

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	森尾 篤
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	吉 栖 正 生	印
審査委員	教授	高 橋 信 也	
審査委員	講師	福 田 幸 弘	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>世界的に虚血性心疾患患者は増加しており、その予防、治療は患者予後に大きな影響を与え、社会的に関心の高い問題である。虚血性心疾患の第一の治療は再灌流であるが、再灌流それ自体により心筋障害が発生する再灌流障害という病態があり、その治療、軽減が期待されている。これまで様々な機序や薬剤等が研究、報告されてきたものの、その全貌は複雑で、不明な点もまだ多い。</p> <p>分岐鎖アミノ酸は必須アミノ酸であり、バリン、ロイシン、イソロイシンとして知られており、近年肝臓、腎臓など他の臓器で虚血再灌流障害の軽減に寄与することが明らかになっている。学位申請者は、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、心保護に関連があるミトコンドリア機能の改善を認める事を示した。分岐鎖アミノ酸のうち、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おり、重要な役割を担っている。ロイシン単体での心保護効果はいまだ明らかでないために、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。</p> <p>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 阻害薬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) 阻害薬である 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。</p> <p>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 ($64.5 \pm 4.2\%$)。また、wortmannin 投与では心筋保護作用は減弱しなかった ($60.8 \pm 4.5\%$) もの、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 ($44.2 \pm 4.5\%$)。ウエスタンブロットではロイシンにより mTOR の活性化が示されたが、PI3K/Akt/GSK3β 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検査では低酸素、活性酸素種による刺激からミトコンドリア膜電位の低下を誘導したが、ロイシン投与により膜透過性遷移孔の開口が阻害され、膜電位は保たれていた。また、ミトコンドリアの分裂、融合に関連する因子に関しては、特に Opa-1 の発現が増加しており、Opa-1 の発現をノックダウンすると、ロイシンの心保護作</p>			

用も失われる結果となった。

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た。

また、ミトコンドリアはエネルギー産生において重要な役割を担う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いまだ不明な点が多い。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、ミトコンドリア膜透過性遷移孔や膜電位からもミトコンドリア機能の改善が得られることが明らかになった。

これらから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有する事が示された。この成果により、さらなる検討が必要ではあるが、虚血再灌流障害に限らない、手術患者の予後に影響を与える周術期全般の心筋障害に対する心保護効果に関する知見が深まったと考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が森尾 篤に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。