

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390217

研究課題名 (和文) Akt シグナルによる心筋代謝調節機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of cardiac metabolism by Akt signaling

研究代表者

塩島 一郎 (SHIOJIMA ICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：90376377

研究成果の概要 (和文) : Akt は PI3 キナーゼによって活性化される蛋白リン酸化酵素であり, 細胞増殖や糖代謝など多彩な生物学的作用を有することが知られている。本研究は Akt シグナルによる心筋代謝調節機構および代謝調節を介した心機能制御機構の解明を目的としておこなわれた。その結果, Akt の活性化によって脂肪酸代謝酵素の転写制御因子の発現が低下し, 相対的に糖代謝を介した ATP 産生量が増加すること, また, Akt の活性が心臓で特異的に低下するようなモデルマウスにおいては左室収縮能の低下が認められること, がそれぞれ明らかになった。以上より, Akt シグナルが ATP 産生を介して心機能を維持しているものと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Akt is a serine/threonine protein kinase that is situated downstream of PI3-kinase and regulates multiple cellular processes including cell growth and glucose metabolism. The purpose of the present study was to investigate the mechanism of metabolic regulation by Akt signaling in the heart. We found that Akt activation leads to downregulation of fatty acid oxidation and that downregulation of Akt pathway in the heart leads to contractile dysfunction. These data suggest that Akt maintains cardiac function in part through regulation of ATP synthesis in the heart.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：Akt・糖代謝・脂肪酸代謝・心不全

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) Akt シグナルによる細胞機能調節

Akt は PI3K の下流に位置するセリン・スレオニンキナーゼである。insulin/IGF により PI3K が活性化されると Akt は PH ドメインを介して膜に移行し, 2カ所のリン酸化部位が

リン酸化されることにより活性化される。活性化された Akt は核内を含む細胞内のさまざまな場所に移行し, 下流の標的蛋白をリン酸化する。多くの蛋白が Akt の基質として報告されているが, 細胞増殖・細胞死などを制御する他に, GSK3 の活性化や GLUT4 の膜移行などの調節を介して, 糖代謝にも関与している事が知られている。

## (2) 心筋における糖脂質代謝とエネルギー産生

心筋は絶えず収縮弛緩を繰り返しており、その収縮能を維持するためのエネルギーは通常その約 70%が脂肪酸代謝、残り約 30%が糖代謝を介した ATP 産生によって供給され、これら 2つの経路は相互に補完的である。心不全では一般的に脂肪酸代謝が優位で糖代謝を介した ATP 産生は減少しており、このような糖から脂肪酸への代謝のシフトが心機能低下の一因であるとする考え方がある。実際に急性心筋梗塞患者に GIK (glucose-insulin-potassium(K)) 療法を行うと心機能の改善が認められるが、これは強制的に細胞内にグルコースを取り込ませることにより糖代謝を亢進させ、相対的に脂肪酸代謝を抑制した効果であると考えられている。したがって、心筋における糖脂質代謝制御機構を解明し、それを制御する方法を開発することにより、心不全のあらたな治療法の開発につながる可能性が考えられた。

### (3) Akt シグナルと心筋代謝調節

我々は以前心筋特異的発現誘導型 Akt トランスジェニックマウスを用いて、短期間 (2週間) の Akt 過剰発現では心機能の改善がみられること、また、長期間 (6週間) Akt を活性化すると逆に心機能の低下がみられることを報告した (Shiojima I et al, J Clin Invest 2005; 115:2108-18)。すなわち短期間 Akt 活性化は心不全治療モデル、長期間 Akt 活性化は心不全発症モデルと考えることができる。さらに Akt 活性化による糖脂質代謝の変化を検討したところ、短期間の Akt 活性化により心筋内の glycogen 蓄積がみられ、解糖系の亢進と脂肪酸  $\beta$  酸化の抑制が認められた。脂肪酸  $\beta$  酸化抑制が心機能改善をもたらすこととあわせて考えると、これらの結果は、Akt による心機能調節が、心筋における糖脂質代謝制御 (糖代謝亢進と脂肪酸代謝抑制) を介したものである可能性を示唆すると考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、心筋特異的発現誘導型 Akt トランスジェニックマウスやインスリン受容体欠損マウスを用いて以下の 3 点について検討し、Akt による「代謝調節を介した」心機能制御のメカニズムの解明を目指した。具体的な研究目的は以下の通りである。

(1) Akt シグナルによる心筋代謝調節機構の詳細を明らかにする

(2) Akt シグナルによる糖脂質代謝調節の機序を明らかにする

(3) Akt シグナルによる「代謝調節を介した」心機能制御の機序を明らかにする

## 3. 研究の方法

(1) Akt シグナルによる心筋代謝調節機構の詳細を明らかにする

・Akt シグナル短期活性化モデル (心不全治療モデル) および Akt シグナル長期活性化モデル (心不全発症モデル) の両者において、Akt 活性化が ATP 産生に及ぼす影響を検討した。また、心筋内の主要な糖脂質代謝経路である、解糖系、脂肪酸  $\beta$  酸化、TCA サイクル、ミトコンドリア電子伝達系について、各経路の主要な酵素の活性もしくは蛋白量、遺伝子発現量について検討し、短期間および長期間の Akt 活性化がこれらの代謝経路に及ぼす影響を検討した。

(2) Akt シグナルによる糖脂質代謝調節の機序を明らかにする

・短期間 (2週間) Akt 活性化および長期間 (6週間) Akt 活性化の 2つのモデルにおいて、①Akt によってリン酸化を受ける蛋白の同定、②Akt 活性化により増減する mRNA の網羅的解析、を行い Akt 下流シグナルの解析を試みた。

(3) Akt シグナルによる「代謝調節を介した」心機能制御の機序を明らかにする

・Akt の生理的機能を知るためには、過剰発現による機能獲得型の表現型だけでなく、機能喪失にともなう表現型の解析が重要になる。そこで、成人期において心臓特異的に Akt の活性が低下するようなマウスモデルを作成し、Akt の活性低下が心機能や心筋代謝に及ぼす影響を検討した。

## 4. 研究成果

(1) Akt シグナルによる心筋代謝調節機構の詳細を明らかにする

・脂肪酸代謝酵素の転写制御因子である PPAR- $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 、PGC-1 $\beta$ 、ERR $\alpha$  についてその遺伝子発現量を qRT-PCR で検討したところ、PPAR- $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 、PGC-1 $\beta$  については短期間の Akt 活性化および長期間の Akt 活性化いずれにおいてもその発現量の低下が認められた。ERR $\alpha$  の発現量には有意な変化は認められなかった。一方、電子伝達系酵素の転写調節因子である Tfam、NRF1、NRF2 については、Akt 活性化によってもその発現量に有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、Akt 活性化により脂肪酸代謝酵素の発現が低下し、相対的に糖代謝を介した ATP 産生量が増加することが、Akt 活性化にともなう心機能改善のメカニズムである可能性が考えられた。

(2) Akt シグナルによる糖脂質代謝調節の機序を明らかにする

・Akt の心保護作用がどのような下流のシグナルによって調節されているかを明らかにするために、Akt によってリン酸化される基質の同定を試みた。Akt によってリン酸化されるアミノ酸配列を特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降後に SDS-PAGE を行い、免疫沈降される蛋白の同定を MS/MS により試みた。しかしながら、既知の Akt 基質についてはいくつか同定されたものの、新たな Akt 基質の同定には至らなかった。

一方、Akt 活性化により増減する mRNA を明らかにするために、DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った。短期間の Akt 活性化により 366 個の遺伝子の発現亢進が、また、459 個の遺伝子の発現低下が認められた。これらの遺伝子の大部分は Akt を長期間活性化してもその発現量のさらなる変化は認められなかったが、Akt シグナルを遮断すると約半数が Akt 活性化前の状態に戻ることが示された。一方、Akt を長期間活性化すると、短期間の Akt 活性化では変化がみられなかった遺伝子のうち、211 個の遺伝子の発現亢進が、また、328 個の遺伝子の発現低下が認められた (図 1)。変化の見られた遺伝子には、細胞死やストレス反応に関連する遺伝子が多く見られたが、PI3-kinase や insulin receptor substrate 1 (IRS1) などのインスリンシグナル伝達経路の構成因子や、pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) などの代謝系酵素も含まれており、これらの因子が Akt による心筋代謝調節に関与している可能性が考えられた。

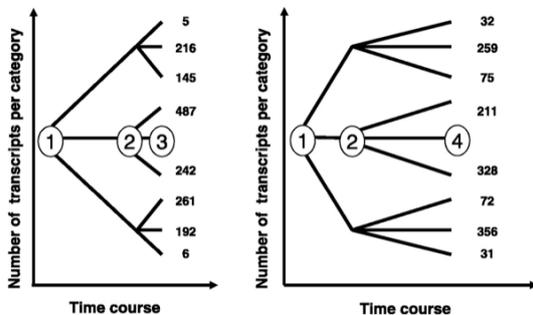


図 1 DNA マイクロアレイ解析

①は Akt 活性化前、②は Akt 活性化 2 週間後、③は 2 週間活性化の後に Akt シグナルを遮断し 2 日後、④は Akt 活性化後 6 週間後、をそれぞれ示す。

(3) Akt シグナルによる「代謝調節を介した」心機能制御の機序を明らかにする

・成人期において心臓特異的に Akt の活性が低下するようなマウスモデルを作成を試みた。心筋における最も強力な Akt の活性化因子はインスリンであることが知られている。そこで、インスリン受容体 (IR) 遺伝子の flox mice と心筋特異的に MerCreMer (MCM) を発現する aMHC-MCM トランスジェニックマウスを交配し、IR flox allele: homozygous, aMHC-MCM: hemizygous のマウスを得た。このマウスに生後 12 週から 2 週間 tamoxifen を投与したところ、2 週間後にはインスリン受容体の発現レベルは著明に低下し、tamoxifen 誘導型心筋特異的インスリン受容体欠損 (iCIRKO) マウスが得られたことが確認された (図 2)。

このマウスでは次第に左室収縮能が低下し心重量も減少した (図 2)。また、Akt 活性低下に伴い心臓組織における ATP 濃度は減少した。

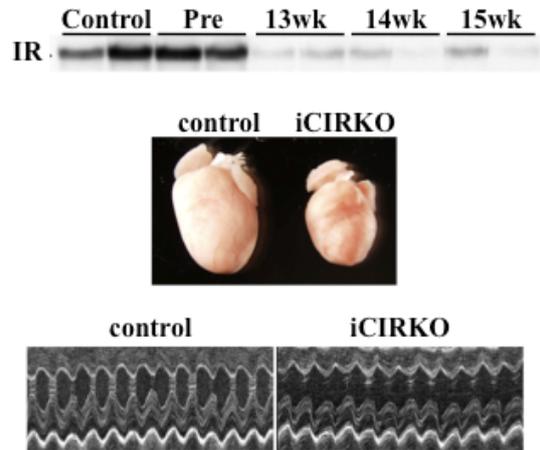


図 2 Akt 活性低下による心機能低下

(上段) tamoxifen 投与によるインスリン受容体蛋白の発現低下を確認した。(中段) 心臓における Akt 活性低下に伴い心重量の低下がみられた。(下段) また、同時に左室収縮能の低下もみとめられた。

さらに、上記のマウスにおいてミトコンドリア機能を解析したところ、state 3 における酸素消費量が減少しており、Akt シグナル低下によるミトコンドリア機能障害が示唆された。すなわち、ミトコンドリア機能障害が Akt 活性低下にともなう心機能低下の原因のひとつである可能性が考えられた。

(4) 研究結果のまとめ

以上の結果から、Akt シグナルによる心機能調節のメカニズムとして、①糖代謝・脂肪酸代謝バランスの調節、および、②ミトコンドリア機能の調節、を介する ATP 産生の亢進が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

1. Naito AT, Shiojima I, Komuro I. Wnt signaling and aging-related heart disorders. *Circ Res* 2010;107:1295-303. (査読あり)
2. Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, Akazawa H, Nagai T, Shiojima I, Komuro I. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res* 2010;106:1692-702. (査読あり)
3. Shimizu I, Minamino T, Toko H, Okada S, Ikeda H, Yasuda N, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Koh GY, Akazawa H, Shiojima I, Kahn CR, Abel ED, Komuro I. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *J Clin Invest* 2010;120:1506-14. (査読あり)
4. Yoshida M, Shiojima I, Ikeda H, Komuro I. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:698-705. (査読あり)
5. Ikeda H, Shiojima I, Ozasa, Y, Yoshida M, Holzenberger M, C Ronald Kahn, Kenneth Walsh, Takashi Igarashi, E Dale Abel, Issei Komuro. Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:664-75. (査読あり)
6. Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, Gould A, Weiss A, Shiojima I, Walsh K, Bernal-Mizrachi E. mTORC1 activation regulates beta-cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem* 2009;284:7832-42. (査読あり)
7. Zhu W\*, Shiojima I\*, Ito Y\*, (\*equal contribution), Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature* 2008;454:345-9. (査読あり)

8. Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE* 2008;3:e2407. (査読あり)

9. Monzen K, Ito Y, Naito AT, Kasai H, Hiroi Y, Hayashi D, Shiojima I, Yamazaki T, Miyazono K, Asashima M, Naigai R, Komuro I. A crucial role of a high mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. *Nat Cell Biol* 2008;10:567-74. (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩島 一郎 (SHIOJIMA ICHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
准教授

研究者番号 : 90376377

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :