



Title	低酸素刺激/再酸素化による心筋細胞におけるインターロイキン-6の産生
Author(s)	井原, 義二
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39625
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	井 原 義 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 2 0 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 2 月 2 8 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	低酸素刺激／再酸素化による心筋細胞におけるインターロイキン-6の産生
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸 本 忠 三 (副査) 教 授 平 野 俊 夫 教 授 荻 原 俊 男

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

近年、虚血性新疾患に対し再灌流療法が広く施行されるようになり、虚血・再灌流障害の発生机序の解明が重要な課題となってきた。また、急性心筋梗塞患者において、多機能性サイトカイン・インターロイキン-6 (IL-6) が一過性に上昇することや、細胞間接着分子を介して心筋と好中球の接着性を高めることが報告され、サイトカインの虚血・再灌流障害への関与が注目されている。本研究では、心筋細胞がIL-6を産生するか否か、また虚血・再灌流時に心筋がさらされるとされる種々の因子が心筋細胞のIL-6を再生を増強し得るか否かを明らかにすることを目的とした。

【方 法】

1日齢ラットから心臓を摘出し、酵素的に単離した後、培養皿への接着時間差を利用して培養心筋細胞および非心筋細胞を調製した。通常の培養には10%新生仔牛血清を含むMedium199 (M-199) を用いた。95% N₂/5% CO₂ 下での2時間培養を低酸素刺激とした。重曹非含有M-199を用いた95% air/5% CO₂ 下での2時間培養をアシドーシス刺激 (pH 5.82 ± 0.7) とし、アシドーシス刺激後、正常pH下2時間の培養上清中のIL-6活性を測定した。また、カルシウム・イオノフォア (イオノマイシン 5 × 10⁻⁶ M) の培養液への添加をカルシウム負荷、10⁻⁷ M および 10⁻⁵ M エピネフリン添加をカテコラミン刺激とし、4時間培養を行った。培養上清中のIL-6は、MH60.BSF2細胞を用いたバイオアッセイ法により測定した。低酸素刺激前および刺激中の培養心筋細胞より全RNAをAGPC法で抽出し、IL-6 mRNAの発現をノーザンブロット法により検討した。

【成 績】

まず、心筋細胞および非心筋細胞が、IL-6を産生するか否かを検討した。培養液のIL-6活性は 36 ± 0.07 pg/ml (n = 3) であったが、5 × 10⁶ の心筋細胞を2時間培養した後の培養上清中IL-6活性は、90 ± 36 pg/ml (n = 5) と有意に高値を示した (p < 0.01)。次に、心筋細胞に低酸素刺激 (酸素分圧約 30 torr) を加えた後培養液を交換し、さ

らに好氣的に2時間培養後の上清中IL-6活性は $880 \pm 36\text{pg/ml}$ ($n = 5$)であり、刺激前に比し有意なIL-6活性の上昇 ($p < 0.01$) が認められた。以上より、好氣的条件下での心筋細胞のIL-6産生が明らかとなり、低酸素刺激後、再酸素化することによりIL-6産生はさらに増強することが示された。一方、非心筋細胞 (5×10^6) では低酸素刺激前の培養液上清中IL-6活性は $120 \pm 42\text{pg/ml}$ ($n = 5$)であり心筋細胞に比べ有意に高値を示した ($p < 0.01$) が、刺激後においても $112 \pm 32\text{pg/ml}$ と反応生のIL-6産生増強は認められなかった。

次に、アシドーシス、カルシウムおよびカテコールアミン刺激についても、心筋細胞のIL-6産生に与える影響を検討した。結果は通常の培養条件下でのIL-6活性をコントロールとして、アシドーシス刺激では 6.3 ± 1.4 倍、カルシウム刺激では 2.2 ± 0.1 倍、 10^{-7}M 、 10^{-6}M エピネフリン刺激はそれぞれ 2.1 ± 0.2 倍、 5.4 ± 0.1 倍と、いずれもIL-6活性の有意な増強が認められた。エピネフリン刺激では、IL-6産生増強作用に濃度依存性がみられた。以上の結果より、虚血・再灌流時に心筋がさらされると考えられる種々の刺激によっても、心筋細胞のIL-6産生が増強することが明らかとなった。

次に、IL-6の産性増強が転写レベルで調整されているか否かを検討するため、ノーザンブロット解析を行った。無刺激心筋細胞では、IL-6 mRNA は検出できなかったが、低酸素刺激開始30分後にIL-6 mRNA の発現が認められ、60分後に最高となり、90分後には検出できない程度にまで減少した。また、タンパク合成阻害剤を用いた実験では、低酸素刺激によりIL-6 mRNA 発現の増強の著明な強調を認めた。このことから、低酸素刺激/再酸素化によるIL-6産生の増強はIL-6遺伝子の発現によることが示された。

【総括】

心筋細胞の低酸素刺激時の細胞内情報伝達系は未だ明らかではないが、本研究において示された低酸素刺激によるIL-6遺伝子の発現は、この問題の詳細な検討に有用な情報を提供すると考えられる。また、筆者は、培養心筋細胞においてIL-6が細胞内カルシウム濃度を減少させることを報告しており、虚血・再灌流時に直面する種々の刺激によって心筋が産生したIL-6は、心筋への好中球接着性増強作用のみならず、虚血・再灌流障害時の心筋不全のメディエーターとして作用することを示唆する。

論文審査の結果の要旨

心筋梗塞急性期に血中インターロイキン-6 (IL-6) 値が上昇することは知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。本論文において

- 1) 心筋細胞は通常培養条件下においてIL-6を産生する。
- 2) 心筋細胞は低酸素刺激、アシドーシス刺激、カルシウム負荷、カテコールアミン刺激によってIL-6の産生を増強する。
- 3) 低酸素刺激により、心筋細胞はIL-6 mRNA の発現を一過性に増強する。

の3点が明らかにされたことにより、虚血再灌流時に心筋が自らIL-6を産生することが明らかとなった。また、心筋細胞の O_2 センサーおよび心筋細胞の低酸素刺激時の細胞内情報伝達系は未だ明かではないが、本論文において明らかにされた低酸素刺激によるIL-6遺伝子の発現は、低酸素刺激により惹起される情報伝達系の詳細な検討に有用な情報を提供すると考えられる。

以上より、本論文は学位の授与に値すると考えられる。