

## 低酸素, 再酸素化時の心筋ミトコンドリア内 遊離カルシウムの動態と筋小胞体の役割

The changes in mitochondrial calcium concentration and the role of sarcoplasmic reticulum during hypoxia and reoxygenation

浜松医科大学 第三内科

宮田 晴夫・小林 明

浜松医科大学 光子医学研究センター

林 秀晴

Laboratory of Cardiovascular Science, GRC, NIA, NIH.

Edward G. Lakatta

The 3rd Department of Internal Medicine and \*Photon Medical Research

Center, Hamamatsu University School of Medicine. Haruo Miyata, Akira

Kobayashi, \*Hideharu Hayashi. LCS, GRC, NIA, NIH, Edward G. Lakatta.

### 【目 的】

虚血再灌流時の細胞障害の不可逆性に心筋のミトコンドリア内カルシウム過剰・沈着が関連していると報告されている<sup>1)</sup>。しかし、従来の研究ではその経時的測定、病態時の細胞障害との関連性等の検討は困難であった。今回、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 indo-1 を用いて、収縮・弛緩している単一心筋細胞レベルにおける低酸素・再酸素化時のミトコンドリア内遊離カルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ )<sup>2)</sup> および細胞内カルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) の検討をした。

### 【方 法】

ラットの単一心筋細胞は酵素法により分離した。蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 indo-1 を indo-1 の AM 体で負荷した時には約半量の indo-1 がミトコンドリアに存在すること<sup>3)</sup> より、 $\text{Mn}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) にて細胞質内の indo-1 蛍光を quench した後に、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$  を測定した。また、 $[\text{Ca}^{2+}]_c$  は indo-1/FA を細胞質内に選択的に負荷して測定した。 $[\text{Ca}^{2+}]$  の測定には落射蛍光顕微鏡装置を使用し、350 nm で励起時の蛍光強

度比 (410/490 nm) より測定し、細胞収縮も同時に観察した<sup>3)</sup>。低酸素状態は無グルコース溶液にアルゴンガスを使用し、 $\text{pO}_2 < 0.02$  torr とした。実験のプロトコールは、細胞を 0.2 Hz で刺激し、低酸素化により図 1 のように酸素化状態の 65% に短縮 (rigor), その 35 分後に再酸素化した。再酸素化時に細胞は延長 (回復群) またはより短縮する (障害群) 経過を示した。

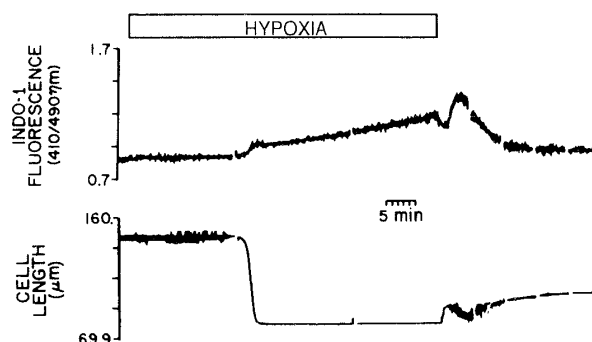


図2 低酸素再酸素化時のミトコンドリア内遊離カルシウム濃度の変化 (Miyata<sup>4)</sup>)

上段は  $\text{Mn}^{2+}$  で細胞質内 indo-1 を quench 後のミトコンドリア由来の indo-1 蛍光比, 下段は細胞長である。

### 【結 果】

$[\text{Ca}^{2+}]_m$  を測定した細胞における低酸素, 再酸素化の経過を図2に示す。 $[\text{Ca}^{2+}]_m$  は、細胞短縮後に酸素化時の 80 nM より 110 nM に上昇した。その後も  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  は緩徐に上昇し、再酸素化した時には一過性に低下後再度上昇した。この細胞は elongation し、刺激に反応した。図3は  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  を測定した細胞における記録で、酸素化時の収縮期  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  は

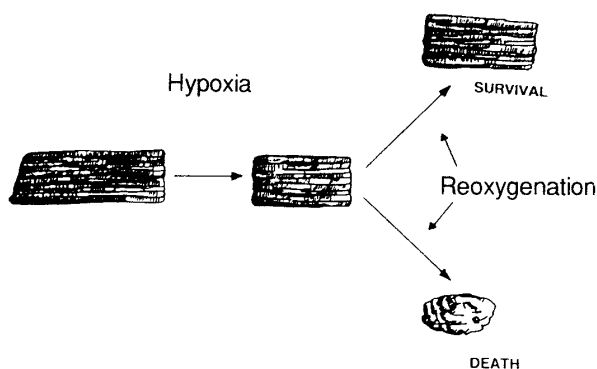


図1 低酸素再酸素化時の細胞形態

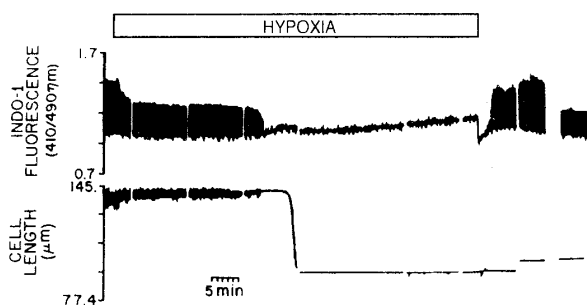


図3 低酸素再酸素化時の細胞内遊離カルシウム濃度の変化

400 nM, 弛緩期 120 nM であった。低酸素化後の細胞短縮時に  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を認めず, 短縮後徐々に上昇し, 再酸素化時には急激な低下を認めた後に  $Ca^{2+}$  transients は回復した。低酸素により短縮し, 35 分後に再酸素化した細胞を形態により障害群, 回復群に分けてその  $[Ca^{2+}]$  値を plot したものを図 4 に示す。再酸素化直前の  $[Ca^{2+}]_m$  は障害群で  $404 \pm 39$  nM (Mean  $\pm$  SE) と回復群の  $157 \pm 18$  nM に比し有意に高値であった。また,  $[Ca^{2+}]_c$  も障害群で有意に高値であった ( $430 \pm 35$  nM vs  $197 \pm 23$  nM)。  $[Ca^{2+}]_c$  は, すべての細胞において再酸素化 1 分後

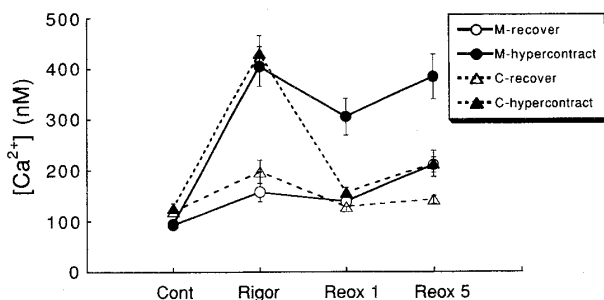


図4 カルシウム濃度と細胞障害

Rigor, Reox 1, Reox 5 はそれぞれ再酸素化直前, 再酸素化 1 分, 再酸素化 5 分を表す。

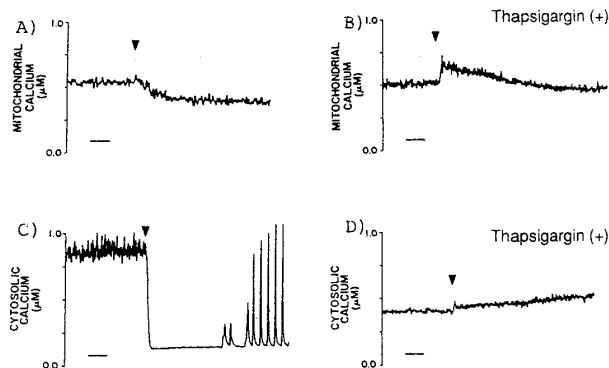


図5 再酸素化時のカルシウム濃度

▼は再酸素化時点を scale bar は 10 秒を示す。

には前値まで急激に低下し, 細胞障害との関連性は認めなかった。一方  $[Ca^{2+}]_m$  は, 低酸素再酸素化のいずれの時点でも障害群において, 有意に高い  $[Ca^{2+}]$  値を示した。

図 5 は再酸素化時の  $[Ca^{2+}]_m$  および  $[Ca^{2+}]_c$  の記録で再酸素化直後にはミトコンドリアへの  $Ca^{2+}$  流入は認められず (A), 筋小胞体の  $Ca^{2+}$  ATPase の阻害剤 (Thapsigargin) 投与により筋小胞体に  $Ca^{2+}$  を取り込めない状態にのみミトコンドリアに  $Ca^{2+}$  は流入した (B)。一方,  $[Ca^{2+}]_c$  は再酸素化時により急激に低下し (C), その後  $Ca^{2+}$  transients は出現した。Thapsigargin 存在化においては,  $[Ca^{2+}]_c$  の急激な低下は認められず (D), 再酸素化時の急激な  $[Ca^{2+}]_c$  の低下は筋小胞体のカルシウム取り込みによると考えられ, ミトコンドリアの再酸素化直後の  $Ca^{2+}$  流入は軽微であった。

### 【考 案】

今回の実験で,  $[Ca^{2+}]_m$  は低酸素化時, 細胞が短縮するまでは上昇を認めず, その後の上昇も回復群においては, 可逆性であり再酸素化時にも変動を認めた。ミトコンドリア内膜には  $Ca^{2+}$  流入経路と流出経路が独立に存在し (図 6), 低酸素化時には  $P_i$ ,  $Mg$ ,  $ADP$  等により影響され, また可逆性孔形成<sup>5)</sup>により  $[Ca^{2+}]_c$  と  $[Ca^{2+}]_m$  の較差は減少し,  $[Ca^{2+}]_c$  の上昇に伴い  $[Ca^{2+}]_m$  は上昇したと思われる。低酸素化時の  $Ca^{2+}$  値の上昇は再酸素化時に直接酸化的リン酸化を抑制するというよりむしろミトコンドリア内膜の透過性の変化をもたらし, 低分子物質の漏出により間接的に酸化的リン酸化を抑制し, 細胞障害に関連したと考えられる。

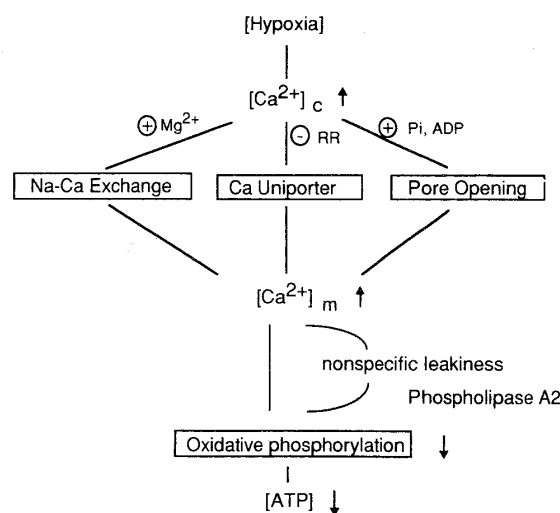


図6 低酸素再酸素化におけるカルシウム濃度を細胞障害の機序

## 〔文 献〕

- 1) Shen AC, Jennings RB., *Am J Pathol.* 1972; **67**: 167-198.
- 2) Miyata H et al., *Am J Physiol.* 1991; **261**: H1123-H1134.
- 3) Spurgeon HA et al., *Am J Physiol.* 1990; H574-H586.
- 4) Miyata H et al., *Circ Res* 1992; **71**: 605-613.
- 5) Crompton M., Calcium and Heart. *Raven Press* 1990; 167-198.