

Title	アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応による心筋細胞障害機構
Author(s)	大江, 洋史
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38943
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	おおえひろし 大 江 洋 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 1 2 6 5 号
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応による心筋細胞障害機構
論文審査委員	(主査) 教授 多田 道彦 (副査) 教授 松田 暉 教授 谷口 直之

論 文 内 容 の 要 旨

[背景, 目的]

虚血早期に心筋組織内に見られる現象として、アラキドン酸の蓄積が知られている。梗塞部心筋組織ではアラキドン酸リポキシゲナーゼ代謝物が増加していること、また梗塞サイズがリポキシゲナーゼ阻害剤投与によって著明に縮小することが報告されており、アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応が梗塞サイズの進展に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究ではラット単離心室筋細胞を用いて、アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応による障害作用を検討した。さらに障害機序を明らかにするため、他の飽和／不飽和脂肪酸とリポキシゲナーゼとの反応、 Ca^{2+} ブロッカー、抗酸化剤等の効果も検討した。

[方法]

1. 心筋細胞の単離, 細胞収縮率／細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

心室筋細胞は、酵素処理により Wistar ラットから単離した。心室筋に Ca^{2+} 蛍光指示薬である Indo-1 AM (25 μ M) を負荷した後、顕微鏡の架台に設置した chamber 内に静置し、電気刺激により 1Hz で拍動させた。細胞像は CCD カメラ、VCR により記録し、細胞収縮率は (弛緩期細胞長 - 収縮期細胞長) / 弛緩期細胞長 (%) と定義した。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は 345 nm で励起された Indo-1 の蛍光強度比 (410 nm / 485 nm) とし、単一細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。

2. アラキドン酸及び、他の脂肪酸とリポキシゲナーゼによる灌流

単離した心筋細胞をアラキドン酸 20 μ M, ダイズリポキシゲナーゼ 0.05U/ml を添加した Tyrode 液で灌流した。アラキドン酸等の脂肪酸と α -tocopherol はエタノールに、アスコルビン酸, SOD, ニカルジピンは脱イオン水に希釈し Tyrode 液に添加した。本実験において単離心筋細胞の障害性をさらに詳しく検討するため、 Δ meanR (20分灌流後の Indo-1 の平均蛍光強度比の増加率), Δ Amp (20分灌流後の収縮率の増加率), Nhyper (40分灌流後に過収縮に至った細胞の数) を定義し、指標とした。この実験においては 1 視野に 1 細胞を測定し、それぞれの実験において 16 細胞のデータを計測した。

[結果]

1. アラキドン酸 - リポキシゲナーゼにより灌流した心筋細胞の収縮率は次第に増加し、収縮期, 弛緩期の細胞長はともに短縮がみられ、その後過収縮に至った。過収縮に至った細胞は短縮円形化し、その細胞表面には突起様隆起

(プレブ)の形成が多数認められた。これらの細胞を再び元の Tyrode 液で灌流しても収縮は再開されなかったため、この障害性は不可逆性であると考えられた。

2. 収縮率の増加とともに収縮期、弛緩期ともに細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められ、過収縮に至った時には収縮-弛緩サイクルも消失し、細胞内 Ca^{2+} 濃度は正常の収縮期の値を越えて上昇した。アラキドン酸単独、リポキシゲナーゼ単独では細胞障害はみられず、またリポキシゲナーゼ阻害剤である nordihydroguaiaretic acid (NDGA, $10 \mu\text{M}$) を添加した群では細胞障害は有意に軽減された。

3. リポキシゲナーゼは炭素二重結合にはさまれた *cis* 構造のメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) を特異的な反応部位とし、この部位をアラキドン酸、リノレン酸は分子内に有するが、ステアリン酸、オレイン酸は持たない。ステアリン酸、オレイン酸とリポキシゲナーゼを灌流した場合は細胞障害性がみられなかったが、リノレン酸とリポキシゲナーゼを灌流した場合はアラキドン酸と同様の反応がみられた。

4. ラジカルスカベンジャーとして知られているアスコルビン酸 (Vitamin C, $100 \mu\text{M}$)、 α -tocopherol (Vitamin E, $10 \mu\text{M}$)、SOD ($1 \mu\text{M}$)、及び Ca^{2+} チャンネルブロッカーであるニカルジピン ($2 \mu\text{M}$) が本細胞障害を抑制するかどうかを検討した。その結果、アスコルビン酸、 α -tocopherol は収縮率増加、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑制したが、ニカルジピン、SOD では抑制効果はみられなかった。

[総括]

1. アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応による直接的障害作用を、単離心筋細胞において細胞収縮形態と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の面から検討した。さらに障害機序を明らかにするため、他の飽和/不飽和脂肪酸とリポキシゲナーゼとの反応、 Ca^{2+} ブロッカー、抗酸化剤等の効果も検討した。

2. アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応により、心筋細胞収縮率の上昇とともに細胞内カルシウム濃度の上昇がみられ、その後、不可逆的心筋細胞障害が惹起された。かかる細胞障害はリポキシゲナーゼ反応部位を有するリノレン酸とリポキシゲナーゼによっても生じることからリポキシゲナーゼ反応自身が大きく寄与していることが明らかになった。

3. 本細胞障害はアスコルビン酸、 α -tocopherol で抑制されたが、ニカルジピン、SOD では抑制効果がなかったことから、アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応によって生じる過酸化脂質ラジカル種が、脂質過酸化反応を介して細胞膜の生理的機能を破綻させ、 Ca^{2+} 過負荷を惹起し不可逆的細胞障害に至らしめると考えられた。

論文審査の結果の要旨

虚血/再灌流心筋組織障害進展に関し、アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応はフリーラジカル産生系の1つとして重要であることが明らかになっている。その障害機構を解明するため、 Ca^{2+} 指示薬である Indo-1 を負荷した単離心筋細胞を、アラキドン酸とリポキシゲナーゼを含む Tyrode 液で灌流したところアラキドン酸単独、リポキシゲナーゼ単独では心筋細胞に変化は認められなかったが、アラキドン酸とリポキシゲナーゼを同時に作用させると収縮率増加とともに心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が起こり、やがて細胞膨化、プレブ形成を伴って不可逆的過収縮状態に至ることが示された。リポキシゲナーゼ阻害剤である nordihydroguaiaretic acid (NDGA) によりこの影響は抑制された。リポキシゲナーゼの基質となりうるリノレン酸ではアラキドン酸と同様の作用がみられたが、基質とならないステアリン酸やオレイン酸では影響が認められなかった。アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応による本細胞障害は α -tocopherol、アスコルビン酸の存在により抑制されたが、カルシウムブロッカーであるニカルジピン、スーパーオキシドアニオン消去剤である SOD 存在では抑制されなかった。本研究の結果、アラキドン酸リポキシゲナーゼ反応による心筋細胞障害は、この反応から副次的に生じる脂質ラジカルにより、 Ca^{2+} 恒常性維持機能が障害され Ca^{2+} 過負荷とそれに引き続く不可逆的な細胞障害をもたらすことが証明され、本論文は学位論文(博士)に値する。