

| | | | |
|---|--|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (医学) | 氏名 | 堀江 貴裕 |
| 論文題目 | Oxidative stress induces GLUT4 translocation by activation of PI3-K/Akt and dual AMPK kinase in cardiac myocytes (心筋細胞において酸化ストレスは PI3-K/Akt および2つの AMPK キナーゼを介して GLUT4 のトランスロケーションを誘導する) | | |
| (論文内容の要旨) 糖輸送体の一つである GLUT4 (Glucose Transporter 4) は定常状態では細胞内顆粒として細胞内に存在するが、インスリン、虚血、低酸素などの刺激に反応して細胞膜へ移動 (トランスロケーション) し、糖輸送を担う。心臓においても虚血時におけるブドウ糖の取り込みの増加は、主に GLUT4 トランスロケーションの糖輸送によることが報告されている。心臓特異的に GLUT4 を欠損させたマウスの心臓は虚血、再還流時の心機能低下が著しくまた不可逆であることから、心筋細胞における GLUT4 トランスロケーションは虚血、再還流障害に対する重要な保護機能であると考えられる。しかし、これらのメカニズムの詳細に関して多くはまだ明らかとなっておらず、この解明が今後の新たな治療法の開発につながる可能性がある。 従来、GLUT4 トランスロケーションを検出するには、超遠心法を用いて膜タンパク分画を分離する方法が用いられてきた。この方法は、完全な分離が難しいことや手技的にも煩雑であることなどの短所がある。 今回、 <i>Myc</i> タグのついた GLUT4 レポーター遺伝子(<i>GLUT4myc-GFP</i>)をレンチウイルスを用いてラット初代心筋細胞に導入し、フローサイトメトリーにより心筋細胞における GLUT4 トランスロケーションを測定する系を確立した。この方法を用いることにより、より簡便にまた定量的に GLUT4 トランスロケーションを測定することができる。 この系を用いて、酸化ストレスの一つである H ₂ O ₂ 刺激をおこなったところ GLUT4 のトランスロケーションが起こることがわかった。H ₂ O ₂ 刺激により細胞内の AMP/ATP 比が上昇し、AMPK が活性化することが知られている。心筋細胞においても H ₂ O ₂ 刺激により AMPK が活性化され、dominant-negative (DN)-AMPK を用いて AMPK の活性化を抑制することにより、GLUT4 トランスロケーションが抑制されることがわかった。AMPK の上流のキナーゼ(AMPK kinase)である LKB1 および calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) βはそれぞれ部分的に AMPK の活性化に関与し、同時に両方のキナーゼを抑制することにより、DN-AMPK と同程度の GLUT4 のトランスロケーションの抑制がみとめられた。 一方、インスリンによる GLUT4 トランスロケーションには PI3-K/Akt pathway が重要であることはすでに広く知られているため、H ₂ O ₂ 刺激による GLUT4 トランスロケーションにおいても検討したところ、DN-PI3-K および PI3-K インヒビターをもちいると Akt の活性化の抑制とともに GLUT4 トランスロケーションの抑制が見られた。DN-PI3K と DN-AMPK の GLUT4 トランスロケーションの抑制効果は相加的であり、PI3K と AMPK を同時に抑制することにより、H ₂ O ₂ 刺激による GLUT4 トランスロケーションを刺激前の状態のレベルにまで抑制することがわかった。また、別の酸化ストレスの刺激として peroxynitrate 刺激も H ₂ O ₂ 刺激と同様に GLUT4 トランスロケーションをおこすことも確認した。 これらの結果から、心筋細胞において酸化ストレスは PI3-K/Akt と LKB1 および CaMKK β の2つの AMPK キナーゼを活性化することにより GLUT4 トランスロケーシ | | | |

オンを誘導することが示された。

(論文審査の結果の要旨)

心筋細胞における GLUT4 (Glucose Transporter 4) トランスロケーションは虚血、再還流障害に対する重要な保護機能の一つである。

今回、GLUT4 レポーター遺伝子(*GLUT4myc-GFP*)を用いて、フローサイトメトリーにより GLUT4 トランスロケーションを簡便にまた定量的に測定する系を確立し、H₂O₂ 刺激による GLUT4 のトランスロケーションのメカニズムを心筋細胞において検討した。①dominant-negative (DN)-AMPK を用いて AMPK の活性化を抑制したところ、H₂O₂ 刺激による GLUT4 トランスロケーションが抑制された。②AMPK kinase の LKB1 および calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) β の DN 体は相加的に GLUT4 のトランスロケーションを抑制した。③DN-PI3-K および PI3-K 阻害薬によっても、H₂O₂ による GLUT4 トランスロケーションの抑制が部分的に認められた。④DN-PI3K と DN-AMPK により、H₂O₂ 刺激による GLUT4 トランスロケーションほぼ完全に抑制された。

これらの結果から、心筋細胞において酸化ストレスは LKB1 および CaMKK β の2つの AMPK キナーゼと、PI3-K/Akt 経路の活性化により GLUT4 トランスロケーションを誘導することが示された。

以上の研究は、心筋細胞における GLUT4 translocation の機序の解明に貢献し、酸化ストレスに対する心筋保護を介した治療開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 2 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降