



| | |
|--------------|--|
| Title | ラット心筋細胞におけるストレス蛋白質誘導機構：模擬虚血再灌流による検討 |
| Author(s) | 青木, 和浩 |
| Citation | 大阪大学, 1999, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/41654 |
| 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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

| | |
|------------|--|
| 氏名 | 青木和浩 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 第14513号 |
| 学位授与年月日 | 平成11年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻 |
| 学位論文名 | ラット心筋細胞におけるストレス蛋白質誘導機構 -模擬虚血再灌流による検討- |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 多田道彦 (副査) 教授 谷口直之 教授 門田守人 |

論文内容の要旨

【目的】

ストレスに対する細胞応答は種を越えて普遍的であることが知られている。なかでも熱ショック蛋白質(HSPs)は蛋白質構造の保存性が高く、熱ショック、虚血などの環境ストレスにより著しく誘導が亢進する。HSPsは細胞内で様々な機能を持つ。HSP70は分子シャペロンとして機能し、変成蛋白質の分解処理を介助することが示されている。HSP32(ヘムオキシゲナーゼ1:HO-1)は、変成ヘム蛋白質を一酸化炭素(CO)と抗酸化能を持つビリルビンに分解する。心臓においても虚血-再灌流は組織障害を惹起するのみならず、抗酸化酵素やストレス蛋白質などの内在性蛋白質誘導によるストレス応答を行い、負荷耐性を惹起することが明らかとなりつつある(ischemic preconditioning)。しかし、生体における虚血は、低酸素分圧、低pH、低代謝基質、代謝産物蓄積など多因子より構成されるが、個々の虚血を構成する因子がそれぞれ如何なる情報伝達系を介して、ストレス蛋白質誘導を惹起するかは明らかとなっていない。今回、種々の異なった模擬虚血-再灌流条件下に、HSP70、HO-1がいかなる細胞内情報伝達経路を介して誘導されるかを検討した。

【方法】

1. 模擬虚血-再灌流系の作成

生後1日目のWistar-Kyotoラットをエーテル麻酔下に開胸し心臓を摘出した。摘出した心臓を洗浄した後、コラゲナーゼ処理にて心筋細胞を単離・培養し、(1)酸素分圧の変化(低酸素:95%N₂+5%CO₂、正常酸素:95%room air+5%CO₂)、(2)代謝基質の変化(無グルコース、対照:25mmol/Lグルコース)、(3)pHの変化(アシドーシス:pH6.5、対照:pH7.4)を負荷した。

2. ストレス蛋白質誘導の検討

HSP70、HO-1蛋白質の発現をWestern blot法、mRNA発現をNorthern blot法で検討するとともに、(1)プロテインキナーゼC(PKC)系の関与をPKC阻害薬(0.1μmol/Lスタウロスポリン、1μmol/LカルホスチニC)、(2)熱ショック因子(HSF)系の関与を0.1mmol/Lケルセチン、(3)新規蛋白質合成の必要性を1mmol/Lシクロヘキシミドをそれぞれ用いて検討した。

【成績】

1. 模擬虚血－再灌流によるHSPsの誘導

- 1) 低酸素負荷により、HO-1蛋白質が負荷後12時間より誘導されたが、HSP70は誘導されなかった。HO-1mRNAも同様に3時間後より誘導された。一方、低酸素24時間後に再酸素化を加えると再酸素化12時間後よりHSP70とともにHO-1蛋白質誘導を認めた。
- 2) 無グルコース培養により、HSP70, HO-1蛋白質が負荷後12時間より誘導され、HSP70, HO-1mRNAも同様に3時間後より誘導された。
- 3) アシドーシスにより、HO-1蛋白質が負荷後12時間より誘導されたが、HSP70は誘導されなかった。HO-1mRNAも同様に3時間後より誘導された。

2. HSPs 誘導の情報伝達系の検討

- 1) PKC阻害剤（スタウロスボリン、カルホスチンC）は、無グルコース培養によるHSP70, HO-1蛋白質、mRNAの誘導を抑制したが、低酸素、低酸素－再酸素化、アシドーシスによるHSP70, HO-1の誘導は抑制しなかった。一方、100ng/ml PMA添加によりPKCを活性化すると、HSP70, HO-1蛋白質の誘導を認めた。
- 2) HSF阻害薬（ケルセチン）は、低酸素、低酸素－再酸素化、アシドーシスによるHSP70, HO-1の誘導は抑制しなかった。
- 3) 蛋白質合成阻害薬（シクロヘキシミド）は、すべての模擬虚血－再灌流によるHSP70, HO-1mRNA誘導を阻害した。一方、熱ショックによる誘導はシクロヘキシミドにより阻害されなかった。

【総括】

虚血－再灌流を構成する低酸素、再酸素化、グルコース欠乏、アシドーシスは、心筋細胞においてそれぞれ異なるストレス蛋白質の発現パターンを示すとともに、その過程に新規蛋白質の合成が必要であった。かかる心筋細胞の模擬虚血－再灌流によるストレス蛋白質誘導に、少なくとも2つの情報伝達系が関与した。低酸素、低酸素－再酸素化、アシドーシスにより活性化される経路はHSFによって制御されており、グルコース欠乏により活性化される経路はPKCによって制御されていた。

論文審査の結果の要旨

本研究は虚血－再灌流による心臓のストレス蛋白質誘導機構を、ラット心筋細胞モデルを用いて検討したものである。

虚血－再灌流を構成する低酸素、再酸素化、グルコース欠乏、アシドーシスは、心筋細胞においてそれぞれ異なる発現パターンでHSP70, HSP32 (HO-1)蛋白質発現を惹起した。かかる心筋細胞の模擬虚血－再灌流によるストレス蛋白質誘導には、少なくとも2つの情報伝達系が関与した。低酸素、低酸素－再酸素化、アシドーシスにより活性化される経路はheat shock factorによって制御されており、グルコース欠乏により活性化される経路はprotein kinase Cによって制御されている可能性が示された。また、両経路の活性化には、新規蛋白質の合成が必要であった。

本研究は心臓のストレス蛋白質誘導を介した負荷応答機構の解明に貢献するものであり、学位に値すると考えられる。