

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                          |     |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 博士（ 医 学 ）                                                                                                                                                                                | 氏 名 | 西 仁 勇 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | MicroRNA-15b modulates cellular ATP levels and degenerates mitochondria via Arl2 in neonatal rat cardiac myocytes<br>(マイクロ RNA15b は新生仔ラット心筋細胞において Arl2 を介し細胞内 ATP レベルを調節し、ミトコンドリアを変性させる) |     |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                          |     |       |
| <p>マイクロ RNA(以下、miRNA 又は miR)は 15～25 個のヌクレオチドからなる一本鎖 RNA であり、標的遺伝子の mRNA を変性、あるいは翻訳抑制し遺伝子発現を負に制御している。miRNA は個体発生時の細胞増殖・分化における遺伝子制御に重要な役割を果たしており、成体においても生理機能維持や病態形成に深く関与することが諸研究により示されている。心臓においても、マイクロアレイ解析により種々の病態モデルマウスや移植時のヒトレシピエント心における miRNA の発現プロファイルが明らかにされ、特定の miRNA の心血管系における機能が遺伝子改変マウスを用いて解析されている。例えば、miR-133a 欠損マウス、miR-195 トランスジェニックマウスは心筋リモデリング、心不全を呈することが報告されている。このように miRNA は心血管系疾患の病態に深く関与していると考えられ、そのような miRNA を同定し、標的遺伝子を検索することにより、新たな病態メカニズムの解明あるいは新規診断法、治療法の開発に結びつくことが期待される。</p> <p>ミトコンドリアは心筋細胞の 40%を構成し、細胞内 ATP の大部分を生成している。心肥大、心不全といった病態において、心筋細胞内のミトコンドリアには種々の障害が生じており、ミトコンドリアが病態形成に深く関与することが示されている。また、心不全において細胞内 ATP は枯渇しており、病態の進行に関与することが示されている。このような事実は特定の miRNA が細胞内 ATP レベル、ミトコンドリア機能に影響し、病態形成に関与している可能性を示唆している。</p> <p>本研究では、まず心臓に高発現している miRNA を新生仔ラット心筋細胞にレンチウイルスベクターを用いて過剰発現させ、細胞内 ATP レベルに変化を及ぼす miRNA をスクリーニングした。その結果、miR-15b、-16、-195、-424 が細胞の生存能には影響せず、細胞内 ATP レベルを低下させることが明らかになった。これらの miRNA はその配列から同一遺伝子を標的にしていると考えられ、miR-195 トランスジェニックマウスが心不全を呈することからもミトコンドリアに影響し、病態形成に関与することが期待された。バイオインフォマティクスの手法でスクリーニングを行い、候補遺伝子の mRNA とタンパクの発現量を確認した結果、Arl2 が miR-15b の標的遺伝子の一つと判明した。Arl2 は 21kDa の GTPase であり、微小管の動態に関与している一方、ミトコンドリア内膜に存在する ADP/ATP 輸送体の ANT1 と結合している。ANT1 はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に中心的な役割を果たしてい</p> |                                                                                                                                                                                          |     |       |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>る。Arl2 を siRNA によりノックダウンしたところ miR-15 b 過剰発現と同様、細胞の生存能には影響せず細胞内 ATP レベルを低下させた。また、miR-15b あるいは Arl2 siRNA による細胞内 ATP レベルの低下は Arl2 の共発現により回復した。さらに miR-15b、-16、-195、-424 の機能を抑制したところ、Arl2 のタンパク発現量増加とともに細胞内 ATP レベルの上昇を認めたことから、miR-15b が Arl2 を介し細胞内 ATP レベルを調節しているものと考えられた。電子顕微鏡の観察において、miR-15b あるいは Arl2 siRNA は心筋細胞内のミトコンドリアを強く変性させていた。</p> <p>以上よりマイクロ RNA15b は新生仔ラット心筋細胞において Arl2 を介し細胞内 ATP レベルを調節し、ミトコンドリアを変性させるものと考えられた。</p>                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>本研究ではマイクロ RNA (miRNA、miR) と心筋代謝との関連を検索するべく、心筋細胞の ATP レベルを低下させる miRNA とその標的遺伝子の同定を試みた。心臓に高発現していると報告されている miRNA から 23 個を選び、新生仔ラット心筋細胞にレンチウイルスベクターを用いて過剰発現させ、細胞内 ATP レベルを評価した。ATP レベルを低下させた 12 個の miRNA の中で、標的遺伝子決定の上で重要な因子の一つである 2～8 番目の塩基配列 (シード配列) の一致した miR-15b、-16、-195、-424 に注目し、miR-15b を中心に研究を進めた。in silico で関連しうる標的遺伝子を検索したところ、Arl2 がその一つであった。Arl2 はミトコンドリア内膜に存在し、酸化的リン酸化過程に関わる ADP/ATP 輸送体、ANT 1 と結合する。Arl2 siRNA は miR-15b 過剰発現と同様、細胞の生存能には影響せず細胞内 ATP レベルを低下させた。miR-15b、-16、-195、-424 の機能を抑制したところ、Arl2 のタンパク発現量増加とともに細胞内 ATP レベルの上昇を認めたことから、miR-15b が Arl2 を介し細胞内 ATP レベルを調節しているものと考えられた。心筋細胞の電子顕微鏡像では、miR-15b あるいは Arl2 siRNA はミトコンドリアを強く変性させていた。</p> |
| <p>以上の研究は心筋細胞の ATP レベル調節という miRNA-15b の新たな役割の解明と関連する新規標的遺伝子の同定に貢献し、心筋代謝を考察する上での新たな知見の獲得に寄与するところが多い。</p> <p>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 22 年 2 月 10 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。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |