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、*Myc*タグのついたGLUT4レポーター遺伝子(GLUT4*myc*-GFP)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_2O_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_2O_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_2O_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_2O_2刺激によるGLUT4トランスロケーション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_2O_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_2O_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CaMKKβの２つのAMPKキナーゼを活性化することによりGLUT4トランスロケーショ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(GLUT4*myc*-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、H_2O_2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、H_2O_2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、H_2O_2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、H_2O_2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CaMKKβ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