主論文の要旨

LPL/AQP7/GPD2 promotes glycerol metabolism under hypoxia and prevents cardiac dysfunction during ischemia

（低酸素環境下において、LPLとAQP7とGPD2は
グリセロール代謝を促進し、虚血時の心機能悪化を抑制する）

名古屋大学大学院医学系研究科　総合医学専攻
病態内科学講座　循環器内科学分野
（指導：室原 豊明　教授）
石濱 総太

【緒言】

心臓は収縮や組織の維持のために、多くの ATP を必要とする。心臓の ATP の約 60-90% が脂肪酸から生成され、約 10-40% がグルコース・乳酸・ケトン体・アミノ酸の酸化により生成される。運動や妊娠などの生理的ストレスにより脂質をエネルギー源とする ATP 産生は亢進し、病的ストレスではグルコースなどがエネルギー源として利用され、心臓のポンプ機能を維持している。心筋虚血の発生は、酸素の供給と心筋の需要のバランスが崩れることにより起こる。グルコースは酸素消費量当たりの ATP 産生量が多いことが知られており、低酸素状態では心筋の主なエネルギー源は脂肪酸からグルコースに移行する。

リポタンパクリパーゼ(LPL)は、循環中のトリグリセリドを脂肪酸に変換する主要な酵素であり、心筋細胞や骨格筋・脂肪組織から生成される。グリセロールはLPLの酵素作用によりリポタンパクのトリグリセリド成分が分解されて脂肪酸が生成される際に供給される。

アクアポリン7(AQP7)はアクアグリセロポリンであり、心筋へのグリセロール輸送を促進する。AQP7の欠損は心臓における圧負荷誘発性心不全の悪化をさせることが知られている。

グリセロールは細胞内に取り込まれた後、グリセロールキナーゼの作用により、グリセロール3リン酸(G3P)へと代謝され、G3Pはグリセロール3リン酸デヒドロゲナーゼ 2 (GPD2)の作用により、ジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)へと代謝され、糖代謝経路に流入しエネルギー産生に繋がる。

低酸素条件下での心筋細胞におけるエネルギー産生の基質としてのグリセロールの役割についてはまだ明らかになっていない。

本論文では、低酸素条件下での心筋細胞におけるLPL/AQP7/GPD2が制御するグリセロール代謝について検討することとした。

【方法】

GPD2 欠損マウス(GPD2 KO マウス)は東京大学から入手した。AQP7 欠損マウス(AQP7 KO マウス)は RIKEN BRC から入手した。LPL の flox alleles を持つマウスは Columbia 大学から入手した。タモキシフェン誘導型の心筋特異的 LPL 欠損マウス(cmc-LPL-KO マウス)を、α-MHC-CreERT2 マウスと LPL flox/flox マウスを交配することにより作成した。タモキシフェン 1mg を 100ul の Miglyol に溶解したものを 5 日間連続で腹腔内注射することにより心筋特異的 LPL ノックアウトマウスを作製し、誘導後 5-7 日目に実験を行った。心筋梗塞モデルはマウス心臓の左冠動脈前下行枝を結紮することにより作成した。心機能評価は心エコーにおける左室内径短縮率(FS%)で評価した。

【結果】

心筋梗塞1時間後の心臓切片の免疫染色において、心臓でのLPL発現の増加を認めた

(Figure 1A and 1B)。単離マウス心筋細胞を低酸素条件下で培養したところ、1時間で細胞表面のLPL発現の増加が認められた(Figure 1C and 1D)。

心筋梗塞後の心機能をcmc-LPL-KOマウス群とコントロールマウス群を比較したところ、cmc-LPL-KOマウス群の心機能は有意に低下していた(Figure 1F)。さらにTUNEL染色によるアポトーシスを評価したところ、cmc-LPL-KOマウス群では心筋梗塞によるアポトーシスが亢進していた(Figure 1G)。

次に低酸素条件下の心筋細胞においてグリセロールがエネルギー源になるかどうかを検討した。単離マウス心筋細胞を通常酸素および低酸素条件下で4時間培養し、細胞生存率をトリパンブルー染色で評価した。グリセロールは通常酸素条件下では心筋細胞の生存率を用量依存的に増加させ、低酸素条件下ではさらにその効果が増強された(Figure 2A)。

次に低酸素条件下におけるグリセロールの心筋保護作用における AQP7 の役割を明らかにするため、AQP7 KO マウスを用いて検討した。単離マウス心筋細胞を低酸素条件下で培養しグリセロールによる細胞生存率改善効果を検討した。AQP7 KO マウスでは生存率改善効果の減弱が認められた(Figure 2B)。AQP7 KO マウス群では、アポトーシスの増加が認められた(Figure 2C and 2D)。心筋梗塞 7 日後の検討では、AQP7 KO マウス群では心筋梗塞領域の増加が認められた(Figure 2E and 2F)。

次にグリセロール代謝と糖代謝のつなぎ目である GPD2 の働きに関して検討した。GPD2 はミトコンドリア膜上に局在することから、マウス心臓からミトコンドリアを単離し GPD2 活性を評価した。心筋梗塞により Ca^{2+} 濃度が増加することから、ミトコンドリア培養液中に Ca^{2+} を添加し、細胞内 GPD2 活性を評価したところ、GPD2 活性は増強を認めた(Figure 3B)。

心筋細胞でのグリセロールによるATP産生を測定した。正常酸素条件下では、グリセロールの有無で有意なATP産生量の差を認めなかったが、低酸素条件下ではグリセロール非存在下ではATP産生が有意に低下し、グリセロール存在下では有意にATP産生が増加した(Figure 3E)。また、低酸素条件下でのグリセロールによるATP産生効果はGPD2阻害剤により用量依存的に抑制されたが、正常酸素条件下ではATP産生に影響を与えなかった。GPD2 KOマウス群では、心筋梗塞に伴う心機能低下(Figure 3F)と梗塞領域率の増加(Figure 3G)が認められた。心筋梗塞後にグリセロールを投与し、心筋梗塞1日後に心機能を測定したところ、GPD2 KOマウス群ではグリセロール投与による心機能の改善効果は減弱した(Figure 3H)。

【考察】

本研究ではグリセロールが心筋細胞のエネルギー産生の基質であることが明らかにした(Figure 4)。グリセロールは細胞内で代謝された後、糖代謝系に入ることにより、エネルギー産生におけるエネルギー源として機能すると考えられる。心筋梗塞や心不全などの病態下では、心筋細胞へのグリセロールの取り込みはAQP7を介して行われる。AQP7 KOマウスを用いた実験では、AQP7が心筋細胞においてもグリセロールチャ

ネルとして働くことが示されている(論文引用)。LPLは心筋細胞で産生され、内皮細胞の表面に移動して、酵素として働くことが示唆されている(論文引用)。心筋特異的LPL欠損マウスでは血漿トリグリセリド濃度が上昇し、左室収縮が低下することが報告されている(論文引用)。本研究ではタモキシフェンを投与5日後に心筋梗塞を作成し、トリグリセリド濃度上昇に伴うcmc-LPL-KOマウスに対する心筋障害を回避し実験を行った。その結果、心筋梗塞やPPARαアゴニスト投与により、心筋細胞からLPLが分泌され、心筋梗塞による心筋障害が予防されることが分かった。本研究の結果、GPD2欠損が基礎的な心機能に影響を与えないことや心臓における脂質代謝と糖代謝を調整する役割をしていることが明らかになった。GPD2を介したG3PからDHAPへの代謝が嫌気的条件下でのATP産生に寄与しているが示された。心筋細胞内でのCa^{2+} 濃度は心筋梗塞により上昇することおよび、Ca^{2+} 濃度上昇によって心筋のGPD2活性が上がることが知られており、本研究において心筋梗塞1時間後の心筋ミトコンドリアを単離することによりGPD2活性が上昇していることを示した。虚血条件下においてグリセロール代謝が活性化されるメカニズムについては、今後の検討が必要である。

【結語】

本研究において、心筋梗塞によってLPL分泌が増加することが明らかになった。AQP7は心筋梗塞時にグリセロールチャネルとして機能し、取り込まれたグリセロールはGPD2により解糖系に流入しATP産生に寄与する。本研究の結果、LPL/AQP7/GPD2を介したグリセロール代謝が心筋梗塞に対する新たな治療法の標的分子となることが示唆された。