



Title	心筋虚血再灌流におけるエンドセリンの作用
Author(s)	辻, さよ子
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40371
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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 辻 さ よ 子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 2 6 8 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 8 年 9 月 19 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 心筋虚血再灌流におけるエンドセリンの作用

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 岸本 忠三
(副査)
教 授 多田 道彦 教 授 荻原俊男

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

強力な血管収縮性ペプチドである endothelin (ET) は、血管平滑筋細胞における増殖促進作用、心筋細胞における陽性変力作用ならびに肥大促進作用などの循環器系における多彩な作用が報告されている。中でも冠動脈に対する収縮作用から、虚血性心疾患の病態への関与が注目される。心筋梗塞の急性期における血漿 ET 濃度の上昇が知られているが、その詳細な機序と生理的な役割は明確にされていない。本研究では、犬冠動脈結紮モデルを用いた持続的心筋虚血および虚血後再灌流の条件下で、血漿 ET 濃度の上昇が心筋虚血のみによるものか、あるいは虚血後の再灌流に起因するものかを検討した。さらに心筋細胞に対する ET の直接作用を知るため、血行動態や液性因子の影響が除外される培養心筋細胞を用いて、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度および心筋細胞肥大時のマーカーである *c-fos* 遺伝子の発現に対する ET の作用を検討した。

【方法ならびに成績】

1. in vivo

雑種成犬を呼吸管理下に開胸し、心筋虚血および虚血再灌流のモデルを作成した。Control 群は左冠状動脈前下行枝の第一対角枝分岐遠位部で冠動脈の剝離のみを施し、ligation 群は同部位の結紮により心筋梗塞を作成した。Reperfusion 群は、45分間の結紮による心筋梗塞作成後、再灌流を施した。中心静脈における血漿 ET 濃度を、ET-1に特異的な高感度の sandwich-type enzyme immunoassay により経時的に測定した。Control 群では血管剝離後、また ligation 群では冠動脈結紮後それぞれ225分まで、血漿 ET-1濃度に有意な上昇は認められなかった。Reperfusion 群では、冠動脈結紮中は血漿 ET-1濃度に明らかな変化はなかったが、再灌流後30-120分にかけて血漿 ET-1濃度の有意な上昇を認めた。ET-1濃度は、再灌流後60分をピーク ($2.64 \pm 0.45 \text{ pg/ml}$) として前値 ($1.20 \pm 0.16 \text{ pg/ml}$) の約2.2倍の上昇を示した。この間、平均血圧に明らかな変化は観察されなかった。

2. in vitro

Wister 系新生児ラットの心室筋よりトリプシン・コラゲナーゼ処理にて単離した心筋細胞を、10%新生仔牛血清

含有199培地で培養し実験に供した。

1) 細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の検討

細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度は、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素 fura-2を用いて検討した。カバーグラスにシート状に培養した自動拍動を伴う心筋細胞に、0.2% cremophor EL を添加した血清含有培地内で5 μM fura-2/AM を30分間負荷後、無蛍光の無血清培地に交換した。細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の解析には、高速で光路の切換えが可能な倒立型蛍光顕微測光システム (INTER DEC 社 M500) を用い、340 nm および380 nm の2波長励起による fura-2の蛍光強度比を細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の指標として解析した。自動拍動を伴う心筋細胞において、ET-1 (10^{-7}M) 投与後10秒以内に蛍光強度比は一過性に上昇し、2分以内に投与前のレベルに回復した。この蛍光強度比の上昇は細胞外 Ca^{2+} 非存在下においても認められたが、caffeine 前投与によりその上昇は抑制された。

2) c-fos mRNA 発現の検討

無血清培地内で、各種の条件下に ET-1刺激を加えた培養心筋細胞から全 RNA を抽出し、human c-fos exon IV fragment をプローブとしてノーザンブロット法により解析した。c-fos mRNA は ET-1投与15分後から発現の増強を認め、30分後にピークを示した。c-fos mRNA の発現は、 10^{-9}M から 10^{-7}M で濃度依存性が観察された。c-fos mRNA の発現の増強は Ca^{2+} 拮抗剤投与による細胞外 Ca^{2+} 流入の抑制下および細胞外 Ca^{2+} 非存在下でも認められた。

【総括】

冠動脈結紮による持続的な心筋虚血のみでは血漿 ET-1濃度の上昇は認められず、心筋虚血後に伴う再灌流によりその濃度が上昇することが明らかにされた。ラット培養心筋細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度は、ET-1投与直後に一過性に上昇した。この細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞外 Ca^{2+} 非存在下でも認められたが、caffeine 前投与により抑制され、細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出によることが示唆された。培養心筋細胞において、ET-1刺激により c-fos mRNA 発現の増強を認めた。ET-1による c-fos mRNA 発現の増強は Ca^{2+} 拮抗剤前投与並びに細胞外 Ca^{2+} 非存在下でも認められ、この情報伝達系に細胞外 Ca^{2+} の流入は関与しないことが推察された。血漿 ET-1濃度の上昇は、虚血・再灌流における細胞傷害の憎悪因子の一つとして梗塞サイズの拡大に関与するのみならず、ET の心筋細胞に対する肥大作用や線維芽細胞に対する増殖促進作用から、梗塞後のリモデリングとの関与が示唆される。

論文審査の結果の要旨

心筋梗塞における血漿エンドセリン-1濃度の上昇は、心筋虚血のみでは認められず、虚血後に伴う再灌流によりもたらされることを初めて明らかにした。さらに、心筋細胞において、エンドセリン-1は細胞内 Ca^{2+} 濃度を一過性に上昇させることを明らかにし、そのメカニズムが細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出に起因することを証明した。以上より、本研究は学位の授与に値すると考えられる。