



A single cell model of myocardial reperfusion injury : changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations in guinea pig ventricular myocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 拓郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1577

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	医博論第 300号	学位授与年月日	平成11年 3月 9日
氏名	中村拓郎		
論文題目	<p>A single cell model of myocardial reperfusion injury:changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations in guinea pig ventricular myocytes (心筋再灌流障害の単一細胞モデル:モルモット心室筋細胞における細胞内 Na⁺ と Ca²⁺ 濃度の変化)</p>		

博士(医学) 中村拓郎

論文題目

A single cell model of myocardial reperfusion injury: changes in intracellular Na^+ and Ca^{2+} concentrations in guinea pig ventricular myocytes

(心筋再灌流障害の単一細胞モデル：モルモット心室筋細胞における細胞内 Na^+ と Ca^{2+} 濃度の変化)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

心筋の虚血/再灌流障害の原因として、 Ca^{2+} 過負荷が重要と考えられている。虚血中の細胞内 Na^+ 濃度 ($[\text{Na}^+]_i$) の上昇が、再灌流後に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇を引き起こすと考えられているが、虚血中や再灌流後の $[\text{Na}^+]_i$ に関しては報告により一定していない。また、 $[\text{Na}^+]_i$ や $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化と細胞障害の関係も未だ明らかではない。これは、心筋組織では細胞間の不均一性があることもその理由である。我々は、単一心筋細胞を用いて疑似虚血/再灌流モデルを作成し、個々の細胞において $[\text{Na}^+]_i$ 、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と細胞内pH (pHi) を測定し、細胞障害との関連を検討した。

〔材料ならびに方法〕

酵素法によりモルモット単一心室筋細胞を分離し、SBFI/AM ($5\mu\text{M}$) と fluo-3/AM ($10\mu\text{M}$) により $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を同時測定した。 pHi は BCECF/AM ($0.5\mu\text{M}$) により測定した。虚血/再灌流モデルとしては、CCCP ($5\mu\text{M}$) と amytal (3.3mM) を $\text{pH}6.6$ の溶液で灌流し、 $\text{pH}7.4$ の溶液で wash out した。

〔結果〕

(1) 7.5分間の疑似虚血中、 $[\text{Na}^+]_i$ は 7.9 ± 2.0 (平均 \pm SE, $n=22$) mMから 14.0 ± 3.4 mM ($p < 0.01$) に上昇し、再灌流7.5分後にさらに 18.8 ± 3.0 mM まで上昇した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は虚血7.5分後に control の $133 \pm 8\%$ ($p < 0.01$) に上昇し、再灌流後に徐々に低下した。 pHi は 7.53 ± 0.04 から虚血7.5分後に 6.31 ± 0.04 ($p < 0.01$) まで低下し、再灌流後に速やかに回復した。(2) 虚血中に、 Na^+/H^+ 交換の選択的阻害剤である hexamethylene amiloride (HMA; $2\mu\text{M}$) を投与すると、 $[\text{Na}^+]_i$ は 10.0 ± 0.5 mM から 5.8 ± 0.6 mM ($p < 0.01$) に低下し、再灌流後の $[\text{Na}^+]_i$ 上昇と pHi の回復は抑制された。(3) 虚血時間を15分に延長すると、再灌流後に43%の細胞では形態に変化はなかったが、57% (37個中21個) の細胞は Ca^{2+} wave を呈し、そのうちの19% (4個) の細胞は、過拘縮を起こした。形態変化を示さなかった群の $[\text{Na}^+]_i$ と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は、ともに再灌流後に速やかに低下した。 Ca^{2+} wave のみを示した群では、 $[\text{Na}^+]_i$ は再灌流後早期に一過性に上昇した後に低下したが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は上昇しなかった。過拘縮をきたした群は、再灌流後 $[\text{Na}^+]_i$ が上昇し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は著しく上昇した。(4) Ca^{2+} free溶液で再灌流すると再灌流後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇はなく、形態の変化もなかった。(5) 再灌流時に、筋小胞体の Ca^{2+} 放出チャンネルを開放固定する ryanodine ($10\mu\text{M}$) を投与すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は増幅され、14%の細胞は Ca^{2+} wave を示さないまま過拘縮をきたした。

〔考察〕

虚血中の $[\text{Na}^+]_i$ 上昇がHMAで抑制されたことより、虚血中にも Na^+/H^+ 交換は活性化されていると

考えられ、再灌流後の一過性の $[Na^+]_i$ 上昇も Na^+/H^+ 交換によることが示された。15分間の虚血後の再灌流モデルでは、細胞形態の変化により3群に分けられ、形態変化のなかった群では、再灌流後に $[Na^+]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ は共に速やかに低下し、 Ca^{2+} waveを示した群では、再灌流直後に一過性に $[Na^+]_i$ が上昇し、過拘縮をきたした群では、再灌流後 $[Ca^{2+}]_i$ が著しく上昇した。以上より、再灌流後の細胞障害は $[Na^+]_i$ 上昇と、 Na^+/Ca^{2+} 交換を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇により決定されたと考えられた。また、筋小胞体の機能を抑制しておくことにより、 $[Ca^{2+}]_i$ は制御不能となって、一部の細胞は過拘縮を起こした。

〔結論〕

1) 疑似虚血/再灌流時に Na^+/H^+ 交換が活性化されて、 $[Na^+]_i$ は上昇する。2) 再灌流後の $[Na^+]_i$ 上昇と、 Na^+/Ca^{2+} 交換を介した Ca^{2+} 流入が再灌流障害の決定因子である。3) 筋小胞体の Ca^{2+} の buffering も再灌流の $[Ca^{2+}]_i$ 調節と細胞障害に関係する。

論文審査の結果の要旨

心筋の虚血/再灌流障害の原因として、 Ca^{2+} 過負荷が重要と考えられている。虚血中の細胞内 Na^+ 濃度 ($[Na^+]_i$) の上昇が、再灌流後に Na^+/Ca^{2+} 交換を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇を引き起こすと考えられているが、虚血中や再灌流後の $[Na^+]_i$ に関しては報告により一定していない。また、 $[Na^+]_i$ や $[Ca^{2+}]_i$ の変化と細胞障害の関係も未だ明らかではない。これは、心筋組織では細胞間の不均一性があることもその理由である。それ故、単一心筋細胞を用いて、これらを検討することは、虚血/再灌流障害の機構を解明する上で重要である。

申請者はこの解明を試みて、酸素法により分離したモルモット単一心室筋細胞を用いて、carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) と amytal の代謝阻害剤を pH6.6 の灌流液に投与することにより虚血モデルとした。さらに、これらの代謝阻害剤を pH7.4 の灌流液で washout することにより、虚血/再灌流モデルを作成した。 $[Na^+]_i$ は、蛍光色素 sodium-binding benzofuran isophthalate (SBFI) /AM を負荷し、340nm と 380nm の励起光を細胞に照射し、510nm での蛍光比を測定することにより求めた。

$[Ca^{2+}]_i$ の測定は、蛍光色素 fluo-3 を負荷し、500nm の励起光を照射し、540nm の蛍光を測定し、control 値に対する % で求めた。このとき、細胞形態の変化による影響を除くために、 $[Na^+]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ によらない 360nm の励起光を用いて補正した。これらの蛍光色素を同時負荷し、 $[Na^+]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ を同時に測定した。

1) 7.5分間の虚血中、 $[Na^+]_i$ は有意に上昇し、再灌流後にさらに一過性に上昇したが、これは、hexamethylene amiloride (HMA) で抑制されたことより、虚血中も Na^+/H^+ 交換は活性化されていると考えられ、再灌流後の一過性の $[Na^+]_i$ の上昇には、 Na^+/H^+ 交換が関与していることが示された。2) 15分間の虚血後の再灌流モデルでは、細胞形態の変化により3群に分けられた。形態変化のなかった群では、再灌流後に $[Na^+]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ は、共に速やかに低下し、 Ca^{2+} waveを示した群では、再灌流直後に一過性に $[Na^+]_i$ が上昇し、一方、 Ca^{2+} wave の後に過拘縮をきたした群では、再灌流後に $[Na^+]_i$ の上昇、および、 $[Ca^{2+}]_i$ の著しい上昇を認めた。3群とも、虚血中の $[Na^+]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に有意差はなかった。このことより、再灌流後の細胞障害は $[Na^+]_i$ 上昇と、 Na^+/Ca^{2+} 交換を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇により決定されたと考えられた。3) 無 Ca^{2+} 灌流液で再灌流すると、再灌流後の一過性の $[Na^+]_i$ の上昇はみられたが、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はなく、 Ca^{2+} wave が抑制されたことより、 Ca^{2+} wave は、再灌流後の $[Na^+]_i$ 上昇のみでなく、細胞外からの Ca^{2+} 流入が関与していることが示唆された。4) Ryanodine によ

り筋小胞体の機能を抑制すると、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は増幅され、一部の細胞は過拘縮を起こしたことより、筋小胞体による Ca^{2+} のbufferingも、再灌流後の $[Ca^{2+}]_i$ 調節と細胞障害に関係する可能性が示された。

審査の過程において、申請者に対して、次のような質問がなされた。

- 1) 単離心筋細胞での虚血/再灌流モデルと臨床における虚血/再灌流の相違
- 2) 虚血/再灌流における細胞内ATPレベルについて
- 3) Fluo-3の使用理由とfura-2との比較について
- 4) 細胞内pHの調節について
- 5) Ryanodineの作用機序について
- 6) Na^+/K^+ ポンプが細胞内 Na^+ の上昇へどのように関与するのかについて
- 7) Ca^{2+} waveのメカニズムについて
- 8) 他の虚血モデルとの比較について
- 9) 虚血/再灌流による心筋細胞の形態変化の相違の生じる機序について
- 10) 細胞内 Ca^{2+} 、 Na^+ 、pHの絶対値の算出法について

これらの質問に対し申請者の解答は概ね適切であり、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の一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 大橋 京一

副査 教授 数井 暉久 副査 教授 橋本 久邦