The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	AMPKによる心臓微小管の動的不安定性制御の病態生理学的意義の解明
Author(s)	矢白木, 翔平
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72617
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　矢白木　翔平　　）	
論文題名	AMPKによる心臓微小管の動的不安定性制御の病態生理学的意義の解明 （ Regulation of microtubules dynamic instability by AMPK in cardiomyocytes ）

論文内容の要旨

近年、細胞内のエネルギー代謝調節因子として知られるAMPK (AMP-activated protein kinase) は、エネルギー代謝における役割に加えて細胞極性や分裂の制御により細胞形成にも関与していることが明らかとなり、注目を集めている。本研究室では、遊走細胞においてAMPKが微小管のプラス端結合タンパク質であるCLIP-170のリン酸化を介して微小管の動的不安定性を制御し、細胞極性の形成や細胞遊走に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。しかしながら、CLIP-170はAMPKの新規基質としてマウス心臓ライセートから同定したにもかかわらず、心臓でのAMPK－CLIP-170シグナルの役割は不明であった。

そこで、AMPK－CLIP-170シグナルが微小管の動的制御を介して心臓の適応機能の根幹を担い、心機能の維持に寄与しているという仮説を立て、心筋細胞におけるAMPKによる微小管の動的不安定性制御とその生理的および病態生理学的意義の解明を本研究の目的とした。

まず始めに、マウスの各発達段階における心臓でのAMPKおよびCLIP-170のリン酸化レベルを調べたところ、共に生後８週齢において顕著に増加していることを見出した。さらに、成熟マウス心筋組織においてリン酸化AMPKおよびリン酸化CLIP-170の局在を検討したところ、共に介在板に主に局在することを明らかにした。

次に、心筋細胞での微小管の動的不安定性制御に対するAMPK－CLIP-170シグナルの関与を検討するため、EGFPをN端に付加したCLIP-170を導入した心筋細胞を生細胞タイムラプスイメージングにより観察した。EGFP－CLIP-170 WTを導入した心筋細胞では、CLIP-170は微小管のプラス端の先端に位置する小さな粒状で、細胞の内側から細胞接着に向かって長軸方向に動いた。AMPK阻害剤を加えたところ、微小管の先端に結合するCLIP-170が増加し糸を引いたような形状となり、特に細胞接着部位へ集積することが確認された。また、AMPKによるリン酸化を受けないEGFP－CLIP-170 S311A mutantを導入した心筋細胞においても、同様の現象が見られた

心筋細胞は、常に拍動によるメカニカルストレスに晒されている。そこで、AMPK－CLIP-170シグナルへのメカニカルストレスの影響を検討するため、拍動を抑制した心筋細胞での解析を行ったところ、AMPKの細胞接着部位への局在が拍動により制御されていることを見出した。さらに、拍動を抑制した心筋細胞では、個々の細胞面積の拡大がみられた。この拍動抑制による細胞面積の拡大は、恒常的リン酸化変異であるCLIP-170 S311D mutantの強制発現により抑制された。また、CLIP-170 S311A mutantを強制発現した心筋細胞では、拍動を抑制せずとも細胞面積の拡大が見られた。これらのことは、メカニカルストレスが、AMPK－CLIP-170シグナルによる微小管の動的制御を介して心筋細胞の細胞面積を制御し、その恒常性に影響を与えることを示唆するものである。

最後に、AMPK－CLIP-170シグナルの生体内での生理的意義を検討するため、誘導型CLIP-170 S311A mutant心臓特異的強制発現マウスを作製した。変異タンパク質の誘導から12週経過したCLIP-170 S311Aマウスでは、コントロールと比較して心機能の有意な低下を認めたものの、組織変性は見られなかった。1年以上自然経過したCLIP-170 S311Aマウスでは、コントロールと比較して心機能の有意な低下および線維化を伴った組織変性を認めた。さらに、CLIP-170 S311Aマウスは、ドキソルビシン投与による心不全モデルの病態を悪化させ、微小管の動的制御が病態形成においても重要であることが示された。

これらの結果から、介在板におけるAMPKは、メカノセンシングの機能分子としてCLIP-170のリン酸化を介して微小管の動的不安定性を制御し、心筋細胞の恒常性維持に関与する可能性が示された。また、変異マウスの解析により、AMPK－CLIP-170シグナルは生理的および病態生理学的にも心機能の維持に重要であることが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　矢白木　翔平　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	高島　成二
	副 査　教 授	月田　早智子
	副 査　教 授	吉森　保
	副 査　准教授	岡本　浩二

論文審査の結果の要旨

本博士論文はAMPKの器質として知られるCLIP-170のリン酸化の生理学的意義をin vitroおよびin vivoで解析したものである。CLIP-170は微小管のプラスエンドタンパク質として微小管の先端に局在するが、そのリン酸化の生理学的意義はいまだ不明な点が多い。

矢白木君は特に心筋細胞におけるCLIP-170の局在を詳細に解析し、細胞の接着部位に存在するintercalated discに局在することを発見し、この接着部位においてメカノセンサーとして働いていることを明らかにした。さらにリン酸化の意義をin vivoマウスモデルを用いて解析し、発生過程における心筋の成熟に関与すること、リン酸化の阻害体を導入した個体では心臓収縮力の低下がみられことを示した。

これらの結果により、CLIP-170は心筋細胞の接着部位に存在しメカノレセプターとして張力を感知しリン酸化され、微小管動態に影響することによりその応力適応を担っていることを世界で初めて明らかにした。AMPKの活性を調節することによる心不全治療にもつながる有意義な成果で学会等でも注目を集めた。