



Different actions of cardioprotective agents on mitochondrial Ca^{2+} regulation in a Ca^{2+} paradox-induced Ca^{2+} overload

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松永, 正紀 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/326

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 4 2 5 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 9 日
氏 名	松 永 正 紀		
論文題目	Different actions of cardioprotective agents on mitochondrial Ca^{2+} regulation in a Ca^{2+} paradox-induced Ca^{2+} overload (カルシウムパラドックスによるカルシウム過負荷時のミトコンドリア内カルシウム調節における心保護薬の異なる作用)		

博士(医学) 松 永 正 紀

論文題目

Different actions of cardioprotective agents on mitochondrial Ca^{2+} regulation in a Ca^{2+} paradox-induced Ca^{2+} overload

(カルシウムパラドックスによるカルシウム過負荷時のミトコンドリア内カルシウム調節における心保護薬の異なる作用)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

細胞内 Ca^{2+} 過負荷は、虚血／再灌流心筋や不全心筋における不可逆的な心筋障害の原因となるが、その正確な機序は明らかではない。ミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_m$)は細胞機能の維持において重要であり、最近では、ミトコンドリアの Ca^{2+} 過負荷が不可逆性の細胞障害の主因として重要と考えられている。今回、 Ca^{2+} paradoxによる Ca^{2+} 過負荷モデルを作成し、ミトコンドリアに作用する各種薬剤の心筋保護効果を比較検討した。

〔材料ならびに方法〕

Fura-2を負荷したラット単離心室筋細胞において、15分間の Ca^{2+} 除去後に2mMの Ca^{2+} を灌流する Ca^{2+} paradoxモデルを作成し、細胞質 Ca^{2+} 濃度($[\text{Ca}^{2+}]_c$)の上昇(ΔR)と細胞死の比率、また酸化的リン酸化の指標として細胞内NADHを測定した。加えて、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の変化を評価するために、細胞膜をsaponinにて除去した細胞(スキンド細胞)にrhod-2を負荷し、蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定した。群間検討は、カイ2乗検定または一元配列分散分析にて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

〔結果〕

(1) Ca^{2+} paradoxにより43%の細胞が壊死し、これらの細胞では $[\text{Ca}^{2+}]_c$ が Ca^{2+} 除去時に比較して有意に増加した(生存率; 57%, ΔR ; 0.81 ± 0.05 , 平均±標準誤差, $n=210$)。細胞膜に存在する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構の Ca^{2+} 流入モード阻害薬であるKB-R7943 ($10 \cdot \text{M}$)は、細胞死と $[\text{Ca}^{2+}]_c$ の上昇をともに抑制した(生存率; 100%, ΔR ; 0.14 ± 0.02 , $n=30$, $p < 0.01$ vs. Ca^{2+} paradoxのみ)。(2) Ca^{2+} paradox後に生存した細胞では、 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 上昇の程度は壊死した細胞に比較して軽度であった。(3) ミトコンドリアの Ca^{2+} uniporter阻害薬の ruthenium red (RuR; $10 \cdot \text{M}$)、ATP感受性 K^+ チャネル開口薬のdiazoxide (Dz; $100 \cdot \text{M}$)、およびpermeability transition pore (mPTP)阻害薬のcyclosporin A (CsA; $1 \cdot \text{M}$)は、 Ca^{2+} paradoxによる細胞死と $[\text{Ca}^{2+}]_c$ の上昇をともに抑制した(生存率; RuR: 85%, $n=81$, Dz: 74%, $n=125$, CsA: 83%, $n=109$, $p < 0.05$ vs. Ca^{2+} paradoxのみ, ΔR ; RuR: 0.51 ± 0.06 , Dz: 0.60 ± 0.06 , CsA: 0.48 ± 0.06 , $p < 0.05$ vs. Ca^{2+} paradoxのみ)。(4) RuRは、スキンド細胞において $[\text{Ca}^{2+}]_m$ を低下させたが、正常細胞のNADHは変化しなかった。(5) Dzは、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ およびNADHを低下させた。(6) CsAは、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ とNADHのいずれにも影響しなかった。

〔考察〕

今回の研究により、 Ca^{2+} paradoxによる細胞障害は、細胞膜の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介する Ca^{2+} 流入の増加による細胞内 Ca^{2+} 過負荷が主要な機序であることが示された。ミトコンドリアに作用するRuR、Dz、CsAはいずれも Ca^{2+} paradoxによる Ca^{2+} 過負荷に対して保護的に働いた。しかし、その機序は異なっており、

RuRは $[Ca^{2+}]_m$ の上昇を防ぐことにより、Dzは $[Ca^{2+}]_m$ の上昇の予防と酸化的リン酸化の活性化により保護効果をきたしたと思われた。一方、CsAは、 $[Ca^{2+}]_m$ とNADHのいずれにも影響しなかったことから、 $[Ca^{2+}]_m$ の上昇により開口するmPTPを直接的に抑制した機序が考えられた。これらのミトコンドリア作用薬は、 Na^+/Ca^{2+} 交換阻害薬または他のミトコンドリア作用薬との併用により、 Ca^{2+} 過負荷による細胞障害に対して有効な治療手段となりうることが示された。

〔結論〕

Ca^{2+} paradox による細胞障害において、細胞膜の Na^+/Ca^{2+} 交換機構を介する Ca^{2+} 流入とミトコンドリアの Ca^{2+} 負荷の関与が示された。ミトコンドリアを保護する薬剤の作用機序としては、 $[Ca^{2+}]_m$ の低下、酸化的リン酸化の活性化、mPTPの抑制が示唆された。

論文審査の結果の要旨

細胞内 Ca^{2+} 過負荷は、虚血／再灌流心筋や不全心筋における不可逆的な心筋障害の原因となるが、その正確な機序は明らかではない。ミトコンドリアの Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_m$)は細胞機能の維持において重要であり、最近では、ミトコンドリアの Ca^{2+} 過負荷が不可逆性の細胞障害の主因として重要と考えられている。そこで、申請者は Ca^{2+} paradoxによる Ca^{2+} 過負荷モデルを作成し、ミトコンドリアに作用する各種薬物の心筋保護効果を比較検討した。

Fura-2を負荷したラット単離心室筋細胞において、15分間の Ca^{2+} 除去後に2mMの Ca^{2+} を灌流する Ca^{2+} paradoxモデルを作成し、細胞質 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_c$)の上昇と細胞死の比率、また酸化的リン酸化の指標として細胞内NADHを測定した。加えて、 $[Ca^{2+}]_m$ の変化を評価するために、細胞膜をサポニンにて除去した細胞(スキンド細胞)にrhod-2を負荷し、蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定した。

- (1) Ca^{2+} paradoxにより43%の細胞が壊死し、これらの細胞では $[Ca^{2+}]_c$ が Ca^{2+} 除去時に比較して有意に増加した。細胞膜に存在する Na^+/Ca^{2+} 交換機構の Ca^{2+} 流入モード阻害薬であるKB-R7943は、細胞死と $[Ca^{2+}]_c$ の上昇をともに抑制した。
- (2) ミトコンドリアの Ca^{2+} uniporter阻害薬のruthenium red (RuR)、ATP感受性 K^+ チャネル開口薬のdiazoxide (Dz)、およびpermeability transition pore阻害薬のcyclosporin A (CsA)は、 Ca^{2+} paradoxによる細胞死と $[Ca^{2+}]_c$ の上昇をともに抑制した。
- (3) RuRは、スキンド細胞において $[Ca^{2+}]_m$ を低下させたが、正常細胞のNADHは変化しなかった。
- (4) Dzは、 $[Ca^{2+}]_m$ およびNADHを低下させた。
- (5) CsAは、 $[Ca^{2+}]_m$ とNADHのいずれにも影響しなかった。

以上より、 Ca^{2+} paradoxによる細胞障害において、細胞膜の Na^+/Ca^{2+} 交換機構を介する Ca^{2+} 流入とミトコンドリアの Ca^{2+} 負荷の関与が示された。

審査委員会では、ミトコンドリアの Ca^{2+} 負荷による細胞障害のメカニズムを各種薬物を用いて解明したことを高く評価した。

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) 今回使用した Ca^{2+} paradoxモデルはどのような病態を反映しているか
- 2) NADH蛍光測定とミトコンドリア膜電位との関係について

- 3) Rhod-2によるミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度測定について
- 4) KB-R7943の $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換機構への作用について
- 5) Ca^{2+} 再灌流後の細胞内 Ca^{2+} 上昇においてKB-R7943により抑制できない Ca^{2+} 上昇について
- 6) Dzがミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度を抑制したメカニズムについて
- 7) RuRの薬理作用について
- 8) RuRを Ca^{2+} 再灌流前に投与した場合のミトコンドリア内 Ca^{2+} 濃度推移について
- 9) DzとRuRの併用による効果について
- 10) CsAによるミトコンドリア保護作用と Ca^{2+} 濃度について
- 11) Permeability transition poreのミトコンドリア保護における役割について
- 12) Ca^{2+} paradoxにおける細胞内 Ca^{2+} 濃度変化におけるミトコンドリアの役割について

これらの質問の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	梅	村	和	夫	
	副査	渡	邊	裕	司	副査 山 本 清 二