Eicosapentaenoic acid ameliorates palmitate-induced lipotoxicity via the AMP kinase/dynamin-related protein-1 signaling pathway in differentiated H9c2 myocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-06-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 坂本, 篤志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3192

博士（医学）　　坂本　篤志

論文題目

Eicosapentaenoic acid ameliorates palmitate-induced lipotoxicity via the AMP kinase/dynamin-related protein-1 signaling pathway in differentiated H9c2 myocytes

（分化 H9c2 心筋細胞においてエイコサペンタエン酸は AMP キナーゼ/ダイナミン関連タンパク質 1 シグナル経路を介してパルミチン酸誘発性の脂質毒性を軽減する）

論文の内容の要旨

［はじめに］

n3 多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）は、心不全において心機能を増悪させる過剰な飽和脂肪酸による心筋の脂質毒性に拮抗することが報告されている。また、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示されている。しかし、EPA の心保護効果とミトコンドリア形態変化との関連は未だ十分に検討されていない。本研究にて我々は、脂質毒性に対する EPA の心筋保護作用のメカニズムとして、dynamin-related protein-1（Drp1:ミトコンドリア分裂タンパク質）に注目し、その役割および AMP キナーゼ(AMPK)との関連を検討した。

［材料ならびに方法］

H9c2 ラット培養心筋芽細胞を、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。パルミチン酸（PAL; 飽和脂肪酸, 400 μM）を 24 時間負荷した心筋脂質毒性モデルに、EPA（50 μM）を同時負荷して保護効果を検討した。TUNEL 染色、およびルシフェラーゼ法を用いたカスパーゼ 3/7 活性の解析により、心筋アポトーシスを評価した。ミトコンドリア機能障害は JC-10 蛍光色素を用いた膜電位の測定、ルシフェラーゼ法を用いた ATP 濃度の測定、DCF 蛍光色素を用いた活性酸素種の測定により評価した。ミトコンドリア黄色蛍光タンパク質のプラスミドをリポフェクション法にて細胞内に導入し、共焦点レーザー顕微鏡でミトコンドリア形態の解析を行った。Drp1、AMPK を含む細胞内タンパク質の発現量はウェスタンブロット法を用いて評価した。AMPK を活性化する目的で 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR; 2 mM)を投与した。Drp1、AMPK の発現抑制にはリポフェクション法による RNA 干渉を用いた。

［結果］

PAL を負荷した H9c2 心筋細胞では、TUNEL 陽性アポトーシス細胞の増加、カスパーゼ 3/7 活性の上昇、ミトコンドリア膜電位の低下、ATP の枯渇、細胞内活性酸素種の増加が認められた。これらの変化は、過剰な飽和脂肪酸負荷に伴う心筋脂質毒性を示している。さらに、PAL 負荷はミトコンドリア分裂を増強し、Drp1 の発現を増加させた。EPA の同時投与は、PAL 誘発性のアポトーシス、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア分裂、および Drp1 の増加を抑制した。EPA は単独投与でも Drp1 の発現を減少させ、AMPK のリン酸化を増加させていた。RNA 干渉による Drp1 の発現抑制は、ミトコ

ンドリア分裂を抑制し、PAL 誘発性のアポトーシスおよびミトコンドリア機能障害を軽減していた。

AICAR によって薬理学的に AMPK を活性化させると、PAL 誘発性のアポトーシス、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリア分裂は抑制され、Drp1 の発現は減少していた。RNA 干渉によって AMPK を抑制すると、Drp1 発現は亢進し、EPA による PAL 誘発性アポトーシス、ミトコンドリア機能障害に対する改善効果は阻害された。

［考察］

魚油に含まれる EPA が心血管病の予防効果を持つことは以前から知られている。そのメカニズムとしては、エイコサノイドを介した抗炎症作用や、細胞内エネルギー代謝の改善、および脂質二重膜構成の変化などが提唱されてきた。さらに近年では、様々な細胞内シグナルへ及ぼす EPA の効果が示され、その複雑な保護メカニズムが明らかになりつつある。

今回の我々の研究により、(1) EPA は AMPK を活性化させることで Drp1 の発現を抑制し、(2) ミトコンドリア分裂を抑制することで PAL 誘発性アポトーシスおよびミトコンドリア機能障害から心筋細胞を保護することが明らかとなった。本経路は、EPA の多岐にわたる心保護メカニズムの一端を担っているものと考えられる。

本研究は *in vitro* の検討であり、同様のメカニズムが *in vivo* においても作用しているかを明らかにするためには、更なる研究が必要である。また、EPA を含む脂肪酸は、生体内において様々な代謝産物にその形態を変えていることが知られており、より心保護効果の強力な EPA 代謝産物を探索することが今後の課題といえる。

［結論］

EPA は AMPK を活性化することで Drp1 発現およびミトコンドリア分裂を抑制し、PAL 誘発性の心筋脂質毒性を改善した。我々の知見は、EPA による心保護作用の新たな分子生物学的メカニズムを提供した。