OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	活性酸素による肝細胞傷害における細胞内Ca2+の動態とその役割
Author(s)	村田, 賢
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3075294
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	村田（むら た） 賢（まさる）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 11184 号
学位授与年月日	平成6年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	活性酸素による肝細胞傷害における細胞内 Ca^{2+} の動態とその役割
論文審査委員	（主査）教授 森 武貞 （副査）教授 鎌田 武信　教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

【目的】

種々の細胞傷害モデルにおいて，Ca^{2+} は重要な役割を果たしていることが明らかとなり，肝臓の虚血・再灌流傷害でもその病態との関連において研究が進められている。しかし，個々の細胞で細胞内 Ca^{2+} の動態を細胞傷害との関係で検討した報告は少ない。そこで，著者はラット初代培養肝細胞を用いて，細胞外に superoxide を発生させる肝細胞傷害の系で，superoxide 発生後の肝細胞内自由 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の変化を観察し，膜傷害の進展における役割を検討した。

【方法】

Seglen の方法に準じたコラゲナーゼ還流法で得たラット肝細胞をカバーグラス上で24時間培養した。まず，培養肝細胞に hypoxanthine（HX）と xanthine oxidase（XO）を最終濃度がそれぞれ250mM，75mU／ml となるように添加し，以後経時的に培養液中の LDH を測定した。次に HX と XO 添加後30分間，同一細胞で $[Ca^{2+}]_i$ の動態と細胞の形態学的変化を Ca^{2+} を含む buffer 中と Ca^{2+} を含まない buffer 中で観察した。$[Ca^{2+}]_i$ の測定は培養肝細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fura-2-AM を5μM の濃度で負荷後，蛍光顕微鏡2次元画像処理システムを用いて行った。形態学的変化は光顕と走査型電顕で観察した。次に，細胞傷害抑制の目的で培養液中に EGTA，superoxide dismutase（SOD）と catalase，nifedipine，calpeptin の添加物を加え，同様に観察した。

【成績】

培養肝細胞に HX と XO を添加すると，buffer 中に Ca^{2+} を1.27mM 有する場合，放出される LDH 活性は添加1時間後より上昇しはじめ，5時間ではプラトーに達した。その時，前値が約200nM であった $[Ca^{2+}]_i$ は，HX と XO の添加18分後より上昇しはじめ30分後には約700nM に達した。形態学的には添加18分後より電顕でのみ観察しうる small bleb が散見されるようになり，添加21分後には large bleb が光顕上観察された。30分後にはさらに，その大きさも数も増大し，全細胞の約57％の細胞の表面に large bleb が観察された。Buffer 中に Ca^{2+} を添加しないと，$[Ca^{2+}]_i$ は HX と XO の添加後30分間は上昇は見られず，細胞表面に large bleb を有する細胞も全体の約26％と有意に低下した。さらに，buffer にEGTA を添加すると $[Ca^{2+}]_i$ は徐々に低下し，約10％の肝細胞に large bleb が観察されたにとどまった。細胞外の Ca^{2+} の有無に関わらず HX と XO の添加30分後まで LDH は放出されなかった。また，superoxide の産生は Ca^{2+} を添加しない場合でも，Ca^{2+} を添加せず EGTA を添加した場合でも影響されなかった。

以上より，肝細胞にsuperoxideを作用させると，細胞傷害はCa^{2+}が細胞外より細胞内に流入することによって始まり，続いて細胞膜にsmall blebが，さらにlarge blebが形成され，その30分後より細胞膜の破綻が始まり，5時間後には全細胞が死に至るという経過をたどると考えられた。SODとcatalaseは用量依存性にLDHの放出と$[Ca^{2+}]_i$の上昇を有意に抑制した。Superoxideの産生はSODの存在下で完全に抑制された。HXとXOの添加3時間後のbuffer中に放出されたLDHと$[Ca^{2+}]_i$の上昇は1 μMのnifedipineの存在下で抑制された。Superoxideの産生はnifedipineの存在下で影響されなかった。すなわち，$[Ca^{2+}]_i$の上昇を抑制すると細胞傷害も軽減された。30 μMのcalpeptin（Ca^{2+}依存性non-lysosomalなプロテアーゼ阻害剤）の存在下でHXとXOをbufferに添加するとLDHの放出は有意に抑制された。Blebの形成も30 μMのcalpeptinの存在下では抑制された。しかし，calpeptinの存在下でもsuperoxideの産生や$[Ca^{2+}]_i$の上昇は抑制されなかった。

【総括】

今回の実験で，superoxideによる肝細胞傷害時には細胞膜に何らかの変化が生じ，細胞外より細胞内にCa^{2+}が流入することになる。次に，$[Ca^{2+}]_i$が上昇し，その結果Ca^{2+} dependent nonlysosomal proteaseが活性化され細胞骨格が傷害され，細胞傷害が進行する可能性が示された。また，これらの過程を抑制することのできる薬剤を用いることにより虚血肝障害が予防できる可能性も示された。

論文審査の結果の要旨

これまで種々の肝細胞傷害モデルにおいて細胞外Ca^{2+}の役割や細胞内Ca^{2+}の動態について検討されているが，肝の虚血・再灌流傷害のメカニズムについて一定の結論は得られていない。

本論文は，肝虚血・再灌流傷害のモデルとしてhypoxanthineとxanthine oxidaseとによってsuperoxideを発生させる系を用い，細胞内Ca^{2+}量と形態の変化を経時的に比較検討したものである。その結果，細胞外Ca^{2+}の流入によって細胞内Ca^{2+}が上昇し，上昇した細胞内Ca^{2+}が細胞傷害を進行させることが示された。また，その機序として，上昇した細胞内Ca^{2+}によって活性化されたcalpainが細胞骨格を傷害し，細胞傷害が進行する可能性が示された。

本研究は，superoxideによる細胞傷害のメカニズムを解明する上で重要な手がかりを与えるものであり，学位に値する。