



Inhibition of glutaminase 1-mediated glutaminolysis improves pathological cardiac remodeling

吉川, 祥子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8409号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477835>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Inhibition of glutaminase 1-mediated glutaminolysis

improves pathological cardiac remodeling

グルタミナーゼ1を介したグルタミノリシスの阻害は

病的な心筋リモデリングを改善する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

循環器内科学分野

(指導教員：平田健一教授)

吉川 祥子

背景)

心臓は組織重量当たり、最もエネルギー（アデノシン三リン酸:ATP）を消費する臓器の一つである。健康心筋では第一に脂肪酸、それに次いで糖を基質とした ATP 合成が行われる。一方、一部に乳酸、ケトン体、アミノ酸なども利用可能である。心不全のような病的状況下では、心筋のエネルギー基質の利用バランスが大きく変化する（代謝リモデリング）ことが知られている。具体的には、脂肪酸酸化の低下と解糖系の亢進、さらにケトン体の利用亢進や分岐鎖アミノ酸の代謝障害等が生じることが明らかにされている。このような代謝リモデリングは、心筋の代償的变化である心肥大や心筋線維化（心筋リモデリング）が起こる以前から認められ、心筋代謝と心筋リモデリングの進展機序には深い関連があることが知られている。

グルタミンは血中に最も豊富に存在するアミノ酸で、“グルタミノリシス；Glutaminolysis”と呼ばれる代謝経路を介し、グルタミン酸を経て α -ケトグルタル酸（alpha-ketoglutarate: α KG）としてTCA回路へ流入する。この経路はTCA回路へ、その中間体である α KGを補充する重要な役割を担っており、細胞増殖能の高いがん細胞は、グルタミンをエネルギーおよび増殖に必要な核酸・脂質等の合成に利用するため、この経路に強く依存している。先行研究で、酸化ストレス下の心筋細胞においてグルタミノリシスが亢進し、ATPと抗酸化分子であるグルタチオンの合成を維持することで心筋保護的に働くことを報告した。しかし、心筋リモデリングを来した不全心における、グルタミン代謝制御機構やその病態生理学的意義については十分に解明されていない。

目的)

心筋リモデリングにおけるグルタミン代謝制御機構を解明する。

方法)

8週齢の野生型マウス(C57BL/6J)に、グルタミノリシスの律速酵素であるGlutaminase1(GLS1)の阻害剤BPTES（Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide）(3mg/kg)もしくはDMSO（Dimethyl sulfoxide）を腹腔内注射にて週3回投与した。投与開始3日目より、Angiotensin II (2mg/kg/day)もしくは生理食塩水(0.9%)を充填した浸透圧ポンプを皮下に植え込んだ。14日目に心エコーと血圧測定を施行し、16日目に組織のサンプリングを行った。心臓切片のHematoxylin and eosin染色にて心筋横断面の面積を定量し、Masson-trichrome染色にて線維化を評価した。血中・心臓組織中アミノ酸濃度は液体クロマトグラフ質量分析計（Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry: LC-MS）を用いて測定した。

グルタミン代謝に関連する酵素 (GLS1 (glutaminase)、KGA (kidney type glutaminase)、GAC (glutaminase C) 等) の発現をウエスタンブロット法で評価した。心臓リモデリングのマーカーとして、ANP (atrial natriuretic peptide) と Col1a1 (collagen type I alpha 1) の蛋白・遺伝子発現をウエスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法で評価した。

細胞実験では、生後 1-3 日の新生仔ラット初代培養心筋細胞 (RNCMs; rat neonatal cardiomyocytes) 及び線維芽細胞 (RNCFs; rat neonatal fibroblasts) を用いた。GLS1 阻害剤である BPTES (最終濃度 10 μ M) もしくは DMSO を加えて 4 時間培養した後、Angiotensin II (最終濃度 1 μ M) もしくは生理食塩水を添加し、24 時間培養した。また、siRNA を用いて GLS1 をノックダウンし、Angiotensin II による処理を同様の条件で行った。RNCMs は免疫染色にて細胞表面積を評価し、RNCFs は cell counting kit-8 を用いて増殖能を評価した。

さらに、グルタミン代謝フラックス解析として、RNCMs・RNCFs に上述の刺激処理を行った後、安定同位体標識 [U - $^{13}C_5$]-グルタミンを含む培地で 4 時間培養し、細胞内の標識された代謝物をガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS; gas chromatography-mass spectrometry) にて測定した。

結果)

Angiotensin II を投与したマウスの心臓組織ではグルタミン、グルタミン酸の含量がコントロール群と比較し、有意に増加していた。また、グルタミノリシスにおいて、グルタミンからグルタミン酸への変換を触媒する酵素である GLS1 とその isoform である KGA・GAC の発現が Angiotensin II 群で有意に増加していた。

マウスの心肥大を心重量/体重比 (mg/g) および心重量/脛骨長比 (mg/mm) で評価したところ、いずれも Angiotensin II 投与群で有意に増加し、Angiotensin II + BPTES 投与群では、その増加が有意に抑制された。これは心筋横断面積においても同様の傾向であった。続いて、新生仔ラット初代培養心筋細胞 (RNCMs) を Angiotensin II で刺激すると、時間依存的に GLS1 蛋白発現が増加することを確認した。さらに、BPTES で前処理した RNCMs を Angiotensin II で 24 時間刺激したところ、Angiotensin II に誘導された心筋肥大は BPTES によって抑制された。次に RNCMs に siRNA による GLS1 のノックダウンを施行したところ、GLS1 阻害薬の結果と同様に Angiotensin II 誘導心筋肥大は抑制された。

マウス心筋では、心肥大マーカーである ANP の遺伝子および蛋白発現が Angiotensin II 投与群で顕著に増加し、Angiotensin II + BPTES 投与群では、そ

の増加が抑制された。また心エコーでは、Angiotensin II 投与群の心筋で、壁厚が増大し、拡張末期左室径が縮小する、求心性肥大変化を認めた。しかし、Angiotensin II + BPTES 投与群では、その肥大変化が有意に抑制された。

さらに、心臓切片における線維化面積は Angiotensin II 投与群で顕著に増加し、Angiotensin II + BPTES 投与群では抑制された。同様に、線維化マーカーである Col1a1 の遺伝子発現も、Angiotensin II 投与群で増加し、Angiotensin II + BPTES 投与群では、有意に抑制された。続いて、新生仔ラット初代培養線維芽細胞 (RNCFs) を Angiotensin II で刺激すると、時間依存的に GLS1 蛋白発現が増加することを確認した。BPTES による薬理的 GLS1 阻害と siRNA を用いた GLS1 ノックダウンを施行した RNCFs を、Angiotensin II で 24 時間刺激したところ、両方で Angiotensin II による線維芽細胞の増殖が有意に抑制されることを証明した。これらの結果より、Angiotensin II は GLS1 を介してグルタミノリシスを亢進させ、これを阻害すると、心筋リモデリングが抑制されることが明らかとなった。

次に、不全心筋におけるグルタミン代謝の役割を解明するため、[U - $^{13}C_5$]-グルタミンを用いて、RNCMs もしくは RNCFs の細胞内の標識代謝物の追跡を行った。グルタミンの M+5 分画の割合は Angiotensin II 刺激によって変化することはなかったが、グルタミン酸、 α KG の M+5 分画、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸の M+4 分画の割合は、Angiotensin II 刺激で有意に増加しており、Angiotensin II + BPTES 刺激ではその増加が有意に抑制された。

最後に、グルタミン代謝阻害により心筋リモデリングが制御される機序を解明するため、核酸や脂質などの細胞構成成分の合成に必須であるアスパラギン酸やクエン酸に注目した。[U - $^{13}C_5$]-グルタミン由来のアスパラギン酸 M+4 分画、クエン酸 M+4 分画の割合は、Angiotensin II 刺激で有意に増加し、Angiotensin II + BPTES 刺激ではその増加が抑制されることがわかった。この結果より、不全心において亢進したグルタミン代謝は核酸・脂質の元となるアスパラギン酸やクエン酸の合成に優先的に利用され、心筋リモデリングに寄与している可能性が示唆された。さらに、アスパラギン酸が心筋肥大や線維芽細胞増殖に必須かを確認するため、RNCMs・RNCFs にアスパラギン酸 (最終濃度 0.625~2.5mM) を添加し、Angiotensin II \pm BPTES で 24 時間刺激したところ、BPTES による心筋肥大・線維芽細胞増殖に対する抑制効果が、アスパラギン酸によってキャンセルされた。

以上の結果から、グルタミノリシスは Angiotensin II により亢進し、グルタミンは細胞構成に必要な核酸・脂質の元となるアスパラギン酸やクエン酸へ代謝されることで、心筋リモデリングの進展に寄与している可能性が示唆された。

考察)

高血圧や弁膜症・虚血など、種々の要因により傷害をうけた心臓は、左室拡大や壁肥厚・心筋細胞の肥大や間質の線維化といった構造的・組織学的変化を来す。それに先立って基質の選択性が変化することが知られている。このような“心筋リモデリング”と“代謝リモデリング”が深く関わっていることが提唱されて久しいが、現在までに糖や脂肪酸などの主要な基質における代謝制御機構については多くの研究報告がなされてきた。しかし、未だ心筋代謝経路を直接的な標的とする心不全の治療法は確立されていないのが現状である。

我々はグルタミン特有の代謝経路であるグルタミノリシスに着目した。Angiotensin II誘導肥大心筋ではグルタミノリシスの律速酵素である GLS1 の発現が亢進していることを発見した。さらに、GLS1 阻害は心筋肥大や線維化といった心筋リモデリングを抑制することを証明した。この機序については、Angiotensin II誘導肥大心筋細胞で、¹³C₆-グルタミン由来のアスパラギン酸、クエン酸が有意に増加していることに着目した。心筋ストレス負荷時には、グルタミンが優先的にアスパラギン酸やクエン酸に変換されることで、細胞肥大や増殖に必要な核酸や脂質などの細胞構成成分を効率的に得ていると考えた。

本研究はグルタミノリシスと心筋リモデリングの関連を示す、最初の報告である。2010年以降グルタミノリシスに関連する報告は増加傾向にあり、悪性腫瘍に関するものを中心に肺高血圧症や細胞老化に関する論文も発表されている。それらの病態の共通事項として、グルタミノリシスは種々の細胞において細胞の増殖と生存に寄与し、結果的に病態や臓器機能を悪化させていることがわかる。心筋細胞は分裂を行わない細胞だが、心肥大や線維芽細胞の増殖といった心筋リモデリングの分子メカニズムにおいて、グルタミノリシスが重要な役割を果たしている可能性を考えた。

我々が行った先行研究では酸化ストレスを加えた心筋細胞で GLS1 活性が亢進し、グルタミンは ATP やグルタチオンの産生に利用され心筋保護的に作用することを示した。これは、本研究の結果とは相反する結果であり、心筋細胞は急性ストレス負荷にはグルタミノリシスを活性化させ細胞保護・生存に寄与するが、慢性ストレス負荷による長期的なグルタミノリシスの亢進は、病的な心筋細胞の肥大や線維芽細胞の増殖を導き、心筋リモデリングの進展に繋がっているのではないかと推測している。

我々は、グルタミン代謝阻害が心筋リモデリングを抑制することを発見した。近年、糖尿病治療薬である SGLT2 阻害薬の心保護作用が注目され、新た

な心不全治療薬の一つとして保険収載された。作用機序の一つとして、SGLT2 阻害薬による心筋エネルギー代謝への影響が示唆されているが、本研究は心不全におけるエネルギー代謝機構の新たな分子メカニズムを提唱したもので、心筋代謝が心不全の治療標的となり得る可能性を示している。

結語)

Angiotensin IIによって心筋肥大・線維化を来した心臓では、GLS1 の発現亢進を介したグルタミノリシスの活性化が認められ、GLS1 の阻害は心筋リモデリングの進展を抑制した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3200 号	氏 名	吉川 祥子
論文題目 Title of Dissertation	グルタミナーゼ 1 を介したグルタミノリシスの阻害は病的な心筋リモデリングを改善する Inhibition of glutaminase 1-mediated glutaminolysis improves pathological cardiac remodeling		
審査委員 Examiner	主 査 児玉 裕三 Chief Examiner 副 査 古屋敷 智之 Vice-examiner 副 査 小川 翔 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【背景】

心不全のような病的状況下では、心筋のエネルギー基質の利用バランスが大きく変化する(代謝リモデリング)ことが知られている。グルタミンは Glutaminolysis と呼ばれる代謝経路を介し、 α -ケトグルタル酸 (α -ketoglutarate: α KG) として TCA 回路へ流入する。不全心におけるグルタミン代謝制御機構やその病的意義については十分に解明されておらず、本研究は心筋リモデリングにおけるグルタミン代謝制御機構の解明を目的とする。

【方法】

8週齢の野生型マウスに、グルタミノリシスの律速酵素である Glutaminase1 (GLS1) の阻害剤 BPTES もしくは DMSO を投与した。投与開始3日目より、Angiotensin II もしくは生理食塩水を充填した浸透圧ポンプを皮下に植え込んだ。14日目に心エコーと血圧測定を施行し、16日目に組織のサンプリングを行った。心筋横断面の面積、線維化、血中・心臓組織中アミノ酸濃度、グルタミン代謝に関連する酵素発現、ANP、Colla1 の蛋白・遺伝子発現を評価した。

細胞実験では、新生仔ラット初代培養心筋細胞 (RNCMs) 及び線維芽細胞 (RNCFs) を用いた。BPTES もしくは DMSO を加えて培養後、Angiotensin II もしくは生理食塩水を添加した。また、siRNA を用いて GLS1 をノックダウンし、RNCMs は細胞表面積を、RNCFs は増殖能を評価した。さらに、グルタミン代謝フラックス解析を行なった。

【結果】

Angiotensin II を投与したマウスの心臓組織ではグルタミン、グルタミン酸の量、および GLS1 とその isoform である KGA・GAC の発現が有意に増加していた。Angiotensin II 投与群ではマウスの心肥大が有意に増加し、BPTES 投与群では有意に抑制された。RNCMs を Angiotensin II で刺激すると GLS1 蛋白発現が増加し、BPTES で前処理すると心筋肥大は抑制された。RNCM における GLS1 のノックダウンでも心筋肥大は抑制された。

マウス心筋では、心肥大マーカーである ANP の発現が Angiotensin II 投与群で顕著に増加し、BPTES 投与群では抑制された。また心エコーでは、Angiotensin II 投与群の心筋で壁厚が増大し、拡張末期左室径が縮小する求心性肥大変化を認めたが、BPTES 投与群では有意に抑制された。線維化面積および Colla1 の遺伝子発現は、Angiotensin II 投与群で顕著に増加し、BPTES 投与群では抑制された。RNCFs を Angiotensin II で刺激すると GLS1 蛋白発現し、BPTES 投与、および GLS1 ノックダウンにより、線維芽細胞の増殖が有意に抑制された。これらの結果より、Angiotensin II は GLS1 を介してグルタミノリシスを亢進させ、これを阻害すると、心筋リモデリングが抑制されることが明らかとなった。

次に、RNCMs もしくは RNCFs の細胞内の標識代謝物の追跡を行った。グルタミン酸、 α KG の M+5 分画、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸の M+4 分画の割合は、Angiotensin II 刺激で有意に増加し、BPTES 投与ではその増加が有意に抑制された。また、 $[U-^{13}C_5]$ -グルタミ

ン由来のアスパラギン酸 M+4 分画、クエン酸 M+4 分画の割合は、Angiotensin II 刺激で有意に増加し、BPTES 投与では抑制された。この結果より、不全心において亢進したグルタミン代謝は、核酸・脂質の元となるアスパラギン酸やクエン酸の合成に優先的に利用され、心筋リモデリングに寄与している可能性が示唆された。RNCMs・RNCFs にアスパラギン酸を添加しところ、BPTES による心筋肥大・線維芽細胞増殖に対する抑制効果がキャンセルされた。以上の結果から、グルタミノリシスは Angiotensin II により亢進し、グルタミンは細胞構成に必要な核酸・脂質の元となるアスパラギン酸やクエン酸へ代謝されることで、心筋リモデリングの進展に寄与している可能性が示唆された。

【考察】

本研究ではグルタミノリシスに着目し、Angiotensin II 誘導肥大心筋ではグルタミノリシスの律速酵素である GLS1 の発現が亢進していることを発見した。さらに、GLS1 阻害は心筋肥大や線維化といった心筋リモデリングを抑制することを証明した。これは、グルタミンが優先的にアスパラギン酸やクエン酸に変換されることで、細胞肥大や増殖に必要な核酸や脂質などの細胞構成成分を効率的に得ているためと考えられた。

本研究はグルタミノリシスと心筋リモデリングの関連を示す、最初の報告である。2010 年以降グルタミノリシスに関連する報告は増加傾向にあり、悪性腫瘍に関するものを中心に肺高血圧症や細胞老化に関する論文も発表されている。それらの病態の共通事項として、グルタミノリシスは種々の細胞において細胞の増殖と生存に寄与し、結果的に病態や臓器機能を悪化させていることがわかる。心筋細胞は分裂を行わない細胞だが、心肥大や線維芽細胞の増殖といった心筋リモデリングの分子メカニズムにおいて、グルタミノリシスが重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究により、グルタミン代謝阻害が心筋リモデリングを抑制することが明らかとなった。本研究は心不全におけるエネルギー代謝機構の新たな分子メカニズムを提唱したもので、心筋代謝が心不全の治療標的となり得る可能性を示している。

【結語】

Angiotensin II によって心筋肥大・線維化を来した心臓では、GLS1 の発現亢進を介したグルタミノリシスの活性化が認められ、GLS1 の阻害は心筋リモデリングの進展を抑制した。

本研究は、不全心の心筋肥大および線維芽細胞の増殖における GLS1 の機能を解析し、GLS1 の治療標的としての可能性を示した報告である。心筋リモデリングとグルタミノリシスとの関連をはじめて示し、心不全の病態解明と治療開発において価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。