分裂促進 G タンパク質 dynamin-related protein 1 (Drp1)が自身のカルボキシル末端に存在するシステインにポリ硫黄鎖を形成することで Drp1 の活性を負に調節していること、親電子物質は Drp1 のポリ硫黄鎖を枯渇させることで抑制を解除し、ミトコンドリア分裂を誘導することを明らかにした。Drp1 活性化は心筋虚血(低酸素)や高血糖負荷によって誘発されることから、虚血性心疾患や糖尿病合併症の新規創薬標的になると考え、既承認薬を用いて、病態時における Drp1 活性化を阻害する薬の探索を行ったところ、ヒット化合物一つを得ることに成功した(国際特許出願済、臨床試験実施中)。このヒット化合物が病態時特異的に Drp1 活性を阻害するメカニズムを、プロテオミクスを駆使して網羅的に調べた結果、Drp1 はアクチン結合タンパク質 filamin と

相互作用することでミトコンドリアの病的過剰分裂を誘発することが明らかとなった。

心不全の重症度に相関して血液中で酸化修飾される血漿タンパク質の探索にも着手し、glutathione peroxidase 3 (GPx3)を同定した。マウス心不全モデルにおいて、Gpx3 の親電子修飾は心臓の硬化（線維化）率と強く正に相関することがわかった。心臓の線維化に伴ってGPx3 の親電子修飾が増える機序を解析した結果、心筋細胞膜上の TRPC3 チャンネルが活性酸素依存的な線維化シグナルを増強する創薬標的分子となることを見出した（Sci. Rep.2報に発表）。

機能性食品中の親電子物質が血圧低下に働くことに着目し、その作用点を探索した結果、Gタンパク質共役型のプリン作動性P2Y6受容体であることを明らかにした。P2Y6受容体はアンジオテンシン受容体とヘテロ2量体を形成し、アンジオテンシンIIによる高血圧応答を増強することを、P2Y6欠損マウスを用いて実証した（Science Signaling 誌に発表）。

(2) 詳細

(A) 組織および血液中の親電子シグナル評価技術の構築と疾患モデル動物への適用

マウスの横行大動脈を結紮し圧負荷を誘発することで慢性心不全モデルを作製した。心不全の重症度に伴って親電子修飾を受けるタンパク質を同定するため、ビオチンマレイミド試薬を血漿タンパク質と反応させ、アビジンビーズでプルダウンしたサンプルを質量分析により解析したところ、GPx3 が同定された。GPx3 が酸化修飾されるメカニズムを明らかにするため、圧負荷に対して抵抗性を示す、あるいは脆弱性を示す遺伝子改変マウスを用いて比較したところ、TRPC3 チャンネル欠損マウスの血漿において、GPx3 の酸化修飾が顕著に抑制されていることに気付いた

($r^2=0.53$)。このマウスでは圧負荷による心臓の拡張機能障害と硬化（線維化）が抑制されており、心筋細胞膜上の TRPC3 チャンネルは NADPH oxidase 2 (Nox2)と複合体を形成することで Nox2 を安定化し、機械伸展刺激による活性酸素の生成を増大させ、これが線維化シグナルを誘導

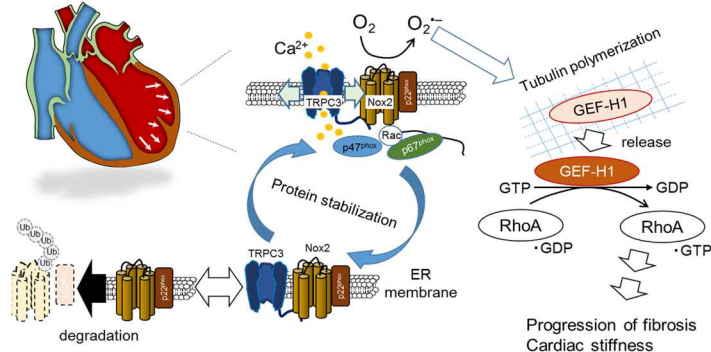


図1 TRPC3-Nox2 機能共役による心臓の硬化（線維化）誘導の分子メカニズム

していることが明らかになった（図1）。一方、TRPC3 と機能的相同性の高い TRPC6 欠損マウスでは、圧負荷によって血漿 GPx3 の酸化修飾は全く抑制されておらず、心臓の線維化は抑制されていたものの、心機能不全は抑制されなかった（Sci. Rep., 投稿準備中）。以上より、TRPC3-Nox2 共役の阻害が心不全治療の新たな標的戦略となる可能性が示された。

マウスでの知見をもとに、ヒト心不全患者（40 症例）の血漿サンプルを用いて心不全重症度と GPx3 親電子修飾との相関性を調べた結果、残念ながら、心筋収縮率 (EF) や血中心不全マーカー (BNP) と GPx3 酸化修飾の間には、マウスほどの有意な相関性は認められず ($r^2=0.13$)、心不全の背景にあるリスク要因をあわせて精査しなおす必要性が示唆された。

(B) 心臓における活性イオウシグナル制御機構の解析と疾患治療への応用

心不全時において心臓組織中に活性イオウ種が増えているかどうか調べるため、sulfane sulfur 検出蛍光指示薬 SSP4 を凍結心臓切片に処置した結果、心筋梗塞モデルマウス心臓の梗塞周辺領域において強い蛍光が観察された。梗塞周辺領域の心筋細胞で何が起きているか電子顕微鏡で形態観察を行ったところ、心筋細胞のミトコンドリアが著しく分裂していることに気付いた。そこで、ミトコンドリア分裂促進 G タンパク質 Drp1 の活性を GTP-agarose を用いたプルダウンアッセイで評価したところ、GTP 結合型 Drp1 量が有意に増加していた。梗塞周辺領域では低酸素シグナルが活性化しており、HeLa 細胞に Drp1 変異体を発現させた系で解析した結果、Drp1 は低酸素刺激によりカルボキシル末端のシステイン依存的に活性化することが明らかになった。システイン依存的な Drp1 活性化は、親電子性の高い環境汚染物質（メチル水銀）を細胞毒性を示さない低濃度で曝露させた際にも同じ現象が確認された。タンパク質ポリ硫黄鎖を検出する Tag-switch-tag アッセイにより、内因性 Drp1 はシステインにポリ硫黄鎖をもつこと、メチル水銀や低酸素負荷によるポリ硫黄の枯渇が Drp1 を活性化させる引き金となる可能性が示された（東北大・赤池孝章教授との共同研究、Nature Commun., in revision）。以上の結果は、これまで GEF や GAP のみで制御されると信じられた G タンパク質サイクルが活性イオウによっても制御されうるという、固定概念を覆す画期的な知見といえる（図2）。

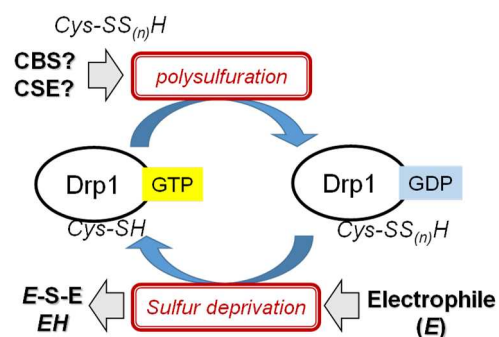


図2 活性イオウによる G サイクル制御

(C) 親電子シグナルを起点としたインスリン抵抗性の原因標的分子の同定と創薬展開

Drp1 は MeHg などの親電子物質だけでなく、低酸素や高血糖などの負荷によっても活性化される。心筋細胞の低酸素／再酸素化によるミトコンドリア過剰分裂を指標に Drp1 活性化を阻害する化合物の探索を行い、わが国の既承認薬の中から高血圧治療薬シルニジピン（ジヒドロピリジン系 Ca²⁺拮抗薬）を同定した（国際特許出願済み）。本薬剤は心筋梗塞後の慢性心不全だけでなく、ストレプトゾトシン誘発性の血糖値増加も有意に抑制することをマウスレベルで見出した。動物レベルでの薬効とメカニズムを基に、九大病院循環器内科・井手友美講師と連携し、医師主導の臨床研究（Treatment for Type 2 Diabetes with cilnidipine by Randomized Prospective study (DRP study))を開始した。

キャベツやワサビ、ブロッコリーに含まれる親電子物質（イソチオシアネート）には血圧低下作用があり、心血管病リスクを軽減することが知られている。アンジオテンシン II 誘発性高血圧のメカニズムを解析している過程で、血管平滑筋細胞に発現するプリン作動性 P2Y6 受容体がアンジオテンシン type1 受容体とヘテロ 2 量体を形成し、高血圧リスクを高めることをマウスで見出した（Science Signal., 2016）。P2Y6 受容体の唯一の阻害薬である MRS2578 には 2 つのイソチオシアネート基があり、MRS2578 はイソチオシアネートの親電子性を介して P2Y6

受容体を阻害することを明らかにした。

3. 今後の展開

・TRPC3-Nox2 複合体は圧負荷による心臓の線維化時だけでなく、抗がん剤投与マウスの萎縮した心臓でより強く発現増加することも最近明らかにしている(論文投稿中)。今後は、萎縮性心筋症での TRPC3-Nox2 複合体形成のメカニズム解析や、その血漿における GPx3 酸化修飾を調べることで、萎縮性心筋症の重症度を反映するバイオマーカーとしての GPx3 酸化修飾の重要性を確立させていく。

・Drp1 ポリイオウ鎖の枯渇と心筋リスクとの直接的な因果関係を明らかにするためには、Drp1 (C624S)変異体発現マウスでの心臓リスク評価に加えて、Drp1 の Cys-SH 基へのイオウ供給酵素の過剰発現・欠損による効果なども in vivo レベルで評価していく。

・創薬標的としての P2Y6 受容体の重要性を確立するためには、イソチオシアネート鎖を基盤に P2Y6 受容体と最も効率よく反応し、心血管疾患に対して強い保護効果をもつヒット化合物を同定する必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

硫化水素を投与したマウスで心不全や心筋細胞老化が抑制されるという動物実験の知見を基盤に求核性の高い活性イオウが生体内で循環し、心臓に取り込まれて保護効果を発揮するという仮説で研究をスタートさせたが、研究初期の段階で心臓組織中でも活性イオウが存在することがわかり、早期の段階で血液や組織中の活性イオウ量を測定することに意味がないことに気付いた。しかし私はすぐにフリーのイオウ分子からタンパク質システインに含まれるポリ硫黄に視点を変更し、創薬戦略構築をゴールに見据えた研究に方向転換した。その結果、血漿 GPx3 の酸化修飾をツールとして、TRPC3 や P2Y6 受容体が心血管病リスク因子となる可能性を見出している。また、ミトコンドリア品質管理が Drp1 タンパク質のポリ硫黄によって制御されることを明らかにし、これを指標とする既承認薬のスクリーニングからドラッグ・リポジショニングにつながりうるヒット化合物の同定に成功した。本さきがけ研究開始に異動のためのラボ立ち上げが重なったため、学術論文の成果が出始めるのに3年を要してしましたが、既報3本と国際特許1つ・臨床試験1つに加えて、新たな論文も3本投稿しており、学術的にも着実に成果が出始めている。既報3本の論文はすべて新聞やインターネット上で広く報道され、製薬企業や異分野研究者からの問い合わせも複数あり、実用化(創薬)や異分野連携を目指した共同研究が芽生え始めている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

活性酸素種の新たな役割が解明されるにつれて酸化ストレスと疾患に対する考え方も大きく

変わりつつある。本研究では、主にタンパク質が有する活性イオウ種の生成・代謝系とその生理機能制御機構を明らかにし、新規の生体レドックス恒常性制御基盤を構築することを目標として開始した。

マウス慢性心不全モデルを用いた実験から、心不全の重症度に伴って酸化修飾を受けるGPx3が同定された。この酸化修飾のメカニズムについても調べ、TRPC3-Nox2 共役の阻害が心不全治療の新たな標的戦略となる可能性が示された。ヒト心不全患者では、マウスとは同様の結果とはならず残念であったが、この結果が新たな研究開始の契機となることは確かで、今後の展開が期待される。

また、マウス心筋梗塞モデルを用いた実験から、内因性 Drp1 はシステインにポリ硫黄鎖を持ち、この枯渇が Drp1 を活性化させる引き金となる可能性が示された。G タンパク質サイクルが活性イオウによっても制御されるという非常に興味深い結果である。また、Drp1 活性化を阻害する化合物として高血圧治療薬シルニジピンも同定し、臨床研究も開始された。

さらに、アンジオテンシンII誘発性高血圧のメカニズムの研究過程で、P2Y6 受容体がアンジオテンシン type1 受容体と2量体を形成し、高血圧リスクを高めることをマウスで見出した。

以上のように、本さがけ研究で新たな研究分野を開拓し、その成果を積極的に論文、学会などで発表した。

これらの他にも現時点では非公開の重要な研究成果も多数有り、今後の学会発表や論文発表が期待される。

本さがけ研究の活性イオウによるミトコンドリア品質管理に関する成果が認められ、複数の学会でのシンポジウム企画立案や、生理学研究所にて異分野融合型のオルガネラ研究会を立ち上げる等、新たな研究分野を開拓しつつある。また、心臓イオウ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本研究分野の顕著な研究者の一人として注目され、新たな共同研究にも発展し、基盤研究特設分野「ネオ・ジェロントロジー」への応募・採択につながっている。さらに、本さがけ研究領域内では、柴田研究者、富澤アドバイザーや魏研究者との研究交流の成果が新たな共同研究に発展し、新学術領域の立ち上げ・応募につながりつつある。このように、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishimura A., Sunggip C., Tozaki-Saitoh H., Shimauchi T., Numaga-Tomita T., Hirano K., Ide T., Boeynaems JM., Kurose H., Tsuda M., Robaye B., Inoue K. and Nishida M*. (2016) The purinergic P2Y6 receptor heterodimerizes with the angiotensin AT1 receptor to promote angiotensin II-induced hypertension. *Science Signaling* 9, ra7. doi: 10.1126/scisignal.aac9187. (*corresponding author)
2. Numaga-Tomita T., Nishida M*, Putney J.W. Jr., and Mori Y*. (2016) TRPC3 amplifies B-cell receptor-induced ERK signalling via protein kinase D-dependent Rap1 activation. *Biochemical Journal* 473(2):201-10. doi: 10.1042/BJ20150596.
3. Kitajima N., Numaga-Tomita T., Watanabe M., Kuroda T., Nishimura A., Miyano K., Yasuda S., Kuwahara K., Sato Y., Ide T., Birnbaumer L., Sumimoto H., Mori Y. and Nishida M*. (2016)

TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. Scientific Reports 6:37001. doi: 10.1038/srep37001.

4. Numaga-Tomita T., Kitajima N., Kuroda T., Nishimura A., Miyano K., Yasuda S., Kuwahara K., Sato Y., Ide T., Birnbaumer L., Sumimoto H., Mori Y. and Nishida M*. (2016) TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. Scientific Reports 6:39383. doi: 10.1038/srep39383.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発明者: 西田 基宏、石川 達也

発明の名称: Drp1 重合阻害剤

出願人: EAファーマ(株)、自然科学研究機構と九州大学(日本のみ)

出願日: 平成 27 年 11 月 20 日

出願番号: 特願 2015-082688, WO2016/080516

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・国際学会発表(招待講演のみ)

1. Nishida M., Shimauchi T., Nishimura A., and Numaga-Tomita T. TRPC channels in cardiovascular stress resilience. International and Interdisciplinary Symposium 2016 “Towards a New Era of Cardiovascular Research”. July 11-13 (2016). Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

2. Nishida M. New strategies for drug development of heart failure. Medical Research Seminar in Malaysia Sabah University, Jan 23 (2017). Kota Kinabalu Sabah, Malaysia.

3. Nishida M., Numaga-Tomita T., Shimauchi T., Matsukane R. and Nishimura A. Imitation of kinesitherapy by inhibition of TRPC6 channel activities. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (ISCIDK2015). Oct 16-17 (2015). Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

4. Nishida M. Negative regulation of cardiac remodeling by S-polythiolation of G proteins. 2nd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecule. Sep1 (2015). Showa Pharmaceutical University, Tokyo, Japan.

5. 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.

6. Nishida M. Role of TRPC channels in mechano-chemo transduction in hearts. The 6th International Workshop on Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia Sep 12-15 (2013). Oxford, UK.

・受賞

1. 第 25 回アステラス病態代謝研究会 最優秀理事長賞受賞(2014 年 10 月)

・英文総説

1. M. Nishida*, A. Nishimura, T. Matsunaga, H. Motohashi, S. Kasamatsu and T. Akaïke*, "Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells" Free Rad. Biol. Med. (in press).
2. S. Fujii, T. Sawa, M. Nishida, H. Ihara, T. Ida, H. Motohashi and T. Akaïke*, "Redox signaling regulated by an electrophilic cyclic nucleotide and reactive cysteine persulfides" Arch. Biochem. Biophys. 595:140–146 (2016). doi: 10.1016/j.abb.2015.11.008..
3. M. Nishida, Y. Kumagai, H. Ihara, S. Fujii, H. Motohashi and T. Akaïke*, "Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species" J. Clin. Biochem. Nutr. 58(2):91–98 (2016). doi: 10.3164/jcbrn.15–111.
4. M. Nishida, K. Kuwahara, D. Kozai, R. Sakaguchi and Y. Mori* "TRP Channels: Their Function and Potentiality as Drug Targets" Innovative Medicine: Basic Research and Development (Springer Open, edited by Nakao K, Minato N and Uemoto S), ISBN 978-4-431-55651-0 (eBook) 195–218 (2015). DOI 10.1007/978-4-431-5561-0_17.
5. M. Nishida*, T. Toyama and T. Akaïke "Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling" J. Mol. Cell. Cardiol. 73, 10–7 (2014). doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.003.

・プレスリリース

- 「加齢高血圧の原因タンパク質を特定」2016.1.20 朝刊およびウェブ掲載(中日新聞、朝日新聞、毎日新聞、日経産業新聞、共同通信、NN マイナビニュースなど)
- 「目耳録 ～高血圧～」2016.3.14 朝刊掲載(中日新聞)
- 「圧負荷により心臓が硬くなる原因を解明」2016.1.20 朝刊およびウェブ掲載(中日新聞、朝日新聞、読売新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞など)