



Critical role of glutamine metabolism in cardiomyocytes under oxidative stress

Watanabe, Koichi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2021-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8112号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008112>

※ 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

Critical role of glutamine metabolism in cardiomyocytes

under oxidative stress

酸化ストレス下の心筋細胞におけるグルタミン代謝の役割

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)

渡部 晃一

背景)

心臓は全身の中で最もエネルギー（アデノシン三リン酸:ATP）を消費する臓器であるが、心筋ミトコンドリア内における TCA(tricarboxylic acid)回路が主要なエネルギー産生系として機能しており、健常心筋では第一に脂肪酸、それに次いで糖を基質とした ATP 合成が行われている。一方で“心臓は雑食性である”と言われるように一部に乳酸、ケトン体、アミノ酸などもエネルギー基質として利用可能である。心不全をはじめとした病的状況下では心筋におけるエネルギー基質の利用バランスが崩れることがわかっており、この“代謝リモデリング”が心不全の病態と深く関わっている。

グルタミンは血中に最も豊富に存在するアミノ酸で、“グルタミン分解 (Glutaminolysis)”として知られる代謝経路を通して、ミトコンドリア内でグルタミン酸、 α -ケトグルタル酸 (α -ketoglutarate: α KG) と順に変換され、TCA 回路を経て最終的に乳酸まで代謝される。本経路は 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源及び、細胞増殖に必要な核酸や脂肪酸合成のための炭素・窒素の供給源として利用するため、グルタミンに強く依存している。しかしながら、エネルギー代謝異常をきたした不全心筋におけるグルタミン代謝の制御機構や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)

酸化ストレス下の心筋細胞におけるグルタミン代謝の制御機構と生理作用を明らかにする。

方法)

In vitro での不全心筋モデルとして、生後 1-3 日の新生仔ラット初代培養心筋細胞 (RNCMs ; rat neonatal cardiomyocytes) に過酸化水素 (H_2O_2) を添加し、酸化ストレスを与えた。液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS ; liquid chromatography-mass spectrometry) により細胞中の α KG、グルタミン酸、グルタミンを測定した。

安定同位体標識グルタミン ($[U-^{13}C]$ -グルタミン)、もしくはグルコース ($[U-^{13}C]$ -グルコース) を含む培地で RNCMs を培養し、酸化ストレス下で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) により測定した。

グルタミン分解、TCA 回路の律速酵素であるグルタミナーゼ (Gls ; glutaminase)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (Idh2 ; isocitrate dehydrogenase)、2-オキソデヒドロゲナーゼ (Ogdh ; oxoglutarate

dehydrogenase)のタンパク発現をウエスタンブロット法で評価した。また、Gls 酵素活性を市販のキットによって測定した。

Gls 阻害剤である Compound 968、細胞膜透過性を有するエステル体 α KG であるジメチル- α -ケトグルタル酸 (DMKG ; dimethyl- α -ketoglutarate) で RNCMs を前処置した後、 H_2O_2 を添加し、クリスタルバイオレット染色で細胞生存率を評価した。細胞内 ATP および抗酸化物質であるグルタチオン (GSH ; glutathione) を市販キットを用いて定量し、活性酸素種 (ROS ; reactive oxygen species) の定性評価をジヒドロエチジウム (DHE ; dihydroethidium) 染色にて行った。

結果)

RNCMs を H_2O_2 で刺激すると、細胞内の α KG、グルタミン酸およびグルタミンは有意に低下した。 $[U-^{13}C]$ -グルタミンを用いて標識代謝物の追跡を行った結果、 H_2O_2 刺激によって α KG、グルタミン酸、グルタミンの M+5 分画およびフマル酸、リンゴ酸の M+4 分画の割合が有意に増加しており、酸化ストレス下における心筋細胞中のグルタミン利用が亢進していることが明らかとなった。一方、 $[U-^{13}C]$ -グルコースを培地に加えて、同様の実験を行うと、グルコース利用の亢進は認められなかった。このことより、心筋細胞では酸化ストレスによって不足した代謝物を補填するため、代償的にグルタミン分解が亢進していることが示唆された。

グルタミン分解と α KG 代謝に関わる酵素の発現を評価すると、 H_2O_2 刺激により Gls、Idh2、Ogdh の発現は不変であったが、Gls の酵素活性は有意な上昇を示し、酸化ストレス下におけるグルタミン分解を促進させる機序の一つであると考えられた。

続いて、グルタミン分解が細胞生存と ATP 産生に及ぼす影響を評価するため、心筋細胞を Gls 阻害剤である compound 968 で前処置し、 H_2O_2 によって刺激したところ、Gls の阻害は細胞生存率および細胞内 ATP 産生を有意に低下させた。また、 α KG のエステル体である DMKG の添加は、酸化ストレス下の心筋細胞生存率を用量依存性に増加させ、ATP 産生の低下を抑制した。

さらに、生体における重要な抗酸化分子である GSH の産生へグルタミン分解が及ぼす影響を検証した。RNCMs を H_2O_2 で刺激したところ、compound 968 によるグルタミン分解の阻害は GSH を相加的に減少させた。一方、TCA 回路の中間体である α KG を DMKG の添加により補充すると、酸化ストレスによる GSH の減少は抑制された。最後に DHE 染色で ROS の産生を評価したところ、 H_2O_2 刺激により認められた ROS の増加が DMKG 添加によって減少傾向を示した。これらの実験結果より、酸化ストレス下の心筋細胞におけるグルタミン分解の亢進は GSH 合成を増加させることと、TCA 回路の中間体である α KG の補充は GSH

の構成アミノ酸であるグルタミン酸の合成に利用されることで、GSH 産生増加に寄与していることが示唆された。

考察)

本研究は不全心筋におけるグルタミン代謝に焦点を当てたもので、酸化ストレス下の心筋細胞ではグルタミン分解が亢進し、グルタミンが心筋での ATP や GSH の生合成に用いられることで、酸化ストレスに対して細胞保護的に作用していることを証明した。がん研究の分野ではグルタミンはアミノ酸、脂質、核酸の生合成を介して、がん細胞の増殖・分裂を促進するため、グルタミン分解の亢進は生体に負の影響をもたらすとされている。実際に Gls 阻害剤やグルタミントランスポーターの阻害薬は新たながん治療薬の候補として治療段階にあるものも存在する。

現段階では心不全におけるグルタミン代謝制御機構とその生理的な役割は十分に解明されていない。安定同位体を用いた実験では、酸化ストレスに曝された心筋細胞においてグルタミン利用が亢進し、グルコース利用には変化が見られなかった。これは従来の報告とは矛盾する結果であった。心臓は主に脂肪酸を基質として ATP を産生しているが、不全心筋ではエネルギー的な飢餓状態に陥り、脂肪酸からグルコース利用へ移行することが知られている。他方でグルコースがミトコンドリアでの ATP 産生よりも優先的に核酸・脂質などの biomass 合成に割り振られ、結果的に心肥大を引き起こすという報告もあることから、今回観察された不全心筋におけるグルタミン分解の亢進は低下したエネルギー産生を補うための代償機構であると考えた。

また、グルタミン分解においてグルタミンより生成される α KG は多面的な生理作用を有することが知られている。具体的には mechanistic target of rapamycin (mTOR) を介したシグナル伝達や慢性炎症の抑制、T 細胞からの Interleukin10 (IL-10) の分泌抑制、さらにはヒストンの脱メチル化を通じた遺伝子発現等に関与し、線虫やマウスにおいては lifespan の延長効果が報告されている。心臓については糖尿病患者の心臓の間葉系細胞および糖尿病モデルマウスの心臓でインスリン感受性とグルコース取り込みを改善させたとの報告もあり、 α KG がシグナル伝達分子や遺伝子修飾の調整因子の役割を担うことが明らかにされている。本研究ではグルタミン分解の阻害が GSH の産生を低下させることと、心筋細胞に対する α KG の投与が GSH 産生を増加させることを証明し、グルタミン分解とその中間代謝物である α KG が酸化ストレスを制御し、細胞保護効果を発揮していることを明らかにした。

本研究における制約として、まず、In vivo 心不全モデルにおけるグルタミン分解の役割が検証できていないことが挙げられる。細胞実験では長期間酸化ストレスにさらされた際のグルタミン分解の動態や慢性的な影響を検討す

ることが困難である。次に虚血や心肥大といった、心不全の原因となる他の病態におけるグルタミン代謝の制御機構を明らかにできていない。また、本研究で認めた酸化ストレスによる G1s 活性化のメカニズムについても不明である。さらに、添加した α KG がグルタミン酸へ変換され、GSH 合成を誘導しているという仮説も、実際にトレーサーを用いた追跡実験による検証はできていない。以上のような制約に対するさらなる研究を通じて、心不全の新たな治療標的となり得るグルタミン代謝制御機構を明らかにすることが課題である。

結論)

酸化ストレス下の心筋細胞ではグルタミン分解が亢進しており、これは ATP 産生の低下を代償するとともに、抗酸化分子である GSH の合成を介して、心筋保護に寄与している。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3088 号	氏 名	渡部 晃一
論 文 題 目 Title of Dissertation	酸化ストレス下の心筋細胞におけるグルタミン代謝の役割 Critical role of glutamine metabolism in cardiomyocytes under oxidative stress		
審 査 委 員 Examiner	主 査 見玉 裕三 Chief Examiner 副 査 小川 渉 Vice-examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【背景と目的】

心臓は全身の中で最もエネルギー（アデノシン三リン酸;ATP）を消費する臓器であるが、心筋ミトコンドリア内におけるTCA(tricarboxylic acid)回路が主要なエネルギー産生系として機能しており、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合成が行われている。一方で心不全をはじめとした病的状況下では心筋におけるエネルギー基質の利用バランスが崩れることがわかっており、この“代謝リモデリング”が心不全の病態と深く関わっている。しかしながら、エネルギー代謝異常をきたした不全心筋におけるグルタミン代謝の制御機構や病態生理学的意義については十分に解明されていない。本研究では、酸化ストレス下の心筋細胞におけるグルタミン代謝の制御機構と生理作用を明らかにすることである。

【方法】

In vitroでの不全心筋モデルとして、生後1-3日の新生仔ラット初代培養心筋細胞(RNCMs; rat neonatal cardiomyocytes)に過酸化水素(H_2O_2)を添加し、酸化ストレスを与え、細胞中の α KG、グルタミン酸、グルタミンを測定した。安定同位体標識グルタミン ($[U-^{13}C]$ -グルタミン)、もしくはグルコース ($[U-^{13}C]$ -グルコース)を含む培地でRNCMsを培養し、酸化ストレス下での標識された代謝物を測定した。グルタミナーゼ(Gls; glutaminase)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(Idh2; isocitrate dehydrogenase)、2-オキソデヒドロゲナーゼ(Ogdh; oxoglutarate dehydrogenase)のタンパク発現、及びGls酵素活性を測定した。Gls阻害剤であるCompound 968、細胞膜透過性を有するエステル体 α KGであるジメチル- α -ケトグルタル酸(DMKG; dimethyl- α -ketoglutarate)でRNCMsを前処置した後、 H_2O_2 を添加し細胞生存率を評価した。細胞内ATPおよび抗酸化物質であるグルタチオン(GSH; glutathione)を定量し、活性酸素種(ROS; reactive oxygen species)の定性評価を行った。

【結果】

RNCMsを H_2O_2 で刺激すると、細胞内の α KG、グルタミン酸およびグルタミンは有意に低下した。 $[U-^{13}C]$ -グルタミンを用いて標識代謝物の追跡を行った結果、 H_2O_2 刺激によって α KG、グルタミン酸、グルタミンのM+5分画およびフマル酸、リンゴ酸のM+4分画の割合が有意に増加しており、酸化ストレス下における心筋細胞中のグルタミン利用が亢進していることが明らかとなった。一方、 $[U-^{13}C]$ -グルコースを培地に加えて、同様の実験を行うと、グルコース利用の亢進は認められなかった。このことより、心筋細胞では酸化ストレスによって不足した代謝物を補填するため、代償的にグルタミン分解が亢進していることが示唆された。グルタミン分解と α KG代謝に関わる律速酵素の発現を評価すると、 H_2O_2 刺激によりGls、Idh2、Ogdhの発現は不変であったが、Glsの酵素活性は有意な上昇を示し、酸化ストレス下におけるグルタミン分解を促進させる機序の一つであると考えられた。

続いて、心筋細胞をGls阻害剤であるcompound 968で前処置し、 H_2O_2 によって刺激したところ、Glsの阻害は細胞生存率および細胞内ATP産生を有意に低下させた。また、 α KGのエステル体であるDMKGの添加は、酸化ストレス下の心筋細胞生存率を用量依存性に増加させ、ATP産生の低下を抑制した。さらに、RNCMsを H_2O_2 で刺激したところ、compound 968によるグルタミン分解の阻害はGSHを相対的に減少させた。一方、TCA回路の中間体である α KGをDMKGの添加により補充すると、酸化ストレスによるGSHの減少は抑制された。最後にDHE染色でROSの産生を評価したところ、 H_2O_2 刺激により認められたROSの増加がDMKG添加によって減少傾向を示した。これらの実験結果より、酸化ストレス下の心筋細胞におけるグルタミン分解の亢進はGSH合成を増加させることと、TCA回路の中間体である α KGの補充はGSHの構成アミノ酸であるグルタミン酸の合成に利用されることで、GSH産生増加に寄与していることが示唆された。

【考察および結論】

本研究は不全心筋におけるグルタミン代謝に焦点を当てたもので、酸化ストレス下の心筋細胞ではグルタミン分解が亢進し、グルタミンが心筋でのATPやGSHの生合成に用いられることで、酸化ストレスに対して細胞保護的に作用していることを証明した。心臓は主に脂肪酸を基質としてATPを産生しているが、不全心筋ではエネルギー的な飢餓状態に陥り、脂肪酸からグルコース利用へ移行することが知られている。他方でグルコースがミトコンドリアでのATP産生よりも優先的に核酸・脂質などのbiomass合成に割り振られ、結果的に心肥大を引き起こすという報告もあることから、今回観察された不全心筋におけるグルタミン分解の亢進は低下したエネルギー産生を補うための代償機構であると考えた。また、本研究ではグルタミン分解の阻害がGSHの産生を低下させることと、心筋細胞に対する α KGの投与がGSH産生を増加させることを証明し、グルタミン分解とその中間代謝物である α KGが酸化ストレスを制御し、細胞保護効果を発揮していることを明らかにした。以上より、酸化ストレス下の心筋細胞ではグルタミン分解が亢進しており、これはATP産生の低下を代償するとともに、抗酸化分子であるGSHの合成を介して、心筋保護に寄与していると考えられた。

本研究は、心不全をはじめとした病的状況下の心筋における代謝リモデリングについて研究したものであるが、酸化ストレス下の心筋細胞においてグルタミン分解が亢進していることを証明した初めての報告である。心不全の病態をエネルギー代謝の面から解明し、今後の心筋保護への介入法の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ものと認める。