

The role of Na^+/H^+ exchange and the Na^+/K^+ pump in the regulation of $[\text{Na}^+]_i$ during metabolic inhibition in guinea pig myocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 加藤, 秀樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1086

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 233号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏名	加藤 秀樹		
論文題目	<p>The role of Na^+/H^+ exchange and the Na^+/K^+ pump in the regulation of $[\text{NA}^+]_i$ during metabolic inhibition in guinea pig myocytes (代謝阻害中のモルモット心筋細胞内ナトリウム濃度の調節における Na^+/H^+ 交換と Na^+/K^+ ポンプの役割)</p>		

博士(医学) 加藤 秀 樹

論文題目

The role of Na^+/H^+ exchange and the Na^+/K^+ pump in the regulation of $[\text{Na}^+]_i$ during metabolic inhibition in guinea pig myocytes

(代謝阻害中のモルモット心筋細胞内ナトリウム濃度の調節における Na^+/H^+ 交換と Na^+/K^+ ポンプの役割)

論文の内容の要旨

[はじめに]

心筋の虚血/再灌流障害の原因として、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇による Ca^{2+} 過負荷が重要と考えられ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の機序として $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の関与が示唆されている。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇への関与を検討するためには、細胞内 Na^+ 濃度 ($[\text{Na}^+]_i$) の動態と、その調節機構を明らかにすることが重要である。本研究では、単一心筋細胞を用いて、代謝阻害中の $[\text{Na}^+]_i$ と細胞内 pH (pH_i) の変化を測定し、 $[\text{Na}^+]_i$ の調節における Na^+/H^+ 交換と Na^+/K^+ ポンプの関与について検討した。

[材料ならびに方法]

酵素法を用いて分離したモルモット心室筋細胞に、 Na^+ 感受性色素のソディウムバインディングベンゾフランイソフタレート (SBFI/AM; $5 \mu\text{M}$) と、pH 感受性色素の2,7ビスカルボキシエチル5,6,カルボキシフルオレセイン (BCECF/AM; $0.5 \mu\text{M}$) を室温で30分間負荷した。 $[\text{Na}^+]_i$ と pH_i の測定には、高感度ビデオカメラ (SIT)、細胞内イオン濃度解析装置 (ARGUS100: 浜松ホトニクス社) を使用した。

$[\text{Na}^+]_i$ は 340nm と 380nm の波長で励起時の 510nm での蛍光像を、 pH_i は 490nm と 450nm の波長で励起時の $505\text{--}560\text{nm}$ での蛍光像を取得した後、それぞれの蛍光強度比として算出した。 $[\text{Na}^+]_i$ の測定ではグラミシジン ($10 \mu\text{M}$)、 pH_i の測定ではナイジェリシン ($10 \mu\text{M}$) を用いて *in vivo* 較正曲線を作成し、蛍光比から濃度に換算した。代謝阻害のためにはクレブス液からグルコースを除き(解糖系の抑制)、カルボニルシアニド *m*-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP; $5 \mu\text{M}$) とアモバルビタール (amytal; 3.3mM) を加えた(酸化リン酸化の抑制)。 Na^+/H^+ 交換の抑制にはヘキサメチレンアミロライド (HMA; $1 \mu\text{M}$) を用いた。 Na^+/K^+ ポンプは、細胞外 K^+ を除去 (0K^+) することにより抑制し、その後 5mM の K^+ 細胞外液に再添加 (5K^+) することにより、再活性化させた。

[結 果]

(1) 代謝阻害中の $[\text{Na}^+]_i$ と pH_i の変化

$[\text{Na}^+]_i$ はコントロールでは $8.3 \pm 0.7 \text{mM}$ (平均 \pm SE) であった。 $[\text{Na}^+]_i$ は代謝阻害20分後に $17.3 \pm 1.3 \text{mM}$ に上昇した ($n=22; p<0.01$)。解糖系は抑制せずに、酸化リン酸化のみを抑制すると、 $[\text{Na}^+]_i$ の上昇は、代謝阻害に比して軽度であった ($p<0.01$)。 pH_i は 7.22 ± 0.03 から代謝阻害20分後に 7.00 ± 0.04 に低下した ($n=28; P<0.05$)。解糖系は抑制せずに、酸化リン酸化のみを制御すると、 pH_i の低下は代謝阻害に比して軽度であった ($p<0.05$)。

(2) 代謝阻害中の $[\text{Na}^+]_i$ 変化における Na^+/H^+ 交換の関与

HMA の存在下では、 $[\text{Na}^+]_i$ は代謝阻害20分後に $9.3 \pm 0.9 \text{mM}$ までしか上昇せず、HMA を灌流し

ない群に比し代謝阻害中の $[Na^+]_i$ 上昇は抑制された ($p < 0.01$)。

(3) 代謝阻害中の $[Na^+]_i$ 変化における Na^+/K^+ ポンプの関与

- (a) $0 K^+$ により Na^+/K^+ ポンプを抑制し、10分後に $5 K^+$ として再活性化した。コントロール群では、 $0 K^+$ により $[Na^+]_i$ は $25.9 \pm 1.4 \text{ mM}$ まで上昇し、その後の $5 K^+$ により低下した。代謝阻害群では $[Na^+]_i$ は $0 K^+$ により $33.3 \pm 2.7 \text{ mM}$ まで上昇したが、その後の $5 K^+$ での低下を認めなかった。
- (b) Na^+/H^+ 交換を抑制した後に、初期10分間は $5 K^+$ 、その後は $0 K^+$ 溶液を灌流すると、コントロール群では $0 K^+$ にした直後から $[Na^+]_i$ は上昇を始めた。代謝阻害群では $[Na^+]_i$ は8分後から上昇を始め、10分後に $0 K^+$ としても上昇の程度には変化を認めなかった。代謝阻害と同時に $0 K^+$ とした群では、 $[Na^+]_i$ は代謝阻害の直後より上昇した。

[考 察]

代謝阻害中には、 pH_i 低下により細胞膜内外の H^+ 濃度勾配が生じるため、 Na^+/H^+ 交換が活性化されて $[Na^+]_i$ が上昇すると考えられた。HMA により代謝阻害中の $[Na^+]_i$ 上昇は抑制され、代謝阻害中の $[Na^+]_i$ 上昇において、 Na^+/H^+ 交換は細胞外からの Na^+ 流入の主な経路であることが示された。代謝阻害10分後に Na^+/K^+ ポンプを再活性化しても $[Na^+]_i$ には変化を認めず、 Na^+/H^+ 交換を抑制した条件下では、代謝阻害後8分から $[Na^+]_i$ の上昇を認め、10分後に Na^+/K^+ ポンプを抑制しても $[Na^+]_i$ 上昇の程度には変化を認めなかった。代謝阻害により Na^+/K^+ ポンプが抑制されたため、細胞内からの Na^+ 排出が減少して $[Na^+]_i$ が上昇したと考えられた。

[結 論]

- (1) 代謝阻害中に $[Na^+]_i$ は上昇し、 pH_i は低下した。代謝阻害中の $[Na^+]_i$ 上昇には、 Na^+/H^+ 交換を介する細胞外からの Na^+ 流入が重要であることが示された。
- (2) Na^+/K^+ ポンプは代謝阻害10分後には抑制され、細胞内からの Na^+ 排出の抑制が、代謝阻害中の $[Na^+]_i$ 上昇の機序の一つであることが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

心筋の虚血再灌流時や低酸素負荷時に、細胞内 Ca イオン濃度が上昇することはこれまでよく知られてきた。この機構のひとつとして Na^+/Ca^{2+} 交換作用が考えられている。実際、細胞内 Na イオンの濃度は虚血再灌流時や低酸素負荷時には上昇することが示されている。しかし、その上昇の機構についての解析は十分には行われておらず、 Na^+/H^+ 交換機構と Na^+/K^+ ポンプが実際に関与していることの証明もなされていなかった。

そこで申請者は、モルモット心筋細胞内の Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) と H^+ 濃度 ($[H^+]_i$) とを測定しながら細胞の代謝を阻害し、それぞれの濃度変化に対して、どのような薬物が影響を与えるかを検討することによって、それらのイオン濃度の変化の機構を薬理的に解析した。 Na^+ 感受性の蛍光色素であるソディウム-バインディング ペンゾフランイソフタレート (SBFI) と、 H^+ 感受性の蛍光色素である2,7-ビスカルボキシエチル-5,6-カルボキシフルオレセイン (BCECF) を心筋細胞内のロードし、それらの蛍光強度から $[Na^+]_i$ と $[H^+]_i$ とを同時に測定した。代謝阻害のために、溶液のグルコースを除いて解糖系を抑え、また、溶液にアモバルピタールを加えて NADPH- デヒドロゲナーゼの抑制をし、カルボニルシアニド m - クロロフェニルヒドラゾンを加えて酸化的リン酸化を抑制した。また、溶液にアミロライドを加えて Na^+/H^+ 交換機構の抑制をした。溶液中の K^+ 濃度を 0 と 5 mM の間で動かし、 Na^+/K^+

ポンプを抑制したり再活性化したりした。

代謝阻害を行うと、 $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{H}^+]_i$ が共に大きく上昇する反応が見られた。アミロライドの存在下では、この $[\text{Na}^+]_i$ の上昇反応は抑えられた。したがって、この反応には Na^+/H^+ 交換機構が関わっていることが示唆された。対照群では Na^+/K^+ ポンプの抑制で $[\text{Na}^+]_i$ は上昇し、再活性化で下降したのに対し、代謝阻害群ではポンプの抑制で $[\text{Na}^+]_i$ は上昇したが、再活性化での下降が起きなかった。これは、代謝阻害のためポンプが働かず、細胞内の Na^+ を排出できないためと解釈された。 Na^+/H^+ 交換機構を抑制した条件下で、 Na^+/K^+ ポンプの抑制を代謝阻害の早い時期にすると $[\text{Na}^+]_i$ の上昇が認められたが、代謝阻害の進行後にポンプの抑制をしてもその効果は検出できなかった。代謝阻害によりポンプ機能が停止すると K^+ 濃度低下によるポンプ抑制の効果がマスクされるものと考えられた。これらの事から申請者は、代謝阻害時には、まず $[\text{H}^+]_i$ が上昇し、その結果 Na^+/H^+ 交換機構を介して $[\text{Na}^+]_i$ が上昇することを結論し、さらに、代謝阻害による Na^+/K^+ ポンプの抑制で Na^+ の排出が低下することが重疊しているものと結論した。

審査委員会は、心筋細胞内の $[\text{Na}^+]_i$ の上昇が Na^+/H^+ 交換を介して起こることを明らかにした点を、基礎医学的に意義のある研究結果と認めた。これまで反応としては分かっていたことの細胞機構が薬理学的に証明された点を、特に評価した。虚血に際する心筋細胞内のイオン動態が、どのように障害に結びついていくかという問題にひとつの解答が得られ、虚血再灌流障害の理解に新たな一項目が付け加えられたものと評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 細胞内 Na^+ の測定法の種類とそれぞれの問題点は
- 2) SBFi が使われるようになった経緯について
- 3) 蛍光色素を使って細胞内 Na^+ を測定するための校正曲線はどのように得るか
- 4) 校正のために用いられるイオノマイシン法とグラミシジン法の差
- 5) 蛍光色素が選択的に取り込まれる細胞内コンパートメントの量はどのように推定できるか
- 6) 代謝阻害のためにシアンを使わなかった理由
- 7) 細胞の長時間の蛍光測定における問題点は
- 8) アミロライドによって Na^+/H^+ 交換機構の働きを抑制しているときに $[\text{H}^+]_i$ の測定をしなかった理由
- 9) $[\text{Na}^+]_i$ の増加による細胞死と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加による細胞死の違いについて
- 10) 臨床的に再灌流障害を防ぐにはどうすればいいか
- 11) 細胞内 pH を操作することによって $[\text{Na}^+]_i$ を下げられないか
- 12) 虚血状態と薬物によって代謝阻害をかけたときの差をどのように考えるか
- 13) 虚血と低酸素とはどのように違うか
- 14) 培養下の心筋細胞と生体内の心筋細胞との差をどのように考えるか
- 15) 蛍光強度の時間変化を測定するのにビデオカメラを使う利点は何か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 寺川 進
副査 教授 中島 光好 副査 助教授 菱田 明