

細胞内代謝適応を標的とした心筋梗塞後の線維化に対する
新規治療法の開発

村越 幹昭

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 生体機能制御学研究室

(佐藤 匠徳 教授)

平成 26 年 3 月 14 日提出

所属 (主指導教員)	生体機能制御学研究室 (佐藤 匠徳)		
氏名	村越 幹昭	提出	平成 25 年 12 月 17 日
題目	細胞内代謝適応を標的とした心筋梗塞後の線維化に対する新規治療法の開発		
要旨 細胞内代謝の変化は細胞の生存、増殖、分化、恒常性の維持を努める事において中心的な役割を担っている。例えば、強い増殖能力を持つガン細胞ではゲノムにおける遺伝変化によって細胞内代謝の変化が生じ、増殖するために必要なエネルギーや核酸、タンパク質、脂質などの生体高分子の産生を助けている。また幹細胞の維持においても細胞内代謝が大きく関わっていることが報告されており、近年ではガン細胞や幹細胞を中心に細胞内代謝適応のメカニズム解明が飛躍的に進んでいる。一方、分化した通常細胞においても細胞内代謝は細胞の挙動を制御する重要な因子であり、疾患のメカニズムとも大きく関わっている。しかし、心臓線維芽細胞の細胞内代謝適応システムの解明は心筋梗塞の治療において大変重要であるにも関わらず、全く明らかにされていない。 心筋梗塞は世界の死因の 13%を占め、先進国においても死因の上位を占めており、治療法については改善の余地が十分に残された疾患である。心筋梗塞は心臓の細胞に血液を送る冠動脈が動脈硬化により閉塞され、酸素や栄養が得られず心筋細胞が壊死する疾患である。その後、壊死した心筋細胞のスペースを埋めるように心臓線維芽細胞が増殖し、コラーゲンが分泌される。そしてコラーゲンが蓄積した心臓では線維化が起きる。この線維化は心臓の心破裂を防ぐ反面、過剰であると心筋の硬化を招き、心機能を妨げるため問題となっている。従来、心臓の線維化に対する治療法としては心室圧負荷の増大や心臓線維芽細胞の増殖・遊走が標的とされ、レニン・アンジオテンシン系の阻害による包括的な治療が行われてきたが十分な成果は上げられていない。また最近では心臓線維芽細胞を心筋細胞にリプログラミングすることで、心臓線維芽細胞を減らして線維化を抑制すると共に、心筋細胞を補充するといった治療法の開発も進んでいるが、未だ発展途上の段階であり、線維化に対するより効果の高い治療法の開発が必要とされている。そこで心臓線維芽細胞の細胞内代謝に注目し、心筋梗塞後の線維化に対する新規治療法の開発を目指した。 心臓線維芽細胞は心筋梗塞後の虚血環境下において生存・増殖できる。そこで「心筋梗塞後の虚血環境下において心臓線維芽細胞は細胞内代謝適応を行うことで生存・増殖している」という仮説を立てた。そして、心臓線維芽細胞の細胞内代謝適応が心筋梗塞後の線維化に対する新規治療標的になるかを検証した。			

本研究ではまず、環境の変化による心臓線維芽細胞の細胞内代謝の違いを調べるために、虚血環境下（低酸素、グルコース飢餓、グルタミン飢餓）で培養した心臓線維芽細胞の代謝産物の蓄積量をメタボローム解析によって網羅的に測定した。その結果、TCA 回路において NADH-fumarate reductase system (NADH-FR system) に特徴的な代謝産物の蓄積がみられた。NADH-FR system は嫌気的環境下において TCA 回路を一部逆回しすることで、酸素を使わずにプロトン勾配を作りだし、電子伝達系で ATP 合成を行う機構である。興味深いことに、NADH-FR system の阻害剤である Pyrvinium pamoate (PP) を心臓線維芽細胞に添加したところ、虚血環境下で細胞死を誘導した。この結果は心臓線維芽細胞が NADH-FR system によってエネルギーを獲得し、虚血環境に適応していることを示唆している。しかし、PP は栄養飢餓環境下（通常酸素、グルコース飢餓、グルタミン飢餓）においても細胞死を誘導した。NADH-FR system は低酸素特異的な機構であるため、この結果は PP が NADH-FR system 以外の標的に作用していることを示唆している。しかし PP の他の標的候補として報告されている Wnt signaling や UPR pathways は虚血環境下の心臓線維芽細胞に PP を添加しても変化がない。したがって、心臓線維芽細胞に対する細胞死の誘導はこれまでに報告のない新規の標的に作用して生じている可能性が示唆された。

そこで、標的の存在条件を明確にするために心臓線維芽細胞を通常環境下（通常酸素、高グルコース、高グルタミン）で一時的に PP 処理を行い、その後 PP を取り除いてから栄養飢餓環境下で培養した。すると培地中に PP が含まれていなくても細胞死が誘導された。これは PP の標的が通常環境下の心臓線維芽細胞に存在していることを示している。また、栄養飢餓に曝されると細胞死が誘導されることから、PP の標的は細胞内代謝と関係があると考えた。そこで、PP 処理による細胞内代謝への影響を調べるために通常環境下の心臓線維芽細胞に PP を添加し、メタボローム解析を行った。その結果、TCA 回路前半の中間代謝産物の著しい減少がみられた。さらにミトコンドリア代謝の指標である酸素消費速度 (OCR) も PP 処理により急激に減少しており、PP がミトコンドリアの代謝を阻害していることが示唆された。これらの結果を踏まえて栄養飢餓における PP の細胞死誘導のメカニズムにもミトコンドリア代謝の阻害が関係していると考察し、PP 処理を行った心臓線維芽細胞の栄養飢餓環境下での細胞内代謝をメタボローム解析にて調べた。その結果、栄養飢餓環境により解糖系が阻害され、また PP 処理により TCA 回路が阻害されることで両経路の中間代謝産物の枯渇が生じ、それに伴い ATP の枯渇が引き起こされることがわかった。以上の結果から心臓線維芽細胞が栄養飢餓環境下においてミトコンドリアエネルギー代謝に依存的に生存しており、PP はミトコンドリアエネルギー代謝を阻害することで ATP の枯渇を引き起こし、細胞死を誘導することが明らかになった。

最後に PP が心筋梗塞モデルマウスの心臓線維芽細胞の生存を抑制して、過剰な線維化を軽減できるか検証した。その結果、PP を投与した心筋梗塞モデルマウスでは心筋梗塞後の細胞増殖及び過剰な線維化が抑制され、エコーによる心機能測定でも心機能の改善がみられた。この結果は、PP が心筋梗塞後の線維化に対する治療薬になりうることを示している。

本研究は、心臓線維芽細胞の細胞内代謝適応が心筋梗塞後の線維化に対する新規治療標的になることを示唆している。今後は、心臓線維芽細胞の細胞内代謝適応メカニズムをより詳細に解明することにより、さらに効果的な治療法の開発に繋がることが期待される。

目次

1. 略語表	P7
2. 序論	P9
2.1 細胞内代謝適応	
2.1.1 代謝研究の始まり	
2.1.2 中心的な代謝経路	
2.1.3 細胞内代謝の制御機構	
2.1.3.1 ガンの代謝調節機構	
2.1.3.2 ガン関連転写因子による代謝調節	
2.1.3.3 ガンにおける代謝酵素の変化	
2.1.4 虚血性ガンの代謝	
2.1.5 細胞内代謝を標的とした治療	
2.1.6 細胞内代謝研究の重要性	
2.2 心筋梗塞と線維化	
2.2.1 心臓と細胞内代謝	
2.2.2 心疾患における心筋細胞の細胞内代謝	
2.2.3 心筋梗塞による死亡率	
2.2.4 心筋梗塞と線維化のメカニズム	
2.2.5 心筋梗塞後の線維化に対する治療法	
2.3 Pyrvinium pamoate (PP)	
2.3.1 ギョウ虫駆除薬～Pyrvinium pamoate～	
2.3.2 PP の適応拡大と新規薬理作用	
2.4 本研究の仮説	
3. 材料と方法	P24
3.1 細胞培養実験	
3.2 WST-8 法	
3.3 心臓線維芽細胞の調整	

- 3.4 化学薬品
- 3.5 使用した実験動物
- 3.6 培養細胞からのミトコンドリアの回収
- 3.7 酵素活性測定
- 3.8 プライマー
- 3.9 RNA 回収、cDNA 合成、Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)
- 3.10 電子顕微鏡
- 3.11 XF96 Flux analyzer
- 3.12 ^{13}C 代謝フラックス解析
- 3.13 代謝産物の抽出
- 3.14 メタボローム解析
- 3.15 心筋梗塞モデルマウスの作製
- 3.16 心エコー測定
- 3.17 ヒドロキシルプロリン測定
- 3.18 凍結切片
- 3.19 マッソントリクローム染色
- 3.20 組織免疫化学的染色

4. 結果 P31

4.1 PP による細胞内代謝適応の阻害

- 4.1.1 心臓線維芽細胞は虚血環境下で細胞内代謝を変化させる
- 4.1.2 PP による細胞死の誘導は NADH-FR system の阻害によるものではない
- 4.1.3 PP によるミトコンドリア代謝の抑制
- 4.1.4 栄養飢餓下で PP は ATP の枯渇を引き起こす
- 4.1.5 解糖系の再活性化は PP による心臓線維芽細胞への細胞毒性を打ち消す
- 4.1.6 ミトコンドリアのエネルギー代謝の回復によって PP 処理された心臓線維芽細胞は栄養飢餓に適応できる

4.2 心筋梗塞モデルマウスへの PP 投与による心機能改善

- 4.2.1 PP は心筋梗塞後の心臓において心臓線維芽細胞を減少させる
- 4.2.2 PP は心筋梗塞後の心臓において過剰な線維化を抑制する
- 4.2.3 PP は心筋梗塞後の心機能改善を促す

5. 考察	P43
5.1 PP の電子伝達系への影響	
5.2 PP の TCA 回路中間代謝産物への影響	
5.3 不活性化したミトコンドリアの回復	
5.4 虚血環境下で増殖する心臓線維芽細胞	
5.5 心臓線維芽細胞とガン細胞	
5.6 栄養飢餓環境下における細胞内代謝適応	
5.7 心筋細胞への PP の影響	
5.8 心筋梗塞モデルマウスへの PP 投与時期	
5.9 心筋梗塞モデルマウスの心臓における代謝の変化	
5.10 心機能改善を誘導する PP の薬理作用	
6. 総括	P50
7. 図表	P51
8. 謝辞	P88
9. 参考文献	P89

1. 略語表

2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose (FDG)
2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH)
3-phosphoglycerate (3PG)
4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride (AEBSF)
50% inhibitory concentration (IC50)
Acetyl-CoA carboxylase (ACC)
Adenosine 5'-diphosphate (ADP)
Adenosine 5'-triphosphate (ATP)
Angiotensin receptor blocker (ARB)
Angiotensin-converting enzyme (ACE) 阻害薬
ATP-citrate lyase (ACL)
Carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1)
Citrate synthase (CS)
Dichloroacetate (DCA)
Ejection-fraction (EF)
Electron transport chain (ETC)
Extracellular acidification rate (ECAR)
Fetal bovine serum (FBS)
Food and Drug Administration (FDA)
Fructose 1,6-diphosphate (F1,6P)
Fructose 6-phosphate (F6P)
Glucose transporter 1 (GLUT1)
Glucose-6-phosphate (G6P)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)
Glucose (Glc)
Glutamin (Gln)
Glutaminase (Gls1)
Guanosine triphosphate (GTP)
Hexokinase (HK)
Hypoxia induced factor 1 (HIF-1)
Isocitrate dehydrogenase (IDH)
Lactate dehydrogenase-A (LDH-A)
Mammalian target of rapamycin (mTOR) シグナル

NADH-fumarate reductase system (NADH-FR system)
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+)
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)
Nuclear respiratory factors (NRF1/2)
Oxygen consumption rate (OCR)
Phosphoenolpyruvate (PEP)
Phosphofructokinase (PFK)
PPAR γ -coactivator-1 α (PGC-1 α)
Prolyl hydroxylase domain-containing protein 3 (PHD3)
Pyruvate (Pyr)
Pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)
Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1)
Pyruvate dehydrogenase(PDH)複合体
Pyruvate kinase (PK)
Pyruvate kinase M (PKM)
Pyruvate kinase M2 isoform (PKM2)
Pyrvinium pamoate (PP)
Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)
R-2 ヒドロキシグルタル酸 (2HG)
Succinate dehydrogenase (SDH)
Synthesis of cytochrome c oxidase 2 (SCO2)
TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR)
Transforming growth factor- β (TGF- β)
Tricarboxylic acid (TCA) 回路
Unfolded Protein Response (UPR)
Unfolded protein response (UPR) pathways
World Health Organization (WHO)
還元型 Flavin-adenine dinucleotide (FADH_2)
還元型 Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)

2. 序論

2.1 細胞内代謝

2.1.1 代謝研究の始まり

人の代謝という概念が広く知られるようになったのは、1614年にイタリアの生理学者 Santorio Santorio によって書かれた *Ars de statica medecina* という本によるものである。Santorio は食事、睡眠、労働、交接、飲酒、排泄の前後で体重がどのように変化するかを 30 年もの間調べ続けた。そして、飲食した物の重さより、排出物の重さの方が少ない事に気付いた。このように古くから人はなぜ物を食べなければ生命を維持する事ができないのかという疑問を持ち続けていた(Eknoyan, 1999)。代謝という言葉は、英語では *metabolism* と書く。これは変化や崩壊を意味するギリシャ語の *Μεταβολισμός* から派生したものである。この代謝という用語を作り出したのはドイツの生理学者 Theodor Schwann(1810~1882 年)である。彼は動物の組織から初めて酵素（ペプシン）を発見し、更に酵母が外部にある糖を体内に取り入れ、体を作っていること（同化）、また糖がアルコールと二酸化炭素に分解され、排出されること（異化）を発見した。そして、生物が同化と異化を繰り返して生命を維持していることを示し、これを代謝と呼んだ(Schadewaldt, 1991)。その後、代謝研究は 20 世紀に入り、解糖系、Tricarboxylic acid (TCA)回路、電子伝達系、グルタミン代謝、 β 酸化経路、ペントースリン酸経路、脂肪酸合成経路といった生物の中心的な代謝経路が発見され、大きく前進した(図 1)。

2.1.2 中心的な代謝経路

解糖系

解糖系とは 1 分子のグルコースから細胞質における 10 段階の反応によりピルビン酸 2 分子を作り出し、その過程で 2 分子の Adenosine 5'-triphosphate (ATP)を生成する代謝経路である(図 2)。解糖系は大きく 2 段階に分類できる。第一段階ではグルコースをリン酸化したのち 2 分子のグリセルアルデヒド 3-リン酸に開裂する。ここまでの反応で 2 分子の ATP を投資する。第二段階ではグリセルアルデヒド 3-リン酸をピルビン酸に変え、4 分子の ATP が生成される。これらの段階を通して 2 分子の ATP を生成する。解糖系は Hexokinase (HK)、Phosphofructokinase (PFK)、Pyruvate kinase (PK) の 3 つが律速酵素として代謝フラックスを制御している。また、Nicotinamide adenine

dinucleotide (NAD^+)は解糖の直接的な酸化剤であり、解糖系の亢進には還元型 Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)を絶えず再酸化して NAD^+ を供給する必要がある。 NAD^+ の供給源は環境条件により異なり、好気条件ではミトコンドリアの酸化リン酸化によって生成され、嫌気条件ではピルビン酸を乳酸に還元することで NAD^+ を再生する。その後、解糖系の最終産物であるピルビン酸は好気条件ではミトコンドリアへと移り、そこでアセチル CoA に変換されてから、TCA 回路へと入っていく。また、嫌気条件では乳酸発酵を行い、2 分子の乳酸を生成し、乳酸の蓄積は解糖系亢進の指標となる。(図 1、図 2)。ほとんどの生物が解糖系を有しており、もっとも原始的な代謝経路とされている。

TCA 回路

TCA 回路は糖、脂肪酸、アミノ酸を酸化的に代謝する主な経路である。TCA 回路では回路一周にあたる 8 段階の反応で、1 分子のアセチル CoA から廃棄物として CO_2 が 2 分子生じるほか、NADH が 3 分子、Guanosine triphosphate (GTP)が 1 分子、還元型 Flavin-adenine dinucleotide (FADH_2)が 1 分子生じる(図 3)。アセチル CoA の供給源は解糖系の最終産物であるピルビン酸によるものだけではない。脂肪酸を基質とした β 酸化経路によってもアセチル CoA が生成され、TCA 回路で利用される。また、アミノ酸の一つであるグルタミンは 2-オキシグルタル酸に変えられ、TCA 回路で利用される。他にもイソロイシン、バリン、メチオニンはスクシニル CoA に、アスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニンはフマル酸へと変換され、TCA 回路で利用される。TCA 回路は Citrate synthase (CS)、Isocitrate dehydrogenase (IDH)、2-oxoglutarate dehydrogenase (OGDH)の 3 つが律速酵素として代謝フラックスを制御している(図 1、図 3)。

一方で TCA 回路は各種生合成の原料を提供する経路でもある。1)グルコース合成(糖新生)はオキサロ酢酸を原料として細胞質で行われる。オキサロ酢酸はミトコンドリア膜を通れないため、リンゴ酸をミトコンドリアから運び出し、細胞質でオキサロ酢酸に変換して糖新生を行う。2)脂肪酸合成は細胞質に移動したクエン酸を材料にして行われる。3)アミノ酸生合成は 2 カ所で行われている。まず一つは 2-オキシグルタル酸からグルタミン酸が合成される反応であり、もう一つはオキサロ酢酸からアスパラギン酸が合成される反応である(図 1、図 3)。

このように TCA 回路はエネルギー生産のための異化経路であると共に、生合成のための同化経路でもある。

電子伝達系

TCA 回路で生じた NADH や FADH_2 の高エネルギー電子に蓄えられた転移しやすいエネルギーは、ミトコンドリア内膜にある電子伝達系に渡される。電子伝達系は、電子受容体と電子供与対が連なった構造をしており、そこをたどってエネルギーの低い状態へと移っていく。電子伝達系には 4 種類の複合体があり、NADH の酸化には複合体 I、III、IV が関与し、 FADH_2 の酸化には複合体 II、III、IV が関与している。この過程で電子が放出するエネルギーを使い、プロトンがミトコンドリアの内部から外部へと膜を通して移動し、プロトン勾配ができる。このプロトン勾配を利用してミトコンドリアの内膜にある ATP 合成酵素は Adenosine 5'-diphosphate (ADP) のリン酸化による ATP の生成を行う (図 4)。

β 酸化経路

脂肪酸は β 酸化経路によってアセチル CoA へと変換され、その後 TCA 回路で NADH や FADH_2 の生成に利用される。まず脂肪酸は細胞質で ATP 依存のアシル化でアシル CoA に変えられる。しかし、アシル CoA はミトコンドリア膜を通過できない。そこで Carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1) によりアシル基をカルニチンに転移し、アシルカルニチンの形でミトコンドリアマトリックスへと輸入される。その後、アシル基がミトコンドリア内の CoA 分子に転移することで、アシル CoA に戻る。ミトコンドリア内のアシル CoA は 4 反応からなる β 酸化経路により、アセチル CoA へと変換され、TCA 回路で利用される。脂肪酸を β 酸化経路で利用するためにはアシル CoA をミトコンドリア内に入れることが必要であるため、この反応を制御する CPT-1 は β 酸化経路の律速酵素である。脂肪酸はグルコースに比べてエネルギー生産効率が高いため、心臓のような収縮により大量のエネルギーを必要とする組織で主に利用される。(図 1、図 3)

ペントースリン酸経路

ペントースリン酸経路は解糖系から枝分かれする代謝経路で主にリボース-5-リン酸と Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) を生成する。解糖系中間代謝産物であるグルコース 6-リン酸がペントースリン酸経路の律速酵素である Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) により 6-ホスホグルコノ-1,5-ラクトンと NADPH に変えられることにより、解糖系の中間代謝産物はペントースリン酸経路へと入る。ペントースリン酸経路では核酸合成の材料となるリボース-5-リン酸が生成されるため、増殖が活発な細胞の生合成において重要とされている (図 1、図 2)。

脂肪酸合成経路

脂肪酸合成はアセチル CoA を原料に細胞質で行われる。ミトコンドリア内のアセチル CoA はミトコンドリア膜を通れないので、クエン酸を細胞質に運び出し、ATP-citrate lyase (ACL)で分解してアセチル CoA を供給する。細胞質に出たアセチル CoA は脂肪酸合成経路の律速酵素である Acetyl-CoA carboxylase (ACC)の作用で ATP を使い、マロニル CoA に変換される。その後、アセチル CoA とマロニル CoA は縮合反応を 7 回繰り返すことで、パルミチン酸（脂肪酸）が合成される。脂肪酸は膜合成の材料となるため、増殖が活発な細胞の生合成において重要とされている。（図 1、図 3）

2.1.2 細胞内代謝の制御機構

細胞の生存、成長、分化、恒常性の維持において、細胞内代謝は極めて重要な役割を果たしている。細胞内代謝は細胞が曝された環境条件によって大きく変動し、細胞の動的な振る舞いを制御している。例えば、グルコースやグルタミンといった栄養や増殖因子が細胞外に豊富に存在する場合、細胞は栄養の取り込みを上昇させ、解糖系やTCA回路で核酸や脂質、タンパク質といった生体高分子の生産を同化代謝で行う。逆にグルコース、グルタミンや増殖因子が限られている場合でも、枯渇していない栄養源（例えば脂肪）が細胞外にあれば、その代謝（ β 酸化経路）を活性化させ、ATPの生産を促す。このように、臨機応変に細胞の要求に対して最善の代謝で状況に適応する(Locasale and Cantley, 2011)。とりわけ、ガン細胞における細胞内代謝適応研究の知見は豊富である。ガン細胞における細胞内代謝研究の歴史は古く、1924 年に Warburg によって「酸素が十分に存在してもガン細胞は解糖系を利用して ATP を生産する (Warburg effect)」ことが発見されたのが始まりである(Warburg, 1956)。Hans Krebs によって TCA 回路が解明されたのが 1937 年であることから、ガンと代謝の研究がいかに古くから行われていたかがわかる(Kornberg, 2000)。この Warburg の発見が発端となり、ガン細胞の代謝研究は活発に行われるようになった。一般的な哺乳類の細胞は、好氣的条件下では、解糖系で生じるピルビン酸をミトコンドリアの TCA 回路に送り、TCA 回路が回ることで NADH が産生され、電子伝達系で ATP を大量に生産する。1 分子のグルコースからの ATP の産生は、解糖系が 2 分子に対して、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化反応では 36 分子とはるかに効率が高い。しかし、ガン細胞は好氣的条件下にもかかわらず、優先的に解糖系を利用して ATP を産生する。なぜ、ガン細胞はエネルギー生産効率の悪い解糖系を使うか、当時の研究ではガンと代謝の

関係を十分に説明できる成果は生まれなかった。近年の見解としては、ガン細胞には ATP のみならず、活発に増殖するために核酸、タンパク質、脂質などの生体高分子が不可欠であり、それらの原料であるヌクレオチド、アミノ酸、脂肪酸などを代謝によって大量に生合成する必要があるという仮説が提唱されている(Vander Heiden et al., 2009)。また、ガン細胞の代謝変化にはいくつもの制御機構が関わっており、細胞内代謝研究を理解する上で大変重要である。そこで、下記にガン細胞における代謝制御機構をまとめる。

2.1.2.1 ガンの代謝調節機構

PI3K/Akt 経路

PI3K/Akt 経路の活性化はガン細胞において良く見られる機構である。PI3K/Akt の活性化はグルコースの取り込み上昇と解糖系の活性化を引き起こしている(Elstrom et al., 2004)。PI3K/Akt 経路の下流にある受容体型チロシンキナーゼの活性化は Glucose transporter 1 (GLUT1)トランスポーターを介してグルコースの取り込みを上昇させる。また解糖系の第一段階の反応を触媒する酵素である HK を活性化させ、グルコースのリン酸化を促す。これにより糖リン酸は細胞膜を通過できないため、グルコースを細胞内にとどめる。更に、解糖系の第三段階の反応を触媒する律速酵素であるホスホフルクトキナーゼの活性化を促している(Deprez et al., 1997; Gottlob et al., 2001; Rathmell et al., 2003)。このように PI3K/Akt 経路の活性化は解糖系を活性化させることで、解糖系から枝分かれする代謝経路で合成される核酸の生成を促している。また、PI3K/Akt 経路の活性化はミトコンドリア代謝から派生する脂肪合成も誘導する。Akt は ACL の活性化を促し、ミトコンドリアに由来するクエン酸からアセチル CoA を作り出す。これにより、脂質の合成を亢進している(Bauer et al., 2005; Berwick et al., 2002)。

mTOR シグナル

Mammalian target of rapamycin (mTOR)シグナルは、Raptor、mLST8/GβL、PRAS40 などからなる mTORC1 と Rictor、mLST8/GβL、SIN1、Protor からなる mTORC2 を構成するセリンスレオニンキナーゼである(Ma and Blenis, 2009)。mTOR1 は PI3K/Akt 経路の下流に位置しており、mTOR シグナルの活性化は多くのガンで観察されている。mTOR シグナルの活性化は発ガン過程において重要な役割をはたしていると考えられており(Meric-Bernstam and Gonzalez-Angulo, 2009)、mTORC1 は、タンパク質翻訳抑制因子である 4E-BP をリン酸化することで、その機能を阻害する。また、リボソーム

の生合成を促進する S6K の活性化を促している。このように mTORC1 の活性化はタンパク質翻訳を促進させることで、ガン細胞におけるタンパク質の生合成を亢進させている。また、mTORC1 はミトコンドリアを構成する分子の調節を行っている PGC-1 α の機能促進を介してミトコンドリアの生合成を促す。その結果、ミトコンドリアによるアミノ酸合成や脂質合成を亢進する(Bentzinger et al., 2008; Cunningham et al., 2007; Ramanathan and Schreiber, 2009)。

2.1.2.2 ガン関連転写因子による代謝調節

Hif-1

ガンの悪性度は低酸素条件で上昇する。この原因として注目されているのが、低酸素誘導因子 Hypoxia induced factor 1 (HIF-1)である(Semenza, 2003)。HIF は α サブユニットと β サブユニットからなるヘテロ二量体の転写因子で、HIF-1、HIF-2、HIF-3 の3種類が存在する(Ke and Costa, 2006)。HIF-1 は GLUT1 によるグルコースの取り込み及び、解糖系酵素の活性を誘導して解糖系での ATP 産生を増加させる。さらに、Lactate dehydrogenase-A(LDH-A)の活性化を誘導し、解糖系の最終産物であるピルビン酸を乳酸に変換する。この過程で NADH は電子を放して NAD⁺に戻る。解糖系の亢進によって NAD⁺が消費されるため、LDH-A による反応は NAD⁺の再生を行い、解糖系の維持に働いている。また、HIF-1 は Pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1)の発現を誘導し、ピルビン酸をアセチル CoA に変換する Pyruvate dehydrogenase (PDH)活性の阻害を促す (Kim et al., 2006)。これにより酸化的リン酸化が低下し、ATP 産生は解糖系にシフトする。

c-Myc

ガン細胞で過剰発現しているガン遺伝子である c-Myc は GLUT、HK2、Pyruvate kinase M2 isoform (PKM2)、LDH-A の発現を亢進し、解糖系を活性化させている(Yeung, 2008)。また、c-Myc はグルタミン代謝の中心的なレギュレーターでもある。c-Myc はグルタミノトランスポーターSlc1a5 の遺伝子発現の亢進し、グルタミンの細胞内への取り込みを誘導する(Wise et al., 2008)。さらに、グルタミンをグルタミン酸に変換する Glutaminase (Gls1)の活性を抑制する miR-23a/b の発現を阻害することで、間接的に Gls1 の活性化を誘導し、ガン細胞においてグルタミン代謝を亢進させている(Gao et al., 2009)。

p53

p53 は多くのヒトガン細胞で遺伝子変異が見つかっている代表的なガン抑制遺伝子である(Junttila et al., 2009)。p53 は IKK-NF- κ B 経路を抑制することで、細胞膜に発現する GLUT の発現を制限している(Kawauchi et al., 2008)。さらに、p53 の標的遺伝子として TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR)が同定されている。TIGAR は Fructose 2,6-bisphosphate(解糖系酵素)の機能を阻害することが示されている(Bensaad et al., 2006)。このように p53 が欠損したガン細胞では、p53 による解糖系の抑制が解除されるため、活発な解糖系の亢進が起きると考えられている。また、p53 はペントースリン酸経路の律速酵素である G6PD と直接相互作用してその活性を抑制している。したがって、p53 が欠損したガン細胞では、ペントースリン酸経路による NADPH の産生及び核酸合成が上昇する(Jiang et al., 2011)。また、p53 はミトコンドリアの呼吸にも関係しており、ミトコンドリア呼吸に必要なシトクロム c 酸化酵素複合体の制御因子である Synthesis of cytochrome c oxidase 2 (SCO2)の発現を促進している(Matoba et al., 2006)。したがって、p53 が欠損したガン細胞では、酸化的リン酸化が低下し、ATP 産生は解糖系にシフトする。

2.1.2.3 ガンにおける代謝酵素の変化

PKM2

Pyruvate kinase M (PKM)には2つのアイソフォーム (PKM1、PKM2) が存在し、解糖系の最終段階であるホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への反応を触媒している。これら2つのアイソフォームは選択的スプライシングによって、同一の遺伝子から作り出され、成体組織では PKM1 が主に発現しており、胎児期の組織やガンでは PKM2 が主体となっている。PKM1 は常に活性型の四量体を形成しているが、PKM2 は活性の低い単量体か二量体で存在している。そして、この PKM2 はガン形成において必須であることが明らかになった(Christofk et al., 2008)。PKM2 は解糖系酵素である FBP が存在すると四量体の形成が促進し、PKM2 の活性が上昇する。これにより、解糖系が亢進する(Mazurek, 2011)。一方で、PKM2 はガン細胞における主なシグナルであるチロシンキナーゼシグナルによってリン酸化を受けると FBP との結合能が低下し、四量体の形成が阻害され、活性が抑えられる(Hitosugi et al., 2009)。また、ガン幹細胞に関連する細胞表面マーカーである CD44 により PKM2 のリン酸化が保たれるとの報告もある(Tamada et al., 2009)。さらに、酸化ストレスとも関係があり、酸化ストレスによって細胞内の ROS レベルが増加すると、PKM2 のシステイン残基が酸化さ

れ、PKM2 の四量体形成が阻害される(Anastasiou et al., 2011)。このようにガン細胞で PKM2 は解糖系の最終産物であるピルビン酸への流れを抑制し、ペントースリン酸経路やグルタチオン合成の代謝を促進している。大変興味深いことに、PKM2 は細胞の核内における転写因子と相互作用しているという報告もある。PKM2 は Prolyl hydroxylase domain-containing protein 3 (PHD3)によってプロリン残基が水酸化されると、HIF-1 と複合体を形成し、HIF-1 による標的遺伝子の活性化を誘導する。PKM2 は HIF-1 によって発現が上昇することから、PKM2 と HIF-1 はポジティブフィードバックを形成し、解糖系の亢進に関わっている(Luo et al., 2011)。また、PKM2 は Wnt シグナルの中心的な制御因子である β -カテニンに直接結合し、核へと移動する。核へと移行した PKM2 と β -カテニンの複合体は標的遺伝子の転写調節領域でヒストン修飾を促し、転写を活性化する(Yang et al., 2011)。このように、ガン細胞において PKM2 は単量体や二量体といった活性が低い形態を保ちつつも、PKM2 自体の存在量は増やすことで、ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への反応を抑制し、生体高分子の合成促進及び、ガン関連転写因子の活性化を誘導している。

IDH

IDH は TCA 回路においてイソクエン酸から 2-オキソグルタル酸への変換を触媒する酵素である。IDH には二種類のアイソフォーム(IDH1、IDH2)があり、IDH1 は細胞質に存在し、IDH2 はミトコンドリアに存在する。局在する場所は異なるが、両者ともイソクエン酸から 2-オキソグルタル酸への変換を触媒する(Corpas et al., 1999)。脳腫瘍や急性骨髄性白血病では IDH1 と IDH2 の変異が確認されている(Mardis et al., 2009; Parsons et al., 2008)。IDH1 の変異は 132 番目のアルギニン残基がヒスチジン残基に変わることによって生じ、IDH2 は 140 番目のアルギニンがグルタミンに、または 172 番目のアルギニンがリジンに変換されることによって生じる。変異が生じた IDH ではイソクエン酸から 2-オキソグルタル酸への変換が阻害され、2-オキソグルタル酸から R-2 ヒドロキシグルタル酸 (2HG)の反応が促進される(Dang et al., 2009)。その結果、細胞内には R2HG が蓄積する。IDH の変異によって 2-オキソグルタル酸が減少すると、2-オキソグルタル酸は HIF-1 の分解酵素である PHD の基質であるため、HIF-1 の安定化が生じる。さらに、2HG は 2-オキソグルタル酸と構造が類似しているため、PHD の活性を拮抗的に抑制する。その結果、HIF-1 の安定化による解糖系の亢進を誘導する(Chowdhury et al., 2011)。また興味深いことに、2HG はエピジェネティクスの異常も引き起こす。DNA 脱メチル化酵素である TET ファミリーの一つメチルシトシン酸化酵素 TET2 やヒストン脱メチル化酵素 KDM4C は 2-オキソグルタル酸の存在下で機能する。したがって、2HG が蓄積することでこれらの酵素によるクロマチンリモデリン

グは阻害される(Figueroa et al., 2010) 。このようなエピジェネシスの異常は細胞のガン化を誘導すると考えられており、2HG はオンコメタボライトと呼ばれる。

2.1.3 虚血性ガンの代謝

すべてのガン細胞が多血性で酸素や栄養に恵まれた環境で生存・増殖しているわけではない。一部のガン細胞は急速に増大するため血液の供給が間に合わず、低酸素、低栄養による細胞死の危険に常に曝されている(Jones et al., 2009)。特に膵臓ガンのような虚血性ガンは低栄養状態に曝されやすく、グルコースや酸素の供給が不足しがちである(Izuishi et al., 2000; Kato et al., 2002)。したがって、虚血環境に曝されたガン細胞では Warburg effect による解糖系の亢進だけでは生存・増殖に必要な ATP をどのように捻出しているかは説明ができない。近年、グルコース飢餓に曝されたガン細胞では c-Myc によりグルタミン代謝が亢進され、グルタミンから 2-オキシグルタル酸を産生することで TCA 回路を利用し、エネルギーを得ていることが報告されている(Le et al., 2012)。また、虚血環境に曝されたガン細胞は TCA 回路を一部逆回しすることで、ミトコンドリアの電子伝達系における電子受容体として酸素の代わりにフマル酸からコハク酸の反応を利用し、嫌氣的環境においてもミトコンドリア膜でプロトン勾配を作り出し、ATP 産生を行う機構 (NADH-fumarate reductase system (NADH-FR system)) を利用しているという報告もある (図 5) (Tomitsuka et al., 2010)。さらに、代謝変化は ATP の産生以外の目的にも利用されており、グルコース飢餓、グルタミン飢餓に曝されることで発生する酸化ストレスを解消するために、ペントースリン酸経路で NADPH の合成を行い、酸化ストレスからガン細胞を保護しているという報告もある (Jeon et al., 2012)。このように虚血環境及び栄養飢餓環境におけるガン細胞の細胞内代謝適応システムの説明は個々に報告されているが、メカニズム解明に繋がる決定的な報告はされていない。したがって、虚血環境、栄養飢餓環境に適応するための代謝変化を明らかにすることは細胞内代謝を標的としたガン治療を発展させる上で大変重要である。

2.1.4 細胞内代謝を標的とした治療

これまでに示したように、ガン細胞の変異によって様々なシグナル伝達が影響を受けて変動する。しかし、ガン細胞における「解糖系の亢進および酸化的リン酸化の抑制」という代謝の変化は一定である。これにより細胞内代謝は個々のシグナル分子を

化学療法の標的としてきたこれまでの治療に代わる、新しい治療標的になるのではないかと注目を浴びている(Cairns et al., 2011)。実際、ガンの診断においてはグルコースと構造が類似している 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose (FDG)を使用した FDG-PET 診断が行われている。FDG は体内でグルコースと同じような動態を示すため、糖代謝が亢進したガン細胞に蓄積し、画像化することができる(Nahmias et al., 2007; Sunaga et al., 2008)。治療薬としては解糖系の HK を標的とした 2-deoxyglucose(Mohanti et al., 1996; Singh et al., 2005; Mathupala et al., 2009; Wolf et al., 2011)やミトコンドリア代謝を標的とした Dichloroacetate (DCA)(Michelakis et al., 2010)の開発が進んでおり、治療への期待が高まっている(Vander Heiden, 2011)。

細胞内代謝研究の重要性

近年、代謝産物の種類や濃度を網羅的に分析・解析する手法であるメタボロミクスの発展により、代謝研究は脚光を浴び、飛躍的に前進した(Fiehn et al., 2011)。細胞の働きを理解するためには、DNA 配列の網羅的解析(DNA ゲノミクス)、RNA 発現の網羅的解析(RNA トランスクリプトーム)やタンパク質の網羅的解析(プロテオミクス)が重要である。しかし、ヒトの遺伝子は約 22,000 とも言われており、得られたデータの解析が容易ではない、それに比べ、代謝産物は約 3000 種類と対象が少なく、得られたデータの解析が容易である。また、代謝産物は生命システムにおける最終産物であり、その変動は生物の環境応答や適応変化などを最も鋭敏に反映していると考えられている(Halama et al., 2013)。これらのことから、メタボロミクスを利用した代謝研究は細胞の動的な振る舞いを理解する上で大変重要であり、今後更なる発展が期待される分野である。

2.2 心筋梗塞と線維化

2.2.1 心臓と細胞内代謝

心筋梗塞に起因する心臓肥大や心不全を発症した心臓では、心筋細胞の代謝が変化することが 45 年前以上前から報告されている(Bishop and Altschuld, 1970)。このように細胞内代謝は心筋梗塞の治療標的として古くから注目されていた。

心筋細胞は心臓の 70%の容積を占めており(Zak et al., 1973)、健常者の心筋細胞ではエネルギーの 70%以上を、脂肪酸を基質とした β 酸化経路で生成している(Augustus et

al., 2003)。脂肪酸は、アルブミンと結合した遊離脂肪酸の形で、受動拡散又は転送タンパク (fatty acid translocate[FAT/CD36]、plasma membrane fattyacid binding protein[FABPpm])によって心筋細胞に取り込まれる(van der Vusse et al., 2000)。心筋細胞内に取り込まれた脂肪酸は細胞質でアシル CoA シンターゼにより活性化され、脂肪酸アシル CoA になる。この脂肪酸アシル CoA は心臓の代謝要求に応じてミトコンドリアで β 酸化されるか、脂肪プールに貯蔵される(Lopaschuk et al., 1994)。また、 β 酸化によりミトコンドリア中のアセチル CoA が上昇すると、ピルビン酸をアセチル CoA に変換する PDH の活性が阻害される。これにより、心筋細胞では解糖系が抑制され、脂肪酸を基質とした β 酸化経路を主なエネルギー源とする(Randle PJ et al., 1963)。脂肪酸はグルコースのような炭水化物に比べ、ATP を大量に生産できる(ステアリン酸(C₁₈)の場合、ステアリン酸 1 分子あたり 146 分子の ATP が生成される)。このように、収縮により大量に ATP を消費する心筋細胞のエネルギー要求に対応している。

2.2.2 心疾患における心筋細胞の細胞内代謝

心筋梗塞に起因する心臓肥大や心不全を発症した心臓では、 β 酸化経路の割合が減少し、グルコースを利用した代謝へと変化することが報告されており、心不全の特徴の一つとされている(Bishop and Altschuld, 1970; Ventura-Clapier et al., 2004)。この代謝の変化は心不全を発症した心臓が低酸素環境にさらされていることが原因の一つであると考えられている。1 分子の酸素により、 β 酸化経路では 2.8 分子の ATP を生産できるのに対し、グルコースを利用した代謝では 3.1 分子の ATP を生産できる。このように、グルコースを利用した代謝の方が 11%も酸素消費に対する ATP 生産量が高く、酸素が限られた環境において有利である(Recchia et al., 1998; Neglia et al., 2007)。また、心不全を発症した心臓の心筋細胞では PPAR γ -coactivator-1 α (PGC-1 α)や Nuclear respiratory factors (NRF1/2)といった、ミトコンドリアの生合成に関係した重要な因子の発現が減少し、ミトコンドリアにおける ATP 生産が低下しているとの報告もある。これにより、TCA 回路を利用する β 酸化経路が抑制され、その代償としてグルコース代謝へと切り替わったとも考えられている (Garnier et al., 2003; Javadov et al., 2006)。

従来は、主な代謝基質が脂質からグルコースへと変わることで、心筋細胞が障害され、心機能低下が引き起こされると考えられていた。そのため、グルコース代謝から通常の脂質代謝へと戻すことが治療方法になると提案されていた。しかし、PPAR リガンドの投与によって β 酸化を活性化させても心不全モデルマウスの心機能を改善させることはできなかった(Morgan et al., 2006)。一方、グルコース代謝を亢進させることが治療方法になることを指示する報告もある。糖尿病患者では慢性的に心筋細胞

の解糖系利用が低下することが知られている(Avogara et al., 1990; Stanley et al., 1997)。驚くべき事に、糖尿病患者は心不全を起こしやすく(Rubler et al., 1972)、梗塞による心筋細胞の損傷も通常に比べて大きい(Soler et al., 1974)。これらは、解糖系の低下が心不全や心筋への損傷を亢進させることを示唆している。また、 β 酸化に対する内在性の阻害物質であるマロニル CoA を上昇させることが心筋梗塞の新規治療法として提案されている(Ussher and Lopaschuk, 2008)。しかし、グルコース代謝を亢進させることが治療方法になりうるのかは、未だ議論の段階にあり、結論は出ていない(van Bilsen et al., 2008)。このように、心筋細胞の代謝に着目した研究は古くから行われているが、心臓線維芽細胞に着目した研究は行われていない。

2.2.3 心筋梗塞による死亡率

心筋梗塞は世界の死因の 13%を占めており、先進国の男女共に発生し得る疾患である。1980 年と 2010 年の World Health Organization (WHO) の統計結果によると、日本では食生活の欧米化や高齢化によってこの 30 年間で心筋梗塞による死亡率が男女ともにわずかではあるが増加していた。その結果、心筋梗塞を含む虚血性心疾患は日本においてガンに次ぐ第二位の死因となった。一方、アメリカやイギリスでは治療方法の発達により急性期死亡率が減少したことで、心筋梗塞による死亡率は男女ともに低下した。しかし、それでも日本の 6~8 倍の心筋梗塞死亡率である。このように心筋梗塞は先進国においても死因の上位を占めており、治療法については改善の余地が十分に残された疾患である(WHO, 2010;厚生労働省, 2009)。

2.2.4 心筋梗塞と線維化のメカニズム

心筋梗塞は心筋に血液（酸素や栄養）を輸送する冠動脈が動脈硬化により閉塞されることで発症する。これにより血液が途絶えた心筋では酸素レベルが落ちるため、好気性代謝から嫌気性代謝へと急激に変化が生じる。この急激な代謝シフトは細胞内の ATP 量を減少させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。そして、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はリパーゼやプロテアーゼの活性化を誘導し、細胞の破壊を引き起こす。このような代謝変化の影響は冠動脈の閉塞後 2 分程度で心臓の機能低下として現れる。その後、治療を行わなければ 20 分で細胞は不可逆的な傷害を受ける(Lodge-Patch, 1951; Cleutjens et al., 1999)。しかし、心筋梗塞はこれだけには留まらない。その後、梗塞領域では壊死した心筋細胞がマクロファージによって貪食される。しかし、心筋細胞は

増殖能力を有していないため、このマクロファージが行うクリアランスにより心室壁が構造的に薄くなり、心破裂の危険性が高まる。そこで、梗塞領域では壊死した心筋細胞のスペースを埋めるように心臓線維芽細胞の増殖及び遊走が活発になる。そして、Transforming growth factor β (TGF- β)や Fibronectin によって心臓線維芽細胞は筋線維芽細胞へと分化し、コラーゲンの分泌が促進する。その結果、コラーゲンが蓄積した心臓では線維化が引き起こされる。この線維化は心筋壊死に伴う心破裂を防ぐ反面、過剰であると心筋の硬化を招き、心機能の悪化を引き起こす（図 6）(Virag and Murry, 2003; Leask, 2010; van den Borne et al., 2010)。この機能低下が継続すると心機能障害を補うように心臓の肥大が生じ、心不全に繋がっていく(Katz, 1995)。さらに、心臓の線維化は心筋再生や心臓での血管新生といった心臓の機能を回復させるために必要なプロセスを阻害する(Rengo et al., 2013)。したがって、心臓の線維化に対する効果的な治療介入は、心筋梗塞及び他の心疾患によって損傷した心臓を回復させるために非常に重要である。

2.2.5 心筋梗塞後の線維化に対する治療法

心筋梗塞後の線維化に対する治療法としては Angiotensin-converting enzyme (ACE) 阻害薬や Angiotensin receptor blocker (ARB)の投与が行われる。梗塞領域ではレニン・アンジオテンシン系の活性化による心室圧負荷の増大、心筋細胞の肥大、心臓線維芽細胞の増殖・遊走、筋線維芽細胞によるコラーゲン合成の促進が誘導される。このため、ACE 阻害薬や ARB がレニン・アンジオテンシン系の活性化を抑えることで、過剰な線維化が抑制できると考えられている(Pfeffer et al., 2003)。しかし、急性心筋梗塞発症後 6 年以内に男性患者の 22%、女性患者 46%が心不全に陥るとの報告(Lloyd-Jones et al., 2010)からもわかるように、心筋梗塞後の線維化に対する治療法には改善の余地がある。最近では心臓線維芽細胞を心筋細胞にリプログラミングすることで、心臓線維芽細胞を減らして過剰な線維化を抑制すると共に、心筋細胞を補充するといった治療法の開発も進んでいる(Qian et al., 2012; Song et al., 2012)。しかし、未だ発展途上の段階であり、実現するにはリプログラミングの成功率、既存の心筋細胞との協調性、法律的な問題など数々の障害がある(Ieda, 2013)。そのため、線維化に対するより効果の高い治療法の開発が必要とされている。

2.3 Pyrvinium pamoate

2.3.1 ギョウ虫駆除薬～Pyrvinium pamoate～

Pyrvinium pamoate (PP)はギョウ虫感染に対する古典的な駆虫薬である(Beck et al., 1959; Thompson et al., 1962)。海外では Vanquin という名称で Pfizer が販売を行っており、日本国内では一般用医薬品（第2類医薬品）としてパモキサン錠が佐藤製薬から市販されている。ギョウ虫に感染すると、ギョウ虫の成虫は、人間の大腸・直腸に寄生する。そして、夜間就寝時に産卵のためにメスが肛門に出てきて動き回ることにより、かゆみが生じる(メルクマニュアル, 2005)。人では 5mg/kg（体重）の PP を経口にて服用することで、大腸・直腸に寄生するギョウ虫に直接作用して、駆除することができる(Smith et al., 1976)。PP によるギョウ虫駆除の薬理作用はギョウ虫のグルコース吸収を PP が干渉するため引き起こされるといわれている(Brugmans et al., 1971)。また、ギョウ虫が使用している NADH-FR system という特殊な代謝を PP が阻害するため、ギョウ虫はエネルギーを確保できなくなり、死滅するとの報告もある（図 5）(Kita et al., 2002; Tomitsuka et al., 2012)。昭和 20 年代の日本は生活環境が不衛生だったこともあり、寄生虫の保卵率は 70~80% と非常に高く、昭和の日本において駆虫薬の開発は重要な医療課題の一つであった。しかし、近年では生活環境の改善に伴いギョウ虫の感染率は 1 %程度まで低下し、またギョウ虫感染による症状は生命を脅かすようなものではないことから、臨床的需要は低下しつつある(ヒューマンサイエンス振興財団, 2010)。

2.3.2 PP の適応拡大と新規薬理作用

近年、PP は駆虫以外にもガン治療に対する適応拡大の研究が進んでいる。虚血性ガンの一種である膵臓ガンの細胞がギョウ虫や嫌気性細菌が使用している NADH-FR system を利用してエネルギーを得ているということが示唆され、PP が NADH-FR system を阻害することで虚血環境下の膵臓ガン細胞の細胞死を誘導することが示された（図 5）(Esumi et al., 2004; Tomitsuka et al., 2010)。さらに、PP の新規薬理作用も数々報告されており、Curtis A Thorne らは、PP が Canonical Wnt signaling pathway を阻害することで大腸ガンの増殖を抑制することを報告している(Thorne et al., 2010)。さらに、De-Hua Yu らは、グルコース飢餓条件において PP が Unfolded Protein Response (UPR) を抑制することにより乳ガン細胞や結腸ガン細胞の細胞増殖を阻害すること

を発見した(Yu et al., 2008)。また、Jones らは、PP がアンドロゲン受容体を介する遺伝子発現誘導に拮抗し、前立腺ガン治療に有効であることを報告している(Jones et al., 2009)。このように PP の薬理作用は様々なガンを標的とする抗ガン剤の候補薬として注目されている。

2.4 本研究の仮説

心筋梗塞により血液の供給が遮断され、心筋細胞は酸素や栄養を補給できなくなるため壊死する。一方、心臓線維芽細胞は同じ環境で生存・増殖することができ、心機能悪化に繋がる心臓の過剰な線維化を引き起こす。そこで本研究では、「心筋梗塞後の虚血環境下において心臓線維芽細胞は細胞内代謝適応を行うことで生存・増殖している」という仮説を立てた。そして、心臓線維芽細胞の代謝適応を妨げることが、心筋梗塞後の過剰な線維化を抑制するための、新規でかつ効果的な治療法になり得ると推論する (図 7)。

3. 材料と方法

3.1 細胞培養実験

心臓線維芽細胞の培養には Collagen-Coated Dish (IWAKI) を使用し、高グルコース、高グルタミンの培地 (25mM グルコース、4mM グルタミン、DMEM (Nacalai)、10% FBS、1% penicilin、1% streptomycin) で 24 時間前培養後、それぞれ (本文及び図に記載された) の酸素及び栄養環境下にて培養した。グルコース飢餓、グルタミン飢餓の環境は DMEM (Sigma) からグルコース、グルタミンを除くことで作製した。しかし、培地中の 10% FBS には微量なグルコース、グルタミンが含まれており、最終濃度はグルコース 300 μ M、グルタミン 100 μ M 以下である。また、低酸素環境は Hypoxia chamber (Veritas) と混合ガス (3% O₂, 10% CO₂, 87% N₂) で作製した。そして、生存細胞数は Trypan Blue dye (GIBCO) で染色後にカウントまたは、WST-8 法にて計測した。

3.2 WST-8 法

生存細胞数は Cell Count Reagent SF (Nacalai) を用いて測定した。この測定は脱水素酵素により産生される細胞中の NADH が 1-Methoxy PMS を介して WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] を還元する反応をもとにしている。最終的に生存細胞数は Multiskan FC microplate reader (450nm) で formazan の量を測定し、定量した。

3.3 心臓線維芽細胞の調整

8-12 週齢のマウス (Jcl:ICR) から心臓を摘出し、D-PBS (Ca²⁺, Mg²⁺ を含まない) で洗浄後にハサミで細切れにした。その後 1% collagenase (Worthington CLS-2) / DPBS (with Ca²⁺, Mg²⁺) 5ml で懸濁し、37°C で 30 分間 Collagenase 処理を行った。Collagenase 処理後に 0.25% trypsin-EDTA (Invitrogen) 4ml を加え 37°C で 5 分間処理し、1ml ガラスピペットで 50 回ピペッティングを行った。20ml の培地 (DMEM, 10% FBS, 1% penicilin, 1% streptomycin) を加え、100 x g, 4°C で 5 分間遠心後、ペレットを培地 (DMEM, 20% FBS, 1% penicilin, 1% streptomycin) で懸濁し、培養した。細胞は約一週間後に 20% FBS、20% DMSO を含む DMEM で懸濁し、液体窒素にて保存した (Kobayashi et al., 2009)。

3.4 化学薬品

Pyrvinium pamoate (PP):
6-(dimethylamino)-2-[2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-pyrrol-3-yl)phenyl]-1-methyl-quinolinium
pamoate salt (Sigma), Flutolanil (Wako), Atpenin A5 (Santa Cruz Biotechnology), XAV939
(Sigma), AEBSF (Sigma), Irestatin9389 (Axon), GSK PERK inhibitor (Tronto Research
Chemicals Inc.), ¹³C グルコース (Sigma)

3.5 使用した実験動物

8週から12週齢の雄のICRマウスを使用した。ICRマウスはCLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan から購入し、ATF6α^{-/-}マウスは森和俊 博士（京都大学）から供与していただいた(Yamamoto et al., 2007)。

3.6 培養細胞からのミトコンドリアの回収

心臓線維芽細胞（約 2×10^7 細胞）を 0.25% Trypsin-EDTA で剥がした後に回収し、ミトコンドリア調整バッファー(250 mM sucrose (Wako), 20 mM HEPES (DOJINDO), 3 mM EDTA (DOJINDO), 1 mM sodium malonate (Wako) and 1/100 protease inhibitor Cockatail (Nacalai) at pH7.5)で懸濁した。その後、テフロン乳棒(1cc, clearance 0.2-0.3mm)にてホモジナイズし、500 x g で 15 分間遠心する。さらに上澄みを 15000 x g で 15 分間遠心を 2 回繰り返す、ミトコンドリアペレットを回収する。ミトコンドリアペレットはミトコンドリア調整バッファーから 1 mM sodium malonate と 1/100 protease inhibitor Cockatail を除いた溶液で懸濁し、-80°Cで保存した。

3.7 酵素活性測定

<SDH 活性測定>

石英キュベットに 30mM Tris-HCl buffer pH8.0 928μl, 4mg/ml phenazine methosulfate (PMS) 30μl, 2mg/ml 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) 30μl, 1M KCN 2μl, ミトコンドリア画分 30μg を加え、パラフィルムをかぶせて 3 回上下に傾け混和した。そして、キュベットを測定室に入れ、4 分間インキュベートした後に base line を 570nm で 5 分間測定した。その後キュベットを測定室から出

し、1M Sodium succinate 10 μ l 添加し酵素反応を開始し、MTT の吸光度変化 (17 mM⁻¹ cm⁻¹) を 5 分間測定した(Kita et al., 1989)。

<NADH-fumaarte reductase (NADH-FR) 活性測定>

石英キュベットに 50mM Kpi buffer pH7.5 930 μ l, 1M β -D-Glucose 10 μ l, 1000units/ml Glucose oxidase 20 μ l, 1000units/ml Catalase 26 μ l, 1M KCN 2 μ l, 50mM NADH を加え、パラフィルムをかぶせて 3 回上下に傾け混和した。そして、N₂ ガスを溶液に 5 分間吹き込んだ後に、ミトコンドリア画分 30 μ g を加え、更に 3 回上下に傾け混和した。そしてキュベットを測定室に入れ、base line を 340nm で 3 分間測定した。その後、キュベットを測定室から出し、500mM Disodium fumarate を 10 μ l 添加し酵素反応を開始し、NADH の吸光度変化 (6.2 mM⁻¹ cm⁻¹) を 7 分間測定した(Kita et al., 1988)。

3.8 プライマー

B2m

(F: 5'- GCTCGGTGACCCTGGTCTTT -3';

R: 5'- AATGTGAGGCGGGTGGA ACT -3')

Axin 2

(F: 5'- GAGAGTGAGCGGCAGAGC -3';

R: 5'- CGGCTGACTCGTTCTCCT -3')

c-myc

(F: 5'- CCTAGTGCTGCATGAGGAGA -3';

R: 5'- TCCACAGACACCACATCAATTT -3')

GRP78

(F: 5'- CTGAGGCGTATTTGGGAAAG -3';

R: 5'- TCATGACATTCAGTCCAGCAA -3')

GRP94

(F: 5'- AGGGTCCTGTGGGTGTTG -3';

R: 5'- CATCATCAGCTCTGACGAACC -3')

Xbp1[total]

(F: 5'- AAGAACACGCTTGGGAATGG -3';

R: 5'- ACTCCCCTTGGCCTCCAC -3')

Xbp1s

(F: 5'- GAGTCCGCAGCAGGTG -3';

R: 5'-GTGTCAGAGTCCATGGGA-3')

3.9 RNA 回収、cDNA 合成、Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA は TRIZOL 試薬 (Invitrogen) で抽出し、cDNA は SurperScript First-strand synthesis system (Invitrogen) を用いて合成した。そして、qRT-PCR には QuantiTect SYBER Green PCR kit (Qiagen) を使用した。qRT-PCR の結果は B2m (β -2-microgloblin) の転写レベルで補正した。これらすべての手順は製造元のプロトコルに従った。

3.10 電子顕微鏡

細胞に 2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde を含む 0.1M の phosphate buffer pH7.4 を加え、4°C で 30 分間固定する。その後 2% glutaraldehyde を含む 0.1M の phosphate buffer で一晩再度固定した。そして、固定したサンプルを 0.1M の phosphate buffer で 30 分 3 回洗浄後に 2% osmium tetroxide を含む 0.1M の phosphate buffer で 60 分間固定した。固定したサンプルは 50%、70%、90%、100% エタノールで脱水し、resin (Quetol-812; Nisshin EM Co., Tokyo, Japan) で包埋し、48 時間 60°C で重合した。そして、ultramicrotome (ULTRACUT UCT; Leica) でダイヤモンドナイフを使用して厚さの 70nm の切片を作製した。切片は 2% uranyl acetate で室温 15 分間染色し、蒸留水ですすいだ後に、lead-staining solution (Sigma-Adrich) で室温 3 分間再度染色した。Transmission electron microscope (JEM-1200EX; JEOL Ltd.) を使用し、加速電圧は 80kV にして観察した。デジタルイメージ (2048x2048 pixels) は CCD camera (VELETA; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) を使用した。

3.11 XF96 Flux analyzer

XF96 プレート (Seahorse Biosciences) に心臓線維芽細胞を 80000 細胞または 40000 細胞播いて一晩培養し、その後、酸素消費速度 (Oxygen consumption rate (OCR)) と細胞外酸性化速度 (Extracellular acidification rate (ECAR)) を XF96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Biosciences) で測定した。XF96 Extracellular Flux Analyzer は培養細胞の酸素濃度 (pmol/min) と水素イオン濃度 (mpH/min) をルミネッセンス法により無侵襲・高感度に経時的計測できる。解糖系が活性化すると解糖系の最終産物である乳酸が細胞外に排出され、乳酸に由来する水素イオンによって、細胞外の pH が産生に傾く。この pH の変化を指標に解糖系の状態を評価する。また、ミトコンドリアでは TCA 回路で得られた NADH の電子を、ミトコンドリア内膜状の酵素間で伝達し、ATP を大量

に産生する。この過程で酸素が消費されるため、酸素消費を指標にミトコンドリアによる好気呼吸を評価できる。

3.12 ^{13}C 代謝フラックス解析

グルコースとグルタミンを含まない DMEM (sigma)に最終濃度がそれぞれ 25mM と 4mM になるようにグルコースとグルタミン (^{13}C グルコースまたはラベルされていない ^{12}C グルコース) を加えて培地を作製した。まず高グルコース、高グルタミンの培地で心臓線維芽細胞を 24 時間前培養し、その後新しい高グルコース、高グルコースの培地へと交換した。その 1 時間後に培地の半分を ^{13}C グルコースが入った培地に交換し、87 nM PP またはコントロール (DMSO)で処理した。このように最終的には ^{13}C グルコースと ^{12}C グルコースが 1:1 の割合で混ざった 25mM のグルコースを含んだ培地を使用した。上記のように段階的に ^{13}C グルコースを含む培地と交換することで、培地交換によるメタボリズムへの影響を最小にした。そして、 ^{13}C グルコースを 50% 含む培地で培養後、それぞれのタイムポイント(0 分、20 分、120 分、720 分)で代謝産物を回収し、メタボローム解析を行った。

3.13 代謝産物の抽出

100mm ディッシュに播いた細胞を 5%マンニトール溶液で 2 回洗浄し、その後 4 つの内部標準物質 (3-aminopyrrolidine, L-methionine sulfone, trimesate, 2-morpholinoethanesulfonic acid) をそれぞれ 25 μM 含んだ 1ml のメタノールをディッシュに加えた。そして、メタノールと細胞の混合液を回収し、回収溶液、Milli-Q 水、クロロホルムが 2:1:2 の割合になるように混ぜた。次に 10,000 x g で 3 分間遠心し、溶液を分離する。水層を ultrafiltration tube (HMT)に入れ 9,100x g で 3 時間遠心し、得られた溶液は解析まで -80°C で保存した。

3.14 メタボローム解析

使用した装置はすべて Agilent Technologies 社製を使用した。Agilent CE capillary electrophoresis system(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)、Agilent G3250AA LC/MSD TOF system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)、Agilent 1100 series binary HPLC pump、G1603A Agilent CE-MS adapter、G1607A Agilent CE-ESI-MS sprayer kit replacing the stainless steel- with Agilent G7100-60041 Platinum electrospray ionization spray needle を使用した。データは G2201AA Agilent ChemStation software for CE と

Analyst Qs for Agilent TOFMS software を使って取得した(Soga et al., 2009)。また CE-TOFMS から得られた Raw データは MasterHand で加工を行った (Sugimoto et al., 2010)。

3.15 心筋梗塞モデルマウスの作製

8-12 週齢のオス ICR マウスを 2~2.5%のイソフルラン(Abbott Japan)で麻酔し、20-gauge の静脈用カテーテルで気管挿管した。人工呼吸は volume-controlled respirator (Harvard Apparatus)で 1 サイクル 200 μ l になるように設定し、1 分間に 110 サイクルで行った。マウスの毛を脱毛剤で除いた後に開胸し、左心耳の 1-2mm 下の左冠動脈を 8-0 ナイロン縫合糸で縛り、閉塞は左心室壁の色の変化（青白くなる）で確認した。切り開いた肋骨と肋骨の間や皮膚は 5-0 シルク糸で閉じ、手術後に 37°Cに設定したホットプレートに置き 30 分間覚醒を待った。Sham-operated マウスは左冠動脈の下に縫合糸を通しただけで縛らず、その他はすべて同じ作業を行った。PP は 4% DMSO を含む生理食塩水に 400 μ g/ml の濃度で懸濁させた。そして PP と vehicle (4% DMSO)を心筋梗塞手術後 1 日目から実験終了日まで毎日一回経口投与にて強制的に胃に 0.5 ml 与えた。

3.16 心エコー測定

心エコー測定は Toshiba Diagnostic Ultrasound System Machin (Aplio MX SSA-780A) で心筋梗塞後 1 日目、7 日目、14 日目のマウスで測定した。マウスは 2-2.5%の isoflurane にて麻酔後、心臓の動きを short-axis 2D-mode view と M-mode view にて記録した。short-axis 2D-mode view で拡張期と収縮期での心壁の厚さと空腔の直径を測定し、左心室の収縮機能は駆出率で評価した。 $\%EF = [(EDv - ESV)/EDv] \times 100$ 。

3.17 ヒドロキシシルプロリン測定

マウスから左心室を回収し、Speed-vac で一晩乾燥させた。乾燥した左心室の重量を測定後、1ml の 6N HCL を加え 116°Cで一晩加水分解させた。加水分解させたサンプルは Speed-vac で一晩乾燥させ、乾燥したサンプルを 1ml の蒸留水で溶解後 13400rpm 5 分間遠心した。その後 2% Phenolphthalein 40 μ l を pH 指示薬として加え、溶液がピンク色になるまで KOH solution で中和し、13400rpm 5 分間遠心後に、上清を回収した。1.95ml の蒸留水にサンプル 50 μ l と 0.05M Chloramin T 1ml を加えて室温で 20 分間インキュベートした。その後 1ml の Percholic acid solution を加え、室温で 5

分間インキュベートし、更に 1ml の 20% p-dimethylaminobenzaldehyde solution を加え、ボルテックス後に 60°C で 20 分間インキュベートした。最後に室温で 10 分間おいてから 557nm で吸光度を測定し、ヒドロキシシルプロリン溶液 (0,2,4,6,8,10,12 µg/2ml) で作製したスタンダードカーブから左心室に含有されているヒドロキシシルプロリン量を計算した。

3.18 凍結切片

マウスの心臓をフレッシュな状態で回収し、O.C.T compound (SAKURA)ですぐさま包埋する。凍結切片は厚さ 5µm になるように心尖部からカットし、染色には心尖部から 2000µm-2500µm の切片を使用した。

3.19 マッソントリクローム染色

凍結切片を室温で数分間乾燥させてから、56°C の Bouin's solution で 15 分間固定する。その後、Weiger's iron hematoxylin で 5 分間染色してから Biebrich Scarlet solution に 5 分間浸ける。次に 2.5% phosphotungstic / 2.5% phosphomolybdic acid で 10 分間、Anilin blue で 5 分間、1% Acetic acid で 2 分間立て続けに浸す。そして最後に切片をエタノール(50%、70%、90%、95%、100%)で脱水し、Xylene で置換し、Permount(Fisher Chemicals)でマウントした。ネクロースサイズの測定には Image J (NIH)を使い、線維化サイズは BZII software (Keyence Japan, Inc.)を使い測定した。

3.20 組織免疫化学的染色

凍結切片を室温で数分間乾燥させてから、4% PFA/PBS で 30 分間室温にて固定した。ブロッキングは 10% goat serum / PBS で 1 時間室温にて行った。その後、anti-Ki67 (1:100) (Abcam)、anti-CD31 (1:50) (BD Pharmingen)、Cy3-conjugated anti- α -SMA (1:400) (sigma)の抗体で染色した。Ki67 陽性シグナルと CD31 陽性シグナルはそれぞれ二次抗体に Alexa 488 と Alexa647 を付けて検出した。そして最後に ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen)を使って核を DAPI でカウンター染色した。Ki67 陽性細胞と毛細血管密度は Image J (NIH)で計測し、 α -SMA 陽性筋線維芽細胞と α -SMA 陽性領域は BZII software (Keyence Japan, Inc.)を使って測定した。

4. 結果

4.1 PP による細胞内代謝適応の阻害

4.1.1 心臓線維芽細胞は虚血環境下で細胞内代謝を変化させる

「心筋梗塞後の虚血環境下において心臓線維芽細胞は細胞内代謝適応を行うことで生存・増殖している」という仮説（図 7）の検証を行うために、まず、培養細胞スケールでの虚血環境モデルを作製した。虚血環境下では血管が閉塞されることにより酸素および栄養の供給が滞る。そこで Hypoxia chamber に酸素 3%を充満させることで低酸素環境を再現し、培地から栄養源であるグルコースとグルタミンを除くことで栄養飢餓環境（グルコース飢餓、グルタミン飢餓）を作り出した。しかし、培地中の 10% Fetal bovine serum (FBS)には微量なグルコースとグルタミンが含まれている。したがって栄養飢餓環境のグルコースとグルタミンの最終濃度はグルコース 300 μ M、グルタミンは 100 μ M 以下であった。それに対して通常環境（通常酸素、高グルコース、高グルタミン）としては酸素 20-21%でグルコース 25mM、グルタミン 4mM を含む培地を準備した。そして、これらの環境下でマウスの心臓から回収した心臓線維芽細胞を培養・比較することで、虚血環境下における心臓線維芽細胞の代謝適応を調べた。まず、環境変化による心臓線維芽細胞の細胞内代謝の違いを調べるために、通常環境および虚血環境（低酸素、グルコース飢餓、グルタミン飢餓）で 72 時間培養した心臓線維芽細胞の中間代謝産物の蓄積量をメタボローム解析によって網羅的に測定した。その結果、虚血環境下で培養した心臓線維芽細胞では細胞内代謝が大きく変化していることが明らかになった（図 8a、図 8b）。特に TCA 回路において顕著な変化が生じており、虚血環境下の心臓線維芽細胞では TCA 回路後半の中間代謝産物であるフマル酸とリンゴ酸の蓄積量が著しく減少し、コハク酸の蓄積量はわずかに増加していた（図 9a、図 9b）。

著者は TCA 回路後半の中間代謝産物の蓄積量の変化は虚血環境下の心臓線維芽細胞が TCA 回路を一部逆回しすることでエネルギーを産生しているため生じたものではないかと推測した。古くからギョウ虫や嫌気性細菌の一部では、低酸素環境下で NADH-FR system と呼ばれる代謝システムによって ATP 産生が行われていることが知られている(Kita et al., 2002)。近年では虚血環境に曝されたガン細胞が NADH-FR system を利用しているとの報告がされており、哺乳類の細胞においても NADH-FR system が存在することが示唆されていた(Tomitsuka et al., 2010)。NADH-FR system はミトコンドリアの電子伝達系における電子受容体として酸素の代わりにフマル酸を利用し、嫌気的環境においてもミトコンドリア内膜でプロトン勾配を作り出し、ATP

産生を行う機構である（図 5）。そして、その際に副産物としてフマル酸が減少し、コハク酸が増加することが知られている。本研究のメタボローム解析の結果においてもフマル酸が著しく減少しコハク酸がわずかに増加していることから（図 9b）、TCA 回路をフマル酸からコハク酸へと逆回しすることによって ATP を生成していることが示唆された。そこで、虚血環境下で培養した心臓線維芽細胞における NADH-FR system の働きを調べるために、通常環境および虚血環境で 72 時間培養した心臓線維芽細胞からミトコンドリア画分を回収し、NADH-FR system の主要酵素である NADH-fumarate reductase（フマル酸からコハク酸）の活性を比較した。測定には SDH（コハク酸からフマル酸）活性の値をインターナルコントロールとして使用し、それぞれのサンプル間を比較した。その結果、虚血環境下の心臓線維芽細胞では NADH-fumarate reductase の活性が上昇していることが明らかになった（図 10）。しかし、活性が上昇していてもエネルギー産生をしているか明らかになっていないため、NADH-FR system が虚血環境下の心臓線維芽細胞の生存に貢献しているとは限らない。そこで、虚血環境下における心臓線維芽細胞の生存において NADH-FR system の活性化が必要であるかを検証するために、NADH-FR system の阻害剤として知られている PP を虚血環境下の心臓線維芽細胞に添加して細胞毒性を評価した。すると、PP は通常環境下の心臓線維芽細胞に対しては細胞死を誘導しなかったが、虚血環境下特異的に細胞死を引き起こし、PP 処理後 72 時間での 50% inhibitory concentration (IC50) は 9.5nM という非常に高い選択性を有していることが明らかになった（図 11a、図 11b）。更に Atpenin A5 と Flutolanil という 2 つの NADH-FR system の阻害剤についても検証を試みたところ、両者とも虚血環境下の心臓線維芽細胞特異的に細胞死を誘導し IC50 はそれぞれ Atpenin A5 530nM、Flutolanil 23μM であった（図 11c、図 11d、図 11e、図 11f）。また、これら NADH-FR system の阻害剤は心臓線維芽細胞を虚血環境下に曝してから 72 時間必要とせず、24～48 時間で細胞死を誘導することからも虚血環境に曝された細胞に対して強い毒性を有していることが明らかである（図 11a、図 11c、図 11e）。これらの阻害剤実験の結果は、虚血環境下で心臓線維芽細胞が PP、Atpenin A5、Flutolanil の標的に依存して生存していることを示しており、心臓線維芽細胞が NADH-FR system によってエネルギーを獲得し、虚血環境に適応していることを示唆している。

4.1.2 PP による細胞死の誘導は NADH-FR system の阻害によるものではない

上記のように NADH-FR system の阻害剤である PP は虚血環境下の心臓線維芽細胞特異的に細胞死を誘導することが明らかになった（図 11a、図 11b）。また、選択性

もその他の阻害剤に比べて顕著であった。そこで、PP のターゲットを明らかにすることで、心臓線維芽細胞が虚血環境に適応するメカニズムを解明するための手がかりが得られると考え、PP に焦点を当てることにした。

PP は酸素、グルコース、グルタミンという 3 つの因子をすべて除いた虚血環境特異的に細胞死を誘導した (図 11a、図 11b)。そこで、これら 3 つの因子のうちどの因子が PP の細胞毒性において重要であるのかを調べることで PP の標的をより明確にすることにした。実験としては、通常環境から酸素、グルコース、グルタミンのうち一つを除いた環境を作製し、それぞれの環境条件で 24 時間培養した際の PP の細胞毒性を調べた。その結果、通常環境からグルコースを除いたグルコース飢餓環境下 (酸素 20-21%, グルコース 300 μ M, グルタミン 4mM) では PP は細胞死を誘導したが (図 12a)、グルタミン飢餓環境下 (酸素 20-21%, グルコース 25mM, グルタミン 100 μ M 以下) では部分的に (図 12b)、そして低酸素環境下 (酸素 3%, グルコース 25mM, グルタミン 4mM) では PP によって引き起こされる細胞死が完全に弱毒化された (図 12c)。このように NADH-FR system は嫌氣的代謝特異的な機構であるにも関わらず、通常レベルの酸素では PP による心臓線維芽細胞に対する細胞死を弱毒化できなかった (図 12a、図 12b)。したがって、この結果は PP による虚血環境下での細胞死誘導に低酸素は関係していないことを示しており、PP は NADH-FR 以外の標的に作用していることが示唆された。

近年、PP の新規薬理作用が数々報告されており、PP が Canonical Wnt signaling の阻害 (Thrne et al., 2010) や UPR pathways の阻害 (Yu et al., 2008) を行うことが明らかになってきた。そこで、心臓線維芽細胞においてこれらの signaling pathways が虚血環境下で活性化しているかを調べると共に、PP によってこれらの経路が阻害されるかを検証した。

Canonical Wnt signaling の活性化は β -catenin の直接的な転写ターゲットである Axin2 や c-Myc といった下流遺伝子の発現レベルを調べることで評価できる (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>)。そこで、通常環境及び虚血環境下で培養した心臓線維芽細胞から Total RNA を抽出し、Axin2 と c-Myc の発現レベルを qRT-PCR で定量した。その結果、虚血環境下の Axin2 の発現量は通常環境下に比べてわずかではあるが有意に減少していた (図 13a)。そして、虚血環境下で減少した Axin2 の発現量は PP 処理によってさらに減少することが明らかになった (図 13a)。一方で c-Myc の発現量は虚血環境下において上昇しており、さらに PP 処理を行っても発現量に変化がみられなかった (図 13a)。このように虚血環境と PP 処理による Axin2 および c-Myc の一貫した変化を確認する事はできなかった。また Canonical Wnt signaling の阻害剤である XAV939 (Huang et al., 2009) を心臓線維芽細胞に添加してその影響を調べたところ、通常環境、虚血環境共に XAV939 は細胞死を誘導しなかった (図 13b)。

これらの結果は虚血環境により Canonical Wnt signaling が活性化し、PP が Canonical Wnt signaling を阻害することで、虚血環境特異的な毒性を誘導しているという仮説とは一致しなかった。

そこで、もう一つの候補である UPR pathways が虚血環境下において活性化し、PP がその経路を阻害することで、細胞死を誘導しているのではないかと推測し、UPR pathways に対する虚血環境および PP の影響を評価した。UPR pathways には ATF6、IRE1、PERK といった3つの異なる経路が存在する(図 14)(Ron and Walter et al., 2007)。そこでまず始めに UPR pathways の下流にあるシャペロン (Grp78/BiP, Grp94) の発現レベルと ATF6 と IRE1 のメディエーターである Xbp1、Xbp1s の発現レベルを qRT-PCR で調べた。その結果、Grp78/BiP とスプライシングされた Xbp1 である Xbp1s の発現レベルが虚血環境下の心臓線維芽細胞で上昇していた(図 15a)。しかし、Grp94 と total Xbp1 は通常環境と同じレベルの発現量のままであった(図 15a)。また、虚血環境において PP は Grp78/BiP と Grp94 の発現を減少させたが、Xbp1s に関しては Grp78/BiP や Grp94 とは逆に上昇させていた(図 15a)。これらの結果は IRE1 pathway が虚血環境下の心臓線維芽細胞細胞において活性化していることを示唆しているが、PP が虚血環境において Xbp1s の発現量を上昇させるという結果は、PP が UPR pathways を阻害するという事前の考えとは一致しなかった。そこで、虚血環境および PP 処理における UPR pathways の働きについて更に検証するために、阻害剤及び遺伝子欠損細胞を用いて細胞毒性を調べた。まず始めに ATF6 経路について検証するために、ATF6 経路の阻害剤である 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride (AEBSF) の心臓線維芽細胞への影響を調べた。しかし、AEBSF は虚血環境下の心臓線維芽細胞に細胞死を誘導せず、ATF6 α 欠損マウスの心臓線維芽細胞を虚血環境で培養しても同じく細胞死を誘導することはなかった(図 15b)。これらの結果は PP による虚血環境特異的な細胞死誘導は ATF6 経路を介したものではないことを示唆している。また、残りの二つの経路 (IRE1、PERK) についても Irestatin 9389 と GSK PERK inhibitor といったそれぞれの経路の阻害剤を心臓線維芽細胞に添加して細胞毒性を調べたが、AEBSF 同様にこれらの阻害剤は虚血環境下の心臓線維芽細胞に対して細胞死を誘導しなかった(図 15c)。これらの結果は PP の虚血環境特異的な細胞死誘導の根幹に UPR signaling pathways の阻害が関わっていないことを示している。

以上の結果は虚血環境下の心臓線維芽細胞における PP の細胞死誘導が、これまでに報告のない新規の標的によって引き起こされている事を示唆している。

4.1.3 PP によるミトコンドリア代謝の抑制

PP の標的を明らかにする上でまずは、標的の存在条件を明確にすることにした。PP は通常環境では細胞死を引き起こさないが、栄養飢餓環境で細胞死を誘導する。このことから、PP の標的として2つの可能性が考えられた。

1、 PP の標的は通常環境下（通常酸素、高グルコース、高グルタミン）に存在しているが、細胞死という表現型は栄養飢餓環境（通常酸素、グルコース飢餓、グルタミン飢餓）に曝された時にのみ生じる。

2、 PP の標的は細胞が栄養飢餓環境に曝された時にしか存在しない。

これらについて検証するために、通常環境下で一時的に PP 処理を行った後に、PP を取り除いた。そしてその後、通常環境又は栄養飢餓環境下で培養し、細胞毒性を評価した。（図 16）。その結果、通常環境下で一時的に PP 処理している際には PP は心臓線維芽細胞の生存を妨げることはなかったが、その後 PP を取り除き、栄養飢餓環境下で培養すると細胞死が誘導された（図 16b）。また、PP 処理済みの心臓線維芽細胞を栄養飢餓下に曝した際の IC50 は 61.8nM であった（図 16c）。この結果は PP の標的が通常環境の心臓線維芽細胞に存在していることを示している。また、PP の影響が PP を取り除いても継続し、栄養飢餓環境における心臓線維芽細胞の細胞死を誘導することが明らかになった。

PP を前処理した心臓線維芽細胞は高グルコース、高グルタミン環境下では生存を妨げられることはなかったが、グルコース飢餓、グルタミン飢餓環境下では細胞死が誘導された（図 16）。これは PP の標的がグルコースやグルタミンを主要なエネルギー源にする細胞内エネルギー代謝に関係したものである可能性を示唆している。そこで通常環境下の心臓線維芽細胞においても存在し、さらにグルコースとグルタミンを主要なエネルギー源としているミトコンドリア代謝に注目した。ミトコンドリアによって生産されるエネルギーはミトコンドリア内膜上にある呼吸鎖によって電子が運ばれ、プロトン勾配が生じることで ATPase によってエネルギーが産生される。そこで、ミトコンドリアの呼吸鎖の指標である Oxygen consumption rate (OCR) の PP 処理による変化を XF96 Flux analyzer を用いて調べた。すると、通常環境下で培養した心臓線維芽細胞に PP を添加すると OCR の値が著しく減少していた（図 17）。また、この OCR の減少は 10 分以内には完了しており、非常に急激な変化であった。このように PP はミトコンドリアの呼吸鎖を極めて短時間に阻害する作用を有していた。ミトコンドリアの呼吸鎖の阻害が生じる理由として、PP 処理によりミトコンドリア構造の崩壊が生じていることが推測される。そこで、電子顕微鏡を用いて通常環境下で PP 処理を行った心臓線維芽細胞のミトコンドリア構造を調べた。しかし、PP 処理をした心臓線維芽細胞ではミトコンドリア構造の崩壊はみられず、構造は正常なままで

あった（図 18）。これらの結果は PP 処理による OCR の急激な減少は、ミトコンドリア構造の変化によるものではないことを示しており、PP が構造的変化を伴わずにミトコンドリア代謝を阻害していることを示唆している。

次に PP がミトコンドリアの構造的な破壊を伴わずにミトコンドリア代謝を抑制する可能性について更に調べるために、通常環境下で PP 処理した心臓線維芽細胞の ^{13}C グルコースによる代謝フラックス解析を行った（図 19、図 20、図 21）。興味深い事に、PP 処理、無処理の心臓線維芽細胞は共に ^{13}C グルコースを添加してから 20 分後にはすべての解糖系の中間代謝産物に ^{13}C が取り込まれており、その割合は 30%~60%であった（図 20）。この実験では ^{13}C グルコースと ^{12}C グルコースが 1:1 の割合で含ませたグルコースを心臓線維芽細胞に添加し、ラベルされた中間代謝産物の変化を追っているため、ラベルされた中間代謝産物が 50%になった際は飽和状態（定常状態）に達したと考察できる。したがって、これらの細胞では解糖系での代謝の流れが速く、解糖系が活性化していることが明らかになった。また、 ^{13}C が解糖系の最終産物である乳酸に高い割合で取り込まれていることも解糖系の活性化が生じていることが明らかである（図 20）。

一方でこれらの細胞では TCA 回路の中間代謝産物への ^{13}C の取り込みはわずかであった（図 21）。PP 処理をしていない心臓線維芽細胞ではクエン酸への ^{13}C の取り込みは ^{13}C グルコースを添加してから 20 分後ではわずか 12%、その後も 720 分後まで非常に代謝の流れが小さかった（12%→15%→26%）。また、他の TCA 回路の中間代謝産物については Background noise level (10%以下)しか取り込まれておらず、リンゴ酸のみ 20 分後、120 分後、720 分後でそれぞれ 11%、12%、15%の ^{13}C の取り込みがみられるだけであった（図 21）。しかし、解糖系からの流入量が少ないにもかかわらず、TCA 回路の中間代謝産物は時間がたっても減少することなく一定に保たれていた（図 21）。これは通常環境の心臓線維芽細胞において TCA 回路が解糖系に比べ、相対的に遅く流れていることを示している。一方 PP 処理を行った心臓線維芽細胞の TCA 回路の中間代謝産物をみると、リンゴ酸（11%、13%、11%）を除いたすべての中間代謝産物で ^{13}C の取り込みが 0 もしくは Background noise level (10%以下)であった。また、驚くべき事に PP 処理を行った心臓線維芽細胞では 20 分後には TCA 回路前半のクエン酸、アコニット酸、イソクエン酸の枯渇が生じ、720 分後でもこれらの枯渇が回復することにはなかった（図 21）。これらの結果は PP が解糖系から TCA 回路への代謝産物の流入を遮断していることを示唆している。さらに、PP 処理を行った細胞では時間を追うごとに乳酸の蓄積量が増加していった（図 20）。この結果はピルビン酸が TCA 回路の中間代謝産物であるアセチル CoA やクエン酸の合成に利用されるのではなく、乳酸の合成のために利用されていることを示唆しており、PP が解糖系から TCA 回路への代謝産物の流入を遮断するという可能性とも一致するもの

であった。

これらの結果はミトコンドリアの構造的な破壊を伴わずに PP が通常環境下でミトコンドリア代謝を抑制していることを示している。

4.1.4 栄養飢餓下で PP は ATP の枯渇を引き起こす

これまでの結果から PP はミトコンドリア代謝を阻害する作用を有していることが明らかになった。では、PP によるミトコンドリア代謝の阻害が結果的にどのように栄養飢餓環境下での心臓線維芽細胞の細胞死を誘導するのか。この疑問を解決するために、PP 処理済みの心臓線維芽細胞の栄養飢餓環境下での中間代謝産物の蓄積をメタボローム解析で調べた（図 22、図 23、図 24）。その結果、PP 処理あり、PP 処理なし両方の細胞で解糖系の中間代謝産物が栄養飢餓環境下で著しく減少して、枯渇に近い状態に陥っていた（図 23）。また、解糖系の指標である乳酸の蓄積量も栄養飢餓環境下で 12 時間培養した心臓線維芽細胞では減少していた（図 23）。これらの結果は、栄養飢餓環境では培地中のグルコースが飢餓状態であるため解糖系を介したエネルギー生産が機能していない事を示唆している。

一方、TCA 回路の中間代謝産物は栄養飢餓環境下で培養した PP 処理あり、PP 処理なし両方の細胞を通常環境と比べると著しく減少していた（図 24）。図 21 から示されるように心臓線維芽細胞では解糖系から TCA 回路への代謝産物の流入は極めに小さい。したがって、TCA 回路でみられる中間代謝産物の減少は消費速度が上昇したため生じたと考察できる。この結果はグルコース飢餓により解糖系が機能しないため、それを補うために TCA 回路が活性化したことを示唆している。また、PP 処理した心臓線維芽細胞を栄養飢餓環境で 12 時間培養するとクエン酸、アコニット酸、イソクエン酸の蓄積量が極わずかに検出できる、もしくは完全に検出できないレベルにまで減少していた（図 24）。これらの結果に基づいて考えると、ミトコンドリアでのエネルギー生産に必要な TCA 回路の中間代謝産物の蓄積量が、PP 処理を行った心臓線維芽細胞では PP 処理なしの細胞に比べて限られた状態にあることが明らかになった。

上記に示すように栄養飢餓環境により解糖系が阻害され、また PP 処理により TCA 回路が阻害されることで PP 処理後に栄養飢餓環境で培養した心臓線維芽細胞では両経路の中間代謝産物の枯渇が生じることが示唆された。それでは、PP 処理後に栄養飢餓環境で培養した心臓線維芽細胞の代謝フラックスはどのように変化しているのか。そこで、解糖系・TCA 回路のフラックスを調べるために XF96 Flux analyzer を用いて OCR および解糖系の指標である Extracellular acidification rate (ECAR) を測定した。その結果、PP 処理後に PP を取り除き通常環境下で培養すると、PP を含んだ状

態で測定した値（図 17）と同様に OCR の減少がみられた（図 25）。これは PP によるミトコンドリア代謝の障害が PP を取り除かれた後も続くことを示している。また、通常環境における ECAR の値は、PP 処理を行った細胞の方が PP 処理なしの細胞に比べて高かった（図 25）。これは PP 処理を行ったことで解糖系が活性化し、乳酸の生産が上昇したことを示しており、図 20 の結果とも一致していた。また、栄養飢餓環境下では PP 処理あり・PP 処理なしの両方の細胞で ECAR の減少がみられた（図 25）。この結果も図 23 の lactate の蓄積量が減少するという結果と一致しており、共に栄養飢餓環境では解糖系が抑制されることを示している。そして、栄養飢餓環境において PP 処理なしの心臓線維芽細胞では ECAR が抑制されていたが、OCR のレベルは通常のみであった（図 25）。この結果は栄養飢餓環境の心臓線維芽細胞がミトコンドリア代謝を利用して生存していることを示唆している。さらに、PP 処理済みの心臓線維芽細胞を栄養飢餓環境下で培養すると OCR、ECAR 共に減少した（図 25）。これらの結果は PP 処理後に栄養飢餓環境下で培養した心臓線維芽細胞では解糖系とミトコンドリア代謝の両方が阻害されていることを示しており、心臓線維芽細胞は栄養飢餓環境下でミトコンドリアのエネルギー代謝によって生存している事が示唆された。

解糖系とミトコンドリア代謝の両方が阻害された細胞ではエネルギー生産が著しく減少することが予期される。そこで、PP 処理済みの心臓線維芽細胞の栄養飢餓環境下での AMP、ADP、ATP 量の測定をメタボローム解析で行った。その結果、PP 処理した細胞では PP 処理なしの細胞に比べて AMP レベルが著しく上昇していた（図 26）。一方で ADP レベルはわずかに減少し、ATP レベルには劇的な減少がみられた（図 26）。そしてこれら AMP、ADP、ATP レベルからエネルギーチャージを計算すると PP 処理した細胞では PP 処理なしの細胞に比べて 50%以上の減少が生じていた（図 26）。この結果は、TCA 回路でのエネルギー生産のための基質の減少、そして電子伝達系が抑制されること、さらにグルコース飢餓培地によって解糖系でのエネルギー生産が妨げられることにより PP 処理済みの心臓線維芽細胞では著しいエネルギー生産、エネルギーチャージの減少が生じていることを示している。そして、解糖系、ミトコンドリア代謝両方の機能が阻害され、ATP の枯渇が引き起こされるため、PP による栄養飢餓環境下での細胞死誘導が引き起こされることが示唆された。

4.1.5 解糖系の再活性化は PP による心臓線維芽細胞への細胞毒性を打ち消す

これまでの結果から、PP 処理による栄養飢餓環境下での細胞死誘導はエネルギーの枯渇が原因であることが示唆された。したがって、エネルギーが再供給されることにより PP の細胞毒性は軽減されると推測した。そこで、解糖系の再活性化によるエ

エネルギー供給を促すためにグルコースを、電子伝達系を介したミトコンドリアでのエネルギー生産のための基質となるコハク酸の供給源としてグルタミンを、そして TCA 回路中の中間代謝産物であるクエン酸の供給源としてピルビン酸をそれぞれ栄養飢餓環境下の心臓線維芽細胞に添加した。そして、細胞毒性への影響とそれぞれのエネルギー源を供給した際の ECAR と OCR の変化を調べた。その結果、栄養飢餓培地にグルコース（解糖系によるエネルギー生産を促す）を添加した培地で PP 処理済みの心臓線維芽細胞を培養すると、PP による細胞死誘導が完全に解消された（図 27）。またグルコース供給によって OCR に変化はみられなかったが、著しい ECAR の上昇が生じた（図 28）。これはグルコースの供給によって解糖系が活性化されたことを示している。さらに、PP を処理していない細胞に比べて PP を処理した細胞ではグルコース供給による ECAR の上昇が大きかった（図 28）。これらの結果は PP 処理によるミトコンドリアのエネルギー代謝の障害が解糖系の活性化によって補われたことを示している。しかし、ピルビン酸の供給では PP による細胞毒性を解消することができなかった（図 27）。また、ピルビン酸の供給では ECAR、OCR ともに変化が生じないことが明らかになった（図 28）。さらにグルタミンの供給では PP による細胞毒性をわずかにしか解消することができず、ECAR、OCR にも変化はみられなかった（図 27）（図 28）。これらの結果は栄養飢餓環境下で PP 処理済みの心臓線維芽細胞にグルコースを供給すると解糖系が回復し、生存できるようになることを示している。また、ピルビン酸の供給によって細胞の生存と OCR は共に回復しなかったことは、薬剤を除いても PP 処理済みの細胞ではピルビン酸から TCA 回路への流入が遮断された状態にあることを示唆している。またグルタミンの供給では細胞の生存にわずかな回復がみられた。これはグルタミンからのコハク酸生成によってミトコンドリアのエネルギー代謝のための基質が補充されたためだと考察できる。しかし、OCR の減少が回復していないことからわかるように（図 28）、グルタミンによるミトコンドリア代謝の回復は非常に弱く、PP 処理済みの細胞では電子伝達系の障害が継続しているためであると考察できる。

これまでのすべての結果をまとめると、栄養飢餓環境下に対する心臓線維芽細胞の細胞内代謝適応と、PP による代謝適応の障害メカニズムを示すことができる。まず、心臓線維芽細胞は通常環境下において生存のためにミトコンドリアのエネルギー代謝ではなく解糖系を主に利用してエネルギーを生産している。しかし、グルコースの利用が制限された際は解糖系によるエネルギー生産が著しく減少するため、一時的にミトコンドリアのエネルギー代謝に依存していることが明らかになった。そして心臓線維芽細胞に PP を処理すると解糖系から TCA 回路への代謝産物の流入が遮断されることで TCA 回路前半の中間代謝産物（クエン酸、アコニットサン、イソクエン酸）の枯渇が生じ、さらに著しい OCR の減少によっても示されるように電子伝達系の阻

害が引き起こされることが明らかになった。また、PP を処理した細胞ではその後 PP を除いてもミトコンドリアのエネルギー代謝が阻害されたままであった。これはミトコンドリアのエネルギー代謝の阻害状態が代謝の記憶として継続し続けることを示している。このようにミトコンドリア代謝の記憶と栄養飢餓環境下による解糖系の抑制によって、PP を処理した心臓線維芽細胞では PP を取り除いても通常のエネルギー生産レベルを維持する事ができなく、栄養飢餓といった代謝ストレス環境下で生存できないことが示された (図 29)。

4.1.6 ミトコンドリアのエネルギー代謝の回復によって PP 処理された心臓線維芽細胞は栄養飢餓に適応できる

PP 処理によるミトコンドリアのエネルギー代謝の障害が持続的なものなのか、それとも一過性のものなのかを明らかにするために、まず一時的に PP 処理を行った後に PP を取り除き、長時間通常環境下で培養した。その後、栄養飢餓環境下で細胞毒性の評価および OCR の測定を行った。その結果、PP を一時的に処理しても長時間(72 時間)通常環境下で培養を行えば、その後栄養飢餓に曝しても細胞死が誘導されないことが明らかになった (図 30a)。さらに OCR は PP 処理を行っていない細胞と区別ができないレベルにまで回復していた (図 30b)。これらの結果は、PP によるミトコンドリアのエネルギー代謝への障害の記憶は持続的なものではなく、一時的な記憶であることを示している。さらにこの結果は、ミトコンドリアのエネルギー代謝の回復によって PP 処理された心臓線維芽細胞が栄養飢餓環境に適応できることを示しており、図 29 で提案している PP のメカニズムとも一致している。

4.2 心筋梗塞モデルマウスへの PP 投与による心機能改善

4.2.1 PP は心筋梗塞後の心臓において心臓線維芽細胞を減少させる

これまでの結果から、PP は栄養飢餓環境下の心臓線維芽細胞の細胞死を誘導することが示されていた (図 29)。そこで、PP が心筋梗塞後の心臓線維芽細胞の生存を阻害し、過剰な線維化を緩和することができるかを検証することにした。この実験では外科的な手術により冠動脈を縛り心筋梗塞モデルマウスを作製し、実験に使用した。心筋梗塞の生じた心臓では虚血により、閉塞後 24 時間以内に梗塞領域のほとんどの心筋細胞が死滅する。そして 3、4 日目から心臓線維芽細胞の梗塞領域への増殖及び遊走が始まり、心臓線維芽細胞の数は 7 日目にはピークに達する。その後、梗塞領域に集まってきた心臓線維芽細胞はコラーゲンを分泌する筋線維芽細胞に分化し、梗塞領域にコラーゲンを蓄積させ、14 日目までには線維化が形成される (図 31)。そこで、虚血によりほとんどの心筋細胞が壊死した心筋梗塞後 1 日目から毎日 1 回、PP を経口投与し、梗塞領域での細胞増殖および線維化レベルを調べた。PP の投与量および投与方法はガン移植マウスに対する PP 投与実験を行った論文を参考にした (Esumi et al., 2004)。

まず始めに心筋梗塞後 4 日目の境界領域と梗塞領域での増殖細胞の細胞数を調べた。増殖細胞は増殖細胞のマーカーである Ki67 を識別できる anti-Ki67 抗体を使い、心筋梗塞後 4 日目の心臓切片で染色した。その結果、PP を投与したマウスでは境界領域と梗塞領域で Ki67 陽性細胞が劇的に減少していた (図 32)。この結果は、境界領域と梗塞領域での細胞増殖を PP が阻害していることを示している。しかし、PP が心臓線維芽細胞の増殖を阻害できたかどうかは心臓線維芽細胞に対する有用なマーカーがないため検証することができなかった。そこで、筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (α SMA) の抗体を使い、心筋梗塞後 4 日目、7 日目での α SMA 陽性細胞の細胞数を調べた。すると、PP を投与したマウスでは心筋梗塞後 7 日目の心臓で α SMA 陽性細胞の細胞数が境界領域と梗塞領域で共に減少していた (図 33)。さらに、 α SMA 陽性領域も PP 投与により減少していることがわかった (図 33)。これらの結果は PP 投与によって心筋梗塞後に線維化を誘導する心臓線維芽細胞の細胞数を減少できることを示唆している。

4.2.2 PP は心筋梗塞後の心臓において過剰な線維化を抑制する

次に心臓線維芽細胞の細胞数の減少により線維化が抑制されるかを検証するため

に、マッソントリクローム染色によってコラーゲン線維を選択的に染色し、線維化を評価した。その結果、PP を投与したマウスでは心筋梗塞後 14 日目の心臓で線維化領域が減少していた（図 34）。心筋梗塞後 4 日目の心臓でネクロシス領域に差がないことから、梗塞領域（心筋細胞の壊死した程度で決定する）の大きさが PP 投与によって変化したため線維化領域が減少したのではないことが明らかである（図 34）。また、PP 投与による線維化の減少は成熟型コラーゲン分子の定量的な指標であるハイドロキシプロリンのレベルでも検証を行った。その結果、マッソントリクローム染色の結果と同様に PP 投与マウスでは心筋梗塞後 14 日目の心臓でハイドロキシプロリンの含有量が減少しており、PP 投与により線維化レベルが抑制された（図 35）。これらの結果は PP を投与することで心筋梗塞後に生じる過剰な線維化を抑制できることを示唆している。

4.2.3 PP は心筋梗塞後の心機能改善を促す

最後に、線維化レベルの減少が心筋梗塞後の心機能にどのような影響を与えるのかを検証するために、心エコーを使い PP 投与あり、PP 投与なしの心筋梗塞モデルマウスの左心室の駆出率を比較した。まず心筋梗塞後 1 日目に駆出率を測定することで、心筋梗塞によって駆出率が低下していること、そして PP 投与群と無投与群で駆出率に違いがないことを確認した。その後、7 日目、14 日目で駆出率を測定すると、PP 投与群では駆出率の改善が見られた（図 36）。この結果は PP 投与によって線維化レベルの減少だけでなく、心機能改善も促されたことを示している。

PP 投与によって心機能が改善した 1 つの可能性としては、線維化レベルが減少したことによって血管新生を行うために必要なスペースを確保することができ、生き残った心筋細胞に血液が十分送られるため心機能が改善したことが推測できる。実際、心筋梗塞後 14 日目の心臓で血管密度が PP 投与マウスで上昇していた（図 37）。したがって、線維化レベルの減少だけでなく、血管新生の促進によって心機能改善が引き起こされている可能性がある。これらの結果は PP が心筋梗塞後の線維化に対する新規治療薬になることを示唆している。

5. 考察

5.1 PP の電子伝達系への影響

本研究の結果から、①PP が解糖系から TCA 回路への代謝流入を遮断すること（図 21）。②PP が電子伝達系の障害を引き起こすこと（図 17）。そして、①、②によりによりミトコンドリアのエネルギー生産の抑制が生じることが示唆された（図 29）。近年、PP が ComplexI を阻害しているという報告があり、PP による電子伝達系の抑制は ComplexI の阻害によるものと推測される(Harada et al., 2012)。しかし、PP 処理による OCR の値は、ComplexI と ComplexIII の阻害剤により、電子伝達系が機能しない状態で測定した OCR と同じレベルにまで減少していた（図 17）。ComplexI が阻害されても ComplexII が機能していればここまで著しく OCR は低下しないはずである。したがって、PP は ComplexI 以外の電子伝達系の主要因子に対しても障害を引き起こしている可能性がある。ComplexI 以外への影響としては、解糖系から TCA 回路への代謝流入が遮断されることで TCA 回路の代謝産物が減少し、NADH（TCA 回路が回ることによって生成される）が不足することや、ComplexII を介するコハク酸からフマル酸の反応が抑制されることが考えられる。しかし、ピルビン酸、グルタミンを添加しても OCR の改善が見られなかったことから、単に代謝基質が減少したため OCR が劇的に低下したわけではないと考察できる（図 28）。したがって、これらの結果は PP が電子伝達系を仲介する Complex function を一つまたは複数阻害する薬剤であること、あるいは多面的にミトコンドリアのエネルギー生産を阻害する薬剤であることを示唆している。

5.2 PP の TCA 回路中間代謝産物への影響

通常環境下で PP は TCA 回路前半の中間代謝産物の急激な減少を引き起こした（図 21）。なぜこのような代謝変化が生じたのか。一つの解釈としては、PP 処理した細胞では脂肪酸合成（クエン酸から脂肪酸）の急激な上昇が生じたことが考えられる。そして、PP により解糖系から TCA 回路への代謝産物の流入が遮断され、十分にクエン酸の補充を行うことができなかったため、クエン酸、アコニット酸、イソクエン酸の蓄積量が急激に減少したと推測する。PP 処理により脂肪酸合成の活性化が生じるのか、そしてその生理的意味についてはより詳細な研究が必要である。

一方、TCA 回路後半の中間代謝産物の変化は前半に比べてわずかであった。PP を

処理しても、フマル酸とリンゴ酸の蓄積量に変化はみられず、コハク酸は 20 分間の PP 処理でわずかに減少したが、その後も一定の蓄積量を維持したままであった (図 21)。また、2-オキソグルタル酸の蓄積量は PP 処理後 20 分で著しく減少していたが、枯渇に陥る事はなく、その後 720 分まで培養を続けると 2-オキソグルタル酸の蓄積量は徐々に上昇していた (図 21)。通常培地中にはグルタミンが含まれているため、グルタミンから 2-オキソグルタル酸への代謝産物の流入によって 2-オキソグルタル酸は枯渇に陥ることはなかったと考察できる。そして、2-オキソグルタル酸が補充されたことで TCA 回路後半の代謝産物は通常と変わらないレベルで維持されていたと推測する。しかし、グルコース飢餓環境下 (高グルタミンを含む) で PP は細胞死誘導を部分的にしか弱毒化することができなかったこと (図 27) や、PP 処理済みの心臓線維芽細胞にグルタミンを添加しても OCR が回復しなかったこと (図 28) から、TCA 回路後半の中間代謝産物が維持されても心臓線維芽細胞の生存および OCR には影響が小さいことがわかる。そしてこれは TCA 回路前半の代謝産物の維持が栄養飢餓環境下での生存および OCR の維持に重要であることを示唆している。TCA 回路前半ではイソクエン酸から 2-オキソグルタル酸の反応で NADPH の生成が行われる。PP によるミトコンドリアへのストレスによって ROS が発生している可能性もあり、NADPH の生成が阻害されることは細胞の酸化耐性において致命的であると考察できる。

5.3 不活性化したミトコンドリアの回復

PP 処理した心臓線維芽細胞を長時間通常環境下で培養すると、PP によるミトコンドリアのエネルギー代謝への障害がリセットされた (図 30b)。どのようにしてミトコンドリアエネルギー代謝への障害を回復することができたのか。通常環境下のミトコンドリアは質を保つためにマイトファジー／オートファジーやミトコンドリアの分裂を常に行っている (Ashrafin and Schwarz, 2013)。しかし、栄養飢餓環境下ではミトコンドリアのオートファジーの障害が引き起こされることが報告されている (Rambold et al., 2011)。したがって、PP により障害を受けたミトコンドリアは栄養飢餓環境下では障害されたままになっているが、通常環境下では新しいミトコンドリアへと取り替えられている可能性がある。実際、本研究の結果では PP 処理済みの心臓線維芽細胞を 72 時間通常環境下で培養すると、その後栄養飢餓環境下で培養しても細胞毒性を示さず、OCR も通常レベルにまで回復していた (図 30a、図 30b)。これは PP によって障害されたミトコンドリアがオートファジーおよび分裂を介して新しいミトコンドリアへと取り替えられている可能性を示唆している。近年、PP がグルコース飢餓

環境下のガン細胞でオートファジーを阻害しているという報告もあり(Deng et al., 2013)、PP によるオートファジーの阻害によって、ミトコンドリアの取り替えがさらに抑制されている可能性が示唆されている。しかし、PP によるオートファジーの阻害機能がどれだけ本研究で示した現象に関係しているのかは不明であり、今後さらなる研究が必要である。

5.4 虚血環境下で増殖する心臓線維芽細胞

ガン細胞は増殖のために核酸、タンパク質、脂質などの生体高分子を必要とするため、解糖系に依存していると考えられている(Vander Heiden et al., 2009)。では、心筋梗塞後の虚血環境下で増殖する心臓線維芽細胞はどのように生体高分子を獲得しているのか。本研究では虚血環境モデルの心臓線維芽細胞は増殖しなかった(図 11)。したがって、虚血環境下への耐性メカニズムを解明するためのモデルにはなりうるが、虚血環境下で増殖している心臓線維芽細胞の代謝メカニズムを解明するためのモデルにはなり得ない。心筋梗塞後の梗塞領域では心筋細胞の死後、マクロファージが TGF- β や FGF といった増殖因子を放出することで心臓線維芽細胞の分化・増殖を促している(Leask, 2010)。また、増殖因子が細胞内代謝を変化させているとの報告もある(Boerner et al., 1985)。したがって、これらの増殖因子が心臓線維芽細胞の代謝を変化させ、生体高分子の生成を助けている可能性がある。

5.5 心臓線維芽細胞とガン細胞

数種類のガン細胞はグルコース飢餓に曝されると PP によって細胞死が誘導される(Tomitsuka et al., 2010; Thrne et al., 2010; Yu et al., 2008; Deng et al., 2013)。そのメカニズムとしては NADH-FR system の阻害、canonical Wnt signaling の阻害、UPR signaling pathways の阻害、オートファジーの阻害と様々な報告がある。しかし、ガン細胞において PP による細胞死誘導の中心的な役割を果たしている原因は未だに明らかになっていない。本研究で明らかになったミトコンドリアのエネルギー代謝の阻害がグルコース飢餓環境下のガン細胞の細胞死誘導に関わっているかを検証することは大変興味深いポイントである。ガン細胞、心臓線維芽細胞は共に栄養飢餓環境に耐性があり、両細胞とも生存・増殖を抑制することが治療に繋がる。したがって、ガン細胞と心臓線維芽細胞における PP の影響を解明することは心臓線維芽細胞とガン細胞の細胞内代謝適応メカニズムの共通点を明らかにすることに繋がる大変重要な洞察が得られ

る可能性がある。

5.6 栄養飢餓環境下における細胞内代謝適応

本研究の結果は栄養飢餓環境下の心臓線維芽細胞がミトコンドリアのエネルギー代謝に依存して生存していることを示唆している（図 23、図 24、図 25）。しかし、グルコースやグルタミンといった TCA 回路への栄養の供給が欠乏しているにもかかわらず、なぜ心臓線維芽細胞がミトコンドリアのエネルギー代謝を維持することができるのか。そこで、著者が考える 3 つの仮説と検証方法を提示する。

1. 栄養飢餓でもコハク酸の蓄積量は通常レベルを維持していた（図 24）。これは complexII の基質として利用されるコハク酸を常に維持できるような代謝を行うことで complexII を介した電子伝達系を行えるようにしている可能性を示唆している。complexI および complexII の阻害剤を栄養飢餓環境の心臓線維芽細胞に添加して、細胞毒性や OCR の変化を調べることで明らかにすることができると推測する。
2. 心臓線維芽細胞の TCA 回路は ^{13}C 代謝フラックス解析の結果からもわかるように、通常環境下ではわずかに流れているだけであった（図 21）。しかし、栄養飢餓環境に曝した心臓線維芽細胞では短時間で TCA 回路の代謝産物が減少していた（図 24）。したがって、栄養飢餓環境の心臓線維芽細胞では TCA 回路を普段より活発に回していることが考察できる。これにより細胞内に存在する代謝産物を TCA 回路で優先的に利用し、ミトコンドリアで効率的にエネルギーを得ていると推測する。検証方法としては、まず ^{13}C グルコースを含んだ培地で長時間心臓線維芽細胞を培養し、細胞内の代謝産物を ^{13}C に変換させる。その後、栄養飢餓下で培養し、代謝フラックス解析を行うことで、栄養飢餓での TCA 回路の流れを調べることができると推測する。また、TCA 回路の代謝酵素に対するノックダウンを行い、OCR を調べることで栄養飢餓での TCA 回路の代謝酵素の必要性を明らかにすることができると推測する。
3. TCA 回路に流入してくる代謝産物は解糖系に由来するピルビン酸、グルタミンに由来する 2-オキソグルタル酸の他にも、 β 酸化によって脂肪酸から作られるアセチル-CoA、バリンやアスパラギン酸といったアミノ酸に由来するスクシニル CoA やフマル酸、ホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ (PEPCK) によってホ

スホエノールピルビン酸から作られるリンゴ酸などがある(図 3)。これらの経路からの代謝産物の流入によってミトコンドリアのエネルギー代謝を維持していることが推測できる。候補の経路の主要代謝酵素に対するノックダウンや阻害剤を使用して、OCR の変化を調べることで、栄養飢餓での働きを明らかにすることができると考察する。

5.7 心筋細胞への PP の影響

本研究の培養細胞の結果では、PP は通常環境下の心臓線維芽細胞のミトコンドリアのエネルギー代謝に対しても障害を引き起こしていることが示されている(図 17、図 21)。したがって、通常は β 酸化によりエネルギー生産を行っている心筋細胞に対しても毒性を示す可能性がある。しかし、PP を投与した Sham-operated マウスでは心臓のポンプ機能に悪影響がみられなかった(図 36)。この理由としては、PP 投与によってミトコンドリアのエネルギー代謝に障害を受けた細胞は一時的に解糖系に依存する形で生存しており、その後オートファジーやミトコンドリアの分裂によって新しいミトコンドリアへと取り替えられているのではないかと考察できる。特に心筋梗塞に起因する心不全では心筋細胞はグルコース代謝にシフトすることが知られており、PP 処理によるミトコンドリア不全の影響を緩和している可能性がある(Bishop and Altschuld, 1970; Ventura-Clapier et al., 2004)。

5.8 心筋梗塞モデルマウスへの PP 投与時期

本研究では心筋梗塞モデルマウスに PP を投与することで、線維化の抑制および心機能の改善を促すことができた(図 34、図 35、図 36)。心筋梗塞モデルマウスに PP を投与する実験は本研究より以前に既に報告されており、その論文では PP によってわずかに心臓の肥大が改善されたが、線維化の抑制や心機能は改善されなかったと報告されている(Sarawati et al., 2010)。なぜ本研究とは異なる結果であったのか。本研究の結果との矛盾はマウスへの PP 投与方法の違いによるものであると推測する。彼らは冠動脈を閉塞した際に PP を直接心臓に注射し、その後は PP の投与を行わなかった。それに対して本研究では、冠動脈を閉塞して 1 日たってから(ほとんどの心筋細胞が壊死した時期)経口投与で PP を与え、サンプル回収日の前日まで投与を続けた(図 31)。一つの可能性としては、心筋細胞死後に PP 投与を開始したことが、心筋梗塞後の線維化の抑制と心機能の回復を促すための鍵になっているのではないかと考察で

きる。彼らが PP を投与した時期は心筋細胞が虚血環境に曝され、壊死している時期であり、かろうじて生存していた心筋細胞に対して PP が細胞死を誘導し、心筋細胞の壊死を拡大させていた可能性がある。しかし、本研究の投与方法では心筋細胞の壊死が済んだ後に PP 投与を行ったことで、虚血環境下の心筋細胞に対する影響を抑えることができたと推測できる。もう一つの可能性としては、PP の投与を継続的行ったことが鍵になっているのではないかと考察できる。彼らは冠動脈を閉塞した際に PP の投与を行っているが、投与はこの一度のみでその後は行っていない。心臓線維芽細胞の増殖は心筋梗塞後 4 日目から始まり、7 日目にはピークを迎える (図 31)。したがって、この時期に PP の投与を行っていなかったため、線維化を抑えることができなかったのではないかと考察できる。

5.9 心筋梗塞モデルマウスの心臓における代謝の変化

本研究では PP が心筋梗塞後の心臓線維芽細胞の増殖を抑制し、心臓線維芽細胞の細胞数を減少させることによって線維化を抑制していることを示した (図 32、図 33、図 34、図 35)。しかし、PP によるミトコンドリアのエネルギー代謝の障害が線維化抑制の要因であるかは確認する事ができなかった。これまでにマウスの心臓のメタボローム解析を行ったが、個体差が大きいため解析を行うことができなかった。また質量顕微鏡を使い(Hattori et al., 2010)、心臓での代謝産物の検出にも試みたが、代謝産物の分子量が小さいため検出が困難であった。今後メタボローム解析や質量顕微鏡の精度が向上することで、*in vitro* 実験と *in vivo* 実験を繋ぐ革新的な進歩が得られると推測する。

5.10 心機能改善を誘導する PP の薬理作用

近年、PP は NADH-FR 以外に Canonical Wnt signaling、UPR signaling pathways、Androgen receptor signaling pathway といった 3 つの経路の阻害をしていることが報告されている。本研究の培養細胞実験で Canonical Wnt signaling と UPR signaling pathways はどちらも心臓線維芽細胞に対する PP の影響の中心的な役割を果たしているわけではないことが示された (図 13、図 15)。また、Androgen receptor ノックアウトマウスでは線維化が増加することが既に報告されており (Jones et al., 2009)、これは本研究における心筋梗塞モデルマウスでの PP の効果が Androgen receptor signaling の阻害によるものではないことを示唆している。このように既知の薬理作用は心筋梗塞に対する

中心的な役割を担っていない。したがって、本研究で明らかにした PP のミトコンドリアのエネルギー代謝に対する薬理作用と心筋梗塞時の PP の影響がどのように関係しているのかをさらに調べていく必要がある。

6. 総括

本研究では心臓線維芽細胞の栄養飢餓環境に対する細胞内代謝適応メカニズムを明らかにした。さらに、PP という駆除薬を一時的に心臓線維芽細胞に処理することで、ミトコンドリアのエネルギー代謝を阻害できることを発見した。そして PP によるミトコンドリアのエネルギー代謝の障害は栄養飢餓環境での細胞の代謝適応を阻害し、代謝ストレス中での生存を妨げることを明らかにした。

さらに、本研究では心筋梗塞モデルマウスにおいて過剰な線維化の弱毒化と心機能の改善を促す薬剤を提案した。PP は Food and Drug Administration (FDA) 承認済みの虫下し薬であり、治療への適応には大きな問題は生じないと推測できる。また、本研究の結果は線維芽細胞の細胞内代謝適応が線維化抑制および、損傷を受けた心臓の修復を促すための新規治療標的になることを示唆している。さらに心臓以外の損傷を受けた組織に対しても治療標的になる可能性を示唆しており、本研究は「細胞内代謝適応を標的とした治療」という研究分野において新たな可能性を投げかけた研究であると考えている。

7. 図表

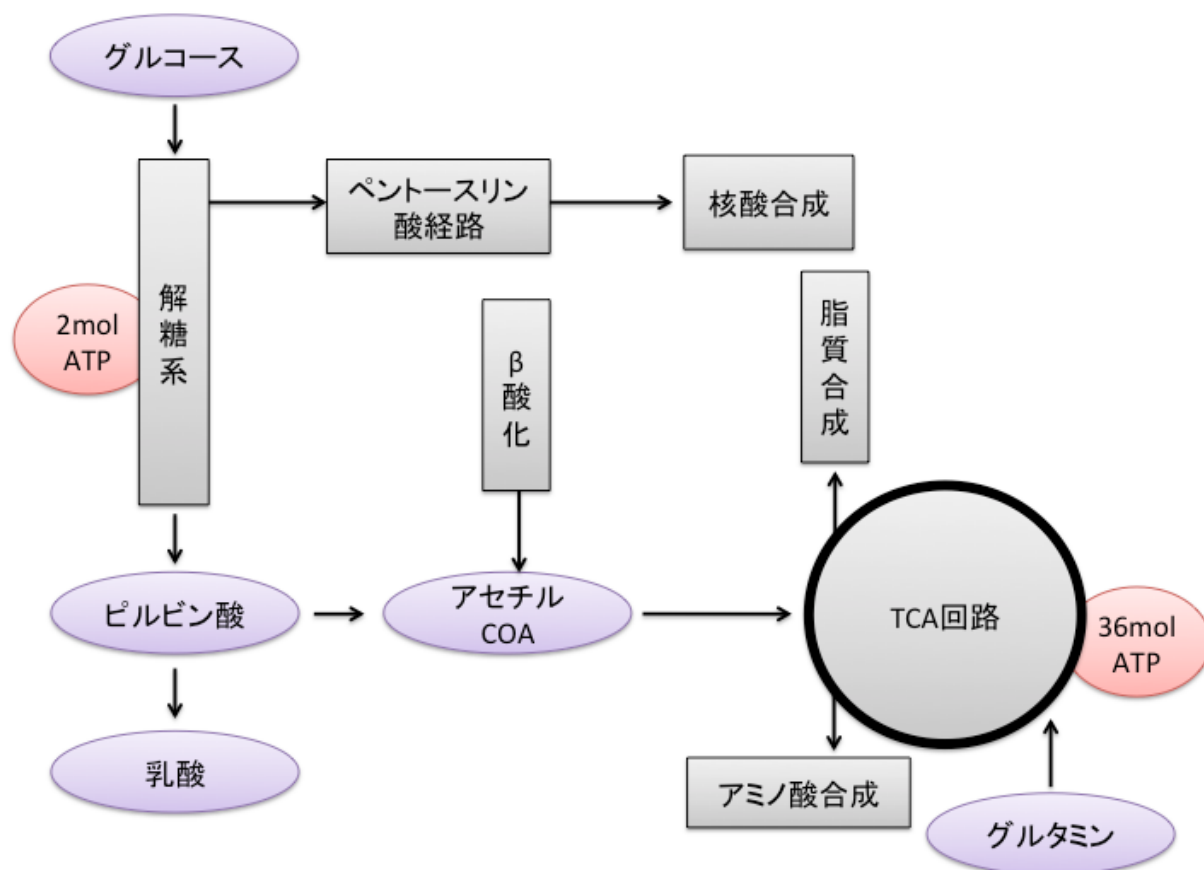


図1 代謝経路の概要図

代謝経路は複雑に繋がりが合い、同化と異化を繰り返し、生命を維持している。

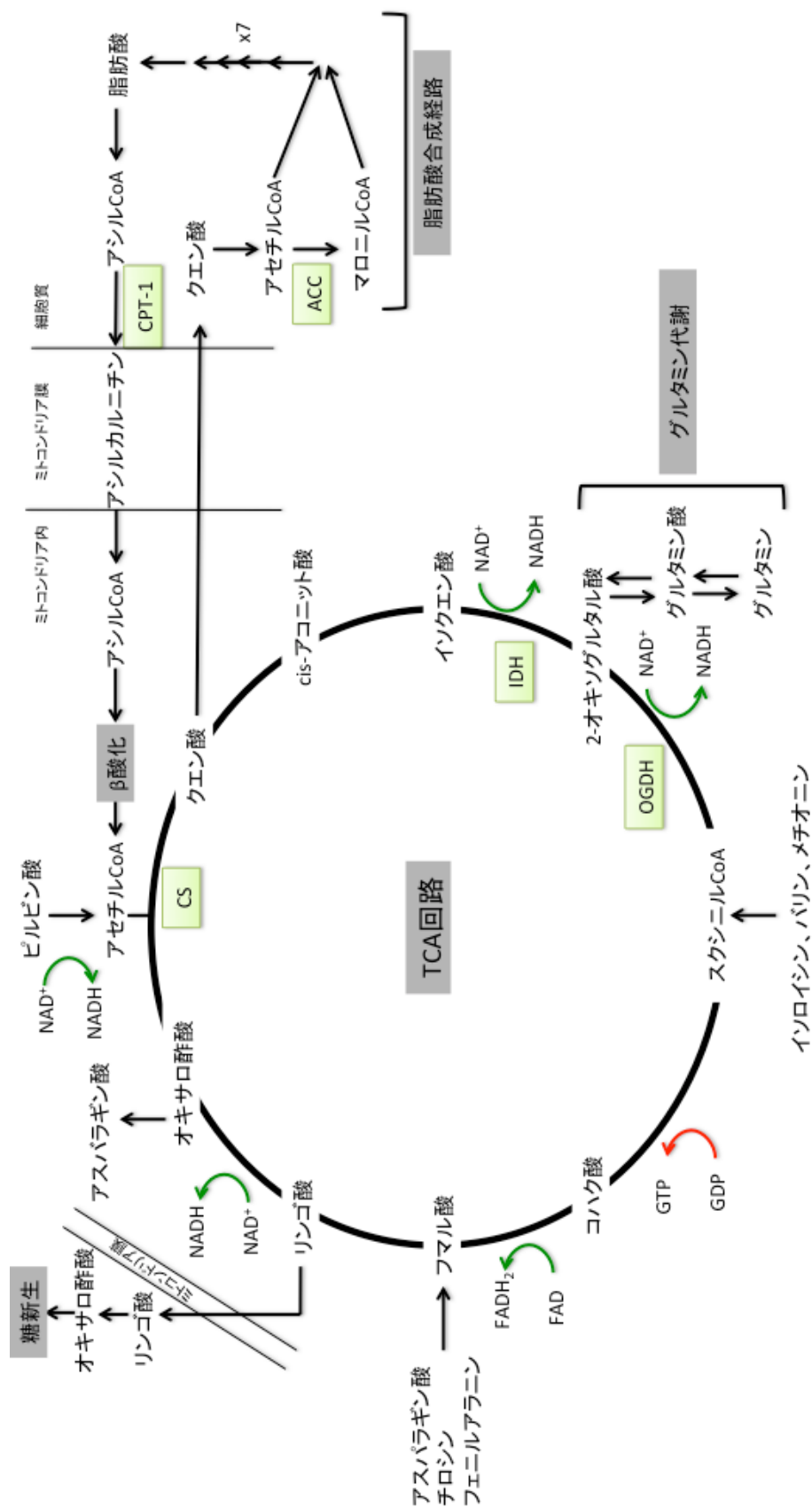


図3 TCA 回路関連の代謝経路

TCA 回路は糖、脂肪酸、アミノ酸を酸化的に代謝し、エネルギー生産を行う異化経路であると共に、生合成のための原料を生成する同化経路でもある。

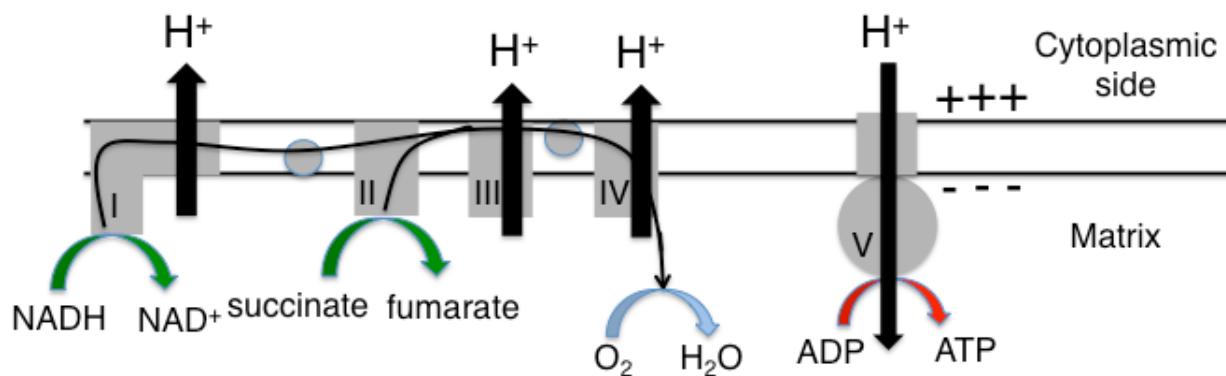


図 4 電子伝達系

電子伝達系では NADH や FADH₂ の高エネルギー電子が放出するエネルギーを使い、プロトン勾配を作り出す。このプロトン勾配を利用して ATP 合成酵素により ATP を産生する。

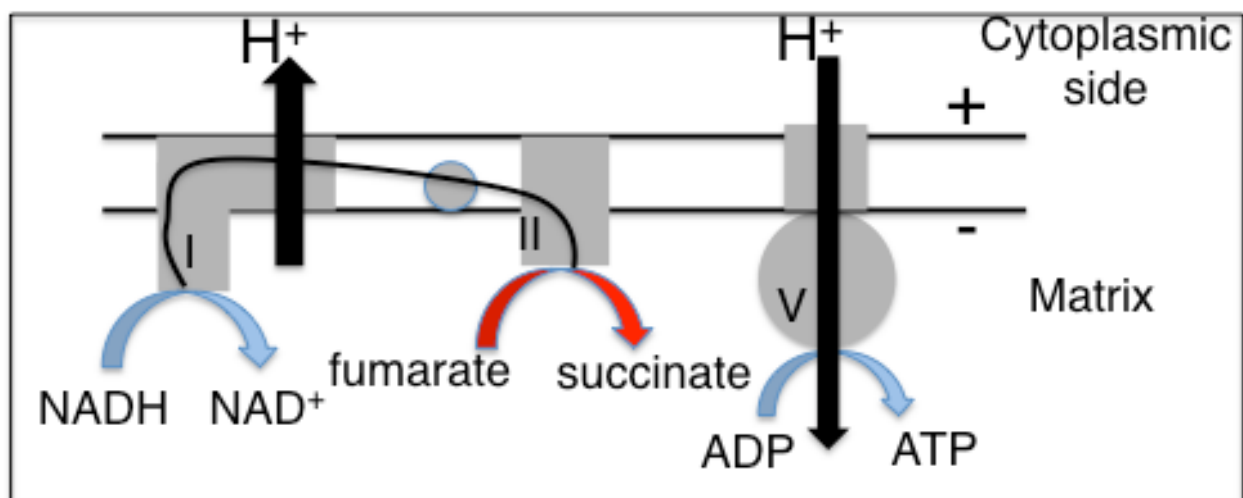


図 5 NADH-fumarate reductase system (NADH-FR system)の模式図

NADH-FR system はミトコンドリアの電子伝達系における電子受容体として酸素の代わりにフマル酸を利用し、嫌気的環境においてもミトコンドリア内膜でプロトン勾配を作り出し、ATP 産生を行う機構である。

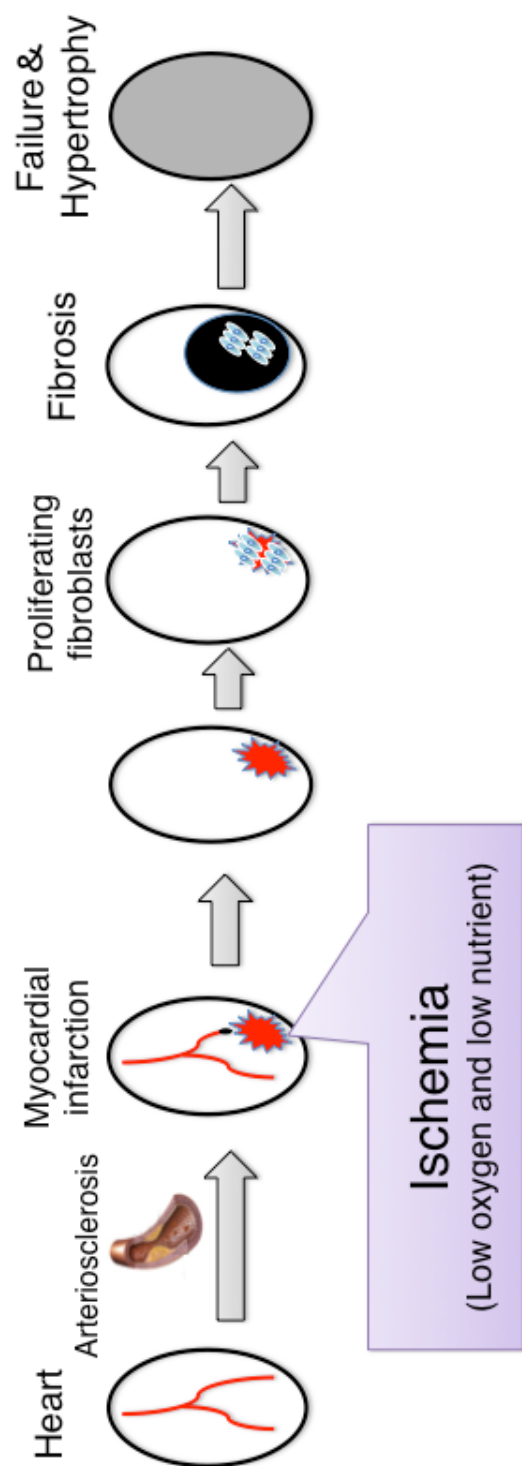


図 6 心筋梗塞後の病態変化

心筋梗塞では心臓の細胞に血液を送る冠動脈が詰まり心筋細胞が壊死する。その後心臓では心臓線維芽細胞が増殖し線維化が促進する。この線維化は心臓の硬化を招き心機能を悪化させ、その後心不全や心肥大を引き起こす。

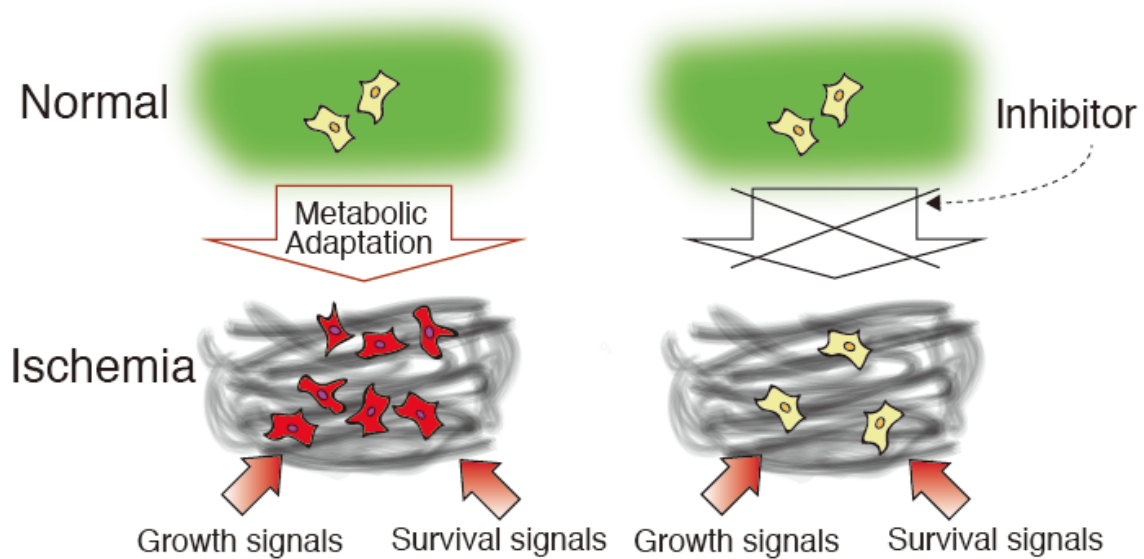


図 7 仮説の概要図

本研究では、「心筋梗塞後の虚血環境下において心臓線維芽細胞は細胞内代謝適応を行うことで生存・増殖している」という仮説を立てた。そして、心臓線維芽細胞の代謝適応を妨げることが、心筋梗塞後の過剰な線維化を抑制するための、新規でかつ効果的な治療法になり得ると推論する。

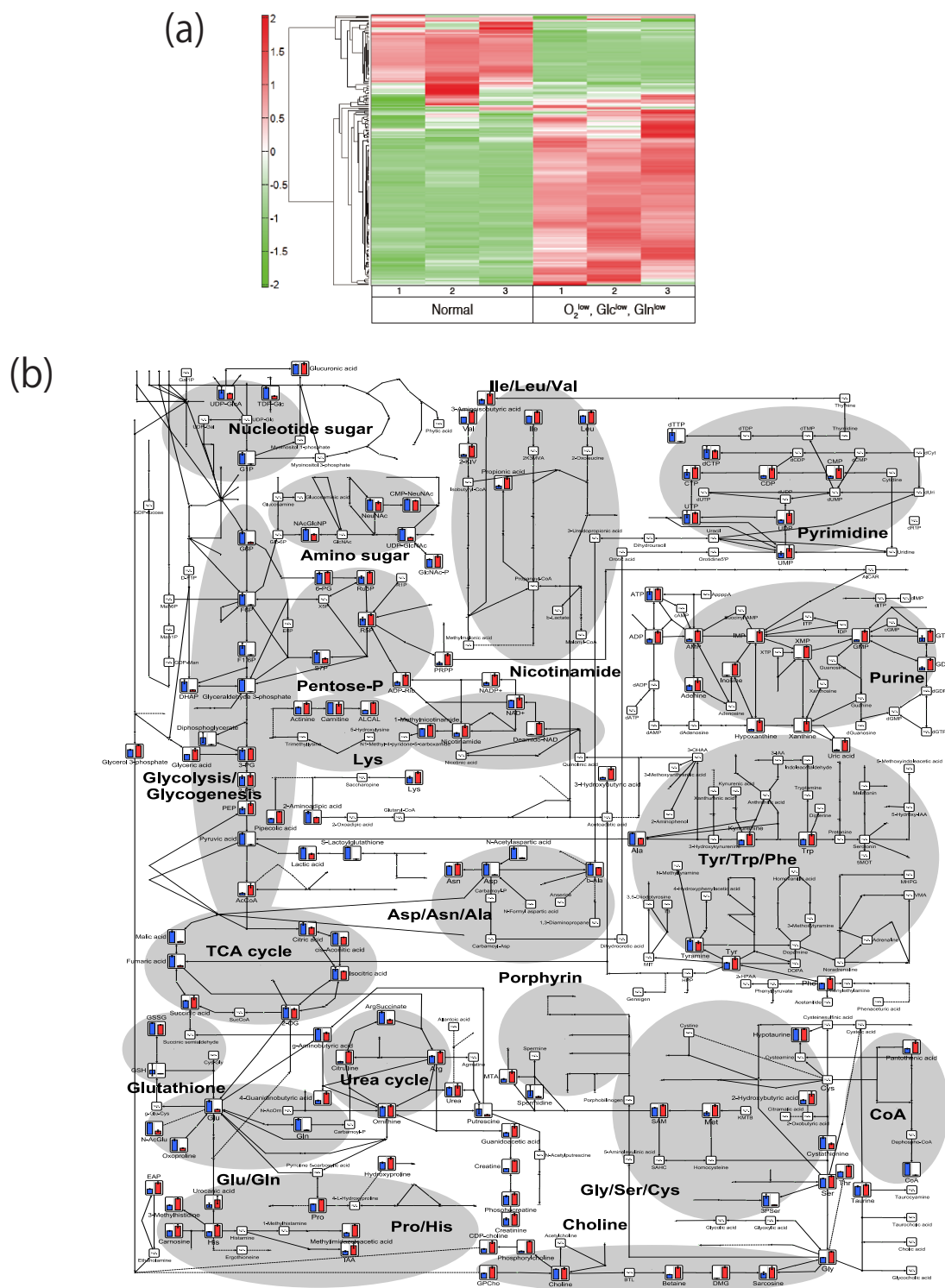


図 8 虚血環境下の心臓線維芽細胞は細胞内代謝が大きく変化する

通常環境及び虚血環境で 72 時間培養した心臓線維芽細胞のメタボローム解析の結果をヒートマップ及びパスウェイマップとして網羅的に示した。(a) ヒートマップ。横軸はサンプル名、縦軸はピークを示す。ピークに対して階層的クラスタリング解析を実施し、ピーク間の距離は図中の樹形図で表している。緑が濃いほど平均より小さいことを示し、赤が濃いほど平均より大きいことを示す。(b) パスウェイマップ。青が通常環境、赤が虚血環境の相対面積値を示す (n=3)。N.D.: Not Detected. Glucose (Glc)、Glutamin (Gln)。

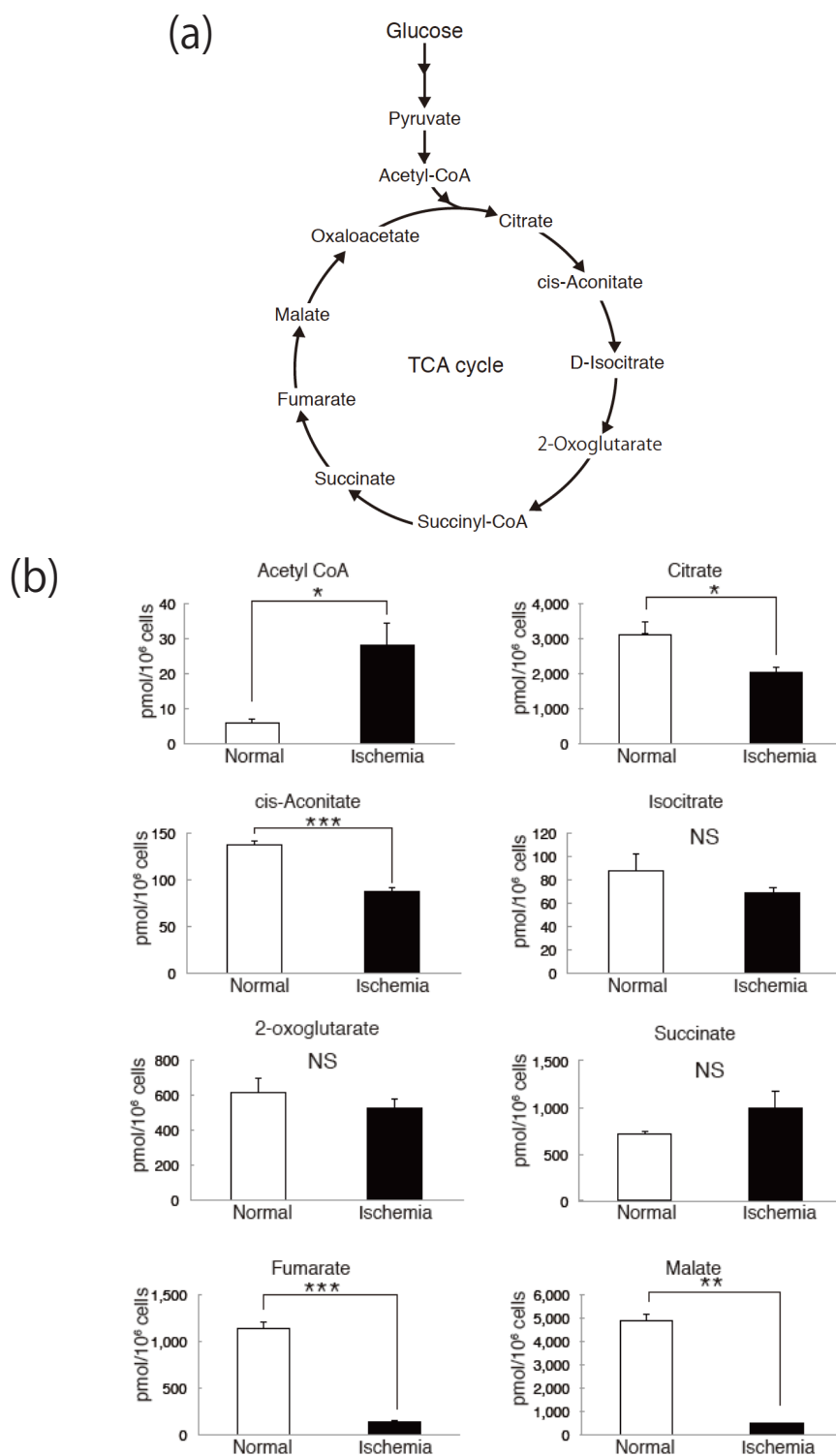


図 9 虚血環境では TCA 回路の中間代謝産物で顕著な変化が生じている

(a) TCA 回路の模式図。(b) 通常環境（白）及び虚血環境（黒）で 72 時間培養した心臓線維芽細胞から代謝産物を抽出し、TCA 回路の代謝産物の蓄積量を解析した（n=3）。

Not significant difference: NS、★: p<0.05、★★: p<0.01、★★★: p<0.001

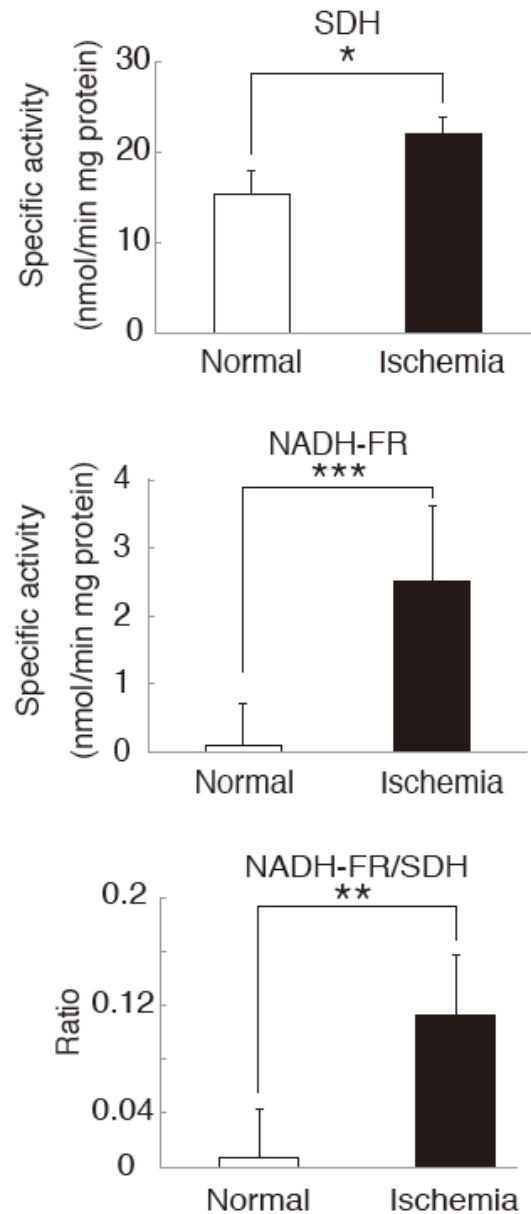


図 10 虚血環境下の心臓線維芽細胞では NADH-fumarate reductase の活性が上昇する

通常環境（白）および虚血環境（黒）で 72 時間培養した心臓線維芽細胞からミトコンドリア画分を回収し、NADH-FR system の主要酵素である NADH-fumarate reductase（フマル酸→コハク酸）の活性を比較した。測定には SDH（コハク酸→フマル酸）活性の値をインターナルコントロールとして使用し、それぞれのサンプル間を比較した（n=6）。酵素活性の値は nmol/min mg protein で示した。★:p<0.05、★★: p<0.01、★★★: p<0.001

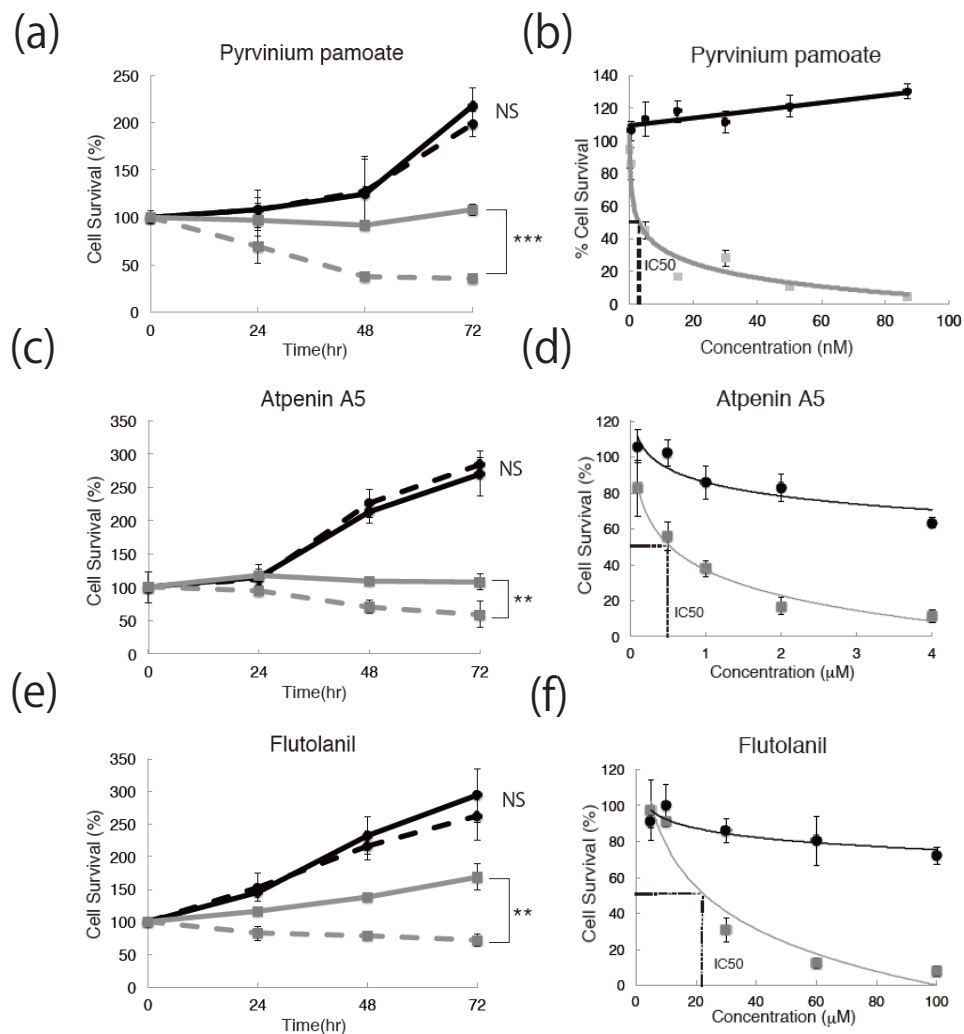


図 11 NADH-FR system の阻害剤は虚血環境下の心臓線維芽細胞に対して細胞毒性を示す

NADH-FR system の阻害剤である Pyrvinium pamoate (PP)、Atpenin A5、Flutolanil の細胞毒性を評価した。(a)、(c)、(e) PP (87nM)、Atpenin A5 (1μM)、Flutolanil (30μM) 添加後の時間経過 (24 時間、48 時間、72 時間) に対する細胞数の変化を調べた。それぞれの環境で培養を開始した際 (0 時間) の細胞数を 100%とした。通常環境は黒、虚血環境は灰色の線で示し、薬剤を添加していないサンプル (DMSO を添加) は実線で、薬剤を添加したサンプルは破線で示した (n=3)。(b)、(d)、(f) 薬剤を添加後、それぞれの環境で 72 時間培養した際の IC50 を調べた。薬剤なし(DMSO)で 72 時間培養した際の細胞数を通常環境、虚血環境それぞれで 100%として計算した。通常環境で薬剤を添加したサンプルは黒線で示し、虚血環境で薬剤を添加したサンプルは灰色線で示した (n=3)。虚血環境下での IC50 はそれぞれ PP=9.5nM、Atpenin A5=530nM、Flutolanil=23μM であった。Not significant difference: NS、★★: p<0.01、★★★: p<0.001

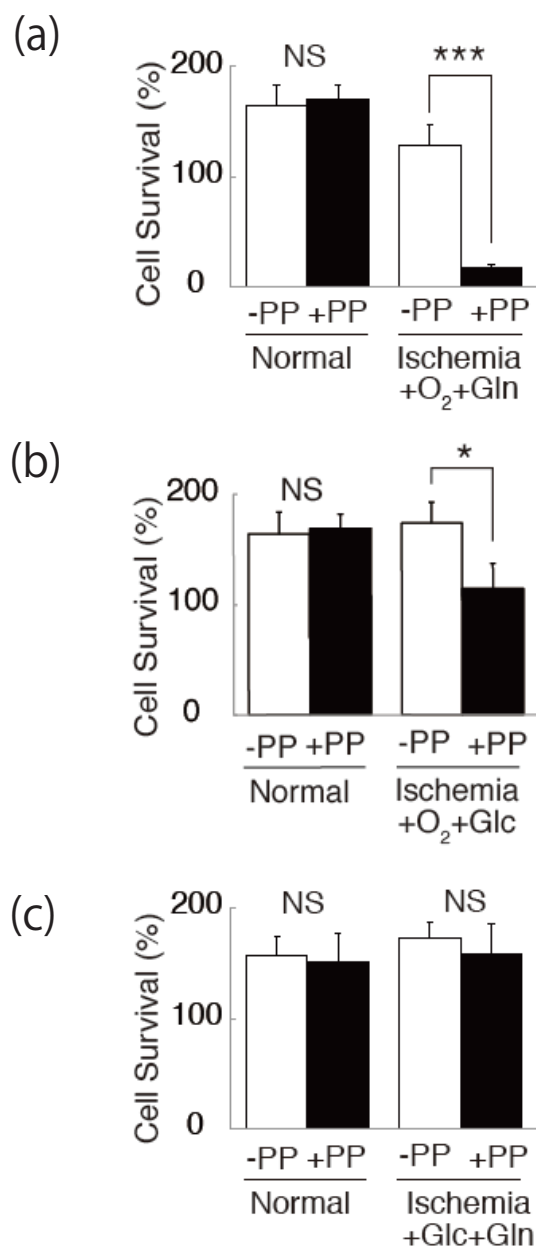


図 12 PP による虚血環境下での細胞死誘導に低酸素は関係していない

通常環境から酸素、グルコース、グルタミンのうち一つを除いた環境を作製し、それぞれの環境条件で DMSO 処理 (-PP) (白) 又は PP 処理 (87nM) (+PP) (黒) を 24 時間行った際の細胞数を調べた。(a) グルコース飢餓環境下 (酸素 20-21%, グルコース 300 μ M, グルタミン 4mM)。(b) グルタミン飢餓環境下 (酸素 20-21%, グルコース 25mM, グルタミン 100 μ M 以下)。(c) 低酸素環境下 (酸素 3%, グルコース 25mM, グルタミン 4mM)。それぞれの環境で培養を開始した際 (0 時間) の細胞数を 100%とした (n=3)。Not significant difference: NS, *:p<0.05、***: p<0.001

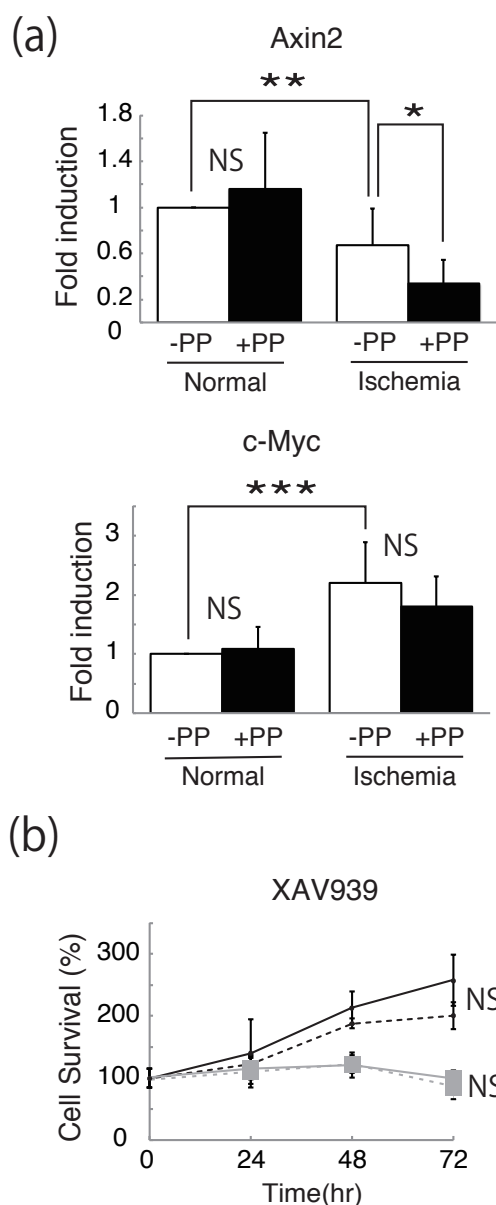


図 13 PP の標的は Canonical Wnt signaling ではない

(a) 通常環境及び虚血環境で DMSO 処理 (-PP) (白) 又は PP 処理 (87nM) (+PP) (黒) を 12 時間行った心臓線維芽細胞から Total RNA を抽出し、Axin2 と c-Myc の発現レベルを qRT-PCR で定量した。発現レベルは通常環境で DMSO 処理を 12 時間行ったサンプルの値を 1 倍として計算した(qRT-PCR は duplicate もしくは triplicate で測定した)。(b) 通常環境 (黒線) 及び虚血環境 (灰色線) の心臓線維芽細胞に DMSO (実線) 又は Canonical Wnt signaling の阻害剤 (XAV939) (3 μ M) (破線) を添加し、時間経過 (24 時間、48 時間、72 時間) に対する細胞数の変化を調べた。それぞれの環境で培養を開始した際 (0 時間) の細胞数を 100% とした (n=3)。Not significant difference: NS, *:p<0.05、***: p<0.001

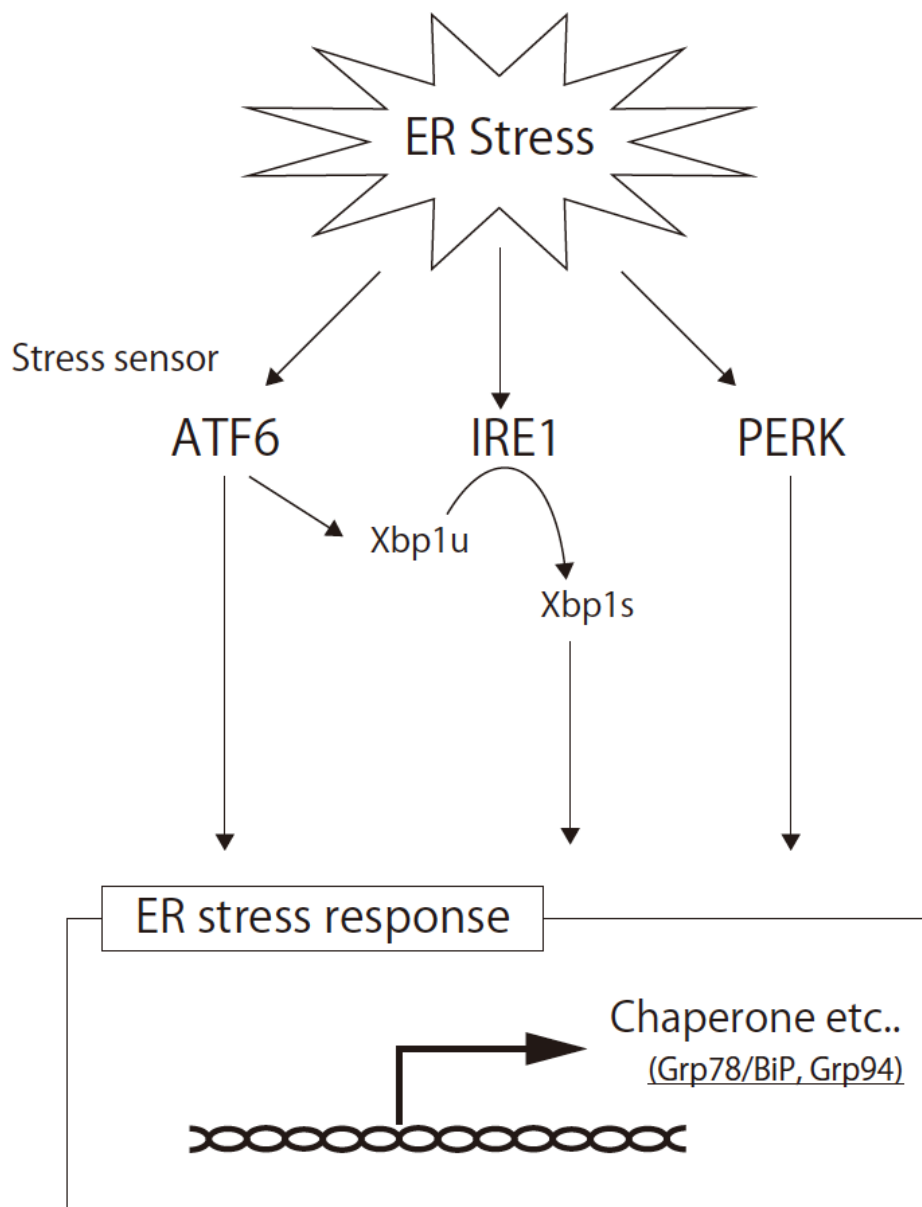


図 14 UPR pathways の模式図

UPR pathways には ATF6、IRE1、PERK といった 3 つの異なる経路が存在する。

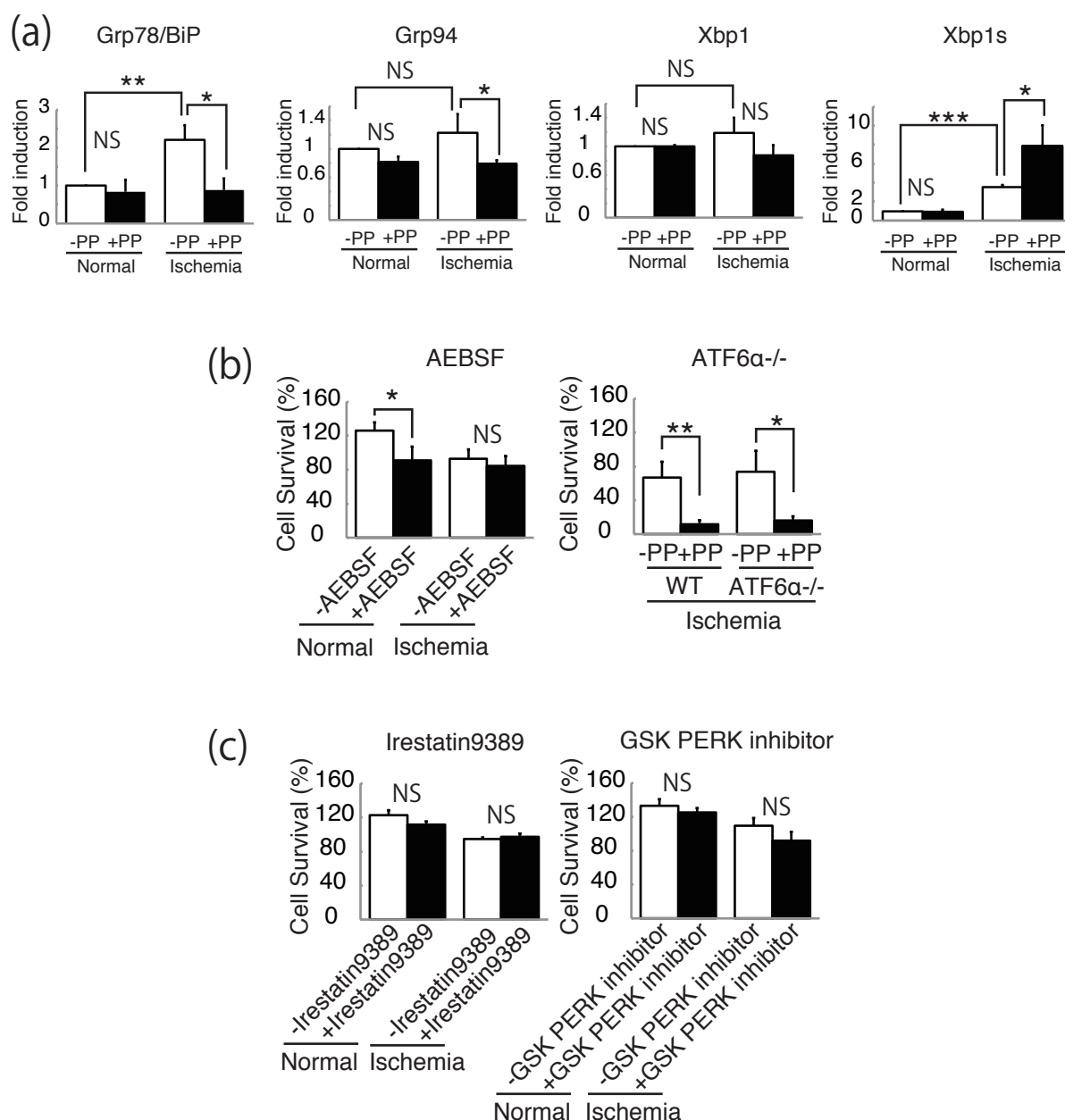


図 15 PP の標的は UPR pathways ではない

(a) UPR pathways の下流にあるシャペロン (Grp78/BiP, Grp94) の発現レベルと ATF6 と IRE1 のメディエーターである Xbp1、Xbp1s の発現レベルを図 13 と同様の方法で調べた。(b) ATF6 経路の阻害剤 (AEBSF) を添加した細胞と ATF6α 欠損細胞を通常環境又は虚血環境で 24 時間培養した際の細胞数を調べた。AEBSF 処理群には 300μM の AEBSF を添加し、PP 処理群には 87nM の PP を添加した。実験手法および解析方法は図 12 と同様 (n=3)。(c) IRE1 経路の阻害剤 (Irestatin9389) (10μM) と PERK 経路の阻害剤 (GSK PERK inhibitor) (2μM) を細胞に添加して、通常環境および虚血環境下で 24 時間培養した際の細胞数を調べた。実験手法および解析方法は図 12 と同様 (n=3)。Not significant difference: NS、★: p<0.05、★★: p<0.01、★★★: p<0.001

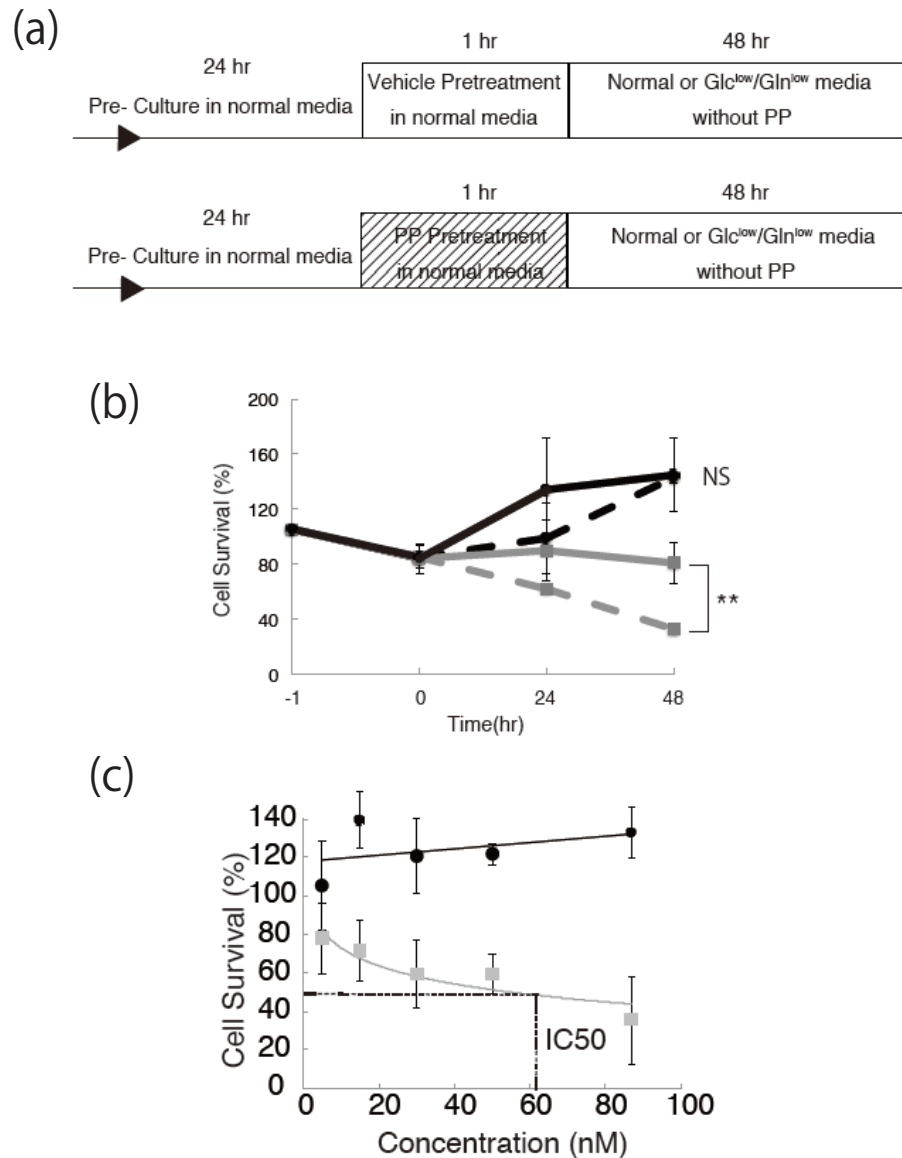


図 16 PP の標的は通常環境の心臓線維芽細胞に存在する

(a) PP 前処理実験の模式図。通常環境下で 1 時間 DMSO 処理又は PP 処理 (87nM) を行った後に、DMSO 及び PP を取り除く。その後、通常環境又は栄養飢餓環境下で 48 時間培養し、細胞数を調べた。(b) 図 16a の手法で時間経過 (24 時間、48 時間) に対する細胞数の変化を調べた。DMSO、PP 処理を行う直前 (-1 時間) の細胞数を 100%とした。通常環境は黒線、虚血環境は灰色線で示し、DMSO 処理を行ったサンプルは実線で、PP 処理を行ったサンプルは破線で示した (n=3)。(c) 図 16a の手法で 48 時間培養した際の IC₅₀ を調べた。通常環境 (黒線) 又は虚血環境 (灰色線) で 48 時間 DMSO 処理を行ったサンプルの細胞数をそれぞれ 100%として計算した (n=3)。虚血環境下での PP 前処理実験の IC₅₀ は PP=61.8nM であった。Not significant difference: NS、★★: p<0.01、

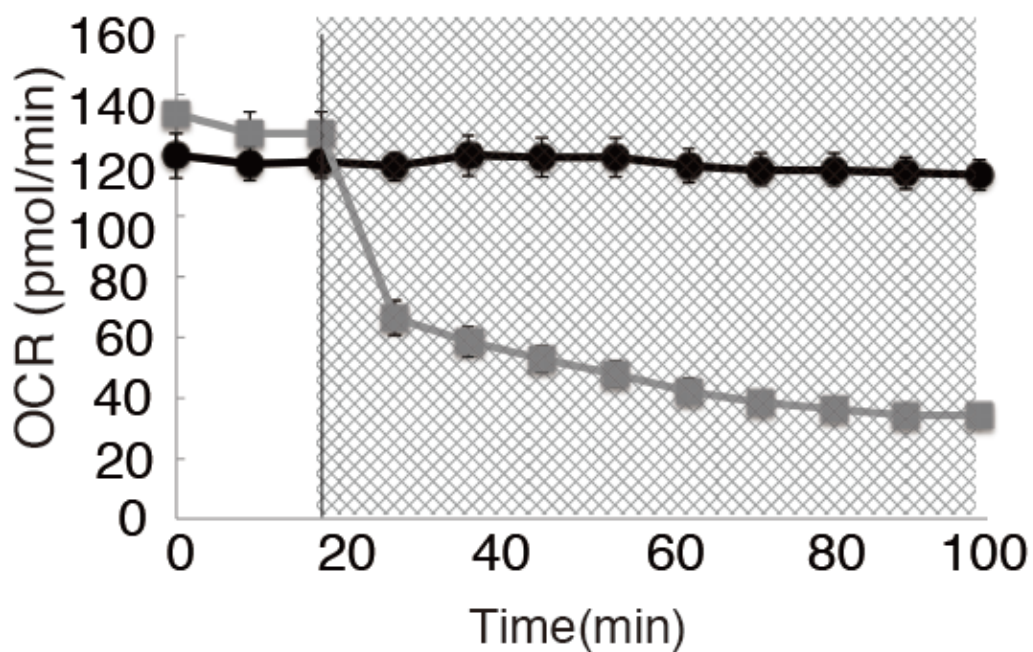
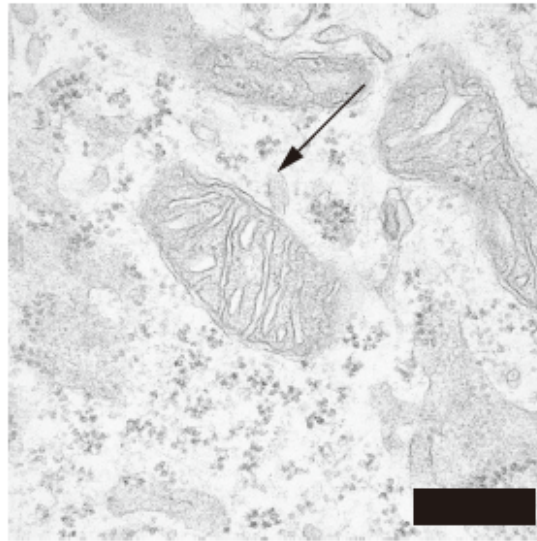


図 17 PP は OCR を急激に減少させる

通常環境下の心臓線維芽細胞に DMSO 処理（黒線）又は PP 処理（87nM）（灰色線）を行い、ミトコンドリアの呼吸鎖の指標である OCR を XF96 Flux analyzer を用いて調べた。DMSO および PP は OCR の測定開始から 20 分経過してから添加し、DMSO および PP で処理されている期間は斜線で示した（n=3）。

-PP



+PP

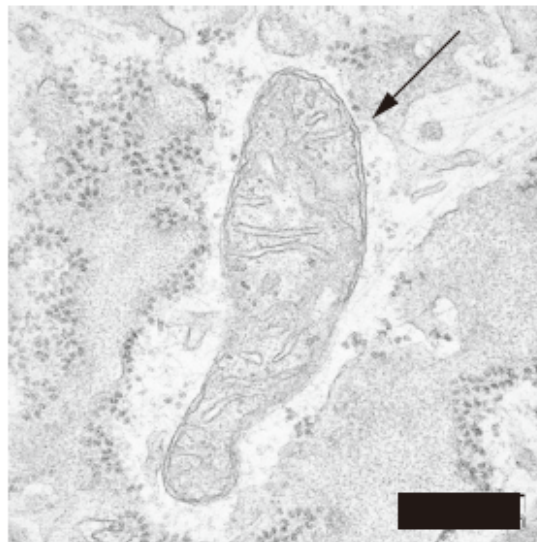


図 18 PP はミトコンドリアの構造的破壊を引き起こさない

通常環境下の心臓線維芽細胞に DMSO 処理 (-PP) または PP 処理 (87nM) (+PP) を 1 時間行ったサンプルのミトコンドリア構造を電子顕微鏡で観察した。矢印は超微細構造に変化がないミトコンドリアを示している。スケールバー: 400nm。

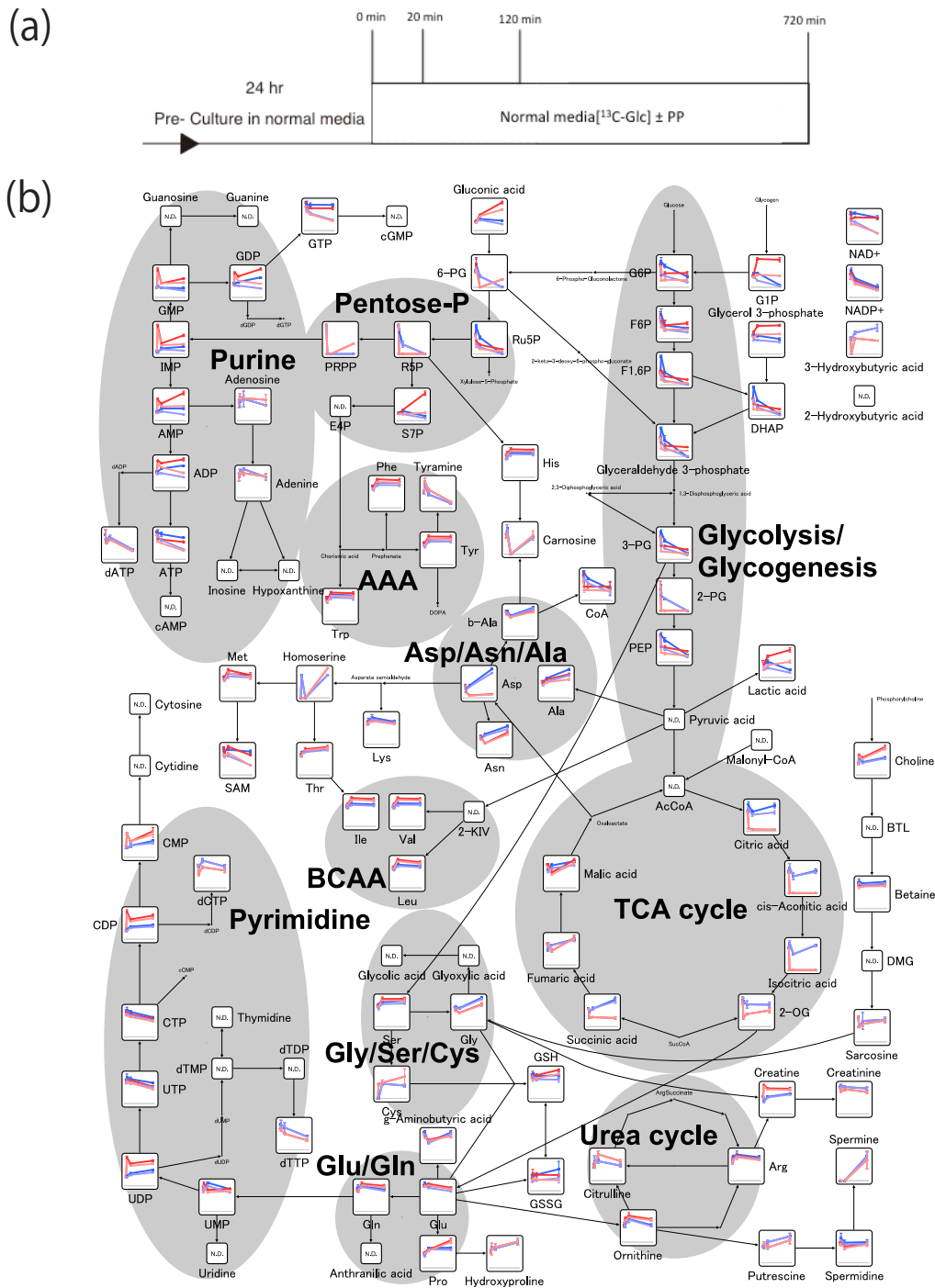


図 19 ^{13}C グルコースによる代謝フラックス解析

(a) 代謝フラックス解析実験の模式図。通常環境下 (^{13}C グルコースを含む) で DMSO 処理または PP 処理 (87nM) を 720 分間行い、時間経過 (0 分、20 分、120 分、720 分) における ^{13}C の代謝を代謝フラックス解析で調べた。(b) 代謝フラックス解析の結果をパスウェイマップとして網羅的に示した。グラフは左から順に 0、20、120、720 分のタイムポイントを示し、DMSO 処理群 (^{12}C 及び ^{13}C の質量の総和) (青色)、DMSO 処理群 (^{12}C の質量) (薄青色)、PP 処理群 (^{12}C 及び ^{13}C の質量の総和) (赤色)、PP 処理群 (^{12}C の質量) (薄赤色) の定量値を示す (n=3)。N.D.: Not Detected.

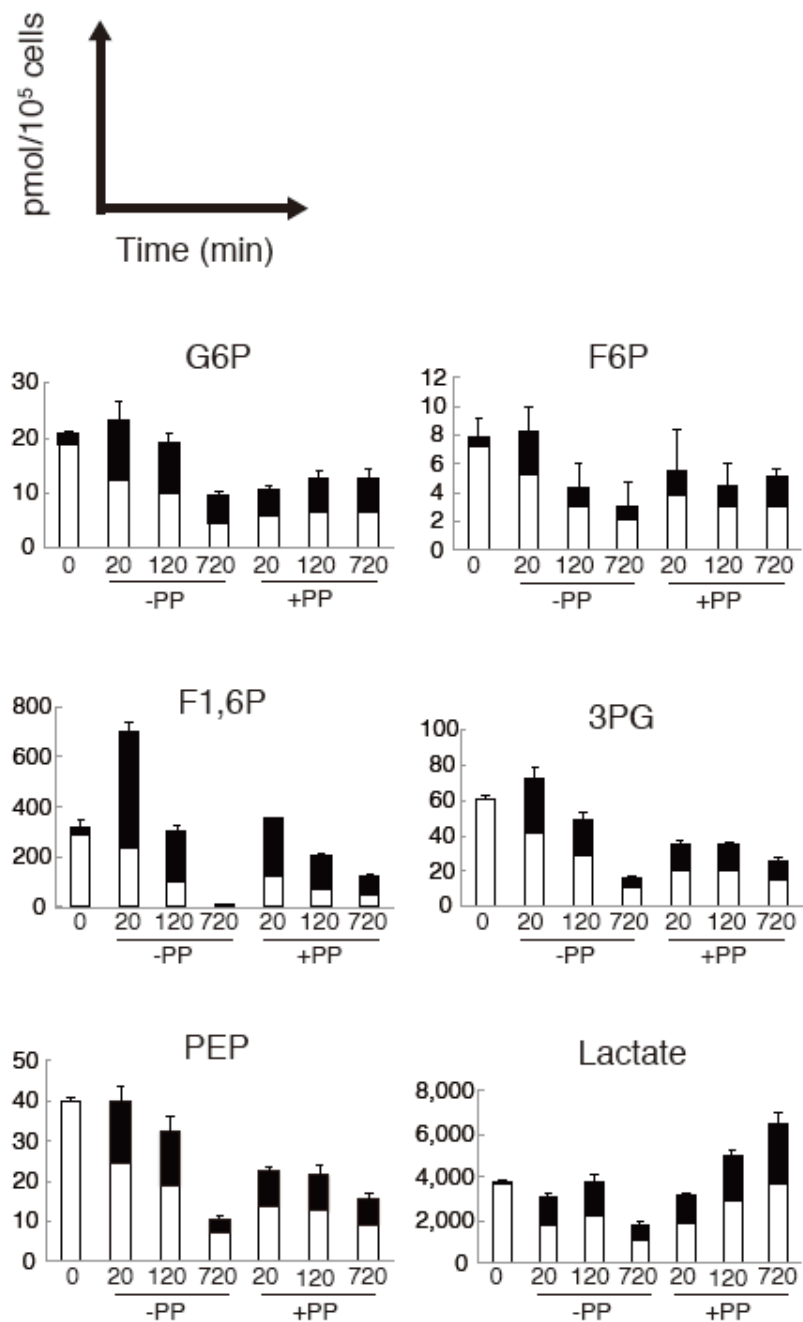


図 20 通常環境下の心臓線維芽細胞では解糖系が活性化している

代謝フラックス解析 (図 19) の解糖系中間代謝産物の結果。グラフは左から順に 0、20、120、720 分のタイムポイントを示し、左が DMSO 処理群 (-PP)、右が PP 処理群(+PP)である。¹²C の質量 (白色)、¹³C の質量 (黒色) の定量値を示す (n=3)。Glucose-6-phosphate (G6P)、Fructose 6-phosphate (F6P)、Fructose 1,6-diphosphate (F1,6P)、3-phosphoglycerate (3PG)、Phosphoenolpyruvate (PEP)。

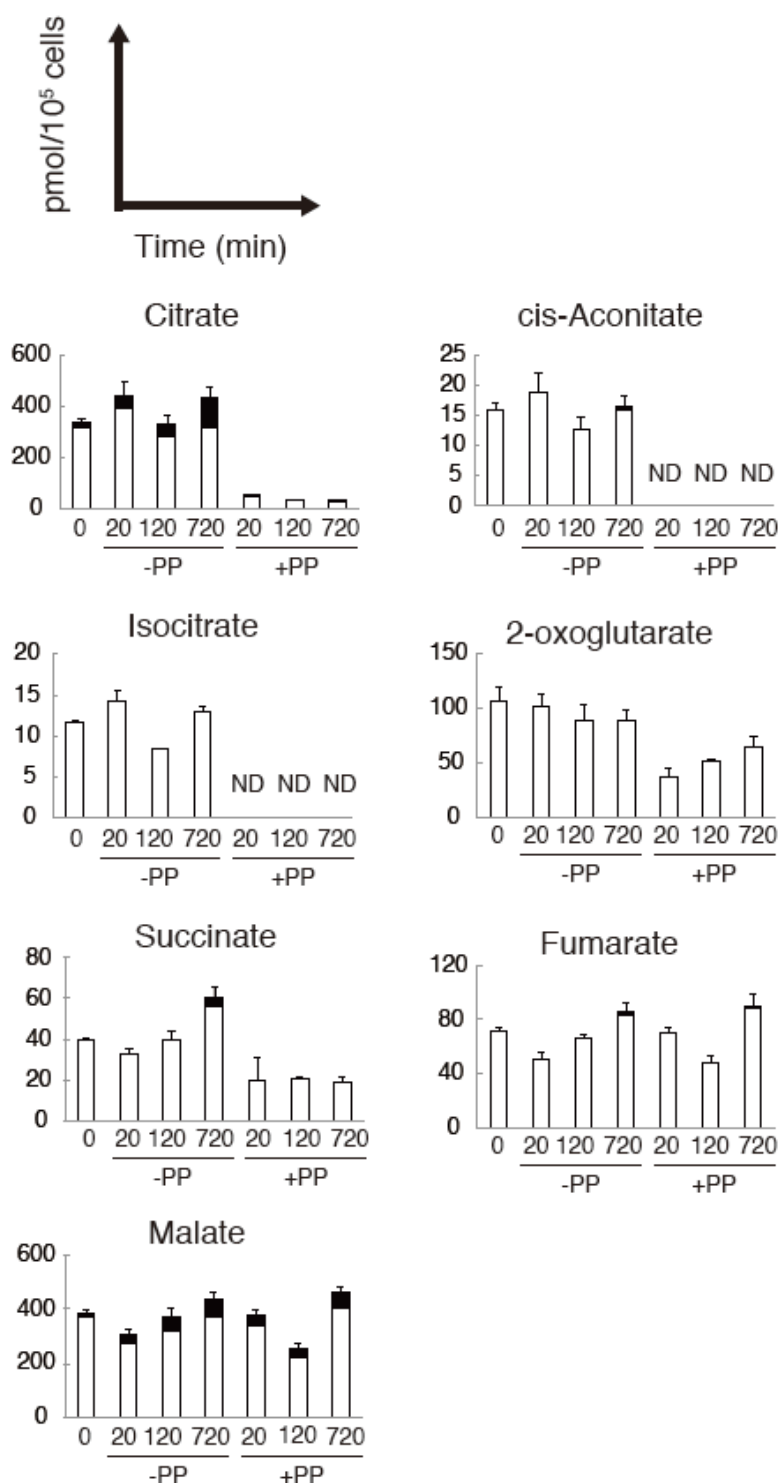


図 21 PP は TCA 回路前半の中間代謝産物の枯渇を引き起こす

代謝フラックス解析 (図 19) の TCA 回路中間代謝産物の結果。グラフは左から順に 0、20、120、720 分のタイムポイントを示し、左が DMSO 処理群 (-PP)、右が PP 処理群 (+PP) である。¹²C の質量 (白色)、¹³C の質量 (黒色) の定量値を示す (n=3)。

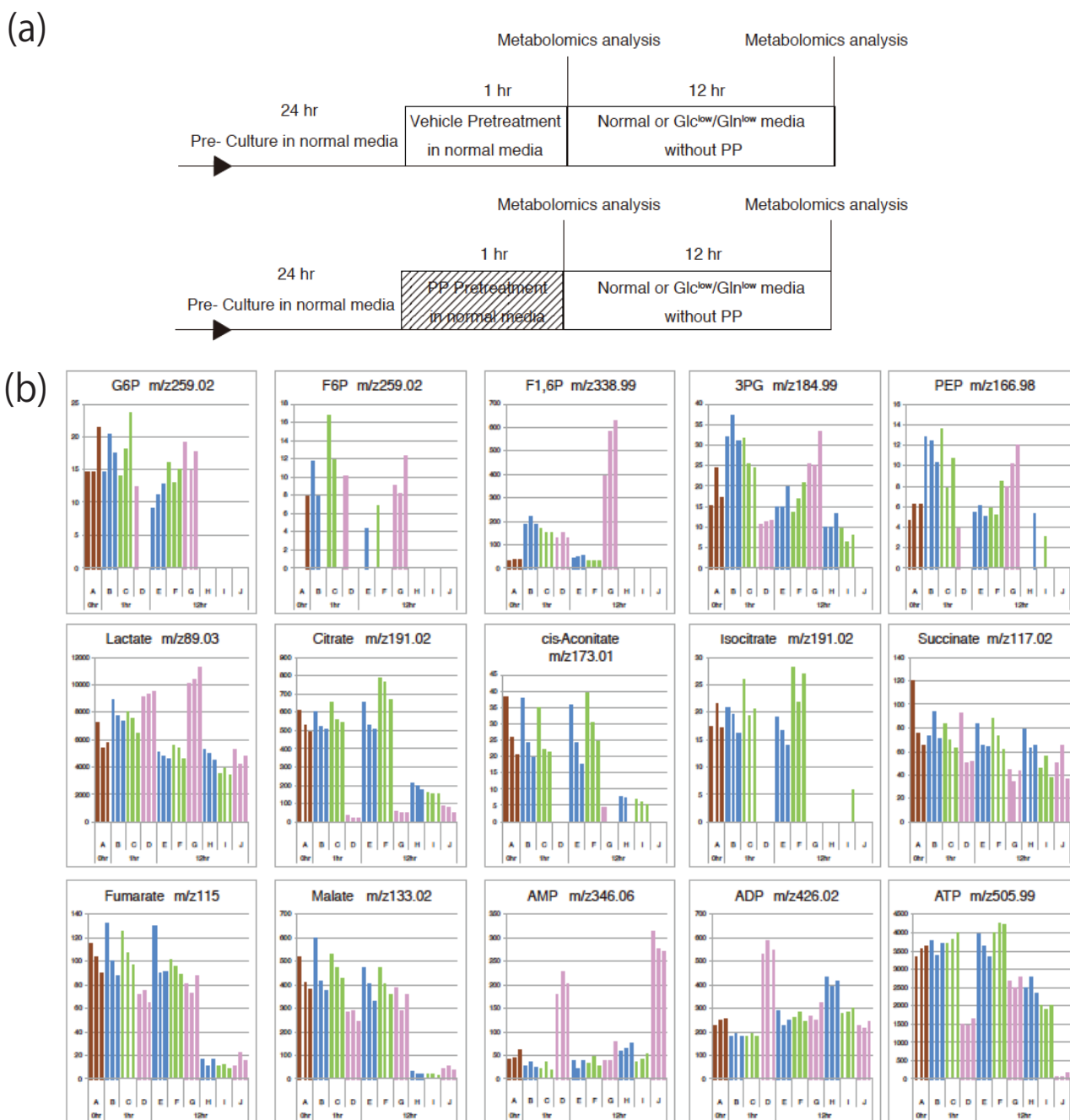


図 22 PP 処理済みの細胞を栄養飢餓環境に曝した際の中間代謝産物の蓄積量

(a) メタボローム解析実験の模式図。通常環境下で 1 時間 DMSO 処理又は PP 処理 (87nM) を行った後に、DMSO 及び PP を取り除く。その後、通常環境又は栄養飢餓環境下で 12 時間培養し、メタボローム解析を行った。(b) 図 22a の実験結果。解糖系(図 23)、TCA 回路(図 24) 及び ATP 関連(図 26)の中間代謝産物の蓄積量を示す。A: 0 時間、B: 1 時間無処理、C: 1 時間 DMSO 処理、D: 1 時間 PP (87nM) 処理、E: 1 時間無処理+通常環境で 12 時間、F: 1 時間 DMSO 処理+通常環境で 12 時間、G: 1 時間 PP 処理+通常環境で 12 時間、H: 1 時間無処理+栄養飢餓環境で 12 時間、I: 1 時間 DMSO 処理+栄養飢餓環境で 12 時間、J: 1 時間 PP 処理+栄養飢餓環境で 12 時間 (n=3)。縦軸は pmol/10⁵cells。

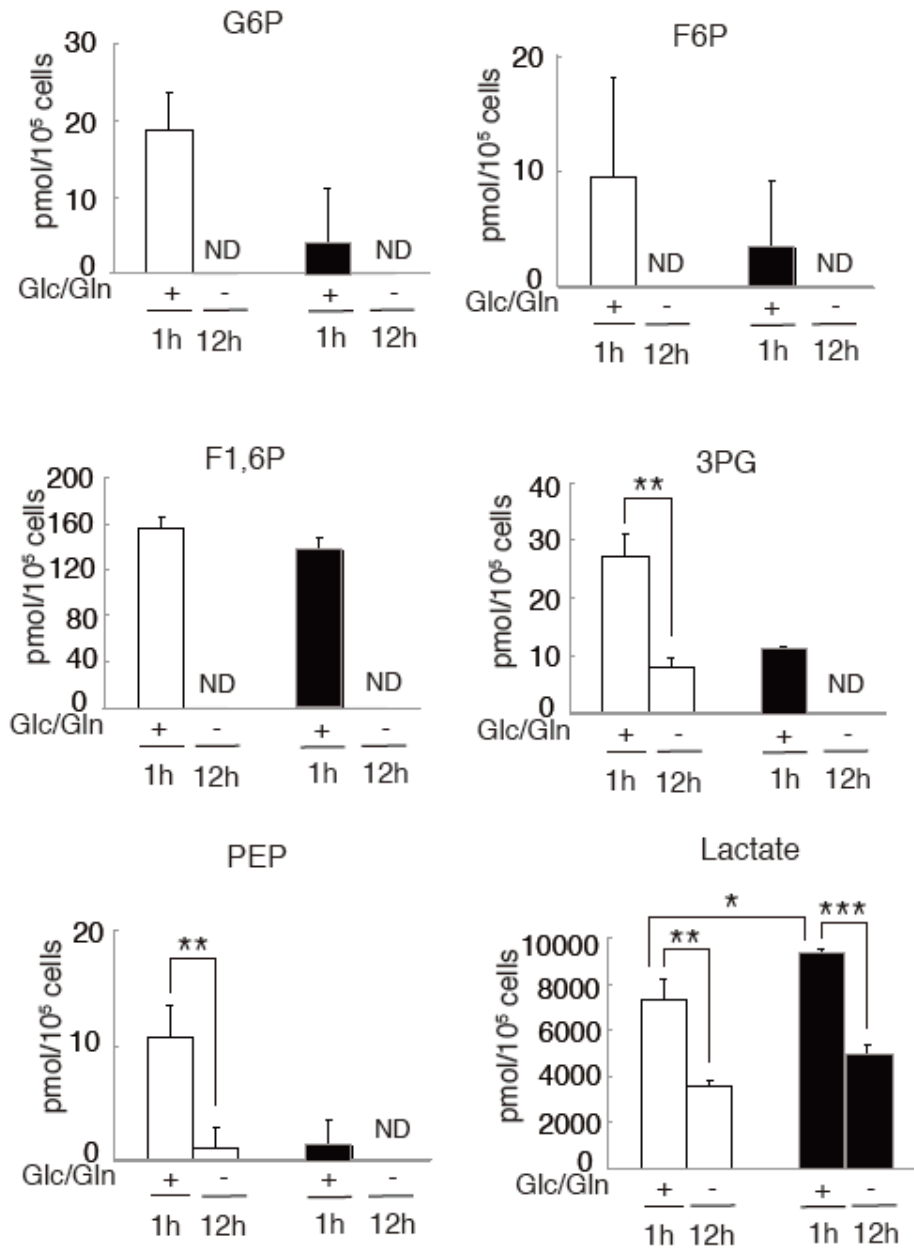


図 23 栄養飢餓環境の心臓線維芽細胞では解糖系の中間代謝産物が枯渇する

図 22 で示した解糖系の中間代謝産物の結果。DMSO 前処理 (白)、PP 前処理 (黒) で示す。左から順に「1 時間通常環境で DMSO 処理」、「1 時間通常環境で DMSO 処理+栄養飢餓環境で 12 時間」、「1 時間通常環境で PP 処理」、「1 時間通常環境で PP 処理+栄養飢餓環境で 12 時間」(n=3)。N.D.: Not Detected、★: p<0.05、★★: p<0.01、★★★: p<0.001

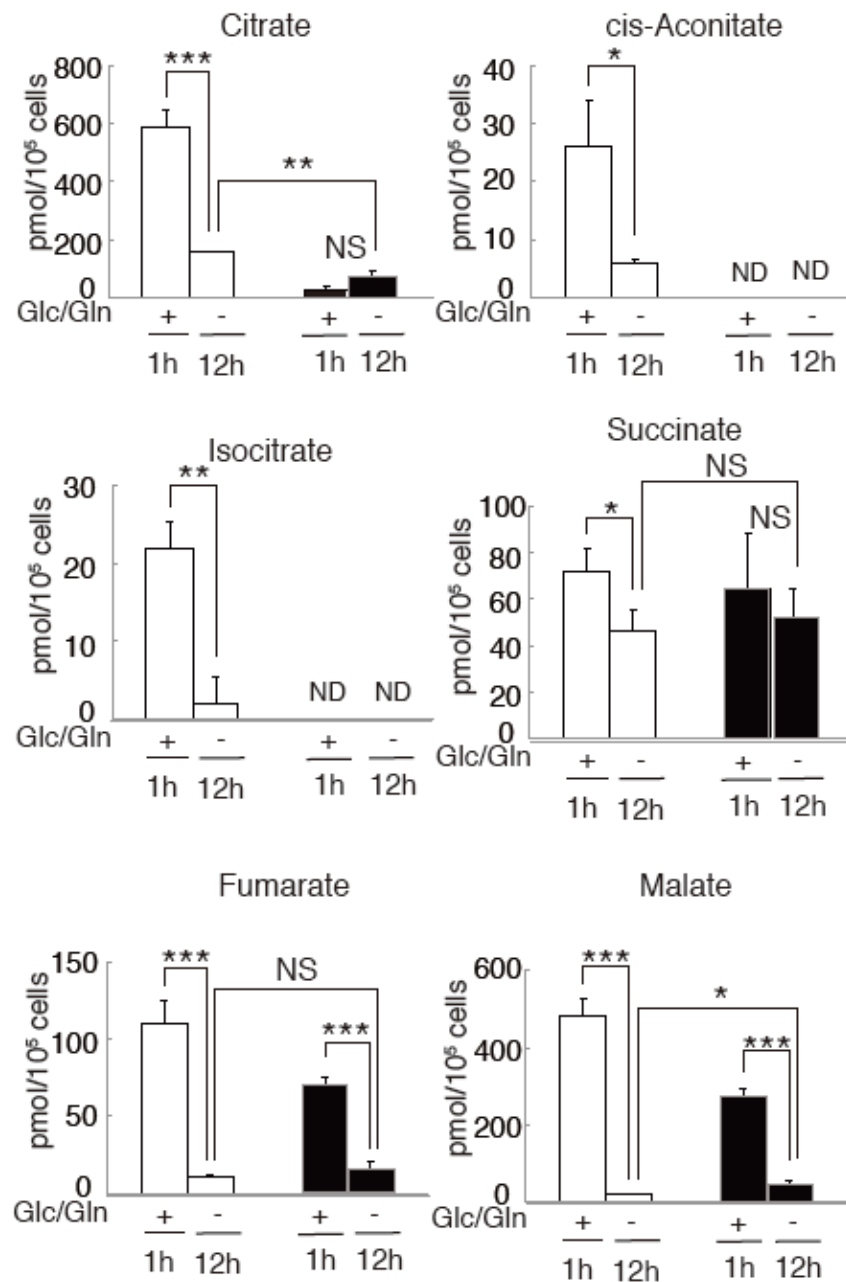


図 24 PP 処理済みの心臓線維芽細胞は栄養飢餓環境に曝されると、TCA 回路の中間代謝産物が更に減少する

図 22 で示した TCA 回路の中間代謝産物の結果。DMSO 前処理(白)、PP 前処理(黒)で示す。左から順に「1 時間通常環境で DMSO 処理」、「1 時間通常環境で DMSO 処理+栄養飢餓環境で 12 時間」、「1 時間通常環境で PP 処理」、「1 時間通常環境で PP 処理+栄養飢餓環境で 12 時間」(n=3)。N.D.: Not Detected、Not significant difference: NS、*:p<0.05、**: p<0.01、***: p<0.001

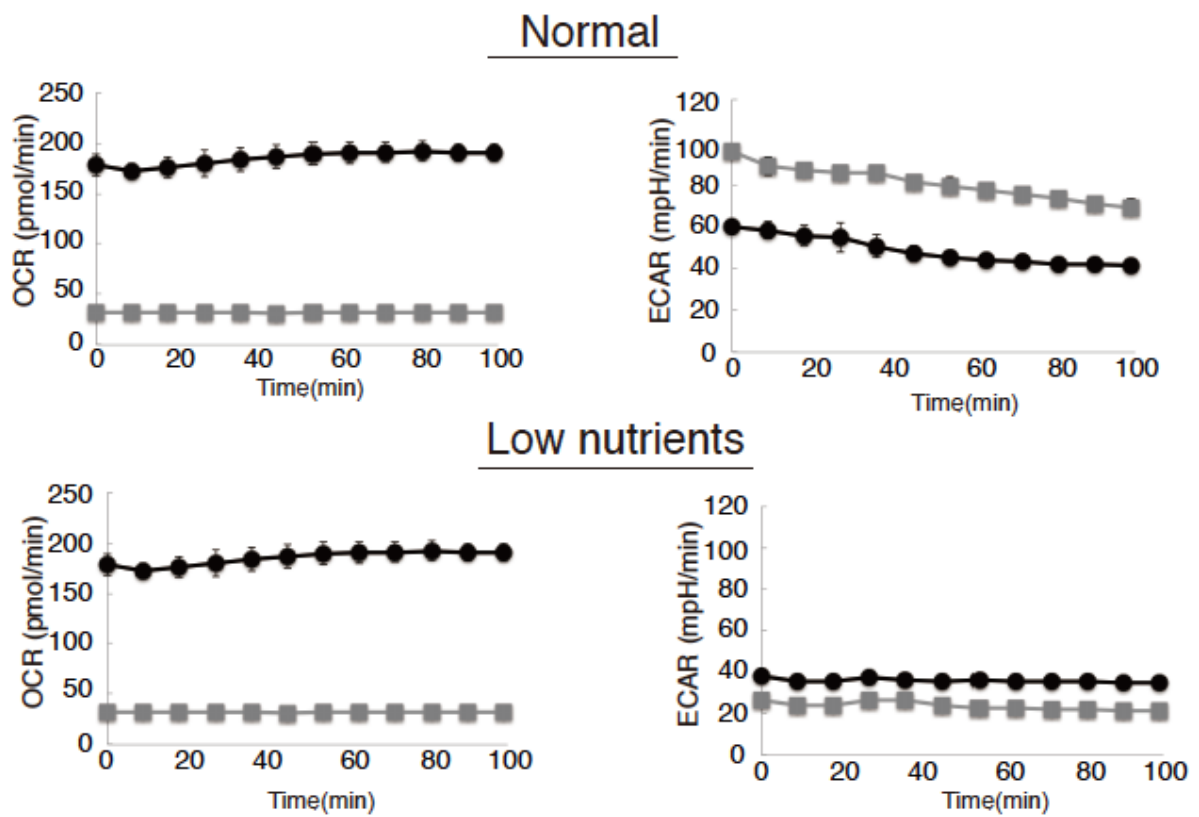


図 25 PP 処理後に栄養飢餓環境下で培養した心臓線維芽細胞では解糖系と TCA 回路の両方が阻害される

通常環境下で 1 時間 DMSO 処理 (黒線) 又は PP 処理 (87nM) (灰色線) を行った後に DMSO と PP を取り除く。その後、通常環境又は栄養飢餓環境で 1 時間平衡化してから OCR と ECAR を XF96 Flux analyzer で調べた (n=3)。

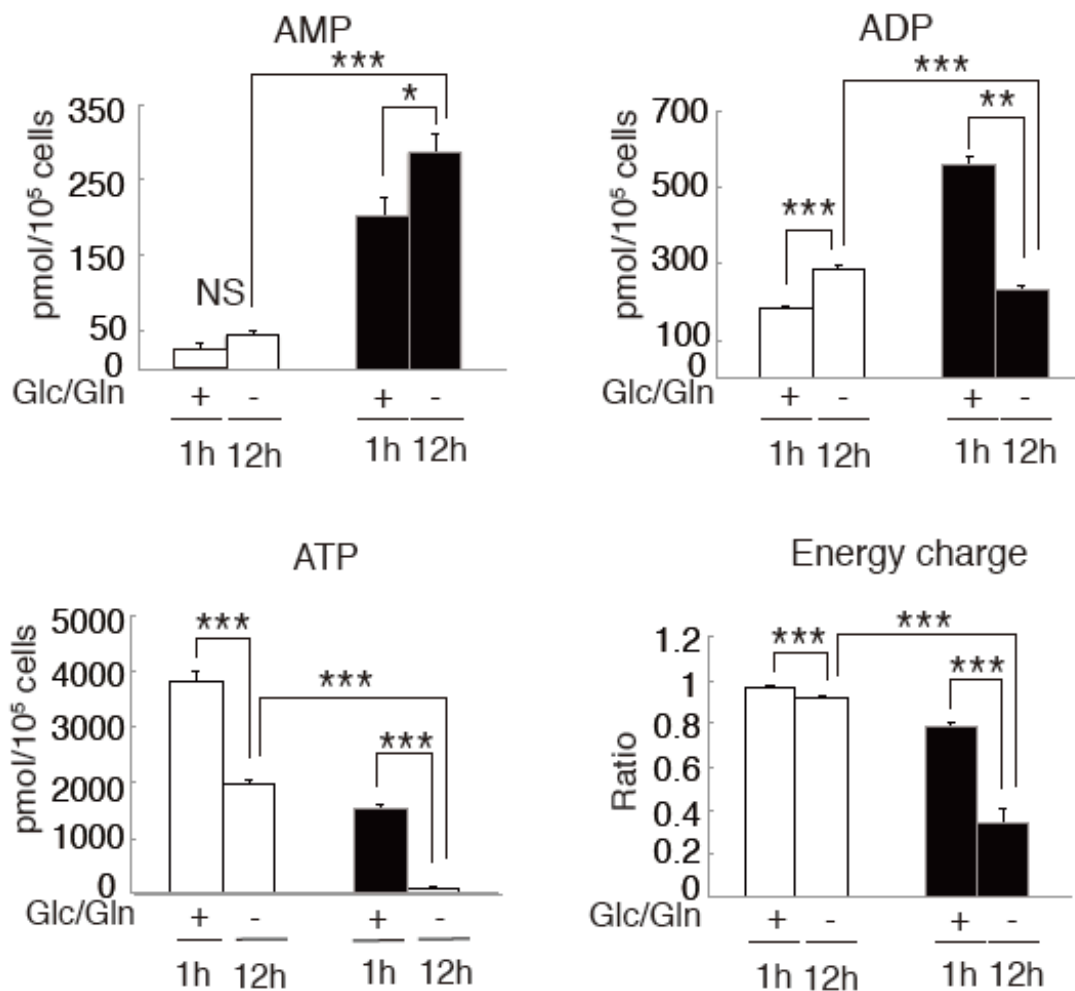


図 26 PP 処理済みの心臓線維芽細胞は栄養飢餓環境に曝されると著しいエネルギーチャージの減少が生じる

図 22 で示した ATP 関連の中間代謝産物の結果。DMSO 前処理(白)、PP 前処理(黒)で示す。左から順に「1 時間通常環境で DMSO 処理」、「1 時間通常環境で DMSO 処理+栄養飢餓環境で 12 時間」、「1 時間通常環境で PP 処理」、「1 時間通常環境で PP 処理+栄養飢餓環境で 12 時間」(n=3)。エネルギーチャージは $([ATP]+1/2[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$ で計算した。Not significant difference: NS、★: p<0.05、★★: p<0.01、★★★: p<0.001

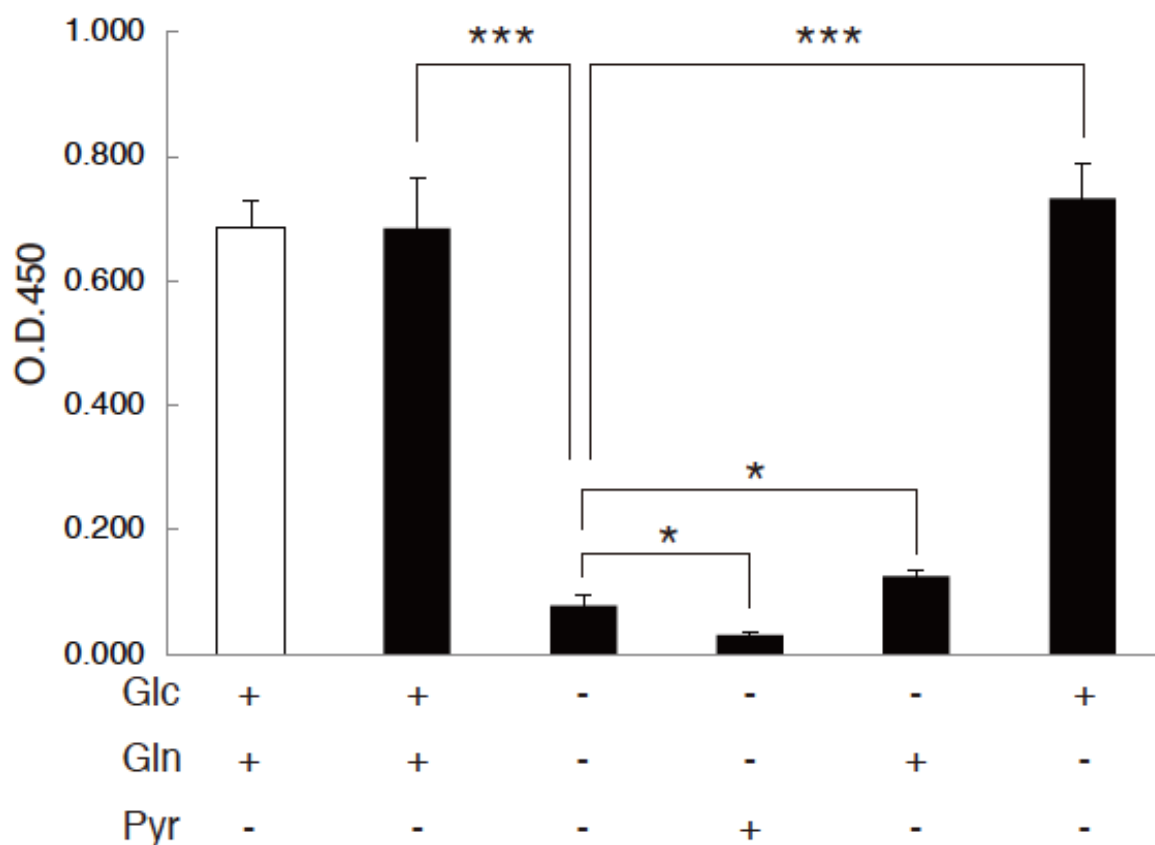


図 27 PP による栄養飢餓環境下での細胞毒性はグルコース供給によって解消できる

通常環境で 1 時間 DMSO 処理（白）または PP 処理（87nM）（黒）を行った後に DMSO と PP を取り除く。その後、グルコース（25mM）、グルタミン（4mM）、pyruvate（1mM）を栄養飢餓培地に加えた環境で 24 時間培養し、細胞数を調べた。生存細胞数は WST-8 測定によって定量し、O.D.450 で示す（n=3）。★:p<0.05、★★: p<0.01、★★★: p<0.001

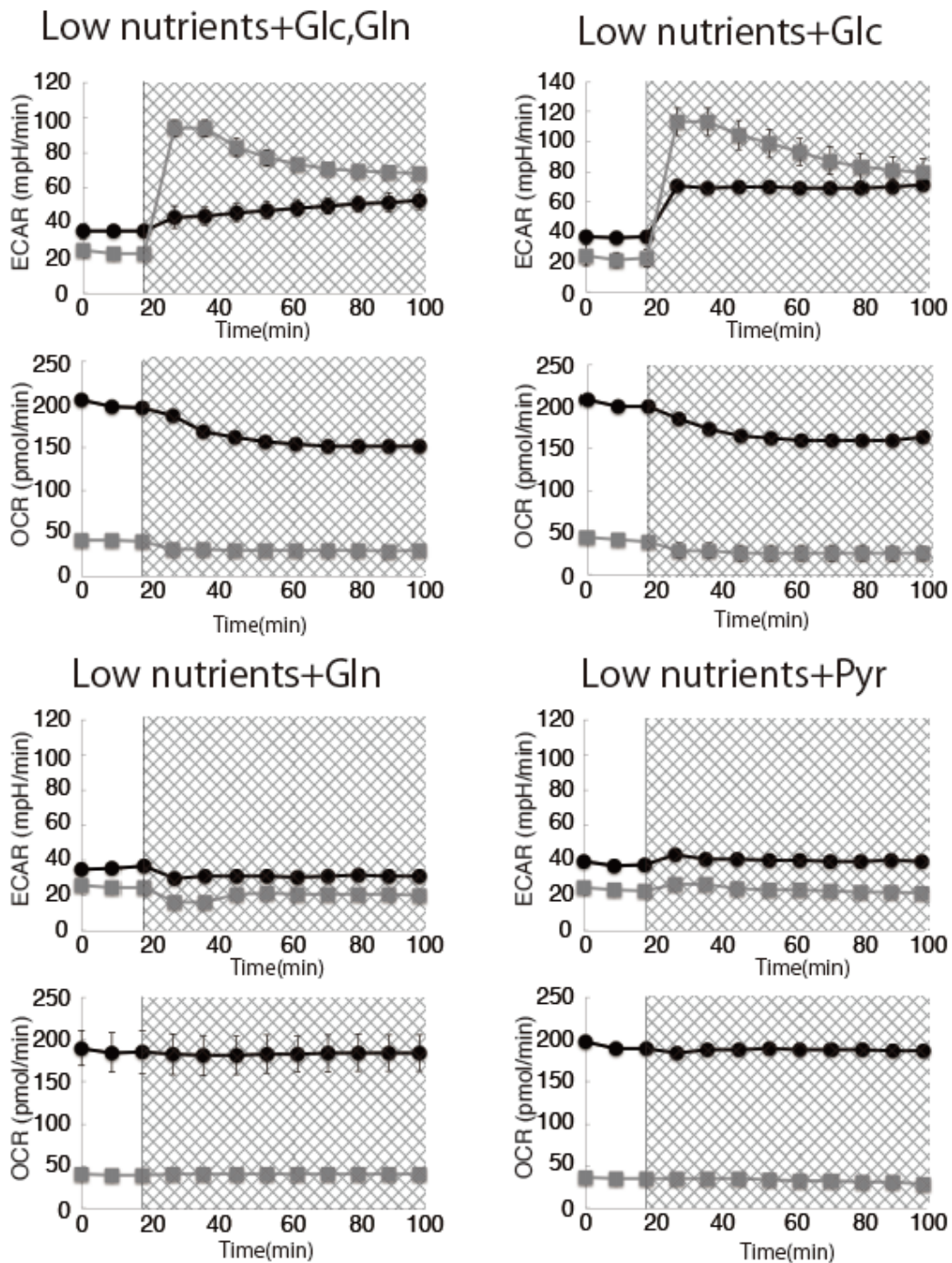


図 28 栄養飢餓環境下の PP 処理済み心臓線維芽細胞にグルコースを供給すると ECAR が回復する

通常環境で 1 時間 DMSO 処理（白）または PP 処理（87nM）（黒）を行った後に DMSO と PP を取り除く。その後、栄養飢餓環境下で 1 時間平衡化してから OCR と ECAR を XF96 Flux analyzer で調べた。グルコース(25mM)、グルタミン(4mM)、pyruvate(1mM)は OCR、ECAR の測定開始から 20 分経過してから添加し、グルコース、グルタミン、pyruvate が栄養飢餓培地に含まれている期間は斜線で示した (n=3)。

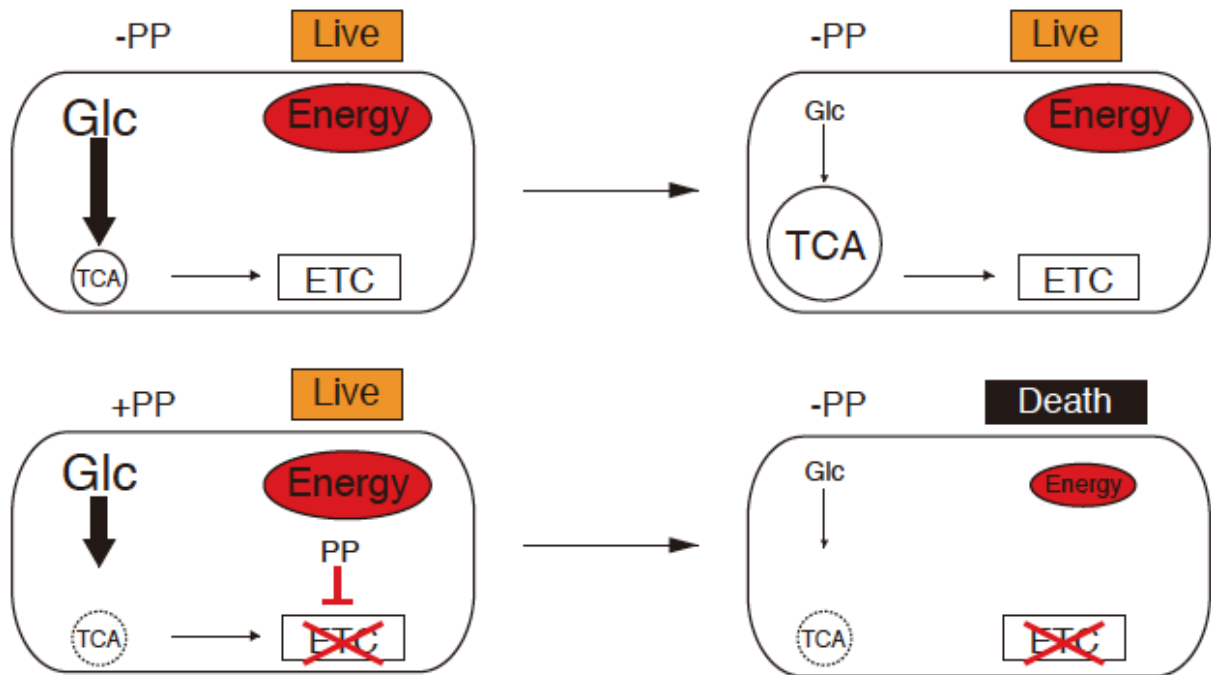


図 29 心臓線維芽細胞への PP の影響を示した模式図

PP が解糖系から TCA 回路への代謝産物の流入を遮断していることを、解糖系から TCA 回路への矢印の間にスペースを開けることで表現した。また、PP が電子伝達系の阻害をしていることを赤色の×印で表現した。模式図の詳細は本文を参照。

Electron transport chain (ETC): 電子伝達系

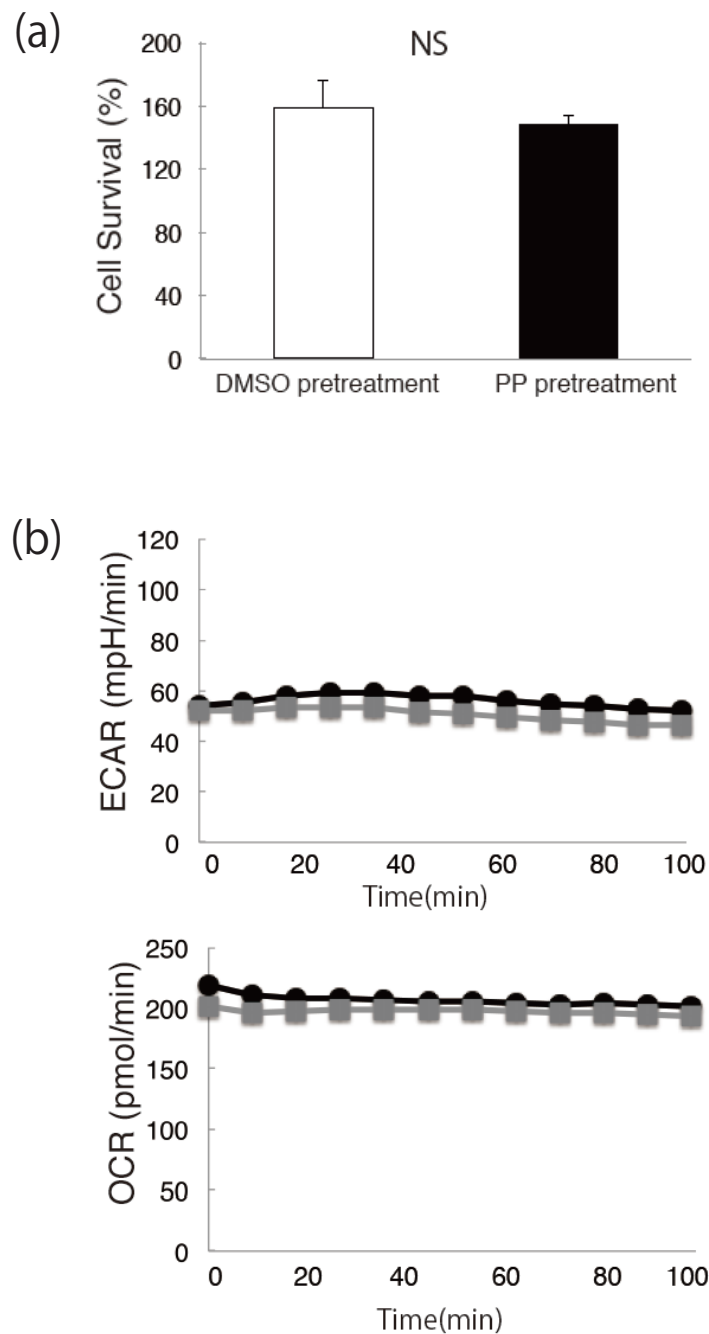


図 30 長時間通常環境で培養することで障害を受けたミトコンドリアのエネルギー代謝は回復する

通常環境下で 1 時間 DMSO 処理（黒線）または PP 処理（87nM）（灰色線）した心臓線維芽細胞を、その後 DMSO、PP を取り除き、通常環境下で 72 時間培養した。(a) 通常環境下で 72 時間培養後、栄養飢餓環境で 72 時間培養してから細胞数を調べた。栄養飢餓環境で培養 72 時間培養を開始する直前の細胞数を 100%として計算した (n=3)。(b) 通常環境下で 72 時間培養後、栄養飢餓環境で 1 時間平衡化してから OCR と ECAR を XF96 Flux analyzer で調べた (n=3)。Not significant difference: NS

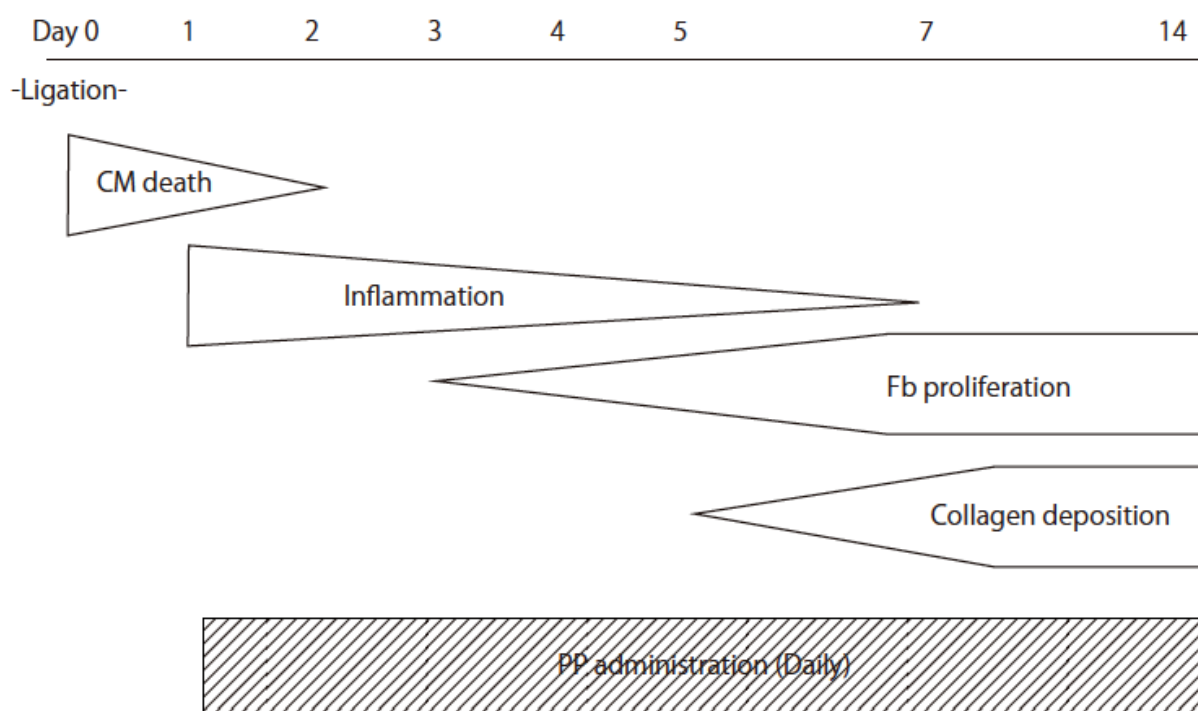


図 31 心筋梗塞モデルマウスへの PP 投与実験の模式図

閉塞後 24 時間以内に梗塞領域のほとんどの心筋細胞（CM）が死滅する。そして 3、4 日目から心臓線維芽細胞（Fb）の梗塞領域への増殖及び遊走が始まり、心臓線維芽細胞の数は 7 日目にはピークに達する。その後、梗塞領域に集まってきた心臓線維芽細胞はコラーゲンを分泌する筋線維芽細胞に分化し、梗塞領域にコラーゲンを蓄積させ、14 日目までには線維化が形成される。そこで、虚血によりほとんどの心筋細胞が壊死した心筋梗塞後 1 日目から毎日 1 回、PP を 200 μ g 経口投与し、梗塞領域での細胞増殖及び線維化レベルを調べた。

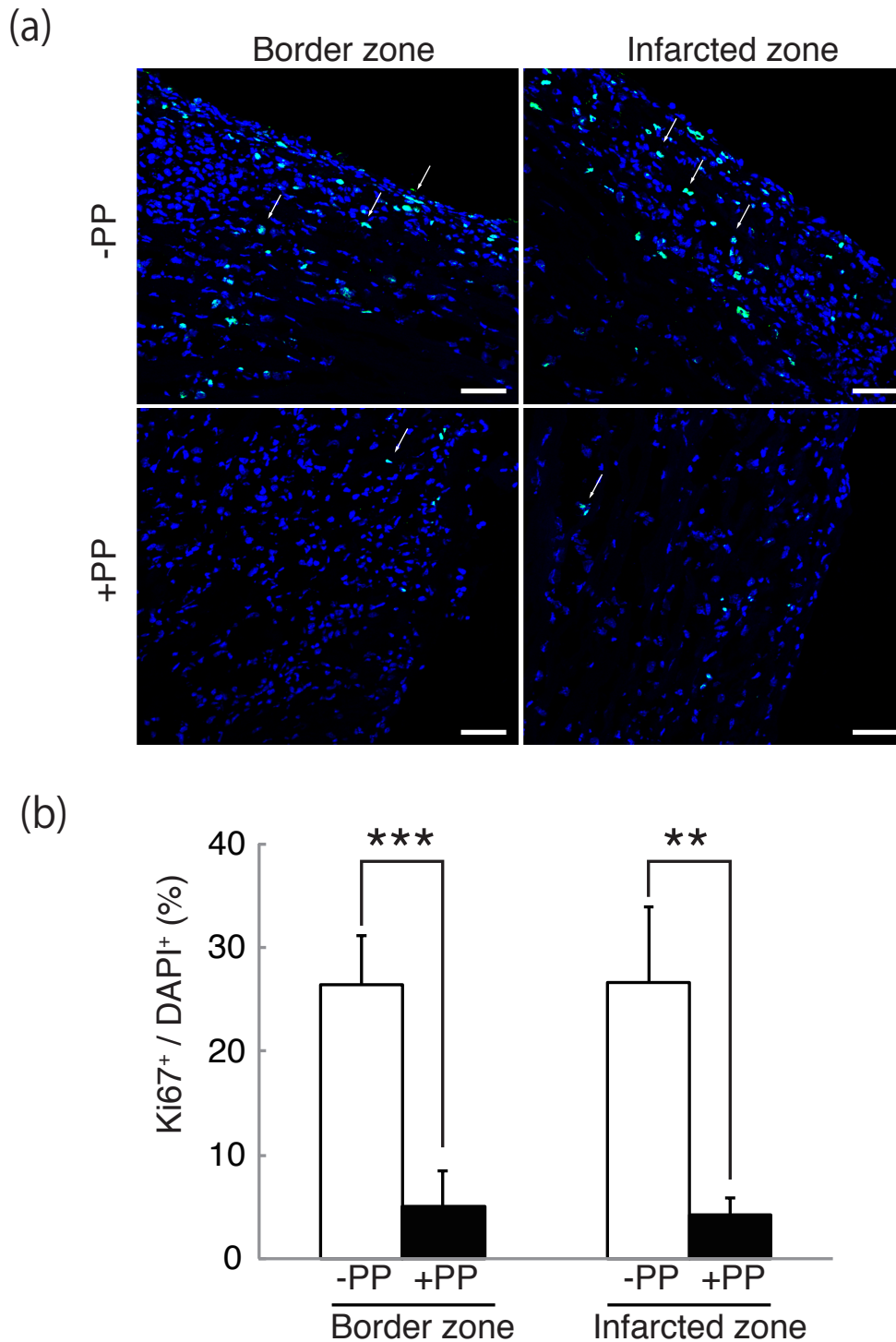


図 32 PP は梗塞領域での細胞増殖を抑制する

梗塞領域での細胞増殖に対する PP の影響。(a) 心筋梗塞後 4 日目の心臓切片で Ki67 陽性細胞（緑）と DAPI 陽性細胞（青）を免疫抗体染色で観察した。DMSO 投与群（-PP）及び PP 投与群(+PP)の境界領域と梗塞領域を観察した。矢印は Ki67 陽性かつ DAPI 陽性の細胞を示す。スケールバー: 50 μ m。(b) Ki67 陽性細胞の割合を定量した。マウス (-PP: n=3、+PP: n=4) の心臓切片で Ki67 陽性細胞をカウントし、割合を%(Ki67 陽性/DAPI 陽性)として示した。★★: p<0.01、★★★: p<0.001

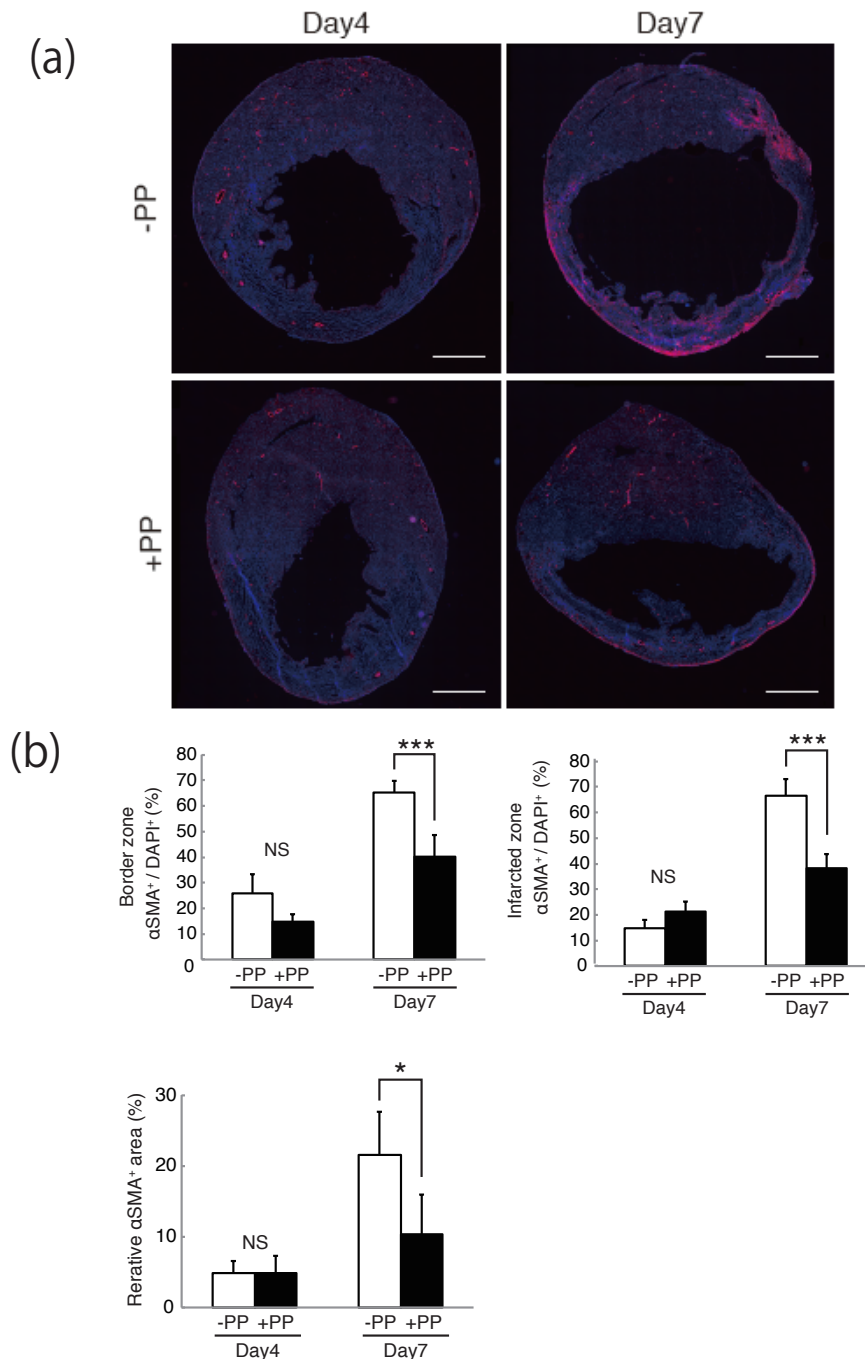


図 33 PP は心筋梗塞後の筋線維芽細胞数を減少させる

梗塞領域での α -SMA 陽性筋線維芽細胞に対する PP の影響。(a) 心筋梗塞後 4 日目と 7 日目の心臓切片で α -SMA 陽性筋線維芽細胞（赤）と DAPI 陽性細胞（青）を免疫抗体染色で観察した。DMSO 投与群 (-PP) 及び PP 投与群 (+PP) の心臓全体を観察した。スケールバー: 1mm。

(b) α -SMA 陽性筋線維芽細胞の定量化。心筋梗塞後 4 日目の心臓 (-PP: n=3、+PP: n=4) と 7 日目の心臓の (-PP: n=5、+PP: n=4) から切片を作製し、 α -SMA 陽性細胞をカウントし、割合を %(α -SMA 陽性/DAPI 陽性) として示した。また、 α -SMA 陽性の領域を %(α -SMA 陽性領域/心臓切片全体の領域) として示した。Not significant difference: NS、★: p<0.05、★★★: p<0.001

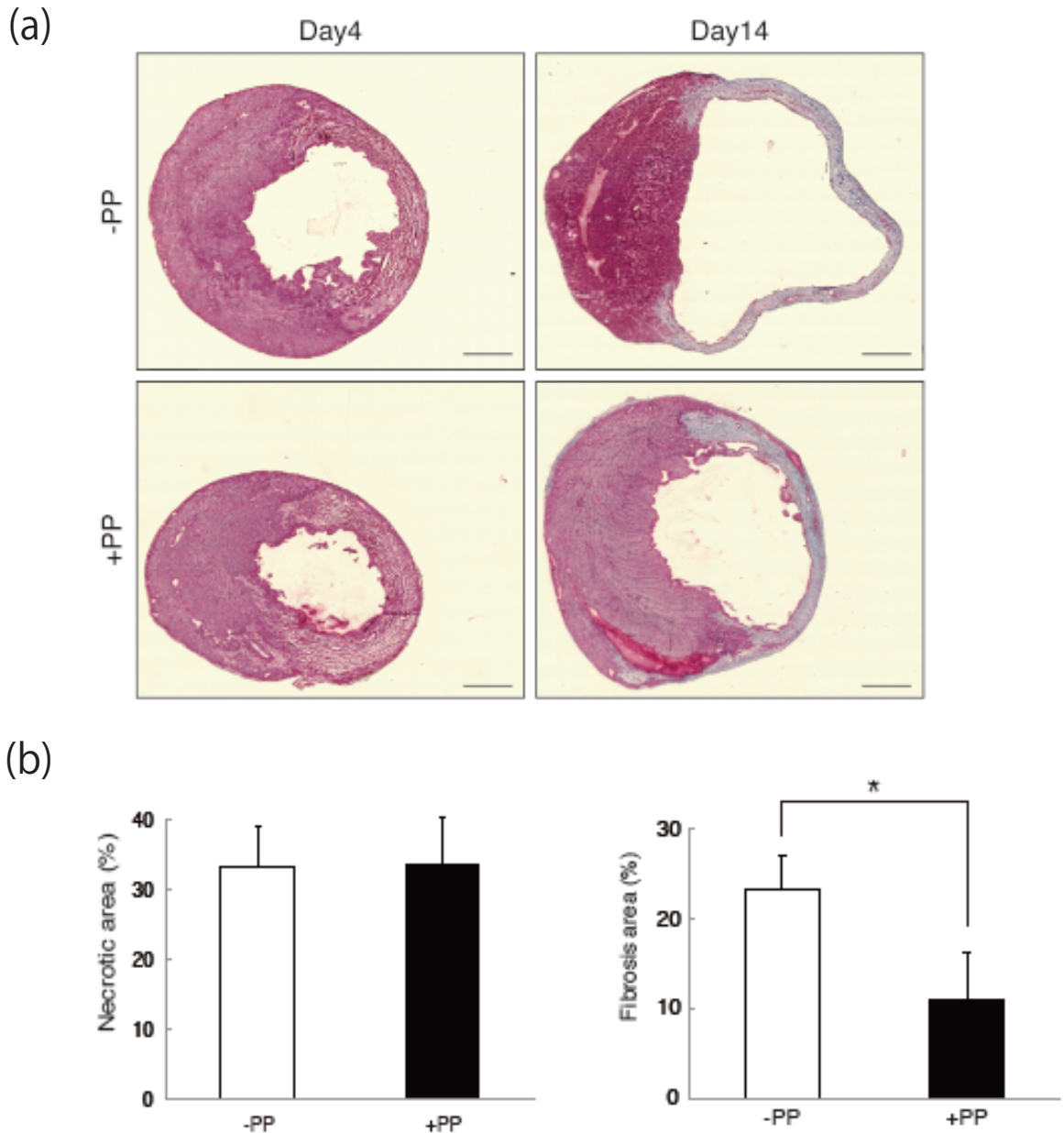


図 34 PP は心筋梗塞後の線維化領域を減少させる

(a) DMSO 投与 (-PP) または PP 投与(+PP)を行った心筋梗塞後 4 日目と 14 日目の心臓から切片を作製し、マッソントリクローム染色を行った。スケールバー: 1mm。(b) 梗塞領域と線維化領域の定量化。梗塞領域は細胞壊死の領域を定量化することで表し、%(細胞壊死の領域/心臓切片全体の領域)として示した。線維化領域はマッソントリクローム染色により青く染色された領域を測定し、%(線維化領域 (青) /心臓切片全体の領域)として示した。DMSO 投与マウス(-PP)(n=3)、PP 投与マウス (+PP)(n=4)。★:p<0.05

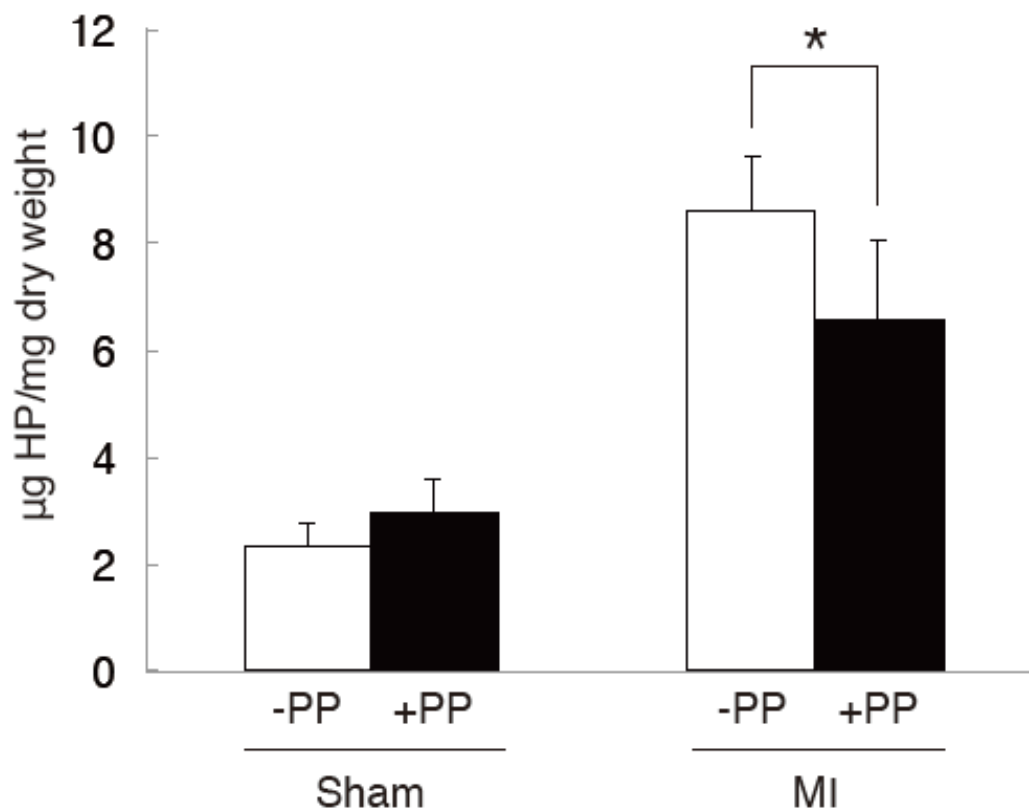


図 35 PP は心筋梗塞後の心臓へのコラーゲン蓄積を減少させる

左心室でのヒドロキシプロリン(HP)の含有量を定量した。Sham-operated マウスに DMSO 投与 (-PP) (n=3)または PP 投与(+PP)(n=3)を行った OPE 後 14 日目の左心室と、心筋梗塞 (Myocardial infarction (MI) モデルマウスに DMSO 投与 (-PP) (n=9)または PP 投与(+PP)(n=10)を行った心筋梗塞後 14 日目の左心室に含まれるヒドロキシプロリン量を測定し、μg HP/mg dry weight として示した。★:p<0.05

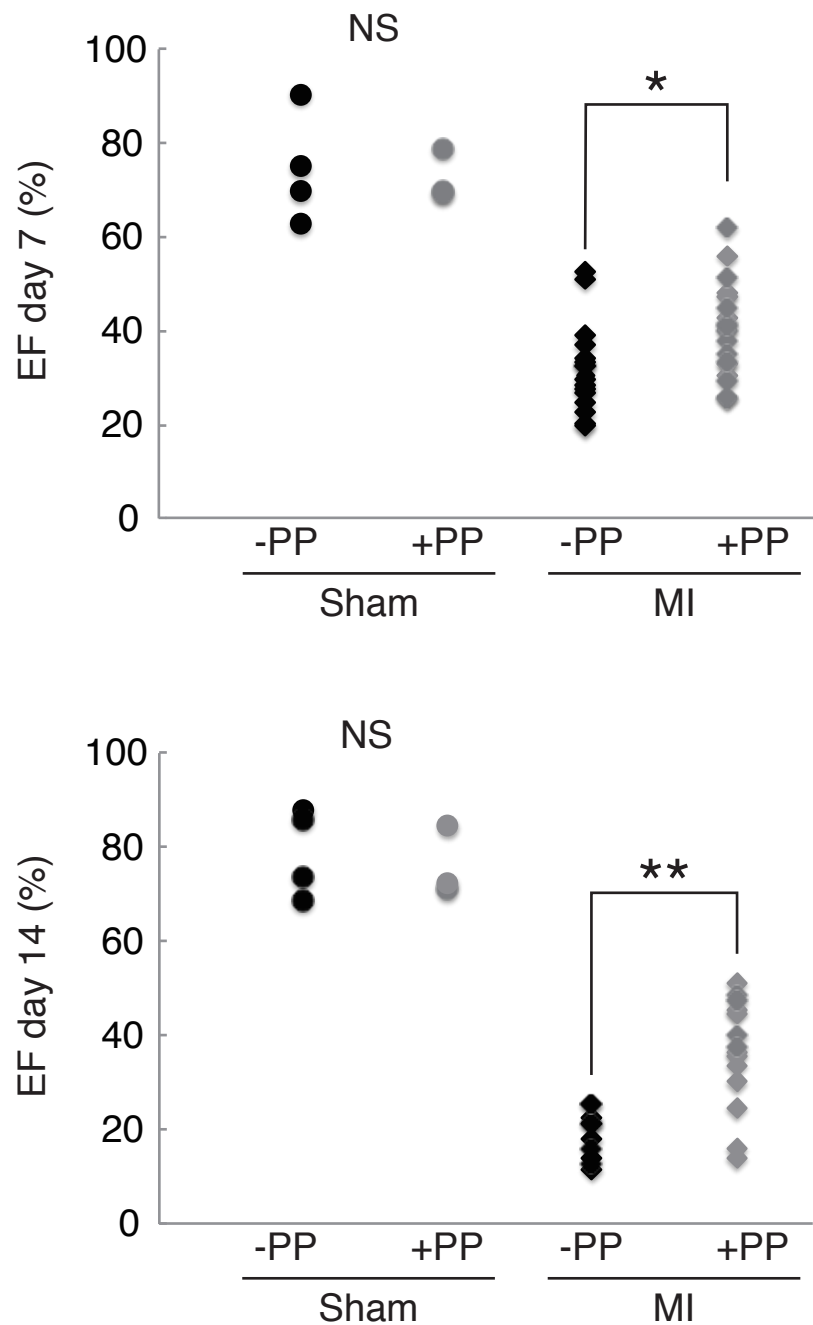


図 36 PP 投与マウスでは心筋梗塞後の心機能が改善する

Sham-operated マウスに DMSO 投与 (-PP) または PP 投与 (+PP) を行った心筋梗塞後 7 日目、14 日目の左心室と、心筋梗塞 (MI) モデルマウスに DMSO 投与 (-PP) または PP 投与 (+PP) を行った心筋梗塞後 7 日目、14 日目の左心室の駆出率(Ejection-fraction (EF)%)を心エコーで測定した。7 日目 (Sham-PP n=4、Sham+PP n=3、MI-PP n=17、MI+PP n=20)、14 日目 (Sham-PP n=4、Sham+PP n=3、MI-PP n=11、MI+PP n=14)。Not significant difference: NS、★:p<0.05、★★: p<0.01

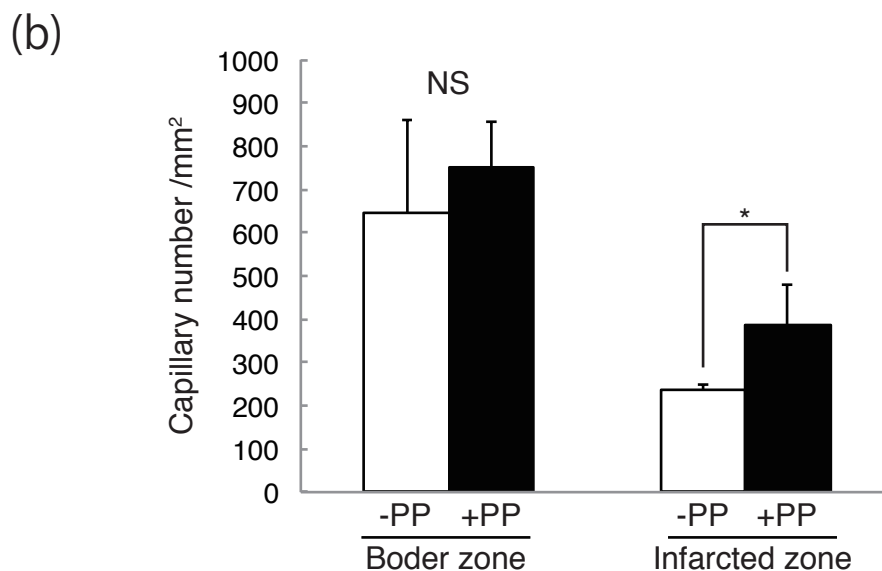
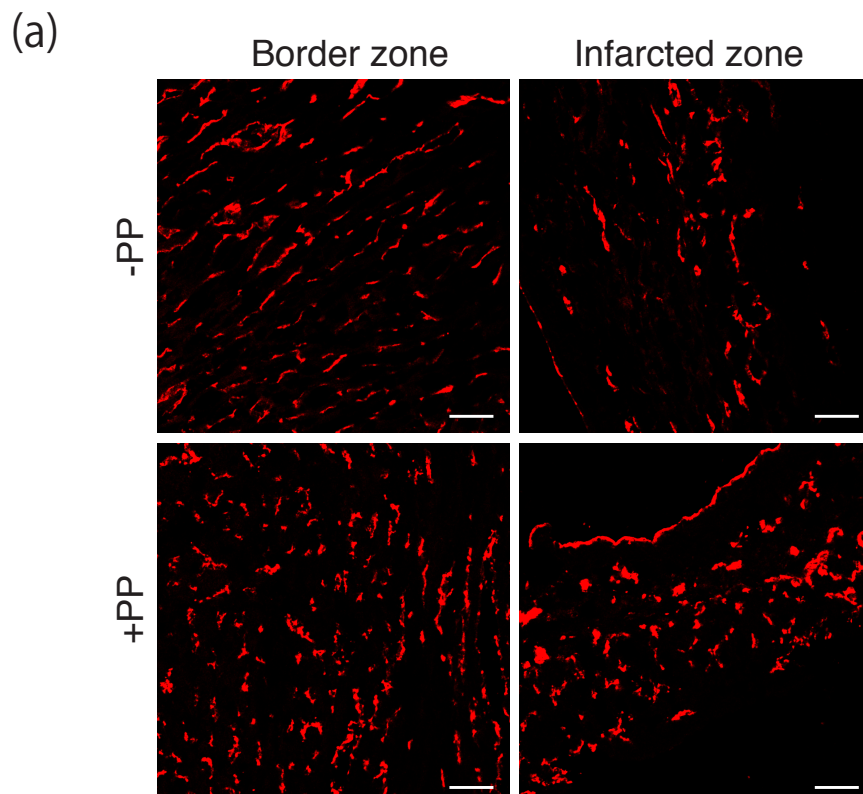


図 37 PP 投与マウスでは梗塞領域での血管密度が上昇する

血管新生に対する PP の影響。(a) CD31 陽性の毛細血管(赤)を免疫抗体染色した。DMSO 投与 (-PP) または PP 投与(+PP)を行った心筋梗塞後 14 日目の心臓の切片を観察した。スケールバー: 50 μ m。(b) CD31 陽性の毛細血管を定量した。心筋梗塞後 14 日目の心臓 (-PP: n=3、+PP: n=4) から切片を作製し、CD31 陽性の毛細血管をカウントし、(毛細血管数/測定領域 (mm^2))として示した。

8. 謝辞

本研究を行うにあたって多くの方々のご指導、ご尽力がありました。特に研究の機会を与えてくださった佐藤匠徳教授に心より感謝と敬意の意を表します。単に学位取得をさせるのではなく、私を一人前の研究者へと育てることを意識してくださりながら、5年間にわたって手厚くご指導くださりました。佐藤教授に指導していただいた5年間は非常に刺激的で、自分の能力を向上させることができたと確信しています。そして、赤沼啓志助教、高田智夫特任助教、浦山恭次特任助教には研究結果や内容について貴重な意見をいただきました。特に直接指導にあたってくださった浦山特任助教に深く感謝いたします。浦山特任助教は *in vitro* 実験での重要な発見や *in vivo* の実験系の立ち上げを行ってくださいました。浦山特任助教の手助けがなければ、本研究の前進は無かったと確信しております。

山田親巨博士には修士課程の間、*in vivo* 実験の技術を厳しく、そして温かくご指導して頂きました。本研究は山田博士からご指導いただいた技術があったからこそ開始することができました。また、本研究の遺伝子発現解析や¹³C代謝フラックス解析、メタボロームデータの分析は現高木研究室の佐伯恭平くんが主体的に行ってくれました。佐伯くんと毎日のように議論をし、励まし合い、お互いに高め合った日々は、私を何倍にも成長させてくれました。

さらに共同研究を行った東京大学の北潔教授にはミトコンドリアを使った生化学的な実験手法を指導していただき、慶応義塾大学の曾我朋義教授にはメタボローム解析を行っていただきました。京都大学の森和俊教授には ATF6 欠損マウスを快く提供していただきました。大阪大学の高島成二教授には XF Flux analyzer 実験を行わせていただき、浜松医科大学の矢尾育子准教授には質量顕微鏡での解析を行っていただきました。また、本学の河野研究室の方々にはいつも実験の助言、助力をいただきました。この場を借りて、深く感謝します。

佐藤研究室の方々には、研究のディスカッションだけでなく、日々の生活を楽しく過ごさせて頂いたことに深く感謝します。特に同期の佐藤洋一君、林祐一君、幸得友美さん、そして秘書の高橋遼子さんには大きな不安と困難を伴った大学院での研究生生活を様々な形で支えて励ましていただきました。皆さんと共有した時間は私にとって大切な財産です。感謝の言葉ありません。

最後にこの5年間支えてくれた家族を含めた全ての方々に、そしてこれからも支え合っていく全ての人に感謝いたします。

9. 参考文献

Anastasiou, D., Poulogiannis, G., Asara, J.M., Boxer, M.B., Jiang, J.K., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A.T., Locasale, J.W., Auld, D.S., *et al.* (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 334, 1278-1283.

Ashrafi, G., and Schwarz, T.L. (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* 20, 31-42.

Augustus, A.S., Kako, Y., Yagyu, H., and Goldberg, I.J. (2003). Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E331-339.

Avogaro, A., Nosadini, R., Doria, A., Fioretto, P., Velussi, M., Vigorito, C., Saccà, L., Toffolo, G., Cobelli, C., and Trevisan, R. (1990). Myocardial metabolism in insulin-deficient diabetic humans without coronary artery disease. *Am J Physiol* 258, E606-618.

Bauer, D.E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C., and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* 24, 6314-6322.

Beck, J.W., Saavedra, D., Antell, G.J., and Tejeiro, B. (1959). The treatment of pinworm infections in humans (enterobiasis) with pyrvinium chloride and pyrvinium pamoate. *Am J Trop Med Hyg* 8, 349-352.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107-120.

Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloëtta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., *et al.* (2008). Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab* 8, 411-424.

- Berwick, D.C., Hers, I., Heesom, K.J., Moule, S.K., and Tavaré, J.M. (2002). The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J Biol Chem* 277, 33895-33900.
- Bishop, S.P., and Altschuld, R.A. (1970a). Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *Am J Physiol* 218, 153-159.
- Bishop, S.P., and Altschuld, R.A. (1970b). Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *Am J Physiol* 218, 153-159.
- Boerner, P., Resnick, R.J., and Racker, E. (1985). Stimulation of glycolysis and amino acid uptake in NRK-49F cells by transforming growth factor beta and epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1350-1353.
- Brugmans, J.P., Thienpont, D.C., van Wijngaarden, I., Vanparijs, O.F., Schuermans, V.L., and Lauwers, H.L. (1971). Mebendazole in enterobiasis. Radiochemical and pilot clinical study in 1,278 subjects. *JAMA* 217, 313-316.
- Chowdhury, R., Yeoh, K.K., Tian, Y.M., Hillringhaus, L., Bagg, E.A., Rose, N.R., Leung, I.K., Li, X.S., Woon, E.C., Yang, M., *et al.* (2011). The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep* 12, 463-469.
- Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Wu, N., Asara, J.M., and Cantley, L.C. (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 452, 181-186.
- Cleutjens, J.P., Blankesteyn, W.M., Daemen, M.J., and Smits, J.F. (1999). The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res* 44, 232-241.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Lupiáñez, J.A., and del Río LA (1999). Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence. *Plant Physiol* 121, 921-928.
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450, 736-740.

- Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., *et al.* (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739-744.
- Deng, L., Lei, Y., Liu, R., Li, J., Yuan, K., Li, Y., Chen, Y., Liu, Y., Lu, Y., Edwards, C.K., *et al.* (2013a). Pyrvinium targets autophagy addiction to promote cancer cell death. *Cell Death Dis* 4, e614.
- Deng, L., Lei, Y., Liu, R., Li, J., Yuan, K., Li, Y., Chen, Y., Liu, Y., Lu, Y., Edwards, C.K., *et al.* (2013b). Pyrvinium targets autophagy addiction to promote cancer cell death. *Cell Death Dis* 4, e614.
- Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., and Rider, M.H. (1997). Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem* 272, 17269-17275.
- Eknayan, G. (1999). Santorio Sanctorius (1561-1636) - founding father of metabolic balance studies. *Am J Nephrol* 19, 226-233.
- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., *et al.* (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64, 3892-3899.
- Esumi, H., Lu, J., Kurashima, Y., and Hanaoka, T. (2004). Antitumor activity of pyrvinium pamoate, 6-(dimethylamino)-2-[2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)ethenyl]-1-methyl-quinolinium pamoate salt, showing preferential cytotoxicity during glucose starvation. *Cancer Sci* 95, 685-690.
- Fiehn, O., Barupal, D.K., and Kind, T. (2011). Extending biochemical databases by metabolomic surveys. *J Biol Chem* 286, 23637-23643.
- Figuerola, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., *et al.* (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18, 553-567.

Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., *et al.* (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762-765.

Garnier, A., Fortin, D., Deloménie, C., Momken, I., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551, 491-501.

Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R.B., and Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 15, 1406-1418.

Halama, A., Riesen, N., Möller, G., Hrabě de Angelis, M., and Adamski, J. (2013). Identification of biomarkers for apoptosis in cancer cell lines using metabolomics: tools for individualized medicine. *J Intern Med* 274, 425-439.

Harada, Y., Ishii, I., Hatake, K., and Kasahara, T. (2012). Pyrvinium pamoate inhibits proliferation of myeloma/erythroleukemia cells by suppressing mitochondrial respiratory complex I and STAT3. *Cancer Lett* 319, 83-88.

Hattori, K., Kajimura, M., Hishiki, T., Nakanishi, T., Kubo, A., Nagahata, Y., Ohmura, M., Yachie-Kinoshita, A., Matsuura, T., Morikawa, T., *et al.* (2010). Paradoxical ATP elevation in ischemic penumbra revealed by quantitative imaging mass spectrometry. *Antioxid Redox Signal* 13, 1157-1167.

Hitosugi, T., Kang, S., Vander Heiden, M.G., Chung, T.W., Elf, S., Lythgoe, K., Dong, S., Lonial, S., Wang, X., Chen, G.Z., *et al.* (2009). Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal* 2, ra73.

Huang, S.M., Mishina, Y.M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G.A., Charlat, O., Wiethe, E., Zhang, Y., Wiessner, S., *et al.* (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614-620.

Ieda, M. (2013). Heart regeneration using reprogramming technology. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89, 118-128.

Izuishi, K., Kato, K., Ogura, T., Kinoshita, T., and Esumi, H. (2000). Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy. *Cancer Res* 60, 6201-6207.

Javadov, S., Purdham, D.M., Zeidan, A., and Karmazyn, M. (2006). NHE-1 inhibition improves cardiac mitochondrial function through regulation of mitochondrial biogenesis during postinfarction remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1722-1730.

Jeon, S.M., Chandel, N.S., and Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 485, 661-665.

Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., and Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol* 13, 310-316.

Jones, J.O., Bolton, E.C., Huang, Y., Feau, C., Guy, R.K., Yamamoto, K.R., Hann, B., and Diamond, M.I. (2009). Non-competitive androgen receptor inhibition in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7233-7238.

Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537-548.

Junttila, M.R., and Evan, G.I. (2009). p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* 9, 821-829.

Kato, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Minegishi, Y., Nakajima, N., Miyazaki, M., and Esumi, H. (2002). Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene* 21, 6082-6090.

Katz, A.M. (1995). The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response. *Eur Heart J* 16 Suppl O, 110-114.

Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., and Tanaka, N. (2008). p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 10, 611-618.

Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70, 1469-1480.

- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3, 177-185.
- Kita, K., Hirawake, H., Miyadera, H., Amino, H., and Takeo, S. (2002). Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta* 1553, 123-139.
- Kita, K., Takamiya, S., Furushima, R., Ma, Y.C., Suzuki, H., Ozawa, T., and Oya, H. (1988). Electron-transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria. III. Composition and fumarate reductase activity of complex II. *Biochim Biophys Acta* 935, 130-140.
- Kita, K., Vibat, C.R., Meinhardt, S., Guest, J.R., and Gennis, R.B. (1989). One-step purification from *Escherichia coli* of complex II (succinate: ubiquinone oxidoreductase) associated with succinate-reducible cytochrome b556. *J Biol Chem* 264, 2672-2677.
- Kobayashi, K., Luo, M., Zhang, Y., Wilkes, D.C., Ge, G., Grieskamp, T., Yamada, C., Liu, T.C., Huang, G., Basson, C.T., *et al.* (2009). Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol* 11, 46-55.
- Kornberg, H. (2000). Krebs and his trinity of cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 225-228.
- Leask, A. (2010). Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* 106, 1675-1680.
- Lloyd-Jones, D., Adams, R.J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T.B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., *et al.* (2010). Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121, e46-e215.
- Locasale, J.W., and Cantley, L.C. (2011). Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab* 14, 443-451.
- Lodge-Patch, I. (1951). The ageing of cardiac infarcts, and its influence on cardiac rupture. *Br Heart J* 13, 37-42.

- Lopaschuk, G.D., Witters, L.A., Itoi, T., Barr, R., and Barr, A. (1994). Acetyl-CoA carboxylase involvement in the rapid maturation of fatty acid oxidation in the newborn rabbit heart. *J Biol Chem* 269, 25871-25878.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 145, 732-744.
- Ma, X.M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 307-318.
- Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., *et al.* (2009). Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361, 1058-1066.
- Mathupala, S.P., Ko, Y.H., and Pedersen, P.L. (2009). Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol* 19, 17-24.
- Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., and Hwang, P.M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312, 1650-1653.
- Mazurek, S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 969-980.
- Meric-Bernstam, F., and Gonzalez-Angulo, A.M. (2009). Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 27, 2278-2287.
- Michelakis, E.D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., Maguire, C., Gammer, T.L., Mackey, J.R., Fulton, D., *et al.* (2010). Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med* 2, 31ra34.
- Mohanti, B.K., Rath, G.K., Anantha, N., Kannan, V., Das, B.S., Chandramouli, B.A., Banerjee, A.K., Das, S., Jena, A., Ravichandran, R., *et al.* (1996). Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35, 103-111.

Morgan, E.E., Rennison, J.H., Young, M.E., McElfresh, T.A., Kung, T.A., Tserng, K.Y., Hoit, B.D., Stanley, W.C., and Chandler, M.P. (2006). Effects of chronic activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha or high-fat feeding in a rat infarct model of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1899-1904.

Nahmias, C., Hanna, W.T., Wahl, L.M., Long, M.J., Hubner, K.F., and Townsend, D.W. (2007). Time course of early response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients with 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med* 48, 744-751.

Neglia, D., De Caterina, A., Marraccini, P., Natali, A., Ciardetti, M., Vecoli, C., Gastaldelli, A., Ciociaro, D., Pellegrini, P., Testa, R., *et al.* (2007). Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H3270-3278.

Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., *et al.* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807-1812.

Pfeffer, M.A., McMurray, J.J., Velazquez, E.J., Rouleau, J.L., Køber, L., Maggioni, A.P., Solomon, S.D., Swedberg, K., Van de Werf, F., White, H., *et al.* (2003). Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 349, 1893-1906.

Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J.D., and Srivastava, D. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485, 593-598.

Ramanathan, A., and Schreiber, S.L. (2009). Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22229-22232.

Rambold, A.S., Kostecky, B., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Fuse or die: Shaping mitochondrial fate during starvation. *Commun Integr Biol* 4, 752-754.

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.

- Rathmell, J.C., Fox, C.J., Plas, D.R., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M., and Thompson, C.B. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol* 23, 7315-7328.
- Recchia, F.A., McConnell, P.I., Bernstein, R.D., Vogel, T.R., Xu, X., and Hintze, T.H. (1998). Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res* 83, 969-979.
- Rengo, G., Cannavo, A., Liccardo, D., Zincarelli, C., de Lucia, C., Pagano, G., Komici, K., Parisi, V., Scala, O., Agresta, A., *et al.* (2013). Vascular endothelial growth factor blockade prevents the beneficial effects of β -blocker therapy on cardiac function, angiogenesis, and remodeling in heart failure. *Circ Heart Fail* 6, 1259-1267.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y.Z., Kumral, T., Branwood, A.W., and Grishman, A. (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol* 30, 595-602.
- Saraswati, S., Alfaro, M.P., Thorne, C.A., Atkinson, J., Lee, E., and Young, P.P. (2010). Pyrvinium, a potent small molecule Wnt inhibitor, promotes wound repair and post-MI cardiac remodeling. *PLoS One* 5, e15521.
- Schadewaldt, H. (1991). [Nutrition and individual defense--historical considerations]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 191, 302-306.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.
- Singh, D., Banerji, A.K., Dwarakanath, B.S., Tripathi, R.P., Gupta, J.P., Mathew, T.L., Ravindranath, T., and Jain, V. (2005). Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol* 181, 507-514.
- Smith, T.C., Kinkel, A.W., Gryczko, C.M., and Goulet, J.R. (1976). Absorption of pyrvinium pamoate. *Clin Pharmacol Ther* 19, 802-806.

- Soga, T., Igarashi, K., Ito, C., Mizobuchi, K., Zimmermann, H.P., and Tomita, M. (2009). Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem* 81, 6165-6174.
- Soler, N.G., Pentecost, B.L., Bennett, M.A., FitzGerald, M.G., Lamb, P., and Malins, J.M. (1974). Coronary care for myocardial infarction in diabetics. *Lancet* 1, 475-477.
- Song, K., Nam, Y.J., Luo, X., Qi, X., Tan, W., Huang, G.N., Acharya, A., Smith, C.L., Tallquist, M.D., Neilson, E.G., *et al.* (2012). Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 485, 599-604.
- Stanley, W.C., Lopaschuk, G.D., and McCormack, J.G. (1997). Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34, 25-33.
- Sugimoto, M., Hirayama, A., Robert, M., Abe, S., Soga, T., and Tomita, M. (2010). Prediction of metabolite identity from accurate mass, migration time prediction and isotopic pattern information in CE-TOFMS data. *Electrophoresis* 31, 2311-2318.
- Sunaga, N., Oriuchi, N., Kaira, K., Yanagitani, N., Tomizawa, Y., Hisada, T., Ishizuka, T., Endo, K., and Mori, M. (2008). Usefulness of FDG-PET for early prediction of the response to gefitinib in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59, 203-210.
- Tamada, M., Nagano, O., Tateyama, S., Ohmura, M., Yae, T., Ishimoto, T., Sugihara, E., Onishi, N., Yamamoto, T., Yanagawa, H., *et al.* (2012). Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 72, 1438-1448.
- Thompson, P.E., Worley, D.E., and Meisenhelder, J.E. (1962). Anthelmintic studies on pyrvinium pamoate (Povan) and other drugs in rodents, dogs, and monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 11, 89-95.
- Thorne, C.A., Hanson, A.J., Schneider, J., Tahinci, E., Orton, D., Cselenyi, C.S., Jernigan, K.K., Meyers, K.C., Hang, B.I., Waterson, A.G., *et al.* (2010). Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1 α . *Nat Chem Biol* 6, 829-836.

Tomitsuka, E., Kita, K., and Esumi, H. (2010). The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 44-49.

Tomitsuka, E., Kita, K., and Esumi, H. (2012). An anticancer agent, pyrvinium pamoate inhibits the NADH-fumarate reductase system--a unique mitochondrial energy metabolism in tumour microenvironments. *J Biochem* 152, 171-183.

Ussher, J.R., and Lopaschuk, G.D. (2008). The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 79, 259-268.

van Bilsen, M., van Nieuwenhoven, F.A., and van der Vusse, G.J. (2009). Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 81, 420-428.

van den Borne, S.W., Diez, J., Blankesteijn, W.M., Verjans, J., Hofstra, L., and Narula, J. (2010). Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nat Rev Cardiol* 7, 30-37.

van der Vusse, G.J., van Bilsen, M., and Glatz, J.F. (2000). Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res* 45, 279-293.

Vander Heiden, M.G. (2011). Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov* 10, 671-684.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2004). Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 555, 1-13.

Virag, J.I., and Murry, C.E. (2003). Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol* 163, 2433-2440.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.

Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., *et al.* (2008). Myc regulates a transcriptional

program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18782-18787.

Wolf, A., Agnihotri, S., Micallef, J., Mukherjee, J., Sabha, N., Cairns, R., Hawkins, C., and Guha, A. (2011). Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J Exp Med* 208, 313-326.

World Health Organization. Media centre. The top 10 cause of death (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>)

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* 13, 365-376.

Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K., and Lu, Z. (2011). Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 480, 118-122.

Yeung, S.J., Pan, J., and Lee, M.H. (2008). Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 65, 3981-3999.

Yu, D.H., Macdonald, J., Liu, G., Lee, A.S., Ly, M., Davis, T., Ke, N., Zhou, D., Wong-Staal, F., and Li, Q.X. (2008). Pyrvinium targets the unfolded protein response to hypoglycemia and its anti-tumor activity is enhanced by combination therapy. *PLoS One* 3, e3951.

Zak, R., and Rabinowitz, M. (1973). Metabolism of the ischemic heart. *Med Clin North Am* 57, 93-103.

厚生労働省. 性別にみた死因順位(第 10 位まで)別死亡数・死亡率(人口 10 万対)・構成割合(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suii09/deth1.html>)

参考図書

Donald Voet and Judith G.Voet. Biochemistry, 4th Edition

Leonard S. Lilly. Pathophysiology of HEART DISEAS, 5th Edition