

課題番号 : 29指1006
研究課題名 : 心筋においてAktの果たす役割の解明
主任研究者名 : 添田光太郎

キーワード : インスリンシグナル、糖尿病性心筋症、ミトコンドリア

背景と目的・方法 : 糖尿病患者の死因調査報告によると、診断・治療技術の進歩などにより冠動脈疾患による死亡は減少したが、心不全による死亡は減少していない。また、糖尿病患者においては冠動脈疾患の影響を除いても心不全による入院も多いことが知られている。このことは、糖尿病による心筋代謝障害の病態が存在する可能性を示唆しているが、その病態の詳細は必ずしも明らかになっていない。

一般に2型糖尿病の主要な特徴である高インスリン血症は、各種組織でインスリンシグナルを増強し、動脈硬化や心肥大の促進により心不全の増悪に関連すると考えられてきたが、高脂肪食負荷マウスや遺伝的肥満糖尿病モデルマウスに加えてインスリン分泌低下モデルマウスでも心不全は生じることが知られている。このようなモデル動物の心臓ではいずれもインスリンシグナルの中心的伝達因子であるAktのリン酸化が低下しうることから、筋組織におけるAktを介したインスリンシグナルの低下が糖尿病合併心不全の発症を促進している可能性があると考え、筋肉特異的Akt欠損マウスの表現型解析を行うことにした。

研究成果 :

MCK-Cre: Akt1 floxed、およびMCK-Cre: Akt2 floxedは正常に成長するが、MCK-Cre: Akt1/2 floxed (以下mDK (Akt1/2)) は4-5週齢で著明な胸水を伴って死亡した。このことから筋組織におけるAkt1/2の相補性が示唆された。

mDK (Akt1/2) は心臓の超音波イメージングで心室壁の菲薄化とFS (Fractional shortening) の低下が認められ、固定標本のHE染色でも同様の形態学的所見が認められた。摘出した心臓は有意に低重量であり、心室壁サンプルを用いたqPCRでは心不全マーカー (ANP) および心筋胎児化マーカー (MHCb) の発現が上昇していた。マイクロアレイ解析ではミトコンドリア構成因子の発現低下の関連が示唆され、実際にqPCRでミトコンドリア呼吸鎖複合体I, II, III, IV, Vに含まれる多くの因子の発現低下が確認された。また、心室壁サンプルではqPCRでミトコンドリアDNAコピー数が減少しており、走査型電子顕微鏡ではミトコンドリアの密度の低下とクリステの浮腫と電子密度の低下が顕著に認められ、別途複合体I, II, IIIの活性低下も認められた。以上のことからミトコンドリアの量的異常と質的異常が関与する可能性が示唆された。

Aktの下流を担うシグナル伝達因子として、代表的二者はmTORシグナル、FoxOシグナルであるが、実際にmDK (Akt1/2) の心室壁サンプルではウェスタンブロッティング法でこれらのリン酸化が減弱していることが明らかになった。そこで、Aktによりリン酸化され両者を抑制する因子であるTSC2、FoxO1/4をCre-loxPシステムを用いて追加で欠損させ、筋肉特異的Akt1/2 TSC2 三重欠損マウス (以下mTK (Akt1/2 TSC2))、筋肉特異的Akt1/2 FoxO1/4 四重欠損マウス (以下mQK (Akt1/2 FoxO1/4)) を作製した (TSC2 floxed: がん研究会がん研究所 野田哲生先生、FoxO1/4 floxed: 慶應義塾大学 中江淳先生のご厚意により提供)。

mTK (Akt1/2 TSC2) は少なくとも150日以上長期生存が可能であり、心重量と心室壁サンプルのミトコンドリアDNAコピー数は有意に改善した。心臓の超音波イメージングでは心室壁厚とFSの有意な改善が得られ、HE染色や走査型電子顕微鏡において形態学的所見の著明な改善が得られた。

mQK (Akt1/2 FoxO1/4) は2週間程度の生存期間の延長が得られ、心重量と心室壁サンプルのミトコンドリアDNAコピー数はわずかに改善した。心臓の超音波イメージングでも改善幅はmTK (Akt1/2) に及ばないがFSの有意な改善が認められた。

以上のことからmDK (Akt1/2) における病態形成にはTSC2-mTORシグナルとFoxO1/4の両者が関与しているものと考えられ、Akt1/2に加えてTSC2とFoxO1/4の両者に介入するモデルを作製している。

Subject No. : 29 指 1006

Title : The role of Akt in cardiomyocytes

Researchers : Kotaro Soeda

Key word : Insulin signaling, Diabetic cardiomyopathy, Mitochondria

Abstract : From the report about the feature of cause of death in Japanese diabetics, the number of patients who died from coronary artery disease is decreasing. However, the number of patients who died from heart failure have not decreased yet. It is also known that the risk of hospitalization from heart failure increase in diabetic patients except the influence of coronary heart disease. These facts suggest that diabetes can influence not only vascular disorder but also energy metabolism of cardiomyocytes.

Generally, hyperinsulinemia, which is a major feature of type 2 diabetes, strengthens insulin signaling in various tissues, that results in atherosclerosis, cardiac hypertrophy and heart failure. However, not only diet-induced obese mice and hereditary obese diabetic model mice but also insulin ablated model mice can proceed heart failure. Because of insulin resistance in cardiomyocytes, one of the common features of these mice is inhibition of phosphorylation of Akt in cardiomyocyte. Therefore, we focused on the role of Akt in cardiomyocyte in heart failure with diabetes.

First, we generated muscle-specific Akt1 knock-out mice, and muscle-specific Akt2 knock-out mice. These mice grew normally, but muscle-specific Akt1/2 double knock-out mice (mDK(Akt1/2)) died 4-5 weeks-old with a large amount of pleural fluid.

mDK(Akt1/2) showed remarkable thinning of ventricle, and reduced fractional shortening in ultrasonography, therefore it was supposed that mDK(Akt1/2) mice died from severe heart failure. Heart weight was remarkably low and increased expression of ANP, MHC β was found in qPCR analysis. Microarray analysis suggested reduced expression of mitochondrial complex factor, and qPCR analysis revealed reduced expression of many genes which code mitochondrial respiratory chain complex I-V. Mitochondrial DNA copy number was reduced in mDK(Akt1/2) ventricles, and observation by electron microscope revealed cristae edema and decreased density of mitochondria. Mitochondrial complex activity assay revealed that activity of complex I, II, III was significantly impaired in whole heart lysate of mDK(Akt1/2). These data suggest Akt supports quantity and quality of mitochondria in cardiomyocytes.

It is well known that the two of major factors that transduce Akt signal were mTOR, and FoxO transcription factor. Therefore, we proceed genetic ablation of negative regulator of these signals, TSC2 and FoxO1/4 respectively (mTK(Akt1/2 TSC2), mQK(Akt1/2 FoxO1/4)).

mTK(Akt1/2 TSC2) survived for 150 days, and heart weight and mitochondrial copy number in ventricle significantly improved. Ultrasonography revealed that significant improvement of wall thickness and fractional shortening, and HE-staining and electron microscope observation showed remarkable improvement.

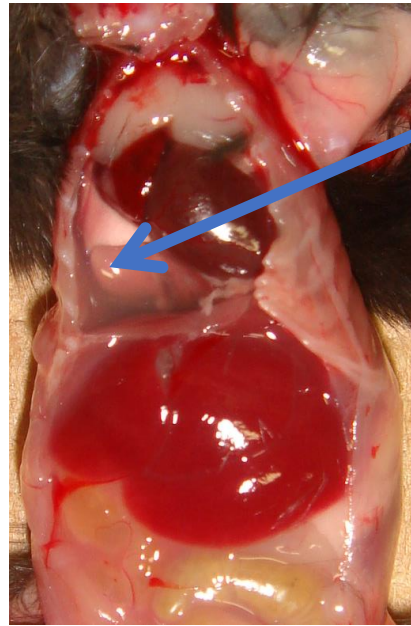
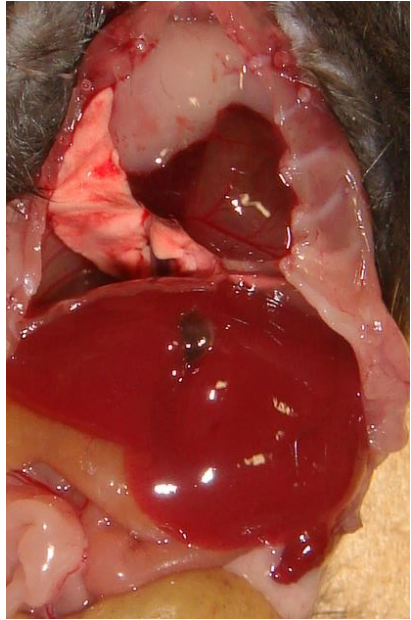
The phenotype of mQK(Akt1/2 FoxO1/4) was mild compared with mTK, but survival period of mQK(Akt1/2 FoxO1/4) was longer than mDK(Akt1/2) and fractional shortening improved significantly. We are now generating muscle-specific Akt1/2 FoxO1/4 TSC2 deficient mice.

Researchers には、分担研究者を記載する。

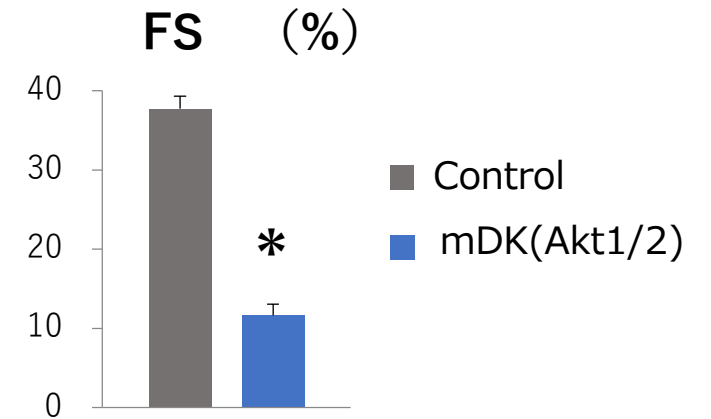
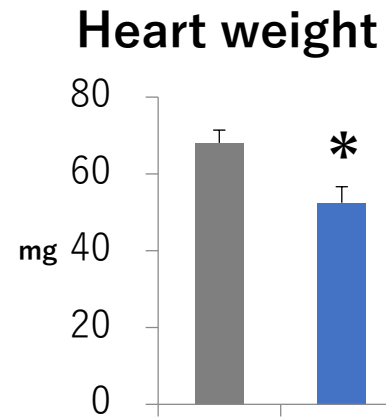
Control

mDK(Akt1/2)

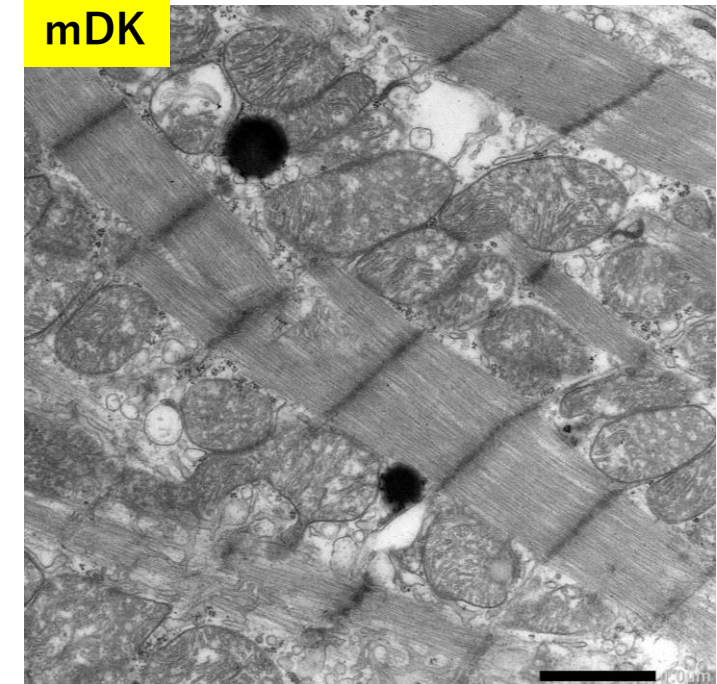
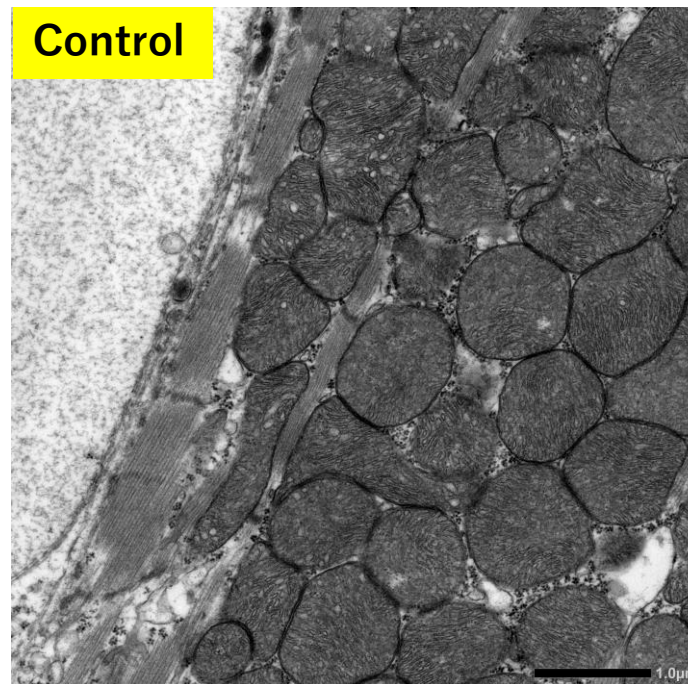
筋肉特異的Akt1/2ダブル欠損マウス (mDK(Akt1/2))は
ミトコンドリアが障害され、重症の心不全を呈した



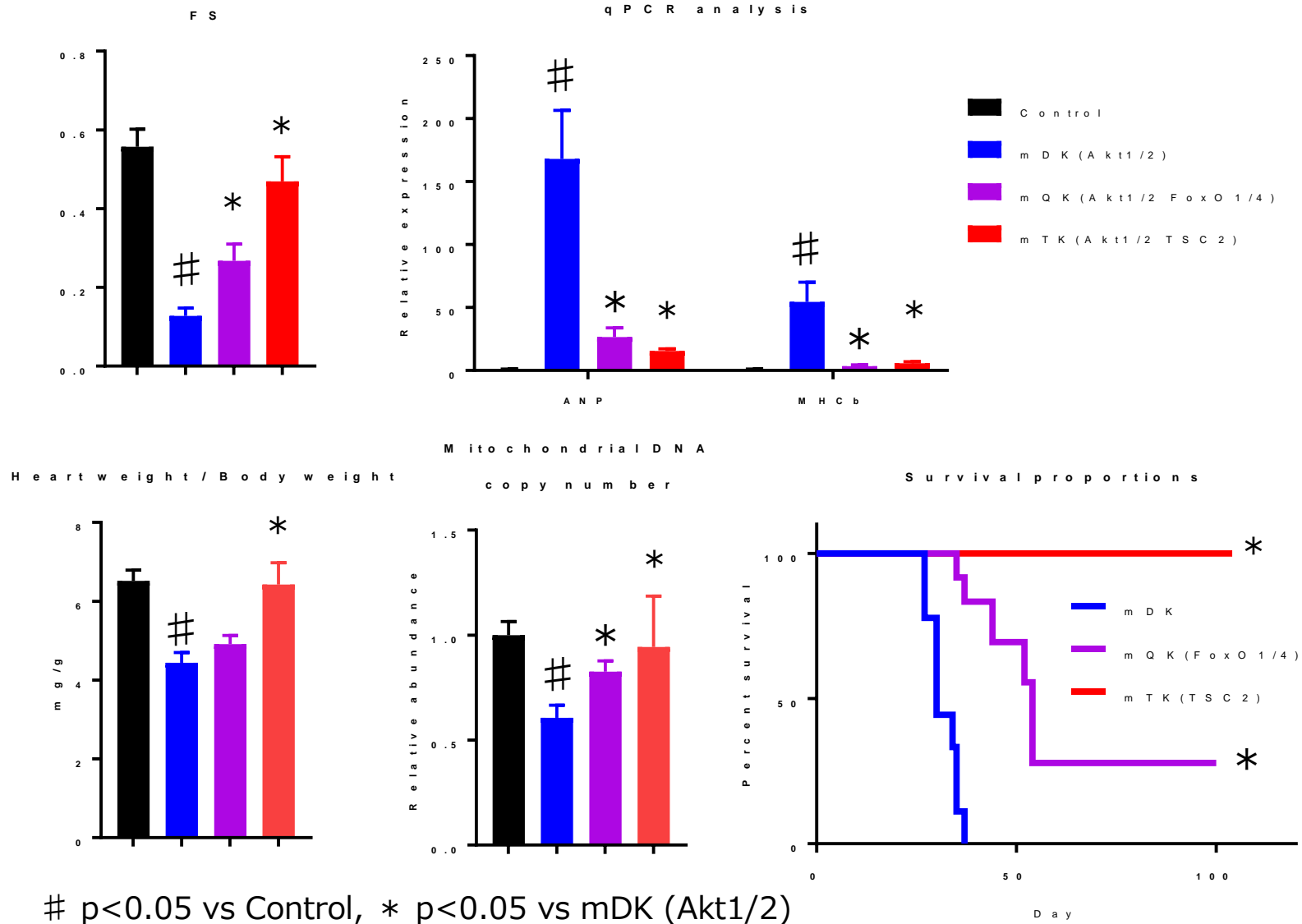
胸水



■ Control
■ mDK(Akt1/2)



筋肉特異的Akt欠損マウスの表現型はTSC2とFoxO1/4の追加欠損でそれぞれ少なくとも一部が緩和された



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1006

研究課題名：心筋におけるAktの役割の解明

主任研究者名：添田光太郎

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
心筋におけるAktの役割の解明	添田光太郎 小林直樹 生島芳子 植木浩二郎 ほか	第61回日本糖尿病学会年次学術集会	JPタワーホール&カンファレンス	2018年5月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。