



Different effects of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl- CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 富永, 宏睦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/779

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 5 1 7 号	学位授与年月日	平成 2 0 年 1 0 月 1 7 日
氏 名	富 永 宏 睦		
論文題目	Different effects of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl- CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes (ラット心筋細胞のミトコンドリア機能に対するパルミトイル-L-カルニチンとパルミトイルコエンザイム A の異なる効果)		

博士(医学) 富 永 宏 睦

論文題目

Different effects of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl-CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes

(ラット心筋細胞のミトコンドリア機能に対するパルミトイル-L-カルニチンとパルミトイルコエンザイム A の異なる効果)

論文内容の要旨

[はじめに]

心筋細胞の主たるエネルギー源である長鎖脂肪酸の血中及び組織中の増加が、心不全発症のメカニズムに関与することが提唱されている。長鎖脂肪酸、及びその中間代謝物の心筋ミトコンドリアに及ぼす影響に関しては、単離ミトコンドリアを用いた報告があるが、それらの効果の差異に関する具体的な報告はこれまでない。血中の長鎖脂肪酸は細胞質に取り込まれたのち、直ちにアシルコエンザイム A エステルに変換される。この大部分は細胞質に存在するカルニチンと、ミトコンドリア膜に存在する carnitine palmitoyl transferase (CPT) -1 によりアシルカルニチンエステルに変換される。ミトコンドリア内で、CPT-2 により再度アシルコエンザイム A エステルに変換され、エネルギー基質として代謝を受ける。このように、長鎖脂肪酸がエネルギー基質として利用されるまでには、複数の中間代謝物が存在し、それぞれの生理活性は異なる。そこで、異なる長鎖脂肪酸中間代謝物の心筋ミトコンドリア機能に対するそれぞれの効果の差異を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞レベルで検討した。

[材料ならびに方法]

雄 Sprague-Dawley ラット(7~10 週齢、体重 250-350 g)の心筋細胞を、コラゲナーゼを用いて単離し、室温にて細胞内液(組成: 50 KCl, 80 K-aspartate, 2 Na-pyruvate, 20 HEPES, 3 MgCl₂-6H₂O, 2 Na₂ATP, 3 EGTA; 単位: mM)で持続灌流した。続いてサポニン溶液(0.05 mg/ml)により化学的に細胞膜除去処理をした心筋細胞を作成した。ミトコンドリアの機能測定として、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) は tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE: 10 nM)を、ミトコンドリア permeability transition pore (mPTP) 開口の指標は calcein (1 μ M)を、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 産生の指標は 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF: 10 μ M)を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により、それぞれの蛍光強度の変化を測定した。長鎖脂肪酸中間代謝物には、パルミトイル-L-カルニチン (Pal-car)とパルミトイルコエンザイム A (Pal-CoA)を使用した。

[実験結果]

1. Pal-car の $\Delta\psi_m$ 、mPTP に対する効果: 1 及び 5 μ M の投与により、10 分後に $\Delta\psi_m$ はそれぞれ前値の $115.5 \pm 5.4 \%$ ($p < 0.05$)、 $110.7 \pm 1.6 \%$ ($p < 0.05$)に増加したが、calcein の蛍光強度は変化しなかった。これに対して、10 μ M の投与により、 $\Delta\psi_m$ は $61.9 \pm 12.2 \%$ ($p < 0.01$)まで低下し、calcein の蛍光強度は前値の $85.1 \pm 1.2 \%$ ($p < 0.01$)に減弱した。
2. Pal-CoA の $\Delta\psi_m$ 、mPTP に対する効果: 1~5 μ M の濃度においても $\Delta\psi_m$ は、10 分後に 1 μ M では $65.8 \pm 4.2 \%$ ($p < 0.05$)、5 μ M では $56.9 \pm 13.0 \%$ ($p < 0.01$)に低下した。一方、10 μ M では $\Delta\psi_m$ は完全に消失した。しかし、(1)の場合とは異なり、1~10 μ M いずれの濃度においても、calcein の蛍光強度は減弱せず、コントロールと差を認めなかった。

3. Pal-car、Pal-CoA による ROS 産生の効果: 1 μM の Pal-car により DCF 蛍光強度は緩やかに上昇したが、前値の 1.6 倍程度に留まった。これに対し、10 μM では DCF 蛍光強度は急峻に上昇し、前値の 3.4 倍 ($p < 0.01$) に上昇した。この増加は、ROS の消去剤である N-アセチルシステイン (NAC) により抑制された。しかし、Pal-CoA による DCF 蛍光強度は、一過性でわずかな増加を認めたのみであった。
4. Pal-car による脱分極の機序: Pal-car による脱分極における mPTP 及び、ROS 産生の関与を検討するために、mPTP の選択的阻害薬であるサイクロスポリン A 及び、NAC をそれぞれ同時に灌流させ、 $\Delta\psi_m$ を測定した。Pal-car による脱分極作用は有意に抑制され ($p < 0.01$)、Pal-car による脱分極は mPTP の開口と ROS 産生に関連していることが示された。
5. L-カルニチンと Pal-CoA による脱分極: Pal-CoA (10 μM) 負荷前に 2.5 mM の L-カルニチンを細胞に前投与すると、Pal-CoA による脱分極作用が抑制された。

[考察]

今回我々は、脂肪酸中間代謝物の違いにより、心筋ミトコンドリアに対する異なる効果を検討した。低濃度の Pal-car は、 $\Delta\psi_m$ を過分極させた。この効果は、至適濃度の Pal-car がミトコンドリア内で代謝を受け、エネルギー産生を促進したことによると考えられる。これに対して高濃度の Pal-car による効果は、ミトコンドリア内にエネルギー物質として取り込まれた Pal-car が過剰に代謝を受け、むしろ ROS 産生が亢進した結果、脱分極と mPTP の開口を引き起こしたと考えられた。一方、細胞質に存在する Pal-CoA は、単独ではミトコンドリア内に取り込まれることはない。従って、L-カルニチンの存在しない環境下においては、Pal-CoA は細胞質側に蓄積し、直接または、ROS の発生を惹起することによりミトコンドリア膜を障害し、 $\Delta\psi_m$ の脱分極を引き起こされたと考えられた。

[結論及び展望]

心筋細胞に過剰の遊離脂肪酸が蓄積することで、心筋細胞の障害が起きると報告されているが、その中間代謝物による違いにより、その障害機序も異なることが示された。長鎖飽和脂肪酸の中間代謝物の作用・役割を解明することは、心不全の病態生理の理解、予防法及び治療法の確立のために不可欠と考えられる。

論文審査の結果の要旨

心筋細胞の主たるエネルギー源である長鎖脂肪酸の血中及び組織中の増加が、心不全発症のメカニズムに関与することが提唱されている。長鎖脂肪酸は細胞質やミトコンドリア内で中間代謝物を経てエネルギー基質として利用される。そこで、申請者は異なる長鎖脂肪酸中間代謝物の心筋ミトコンドリア機能に対するそれぞれの効果の差異を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞レベルで検討した。

雄 Sprague-Dawley ラットの心筋細胞を、コラゲナーゼを用いて単離し、室温にて細胞内液で持続灌流した。続いてサポニン溶液により化学的に細胞膜除去処理をした心筋細胞を作成した。ミトコンドリアの機能測定として、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\psi_m$) は tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) を、ミトコンドリア permeability transition pore (mPTP) 開口の指標は calcein を、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 産生の指標は 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF) を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により、それぞれの蛍光強度の変化を測定した。長鎖脂肪酸中間代謝物には、パルミトイル-L-カルニチン

(Pal-car) とパルミトイルコエンザイム A (Pal-CoA) を使用した。

得られた結果を以下に示す。

1. Pal-car の $\Delta\psi_m$ 、mPTP に対する効果

1 及び 5 μM の投与により、10 分後に $\Delta\psi_m$ それぞれ前値に比べ増加したが、calcein の蛍光強度は変化しなかった。これに対して、10 μM の投与により、 $\Delta\psi_m$ は低下し、calcein の蛍光強度は減弱した。

2. Pal-CoA の $\Delta\psi_m$ 、mPTP に対する効果

1～5 μM の濃度において $\Delta\psi_m$ は低下し、10 μM では完全に消失した。しかし、calcein の蛍光強度は減弱しなかった。

3. Pal-car、Pal-CoA による ROS 産生の効果

1 μM の Pal-car により DCF 蛍光強度は緩やかに上昇し、10 μM では DCF 蛍光強度は急峻に上昇した。この増加は、ROS の消去剤である N-アセチルシステイン (NAC) により抑制された。しかし、Pal-CoA による DCF 蛍光強度は、一過性でわずかな増加を認めたのみであった。

4. Pal-car による脱分極の機序

Pal-car による脱分極における mPTP 及び、ROS 産生の関与を検討するために、mPTP の選択的阻害薬であるサイクロスポリン A 及び、NAC をそれぞれ同時に灌流させ、 $\Delta\psi_m$ を測定した。Pal-car による脱分極作用は有意に抑制され、Pal-car による脱分極は mPTP の開口と ROS 産生に関連していることが示された。

5. L-カルニチンと Pal-CoA による脱分極

Pal-CoA 負荷前に L-カルニチンを前投与すると、Pal-CoA による脱分極作用が抑制された。

以上の結果から、申請者は高濃度の Pal-car による効果は、ミトコンドリア内にエネルギー物質として取り込まれた Pal-car が過剰に代謝を受け、ROS 産生が亢進した結果、脱分極と mPTP の開口を引き起こしたと考えた。一方、細胞質に存在する Pal-CoA は、細胞質側に蓄積し、直接または、ROS の発生を惹起することによりミトコンドリア膜を障害し、 $\Delta\psi_m$ の脱分極を引き起こしたと考えた。

審査委員会では、心不全の病態生理の理解、予防法及び治療法の確立のために長鎖飽和脂肪酸の中間代謝物の作用・役割を解明することの重要性を示したことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 細胞質内 Pal-car 濃度が上昇する理由について
- 2) 添加した Pal-car がどのくらいの割合で Pal-CoA に変換されるか
- 3) L-carnitine と Pal-CoA との関係は
- 4) ROS 産生亢進のメカニズムについて
- 5) 灌流された Pal-car の濃度設定について
- 6) Pal-car による脱分極のメカニズムについて
- 7) Perhexiline の薬理作用と濃度設定について
- 8) Calcein を用いたミトコンドリア機能評価について
- 9) Pal-CoA によるミトコンドリア膜の脱分極のメカニズムについて
- 10) Pal-car による mPTP の開放のメカニズムについて
- 11) ROS と mPTP の開放とミトコンドリア膜の脱分極の関係について

12) Pal-CoA と呼吸鎖との関係について

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	梅村 和夫	
	副査	福田 敦夫	加藤 孝澄