

Title	ラット培養心筋細胞由来一酸化窒素(NO)による低酸素負荷一再酸素化細胞障害機構の研究 : 内因性活性酸素消去酵素活性との関連
Author(s)	五十嵐, 淳介
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40014">https://hdl.handle.net/11094/40014</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	いがらし じゅん すけ 五十嵐 淳 介
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13001 号
学位授与年月日	平成9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	ラット培養心筋細胞由来一酸化窒素(NO)による低酸素負荷-再酸素化細胞障害機構の研究 -内因性活性酸素消去酵素活性との関連-
論文審査委員	(主査) 教授 多田 道彦  (副査) 教授 堀 正二 教授 谷口 直之

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

心筋細胞に存在する誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)は、虚血性心疾患や移植心で賦活化されるサイトカイン系により誘導され、大量の一酸化窒素(NO)を産生する事が生理実験において示されている。かかる心筋細胞のiNOS由来NOの作用としては、グアニレートシクラーゼ-cGMP系を介した陰性変力作用のほか、スーパーオキシド( $\cdot O_2^-$ )との結合による細胞障害性分子であるパーオキシニトライト(ONOO $^-$ )の生成、過酸化水素(H $_2$ O $_2$ )消去酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GSHPx)活性の特異的阻害などが示唆され、虚血再灌流時の酸化ストレスに伴って細胞障害を増悪する可能性がある。従来、心筋虚血再灌流におけるNOの作用は冠循環への役割が主に検討され、in vivo心筋虚血モデルにおいて、冠循環で産生されるNOが、再灌流時の血流保持を介して心筋壊死進展を抑制する可能性が示されてきた。しかし、心筋局所において産生されるNOが、虚血再灌流時の細胞障害を如何に修飾するかはこれまで明らかではなかった。今回、冠循環の影響を除外した培養心筋細胞を用いて、NOが模擬虚血再灌流時の細胞障害を増悪するか否かを検討した。

#### 【方法ならびに成績】

##### 1) 外因性NO負荷の効果

酸化的ストレスによる培養心筋細胞障害に対するNOの効果を検討するため、NO供与体であるS-ニトロソN-アセチルペニシラミン(SNAP, 0.05-5 mM)を心筋細胞に添加した後、過酸化水素(0.1mM)を1時間負荷して検討した。SNAP前処理の1時間後に過酸化水素を負荷すると、過酸化水素による心筋細胞の生存率(WST-1反応)・死細胞率(LDH遊出量)は、共にSNAP無投与群に比して投与量依存性に増悪した(生存率: 69 vs 12%, 死細胞率: 15 vs 43%)。SNAP前処理単独では、心筋細胞障害は不変であった。また、SNAPの脱ニトロソ体では、かかる過酸化水素による心筋障害の増悪は認められなかった。同様に、低酸素負荷-再酸素化による心筋細胞障害もSNAP投与により有意に増加した(LDH遊出: 4 vs 20%)。SNAP負荷により、心筋細胞中のGSHPx活性は無負荷群の34%に著明に低下し、一方、cGMP含量は13倍に有意に増大した(EIA法)。しかし、cGMP類似体(8 Br-cGMP, 0.5 mM)の添加によっては、心筋細胞のGSHPx活性は変化せず、過酸化水素による心筋細胞障害の増大も認められなかった。

## 2) 内因性 NO 産生の効果

心筋細胞由来の内因性 NO の作用を検討するため、心筋細胞をインターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml) にて刺激し、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) を発現させた。心筋細胞は、24時間の IL-1 $\beta$  刺激により iNOS mRNA (ノザン解析) ならびに iNOS 蛋白質 (ウエスタン解析) を発現した。NO 産生をグリース試薬反応による亜硝酸イオン測定で検討すると、L-アルギニン (0-1 mM) の投与量依存性に NO 産生が認められた (3.1 vs. 22.2 nmol/mg prot)。iNOS 誘導下に低酸素負荷-再酸素化を加えると、LDH 遊出量は L-アルギニンにより 3.8 倍に著明に増加するとともに GSHPx 活性は 55% に有意に抑制された。一方、NO 合成酵素阻害剤である L-ニトロアルギニンメチルエステル (L-NAME, 1 mM) は、L-アルギニン存在下の iNOS 誘導心筋細胞からの NO 産生を抑制 (8.4 nmol/mg prot) し、心筋細胞における GSHPx 活性の低下、低酸素負荷-再酸素化に伴う心筋細胞障害の増悪を共に著明に抑制した。

### 【総括】

1) 外因性の NO 供与体 (SNAP) は、単独では細胞障害を惹起しなかったが、SNAP に続いて過酸化水素負荷及び低酸素負荷-再酸素化を行うと、著明な細胞障害の増悪を惹起した。SNAP は、心筋細胞中の過酸化水素消去酵素である GSHPx の活性を著明に低下させたが、GSHPx 活性を低下させない SNAP の脱ニトロソ体及び cGMP 類似体 8 Br -cGMP では過酸化水素負荷時の細胞障害が増悪しなかった。

2) 培養心筋細胞は、IL-1 $\beta$  負荷後に iNOS を発現し、L-アルギニン存在下に著明な内因性の NO 産生を示した。かかる iNOS 由来の NO 産生により、心筋細胞の GSHPx 活性が著明に低下すると共に、低酸素負荷-再酸素化時の心筋細胞からの LDH 遊出は有意に増大した。

以上より、NO は心筋細胞の活性酸素消去酵素、GSHPx の活性を抑制し、酸化的ストレス負荷時の心筋細胞障害を増悪させる可能性が示された。特に、虚血再灌流、心移植などの炎症反応を伴う病態では、サイトカイン系の賦活化により心筋局所において iNOS が誘導されることから、酸化的ストレスに伴う NO の心筋障害因子として作用を考慮する必要があると示唆される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、培養心筋細胞の模擬虚血再灌流モデルを用い、心筋細胞より産生される一酸化窒素 (NO) が、酸化的ストレスを伴う虚血再灌流時の心筋細胞障害を増悪するか否かを、内因性抗酸化酵素、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) 活性の制御との関連から検討したものである。

外因性の NO 供与体投与時、および、インターロイキン-1 $\beta$  負荷による内因性の NO 合成酵素誘導時の実験において、NO は過酸化水素負荷、低酸素負荷-再酸素化などの酸化的ストレスを負荷すると、著明な細胞障害の増悪を惹起した。酸化的ストレスを加えない条件下では NO は心筋細胞障害を惹起しないこと、NO が心筋細胞中の GSHPx 活性を著明に低下させたことより、NO は内因性抗酸化酵素の活性阻害により酸化的ストレスに対する受攻性を高めて細胞障害を惹起する事が示唆される。

従来、心血管研究領域においては、NO は冠血流維持を介した心筋細胞の保護因子であると考えられてきた。しかしながら、本研究により、酸化的ストレス時における NO の心筋障害因子としての可能性、及び、作用機作が初めて明らかにされたことから、学位授与に値するものとする。