

Title	AMP-Activated Protein Kinase Protects Cardiomyocytes against Hypoxic Injury through Attenuation of Endoplasmic Reticulum Stress.
Author(s)	寺井, 和生
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46224">https://hdl.handle.net/11094/46224</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	寺井和生
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第20103号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	AMP-Activated Protein Kinase Protects Cardiomyocytes against Hypoxic Injury through Attenuation of Endoplasmic Reticulum Stress. (AMP-activated protein kinaseは、低酸素刺激により誘導される小胞体ストレスを抑制し、心筋保護作用を示す)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎  (副査) 教授 遠山 正彌 教授 荻原 俊男

### 論文内容の要旨

#### [ 目 的 ]

ミトコンドリアは、細胞内アポトーシスシグナルにおいて中心的な役割を演じる細胞内小器官と考えられてきた。しかし、最近の報告では、小胞体やライソゾーム、ゴルジ体も、ストレス感知やアポトーシスシグナルに重要な役割を演じていることがわかってきた。特に、脳神経細胞や膵β細胞において、脳変性疾患や糖尿病の発症に小胞体ストレス反応 (unfolded protein response, UPR) が強く関与していることが報告されている。遺伝的背景の他に、虚血、低酸素、低グルコース、活性酸素などの物理化学的ストレスにより、小胞体内に異常構造タンパク質が蓄積し、小胞体ストレスとなる。小胞体ストレスに対して、細胞は、翻訳抑制、分子シャペロンによるリフォールディング、ユビキチン-プロテアソーム系による異常タンパクの分解の3つの防御機構を有しているが、持続する過剰な小胞体ストレスの際には、小胞体機能不全、アポトーシスへとつながる事になる。心筋細胞においても、小胞体は細胞内カルシウム濃度の維持や分泌・膜タンパクの合成に重要な役割を演じており、その機能不全は心疾患の病態に関与している可能性が高いと考えられる。

一方、AMP-activated protein kinase (AMPK) は、細胞内のAMP濃度が増加するさまざまなストレス(低酸素、低グルコース、運動)によって速やかに活性化される分子である。活性化AMPKは、ATPを消費する代謝経路を抑制し、脂肪酸β酸化やグルコース利用を促進してATP合成を高め、ストレス時のATP枯渇を抑制する方向へ働く。また最近では、AMPKの新たな作用として、翻訳段階を抑制し、タンパク合成率を抑制することが報告された。AMPKは、心筋虚血時の細胞障害を軽減することが報告されているが、その機序に関しては、詳細は不明である。今回我々は、培養心筋細胞を用いて、低酸素刺激が小胞体ストレスシグナルを誘導すること、及び、AMPKが翻訳抑制を介して小胞体ストレスを軽減かどうかを検討した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

Hypoxic chamberを用いてラット新生仔培養心筋細胞に低酸素刺激を加えた。低酸素刺激により小胞体ストレスマーカーであるBiP、CHOPのmRNAおよびタンパクレベルでの誘導を認めた。また小胞体特異的カスパーゼであるcaspase12の活性化を認めた。さらにそれらの上流シグナルである、ATF6、XBP1のmRNAの誘導も確認された。

次に、小胞体ストレスがアポトーシスを誘導するかどうかを確認するために、低酸素刺激後の培養心筋細胞に対して、CHOP、cleaved poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)、Hoechst の 3 重免疫染色を行った。CHOP 強陽性細胞において、cleaved PARP 染色、核の凝集を認め、アポトーシスが示唆された。また siRNA により CHOP および caspase12 をノックダウンしておくことアポトーシスは抑制された。

次に、低酸素刺激 1 時間前より AMPK を活性化する薬剤として 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) 0.5 mM を前処置しておくこと、CHOP の誘導および caspase12 の活性化の減弱を認め、ER ストレスの減弱が示唆され、MTS assay 及び CPK release の検討では、心筋障害の減弱を認めた。この結果は、AMPK dominant negative adenovirus (dn-AMPK) の導入により抑制された。また翻訳抑制に対する AMPK の標的分子の検討では、翻訳延長段階の eukaryotic elongation factor2 (eEF2) が考えられた。siRNA による eEF2kinase ノックダウンにより、AICAR の小胞体ストレス軽減効果は抑制された。

#### [ 総 括 ]

培養心筋細胞において、低酸素刺激が小胞体ストレスシグナルを誘導することがわかった。そして AICAR による AMPK の活性化は、低酸素刺激による小胞体ストレスシグナル誘導を減弱し、心筋保護効果を示した。その機序として、eEF2 を介する翻訳抑制が関与することが示唆された。

低酸素刺激以外に、酸化ストレス、ウイルス感染も小胞体ストレスを誘導することが報告されている。心筋細胞は、分裂能・再生能に乏しいため、さまざまな環境において小胞体ストレスが蓄積しやすいことが想像される。よって慢性心疾患のさまざまな病態に小胞体ストレスが関与している可能性があると考えられる。小胞体ストレス回避機構の解明は、新たな心不全治療のターゲットと成り得ると考えている。

### 論文審査の結果の要旨

物理化学的ストレスによる過剰な小胞体ストレスの際にはアポトーシスシグナルが誘導される。一方、AMP-activated protein kinase (AMPK) は、虚血などによって活性化される心筋保護分子である。今回、寺井君は AMPK が低酸素による小胞体ストレスを軽減するかどうか検討した。培養心筋細胞に低酸素刺激を加えると、小胞体ストレスマーカーの誘導が認められた。CHOP 及びカスパー 12 をノックダウンしておくことアポトーシスの抑制が認められた。次に、AMPK を活性化する薬剤 (AICAR) を前処置しておくこと小胞体ストレスの減弱、心筋傷害の減弱が認められた。翻訳抑制に対する AMPK の標的分子の検討では、eEF2 が考えられたため、eEF2kinase ノックダウンを行ったところ、AICAR の小胞体ストレス軽減効果の抑制が認められた。以上より、心筋細胞において、低酸素刺激が小胞体ストレスと成り得ることが明らかとなった。また AMPK 活性化は低酸素による小胞体ストレス誘導を減弱し保護効果を示すことが明らかとなった。その機序として、本研究者は eEF2 を介する翻訳抑制と論じた。以上より小胞体ストレス回避機構の解明は、新たな虚血性心疾患のターゲットと成り得ると思われる。よって本論文は、博士 (医学) の学位授与に値する。