

論文内容要旨

Leucine induces cardioprotection in vitro by promoting mitochondrial function via mTOR and Opa-1 signaling

(ロイシンは *in vitro* において、mTOR および Opa-1 シグナルを介してミトコンドリア機能を改善し、心筋保護作用を示す)
Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 31: 2979-2986, 2021.

主指導教員：堤 保夫 教授

(医系科学研究科 麻酔蘇生学)

副指導教員：志馬 伸朗 教授

(医系科学研究科 救急集中治療医学)

副指導教員：入船 正浩 教授

(医系科学研究科 歯科麻酔学)

森尾 篤

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

食生活の変化、人口の高齢化、それに伴う生活習慣病の増加により、虚血性心疾患の患者数は急激に増加している。虚血による心筋障害は、虚血解除後の再灌流時にも虚血再灌流障害としてダメージを負うことが広く知られている。学位申請者らの研究グループはミトコンドリアや細胞膜マイクロドメインと関連させながら吸入麻酔薬、オピオイド、その他薬剤の心筋虚血再灌流障害に対する効果、およびそのメカニズムを明らかにしてきた。その中で、申請者は、分岐鎖アミノ酸が、細胞の増殖や代謝において重要な役割をもつセリン/スレオニンキナーゼである **mammalian target of rapamycin: mTOR** を介する反応で心筋の虚血再灌流障害を軽減する事、また心筋保護に関連があるとされるミトコンドリア機能の改善を認める事を示した (Morio et al., *Life Sci* 245: 117368, 2020)。分岐鎖アミノ酸は必須アミノ酸であり、ロイシンはmTORの働きを特にコントロールすると考えられている。そこで、本研究ではロイシンの心筋保護作用をmTORおよびミトコンドリアの機能と関連させて明らかにすることを目的とした。

【方法】

ラットからランゲンドルフ法にて採取した単一心筋細胞を用いて、虚血再灌流後の細胞の生存率を調べた。インキュベーター内を窒素 95%、二酸化炭素 5%とすることで低酸素状態とし、虚血再灌流を模した。ラット単一心筋細胞は虚血再灌流刺激前に濃度・暴露時間の異なるロイシン暴露を行った。さらに、ロイシンに加えて **mTOR** インヒビターであるラパマイシン、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (**PI3K**) インヒビターである **wortmannin** をそれぞれ加えた群でも反応を調べた。

心筋保護のメカニズムを明らかにするためにミトコンドリア機能検査、ウエスタンブロット等を行い細胞内のシグナル伝達を調査した。

【結果】

疑似的な虚血再灌流障害でラット単一心筋細胞は生存率の低下 ($38.5 \pm 3.6\%$) を示したが、 $160\mu\text{M}$ のロイシンを前投与することで心筋細胞の生存率に改善がみられた ($64.5 \pm 4.2\%$)。一方でラパマイシンをロイシンと共に投与すると、心筋保護作用は消失した ($44.2 \pm 4.5\%$)。wortmannin 投与では心筋保護作用は減弱しなかった ($60.8 \pm 4.5\%$)。

ウエスタンブロットではロイシンにより **mTOR** の活性化が示され、**PI3K/Akt/GSK3B** 経路の活性化は示されなかった。**mTOR** の下流の **p70S6**、**S6**、**4EBP1** のリン酸化は亢進していた。

ミトコンドリア機能においては、膜電位がロイシン投与群で保たれ、**Opa-1** の発現が増えていた。また、**Opa-1** の発現をノックダウンした細胞においては、心筋保護作用が棄却された。

【考察】

本研究では事前のロイシン暴露により虚血再灌流障害による心筋細胞の生存率に改善がみられた。また、ラパマイシンをロイシンと共に投与すると、心筋保護作用は消失し wortmannin 投

与では心筋保護作用は減弱しなかった。ウエスタンブロットではロイシンにより mTOR の活性化が示される一方、虚血再灌流に関連がある PI3K/Akt/GSK3 β 経路の活性化は示されず、これらから心筋保護作用には PI3K/Akt/GSK3 β 経路ではなく、mTOR が関連していると考えられる。申請者は過去に分岐鎖アミノ酸が mTOR を介し、心筋虚血再灌流障害を軽減する事を示したが、この主たる物質がロイシンであると考えられた。

また、ミトコンドリアはエネルギー産生のカギである細胞内小器官であり、細胞の恒常性維持に深く関わっているが、その働きについては不明な点が多い。ミトコンドリアダイナミクスは細胞の様々な状態、状況において異なるが、今回はロイシン投与によりミトコンドリアの融合が促進され、ミトコンドリアの膜電位からも機能の改善が示された。これまでもミトコンドリア機能と心筋保護に関する報告があり、今回 Opa-1 をノックダウンすることで心筋保護作用が消失したことから、ロイシン投与による心筋保護作用にはミトコンドリア機能も関わっていると考えられる。

結論として分岐鎖アミノ酸のロイシンはミトコンドリア機能を改善し、mTOR を介する反応で虚血再灌流障害に対する心筋保護作用を示す事が判明した。