

論文の内容の要旨

論文題目 心筋・骨格筋における Akt1 および Akt2 の機能の解明

指導教員 門脇孝教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 鈴木美穂

糖尿病患者は心疾患を合併する確率が高く、心疾患が糖尿病患者の生命予後を決めていることも多いため、糖尿病患者にとって心疾患の発症・進展の予防は非常に重要である。糖尿病患者が持つ心疾患で、糖尿病に合併する冠動脈疾患や高血圧症などに起因する心疾患とは独立したもので、糖尿病性心筋症と呼ばれる、糖尿病の患者に特異的に見られる心疾患がある。臨床的特徴として左室の拡張能低下が存在し、病理組織所見としては心筋肥大・心筋間質の線維化、心筋内小冠動脈の肥厚などが見られる。心筋内の微小血管病変、心筋細胞でのインスリン作用の低下、心筋細胞の代謝障害、心筋の線維化の亢進、自律神経障害などが糖尿病性心筋症のメカニズムとして挙げられているが、正確な性状や原因、治療法については結論づけられていない。

インスリンは、心筋細胞の細胞膜上のインスリン受容体もしくはインスリン様成長因子

1 受容体(IGF-1R:insulin-like growth factor 1 receptor)に結合すると、受容体は自己リン酸化が生じ、IRS(insulin receptor substrate)のチロシンリン酸化、PI3 キナーゼ(phosphatidylinositol 3 kinase)の活性化によるPIP₃(phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate)の産生の増加を経て、Aktの細胞膜への移動が起こり、ここでPDK1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1)によるAktの308番目のスレオニン残基のリン酸化、mTORC2(mammalian target of rapamycin complex 2)によるAktの473番目のセリン残基のリン酸化が生じて、Aktは完全に活性化され、基質となる分子のセリン/スレオニン残基をリン酸化する活性が上昇し、グルコースの細胞内への取り込みの促進、解糖系の促進、ブドウ糖酸化の促進、グリコーゲン合成の促進、収縮能の亢進、アポトーシスの抑制などの多様な作用を起こす。

Aktは哺乳類ではAkt1, Akt2, Akt3の3種類がある。3種類のアイソフォームは異なる染色体上の異なる遺伝子にコードされているが、80%以上のアミノ酸の相同性が保たれている。Akt1欠損マウスは成長障害、Akt2欠損マウスはインスリン抵抗性、Akt3欠損マウスは脳の大きさの縮小を認めた。Akt1/Akt3ダブル欠損マウスは胎生10.5-11.5日で致死となり、Akt1/Akt2ダブル欠損マウスは出生するものの生後まもなく死亡した。各アイソフォームで異なる役割が生じる機序はまだ不明である。

心臓・骨格筋においては3種類のアイソフォームのうちAkt1とAkt2の発現が優位であり、心臓・骨格筋でAkt1を欠損するマウス、Akt2を欠損するマウス、Akt1とAkt2の両者を欠損するマウスを作成し、インスリンシグナルにおいて重要な分子であるAktが心臓・骨格筋で果たしている役割について検討を行うこととした。特にAkt1とAkt2の両者が心臓・骨格筋で欠損した筋肉特異的Akt1/Akt2欠損(muscle-specific Akt1/Akt2 double knockout:

M-Akt1/2DKO)マウスの心臓での表現型を中心に解析を行った。

定量的 RT-PCR およびウェスタンブロットにより、M-Akt1/2DKO マウスの心筋・骨格筋では Akt1 と Akt2 の発現が有意に抑制されていることが確認された。また M-Akt1/2DKO マウスはコントロールマウスに比べて、心筋・骨格筋において、インスリン刺激によるインスリン受容体のリン酸化、IRS1 のリン酸化、p85 の IRS1 への結合はコントロールマウスと同様に上昇していたが、Akt のリン酸化や GSK3 β のリン酸化はコントロールマウスと比べて有意に低下しており、インスリンシグナルが Akt のレベルで遮断されていると考えられた。

M-Akt1/2DKO マウスとその同胞仔のコントロールマウスを観察すると、M-Akt1/2DKO マウスは全てが生後 25-37 日で死亡した。一方コントロールマウスでは、出生後 40 日までのうちに死亡する個体は認めなかった。

M-Akt1/2DKO マウスの糖代謝について検討を行ったが、3 週齢において随時血糖・インスリン値はコントロールマウスと有意差を認めず、またインスリン負荷試験でも M-Akt1/2DKO マウスはコントロールマウスと比べて血糖値に有意差は認めなかった。ブドウ糖負荷試験において血糖値・インスリン値は有意差を認めなかったが、M-Akt1/2DKO マウスのインスリン値はコントロールマウスに比べて高値の傾向にあり、M-Akt1/2DKO マウスでは、インスリン負荷試験では検出できない程度の軽度のインスリン抵抗性が存在し、インスリンの代償的な分泌により耐糖能が保たれている可能性が否定できなかった。

4 週齢で観察した心臓の重量、体重・脛骨長で補正した心重量は M-Akt1/2DKO マウスではコントロールマウスに比べて有意に低値であり、心臓の器質的な変化が原因で M-Akt1/2DKO マウスが死亡していることが考えられた。ヘマトキシリンエオジン染色では

2 週齢, 4 週齢, 死後の心臓で心室壁の菲薄化が見られた。また, 4 週齢における M-Akt1/2DKO マウスのマッソントリクローム染色では間質での線維化が亢進している傾向が見られ, 4 週齢での心臓の TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick-end labeling)染色では M-Akt1/2DKO マウスはコントロールマウスに比べて TUNEL 陽性細胞が多く見られ, アポトーシスが亢進していることが示された。

心エコー検査では, 4 週齢での左室内径短絡率はコントロールマウスで $43.2 \pm 5.1\%$, M-Akt1/2DKO マウスで $8.8 \pm 2.4\%$ であり, M-Akt1/2DKO マウスで有意に低値であった。2 週齢, 0 週齢の心エコー検査では M-Akt1/2DKO マウスはコントロールマウスの心機能に比べて有意な差を認めなかった。

また定量的 RT-PCR にて心不全マーカーである ANP, BNP の心臓での発現量を検討した。M-Akt1/2DKO マウスの ANP(atrial natriuretic peptide)の発現量は, 0 週齢, 2 週齢, 4 週齢でそれぞれコントロールマウスの 1.0 倍, 5.9 倍, 14.1 倍であり, 2, 4 週齢で有意に上昇していた。BNP(brain natriuretic peptide)の発現量も 0 週齢, 2 週齢, 4 週齢でそれぞれコントロールマウスの 1.2 倍, 25.9 倍, 33.3 倍であり, こちらも 2 週齢, 4 週齢で有意に上昇しており, M-Akt1/2DKO マウスの 2 週齢の心エコーでは明らかな心機能の低下は認めないが, すでに心不全の発症の徴候は明らかにあり, 4 週齢において心不全が顕在化し, やがて死に至ると考えられた。

心不全の発症の機序を考えるため, ミトコンドリアの電子伝達系の酵素, 脂肪酸 β 酸化の酵素, ミトコンドリア DNA などの発現量を定量的 RT-PCR により検討した。

M-Akt1/2DKO マウスでは 2 週齢の時点から電子伝達系で重要なシトクローム c, ミトコ

ンドリア DNA のコピー数, 細胞外から取り込んだ脂肪酸をミトコンドリアへ輸送するの
に
関与する FABP4(Fatty Acid Binding Protein 4)の低下を認め, 4 週齢ではミトコンドリアで
の脂肪酸 β 酸化の酵素である CPT1B(carnitine palmitoyltransferase), CPT2, また脂肪酸の細
胞外から細胞内への輸送体である CD36 の発現量の低下も認めた. 脂肪酸輸送・ β 酸化・電
子伝達系の酵素の発現の低下の多くが, 心不全の顕在化する前段階の 2 週齢より観察され
ることから, 心不全の発症の原因のひとつとして考えることができる.

心筋は全身への血液の供給のために, 収縮と弛緩を繰り返し, 恒常的に多量のエネルギー
一
産生を必要とするため, 脂肪酸 β 酸化や電子伝達系などのエネルギー産生に関与する分
子の発現が低下すると, 心臓でのエネルギー産生が障害を受け, 心機能が維持できなくな
ることが予想される.

インスリンが電子伝達系・脂肪酸 β 酸化の酵素の発現量を正に制御しており, インスリ
ン
シグナルの遮断によりこれらの酵素の発現量が低下するのは, インスリン受容体,
IGF-1R のインスリンシグナルの鍵分子を心筋で欠損させたマウスにおいても報告されて
いるものである.

STZ(streptozotocine)投与により膵 β 細胞でのインスリン分泌を枯渇させたマウスでは,
心筋において ATP 合成酵素の活性低下を認め, このマウスにフロリジン投与を行い腎臓で
の糖の排泄量を増やして血糖値の改善を行っても, この酵素活性は改善しないが, このマ
ウスにインスリンの投与により血糖値改善を行ったところ, この酵素活性が改善すること
が最近報告されており, 糖尿病において生ずるマウスの心機能低下 (糖尿病性心筋症) に,
高血糖よりも心筋細胞内でのインスリンシグナルの低下が重要である可能性が示唆された.

このことから、M-Akt1/2DKO マウスは、まだ機序や治療法の解明されていない糖尿病性心筋症の病態モデルとして非常に有用である、ということが言える。