



Mitochondrial dysfunction caused by saturated fatty acid loading induces myocardial insulin-resistance in differentiated H9c2 myocytes : A novel ex vivo myocardial insulin-resistance model

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-04-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宣原, 守 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2705

博士(医学) 宣原 守

論文題目

Mitochondrial dysfunction caused by saturated fatty acid loading induces myocardial insulin-resistance in differentiated H9c2 myocytes : A novel *ex vivo* myocardial insulin-resistance model

(飽和脂肪酸負荷によって起こるミトコンドリア機能障害は分化 H9c2 心筋細胞において心筋インスリン抵抗性を誘発する:新しい生体外心筋インスリン抵抗性モデル)

論文の内容の要旨

[はじめに]

心不全ではしばしば心筋細胞における代謝異常やエネルギー産生低下を伴う。過去の研究では、心不全時の慢性的な交感神経活性刺激が血清飽和脂肪酸濃度を上昇させて心筋細胞のインスリン抵抗性を引き起こし、その結果心筋エネルギー産生低下を更に悪化させることが報告されている。血清飽和脂肪酸誘発性の心筋インスリン抵抗性の病態については未だほとんど解明されていないため、我々は生体外心筋インスリン抵抗性モデルを確立し、心筋インスリン抵抗性とミトコンドリア機能不全との関係について研究した。

[材料ならびに方法]

H9c2 培養心筋芽細胞は 1%ウシ胎児血清を含んだ培養液を用いて心筋細胞に分化誘導した。また、分化した H9c2 心筋細胞にパルミチン酸(飽和脂肪酸:0.2 mM)を 24 時間負荷して、生体外心筋インスリン抵抗性モデルを作成した。スーパーオキシドディスムターゼ様物質である Mn(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-porphyrin pentachloride (TMPyP: 200 μ M) は活性酸素種 (ROS) を抑制する目的で、carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1) の阻害薬である perhexiline (2 μ M) は、ミトコンドリアの脂肪酸取り込みを抑制する目的で、インスリン抵抗性心筋細胞に添加した。筋原性蛋白質 (Myogenin および TroponinT) とインスリンシグナル関連蛋白質 (insulin receptor substrate-1; IRS1 および glucose transporter type 4; GLUT4) の発現量、そしてインスリン刺激 (100 nM) によるインスリンシグナル蛋白質のリン酸化 (IRS1 チロシン残基および AKT セリン残基) はウェスタンブロット法を用いて解析した。インスリン刺激による心筋細胞内への糖取り込みは [3 H]-2-deoxy-D-glucose (2-DG) と液体シンチレーションカウンターを用いて評価した。インスリン刺激による GLUT4 の細胞膜への移動は、myc-GLUT4-EGFP を発現させた H9c2 心筋細胞を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。ミトコンドリア膜電位測定には JC-1 蛍光色素、細胞内 ATP 濃度はルシフェラーゼ法を用いて評価した。

[結果]

分化誘導した H9c2 心筋細胞は心筋芽細胞に比して、筋原性蛋白質 (Myogenin や TroponinT) やインスリンシグナル伝達物質 (IRS1 や GLUT4) の発現が亢進しており、インスリン刺激による GLUT4 の細胞膜への移動や 2-DG 取り込みも確認された。また、分化した H9c2 心筋細胞にパルミチン酸を負荷すると、インスリンシグナル伝達の阻害、2-DG 取り込みの抑制、IRS1 セリン基の過リン酸化などが生じており、心筋細胞はインスリン抵抗性を呈していた。インスリン抵抗性心筋細胞

を TMPyP で前処置した場合、パルミチン酸による IRS1 セリン基の過リン酸化は消失し、インスリンシグナルの伝達も改善されたが、インスリン刺激による 2-DG の取り込み抑制は改善されなかった。これはパルミチン酸負荷による ROS 上昇がインスリンシグナル伝達を阻害していることを示唆していた。TMPyP とは対照的に、perhexiline で前処置した場合には、パルミチン酸によるインスリンシグナル伝達阻害だけでなく 2-DG の取り込み抑制も (部分的にはあるが有意に) 改善した。さらに perhexiline はパルミチン酸によるミトコンドリア膜電位の脱分極を改善し、ATP 濃度低下も回復させ、インスリン刺激後の GLUT4 の細胞膜への移動を改善させた。そして、これらの変化は TMPyP では認められなかった。このことからパルミチン酸負荷によるミトコンドリア機能不全とそれに引き続く細胞内エネルギー不足が、心筋のインスリン抵抗性の誘発に関わっていると考えられた。

[考察]

我々は分化した H9c2 心筋細胞にパルミチン酸を負荷し、生体外心筋インスリン抵抗性モデルを確立した。我々のインスリン抵抗性モデルによって (1) パルミチン酸負荷により過剰に産生された ROS は主にインスリンシグナルの伝達を阻害していること、(2) 飽和脂肪酸負荷によるミトコンドリアの機能不全が (少なくとも部分的に) 心筋インスリン抵抗性を引き起こすメカニズムであること、(3) ミトコンドリア機能不全に引き続いて生じた細胞内エネルギー不足が GLUT4 の細胞膜への移動を抑制していたことなどが明らかになった。

[結論]

今回の研究によって、ミトコンドリア機能不全と心筋インスリン抵抗性の密接な関係が明らかとなった。また、CPT-1 阻害によるミトコンドリアへの飽和脂肪酸負荷の取り込み抑制が心筋インスリン抵抗性を改善させる可能性も示唆された。