

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 28 年 4 月 26 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名 徳島大学大学院医歯薬学研究部
職 名 助教
研 究 代 表 者 堤 理恵

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。
記

(課題番号: 15011)

1. 共同研究課題名	心筋細胞におけるロイシンのミトコンドリア融合活性化機構と代謝調節			
2. 共同研究目的	必須アミノ酸のひとつであるロイシンが心筋保護作用に有効であるか、またその機序を解明する。			
3. 共同研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 堤 理恵	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 代謝栄養学分野	助教	研究の総括、研究の実施	
(分担研究者) 阪上 浩	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 代謝栄養学分野	教授	研究の助言	
黒田 雅士	徳島大学大学院 医歯薬学研究部 代謝栄養学分野	大学院生	研究の実施、動物の飼育	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	代謝シグナル解析分野	氏 名	北村 忠弘

※ 次の6, 7, 8の項目は, 枠幅を自由に変更できます。但し, 6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

本研究では必須アミノ酸ロイシンが心筋保護作用に有効であるかをラット初代心筋細胞及びマウスを用いて検証し、その機序解明を試みる。

1. 心筋細胞による検証

ラット心臓より心筋細胞を抽出し、初代培養細胞としてロイシン処理し、低酸素刺激および再灌流を行い細胞生存率を測定した。また、その機序を western blot にて確認する。細胞のエネルギー消費はフラックスアナライザー (Seahorse) を用いて測定した。また電子顕微鏡、FRAP アッセイによりロイシンが心筋のミトコンドリアの融合・分裂に与える影響を確認した。

2. マウス心筋による検証

C57Bl/6 マウスを用いてロイシン投与が虚血再灌流時の梗塞サイズに与える影響を確認した。同様に Rapamycin、Wortmanin など阻害剤の影響を検討した。また、インスリン抵抗性モデルである高脂肪食誘導性肥満マウス、mTOR⁺/⁻マウスにおいても同様にロイシンが心筋保護作用に与える影響を検討した。

7. 共同研究の成果

1. 心筋細胞による検証

ラット心臓より心筋細胞を抽出し、初代培養細胞としてロイシン処理し、低酸素刺激および再灌流を行い細胞生存率を測定した。その結果ロイシンにより低酸素誘導性の細胞死を抑制した。また、mTOR 阻害剤ラパマイシン処理にてその効果は抑制され、PI3K 阻害剤 Wortmanin は影響しなかった。また同様にロイシン処理にて mTOR、S6K のリン酸化が活性化されたが、Akt、GSK は変化がなかった。さらに細胞酸素消費量を測定するとロイシンにより最大酸素消費量の増加が認められた。電子顕微鏡観察の結果より、ロイシンの心保護作用は心筋ミトコンドリア融合を介している可能性が示唆された。また、この融合を調整している分子は Opa1 であることが siRNA によるノックダウン実験で明らかとなった。

2. マウス心筋における検証

C57Bl6 wild type マウスにおいてロイシンは虚血再灌流時の心筋梗塞サイズを改善した。また、この効果は Rapamycin の前処理にて棄却された。インスリン抵抗性肥満マウスではプレコンディショニングによる心保護が認められないが、ロイシン処理により作用が認められた。一方で、mTOR⁺/⁻マウスではロイシンの効果が認められなかった。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載, 又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお, 論文の場合は, 別刷りを1部提出してください。)

2015. 11. Keystone symposia: Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies
Leucine induces cardioprotection in vitro and in vivo by promoting mitochondrial function via mTOR and Opa-1 signaling

論文は現在投稿中