



## Roles of mitochondrial fragmentation and reactive oxygen species in mitochondrial dysfunction and myocardial insulin resistance

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-05-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡辺, 知幸 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/2805">http://hdl.handle.net/10271/2805</a>

博士(医学) 渡辺 知幸

## 論文題目

**Roles of mitochondrial fragmentation and reactive oxygen species in mitochondrial dysfunction and myocardial insulin resistance**

(ミトコンドリア機能不全と心筋インスリン抵抗性におけるミトコンドリア分裂と活性酸素種の役割)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

ミトコンドリアの形態変化と心疾患の関連を示唆する研究が近年数多く報告されている。インスリン抵抗性が引き起こす心筋代謝障害は、心疾患において重要な役割を担っているため、我々は心筋インスリン抵抗性の病態生理における **dynamamin-related protein-1 (DRP1:ミトコンドリア分裂蛋白質)** の役割を研究した。

### [材料ならびに方法]

H9c2 培養心筋芽細胞を、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。心筋インスリン抵抗性は、分化した H9c2 心筋細胞に **DRP1** を過剰発現させる、あるいは過酸化水素 ( $100 \mu\text{M}$  を 1 時間) 負荷する、あるいはパルミチン酸 (飽和脂肪酸;  $0.2 \text{ mM}$  を 24 時間) を負荷して作成した。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:  $200 \mu\text{M}$ )** を、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 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。インスリン刺激 ( $100 \text{ nM}$  を 15 分間) による **AKT** セリン残基 (インスリンシグナル蛋白質) のリン酸化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、 $[^3\text{H}]$ -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。ミトコンドリア形態は、チトクローム *c* の免疫染色、またはミトコンドリア **YFP** 蛋白質の過剰発現を用いて共焦点レーザー走査型顕微鏡で評価した。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測定した。

### [結果]

**DRP1** を発現させた H9c2 心筋細胞では、ミトコンドリア形態の分裂とミトコンドリア膜電位の脱分極を認めた。また、インスリン刺激に対する **AKT** セリン残基のリン酸化抑制と 2-DG の取り込み阻害を認め、インスリン抵抗性を示した。**DRP1** を発現させた H9c2 心筋細胞に **TMPyP** を投与すると、インスリン抵抗性とミトコンドリア機能障害が有

意に改善した。H9c2 心筋細胞に過酸化水素を負荷すると DRP1 の発現およびミトコンドリア分裂の亢進を認め、ミトコンドリア膜電位の脱分極とインスリン抵抗性も認められた。siRNA によって DRP1 発現を抑制すると、過酸化水素誘発性のミトコンドリア機能障害とインスリン抵抗性は改善された。以上から、DRP1 と活性酸素種の間にある協調的亢進作用が、ミトコンドリア機能障害とインスリン抵抗性を引き起こすことが示唆された。次にこの DRP1 と活性酸素種の間にある協調的亢進作用について、パルミチン酸負荷によってインスリン抵抗性を誘発した心筋細胞を用いて検証した。パルミチン酸誘発性インスリン抵抗性に対して siRNA を用いた DRP1 発現抑制、あるいは TMPyP を用いた活性酸素種消去を行ったところ、AKT セリン残基のリン酸化抑制は改善したが、ミトコンドリア膜電位の脱分極と 2DG の取り込み抑制には改善が認められなかった。

#### [考察]

我々は、分化した H9c2 心筋細胞を用いて (1) DRP1 と活性酸素種の間にある協調的亢進作用によって起こるミトコンドリア機能障害とインスリンシグナル伝達抑制によって心筋インスリン抵抗性が生じていること、(2) パルミチン酸誘発性インスリン抵抗性の機序には、脂質代謝産物誘発性のミトコンドリア機能障害などを含めた、DRP1 と活性酸素種の間にある協調的亢進作用以外の他の機序が関わっている可能性を明らかにした。

#### [結論]

本研究において我々はミトコンドリア形態変化を介した心筋代謝障害の機序を明らかにした。我々の知見は、心筋代謝不全の改善を目的としたミトコンドリア形態調節のために必要な手掛かりを提供した。