The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning.
Author(s)	山下, 宜繁
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40304
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

【 15 】

氏　　名	山下宜繁（やました のぶしげ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12632　号
学位授与年月日	平成8年6月3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	Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. （心筋 Mn-SOD の合成促進と低酸素耐性獲得における意義）
論文審査委員	（主査） 教授　多田　道彦 （副査） 教授　谷口　直之　　教授　白倉　良太

論文内容の要旨

（目　的）

心筋梗塞実験モデルにおいて，短時間心筋虚血を反復すると，その直後に一過性の虚血耐性が獲得されることが指摘されており，アデノシンやエネルギー代謝との関連が報告されている。我々は短時間心筋虚血の24時間後にも一旦消失した心筋の虚血に対する耐性が再度獲得されることを報告し，同時に心筋組織中の内因性酸素ラジカル消去酵素であるミトコンドリアマンガンスーパーオキシドジスムターゼ（Mn-SOD）の蛋白質量並びに活性が上昇する事を明らかにした。今回，Mn-SOD 誘導と虚血耐性獲得の関連をより詳細に検討するため，培養心筋細胞を用いて心筋細胞の低酸素―再酸素化負荷に対する耐性獲得の機構をミトコンドリア Mn-SOD の誘導との関連により検討した。

（方　法）

培養心筋細胞はラット新生児心より五島の方法を Chien らに従って一部改変して単離し，10％ウシ胎児血清を含む培養液にて2日間，無血清培養液にて1日間培養後，実験に供した。低酸素負荷の酸素分圧の条件は 1％O2，（PO2：7 mmHg）とし，再酸素化の条件は 20％O2（PO2：143 mmHg）とした。Mn-SOD の蛋白質量は Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）により，酵素活性は Nitroblue tetrazolium 法により求めた。

(1) 短時間低酸素負荷における Mn-SOD 誘導：培養心筋細胞に対して，60分の非致死的低酸素負荷を行ない再酸素化36時間後まで12時間間隔で Mn-SOD の蛋白質量及び酵素活性を測定し，低酸素負荷を加えない対照群の値と比較した。また，ノザンブロット法により低酸素―再酸素化後の Mn-SOD の mRNA 量の変化を検討した。

(2) 低酸素―再酸素化耐性獲得と Mn-SOD：短時間の非致死的低酸素負荷により，その24時間後に心筋細胞の低酸素―再酸素化耐性が獲得されるかを検討するために，培養心筋細胞に対して非致死的な60分の低酸素負荷の前処置を行ない，再酸素化24時間後に無グルコース培養液に変換後，致死的な3時間の低酸素―1時間の再酸素化刺激を与えた。心筋細胞障害の指標としては，2度目の再酸素化1時間後に心筋細胞の培養液中のクレアチンキナーゼ活性（CK）値を GSCC 法により測定し，低酸素の前処置を加えない無前処置群と比較した。低酸素―再酸素化耐性獲得における Mn-SOD 誘導の意義を明らかにするために，Mn-SOD に対するアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレ

オチド（ODN）を前処置し，同様の検討を行った。

（成　績）

(1) 低酸素―再酸素化直後，Mn-SOD 蛋白質量は，対照群に比してやや低値を示したが，再酸素化12時間後には差は消失し，再酸素化24時間後では対照群に比して有意に高値を示した。しかし，再酸素化36時間後には Mn-SOD 蛋白質量は減少し，対照群との差は消失した。Mn-SOD 活性も同様に再酸素化24時間後には対照群に比して有意に高値を示した。また，低酸素―再酸素化刺激により，心筋細胞の Mn-SOD の mRNA 量は再酸素化後30分をピークに対照群に比して約1.8倍の増加が認められた。また，60分の非致死的低酸素―再酸素化刺激24時間後では対照群に比して Mn-SOD 蛋白質量及び酵素活性は有意に高値を示したが，Mn-SOD に対するアンチセンス ODN (1.5 μM) 投与下に低酸素負荷を行なった群では，Mn-SOD の蛋白質量及び酵素活性は共に対照群に比して差は認められず，Mn-SOD の誘導は著明に抑制され，センス ODN は Mn-SOD の誘導に影響を与えなかった。再酸素化時にＣキナーゼ阻害剤であるスタロスポリン（100 nM）を投与した低酸素負荷群でも同様に，Mn-SOD の蛋白質量及び活性は共に，対照群に比して差は認められず，Mn-SOD の誘導は著明に抑制された。これらの結果より，Mn-SOD は非致死的低酸素―再酸素化刺激後24時間においてＣキナーゼ系を介してその蛋白質合成が促進され，アンチセンス ODN によりその誘導は抑制されることが示唆された。

(2) 培養心筋細胞に対して60分の低酸素負荷の前処置を行ない，再酸素化24時間後に再度３時間の致死的低酸素負荷―再酸素化（１時間）の侵襲を与え，短時間の非致死的低酸素―再酸素化負荷により，心筋細胞の低酸素―再酸素化耐性が獲得されるかを検討した。低酸素前処置群の致死的低酸素負荷による培養液中の CK 値は無前処置群に比して有意に低値であり，非致死的低酸素負荷の前処置により，その24時間後に心筋細胞の低酸素―再酸素化耐性が認められた。一方，Mn-SOD に対するアンチセンス ODN（1.5 μM）投与下低酸素前処置群の CK 値は無前処置群に比して有意な差は認められず，低酸素耐性現象は消失した。これらのことより，非致死的低酸素―再酸素化刺激24時間後において心筋細胞の低酸素―再酸素化耐性現象が認められたが，Mn-SOD に対するアンチセンス ODN の投与によりその耐性獲得は消失した。

（総　括）

非致死的低酸素―再酸素化刺激後24時間において心筋細胞のミトコンドリア Mn-SOD はＣキナーゼ系を介して合成が誘導されるとともに，低酸素―再酸素化耐性現象が認められた。Mn-SOD に対するアンチセンス ODN により Mn-SOD の発現誘導を抑制すると低酸素耐性獲得は消失することより，Mn-SOD 蛋白質の誘導が低酸素耐性獲得に中心的な役割を果たしていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

心筋梗塞実験モデルにおいて，短時間心筋虚血を反復すると，24時間後の後期に心筋の虚血耐性が獲得され，同時に心筋組織中の内因性酸素ラジカル消去酵素であるミトコンドリアマンガンスーパーオキシドジスムターゼ（Mn-SOD）の蛋白質量並びに酵素活性が上昇する事が報告されているが，この虚血耐性獲得と Mn-SOD 誘導との因果関係は明らかではない。そこで，本研究では Mn-SOD 誘導の虚血耐性獲得における意義を詳細に検討するため，培養心筋細胞を用いて低酸素―再酸素化負荷に対する耐性獲得の機構を Mn-SOD の誘導との関連より検証した。

本研究から，非致死的低酸素―再酸素化刺激後24時間において心筋細胞の Mn-SOD は転写レベルで誘導が亢進されるとともに，致死的低酸素―再酸素化負荷に対する耐性現象が認められた。Mn-SOD に対するアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドにより Mn-SOD の発現を抑制すると低酸素―再酸素化耐性が消失することより，Mn-SOD 蛋白質の誘導が低酸素―再酸素化耐性獲得に中心的な役割を果たしていることが示唆された。

本研究は，短時間反復虚血後期（24時間後）における心筋虚血耐性獲得の機構として，心筋細胞のミトコンドリア Mn-SOD 誘導が重要な役割を果たしていることを，培養心筋細胞を用いた模擬虚血モデルにより解明し，学位論文に値するものと認められる。