

論文内容の要旨

論文提出者氏名 中村 英夫

論文題目

p53 promotes cardiac dysfunction in diabetic mellitus due to excessive mitochondrial respiration-mediated ROS generation and lipid accumulation.

論文内容の要旨

糖尿病性心筋症は、糖尿病患者の主要な死因の一つである。糖尿病性心筋症では、糖毒性、脂肪毒性、ミトコンドリア代謝の変化によりエネルギー代謝異常がみとめられることが知られている。我々はがん抑制遺伝子として最もよく知られている遺伝子の一つである p53 が、ミトコンドリア呼吸鎖の構成蛋白である SCO2(synthesis of cytochrome c oxidase 2) の発現を介してミトコンドリア呼吸を調節していることを報告したが、p53、SCO2 と糖尿病性心筋症の関係は明らかではない。そこでこれらの関係を明らかにするために以下の研究をおこなった。

p53(+/-)マウスに STZ を投与し作成した I 型糖尿病モデルでは、経時的に p53 の発現が増加しており、心エコーで評価した心機能も低下していた。心不全の指標である BNP も mRNA レベルで増加していた。p53(-/-)マウスの STZ I 型糖尿病モデルでは、心機能の低下は抑制され、BNP の発現増加もみとめなかった。

STZ 投与後 4 週の I 型糖尿病心の組織学的検索をおこなった。心筋細胞、炎症細胞、線維化、微小血管は p53 genotype に関して差をみとめなかった。しかし ROS による障害、脂肪酸の蓄積については、p53(+/-)マウスで増加していたが、p53(-/-)マウスで減弱していた。

ミトコンドリア呼吸と細胞内への脂肪酸輸送が亢進することで、脂肪酸の蓄積が亢進することがこれまでも報告されているため、我々もミトコンドリア呼吸の評価をおこなった。ミトコンドリア呼吸全体の評価として state3 呼吸を評価したところ、p53(+/-)糖尿病マウスでは亢進し、p53(-/-)糖尿病マウスでは亢進していなかった。ミトコンドリア呼吸鎖のどの complex がミトコンドリア呼吸の変化に関与しているか検索するため、各 complex の機能を評価した。p53(+/-)マウスでは complex 4 のみ活性が有意に亢進しており、p53(-/-)マウスでは complex 4 活性の亢進が認められなかった。complex 1-3 については、両群間で差をみとめなかった。complex 4 が糖尿病心のミトコンドリア呼吸亢進の原因となっていた。

p53 により発現が調節されている SCO2 蛋白はミトコンドリア呼吸鎖 complex 4 の構成蛋白のひとつである。糖尿病心においてミトコンドリア complex 4 の活性が増加しており、p53(-/-)マウスではこの変化が抑制されていたことから、この機序に SCO2 が関与している

のではないかと考え、SCO2 について解析した。p53(+/-)糖尿病心では SCO2 蛋白の発現が増加しており、p53(-/-)糖尿病心ではその変化がみられなかった。SCO2 を培養心筋細胞に過剰発現させると、脂肪酸代謝と取り込み、ミトコンドリアでの ROS 産生が増加した。SCO2 のノックダウンではこれらの変化が減弱した。このことから、SCO2 は脂肪酸代謝、取り込み、ミトコンドリアでの ROS 産生に大きな役割を果たしていると考えられた。

I 型糖尿病心における ROS の役割を明らかにするため、抗酸化物質である Tempol を投与すると、p53、SCO2 の発現亢進、ミトコンドリア呼吸の亢進、ROS 産生が減弱し、心機能障害も減弱した。ROS による心筋細胞の収縮に対する影響を調べるため、培養心筋細胞を用いて検討した。オレイン酸を含んだ培地で心筋細胞を培養すると、オレイン酸濃度依存性にミトコンドリア由来の ROS が産生される。ROS 産生の多かった心筋細胞ではアポトーシスや細胞の viability に有意差はないが、収縮能が有意に低下していた。

SCO2(-/-)は胎生致死であるため、SCO2(+/-)マウスをもちいて SCO2 の役割を検討した。組織学的検索、ミトコンドリア呼吸評価、心機能評価いずれにおいても、SCO2(+/-) I 型糖尿病マウスは p53(-/-) I 型糖尿病マウスと同様のフェノタイプを示した。このことから、SCO2 によるミトコンドリア呼吸の過剰な変化が糖尿病心の機能障害の原因となっていると考えられた。

これまでに報告されている、脂肪酸代謝を調節する遺伝子について検索した。FAT/CD36 は mRNA レベルでも、細胞膜への発現でも p53(+/-)糖尿病心で増加していたが p53(-/-)糖尿病心で増加していなかった。培養心筋細胞にて、p53 のユビキチン化を抑制する Nutlin-3 を用いると、p53 蛋白の増加とともに FAT/CD36 の mRNA が増加した。また、H2O2 負荷で p53 を誘導しても、FAT/CD36 は増加し、p53 をノックダウンした上で H2O2 を負荷したところ、p53、FAT/CD36 いずれも抑制された。NCBI の CD36 の遺伝子情報によると、p53 の結合部位が存在していた。これらのことから、FAT/CD36 は p53 により遺伝子レベルで発現調節されていると考えられた。

STZ による I 型糖尿病モデルでみとめられた p53/SCO2 の発現、組織学的変化、ミトコンドリア呼吸能の変化、心機能障害はいずれも II 型糖尿病モデルである db/db マウスにおいてもみとめられた。p53/SCO2 システムは I 型、II 型糖尿病のいずれにおいても同様に働いていた。

I 型糖尿病、II 型糖尿病いずれにおいても、ROS に依存して p53、SCO2 の発現が増加した。発現が増加した SCO2 はミトコンドリア呼吸鎖 complex 4 を活性化させることで脂肪酸代謝を亢進させ、その結果ミトコンドリア由来の ROS が増加した。また、p53/SCO2 システムと FAT/CD36 は密接に関わっており、p53/SCO2 システムの活性化により発現が増加した FAT/CD36 により細胞内の異常な脂肪酸蓄積に至った。p53/SCO2 システムを抑制することで心機能障害が抑制されることから、p53、SCO2 は糖尿病性心筋症の進展を予防する治療対象になりうるかもしれない。