

Title	Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells : the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine
Author(s)	西村, 善也
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42921
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"＞ 大阪大学の博士論文について ＜/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	にしむらよしや 西村善也
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14835 号
学位授与年月日	平成 11 年 5 月 28 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	Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine. (培養類洞内皮細胞における chemical hypoxia 時ミトコンドリア障害および細胞骨格の破壊について: pH パラドックスおよび、ブドウ糖、酸性 pH、グリシンによる細胞保護作用)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 松澤 佑次 教授 門田 守人

論文内容の要旨

[目的]

虚血再灌流による臓器傷害は、肝臓外科術後や全身性ショックの病態に関わる臨床的に重要な問題である。肝移植後のグラフト不全の発生にもこの再灌流障害のメカニズムが関与している。類洞内皮細胞の傷害が、虚血再灌流肝障害の主因の一つであることが報告されているが、内皮細胞に対する虚血再灌流傷害のメカニズムは十分に解明されていない。

虚血中には、解糖と ATP の加水分解によって組織はアシドーシスとなる。再灌流後に pH は生理的な値に復帰するが、この急激な pH の変化に伴って細胞死が起こり、pH パラドックスと呼ばれている。pH パラドックスは、再灌流障害を引き起こす主たる要因であると考えられる。グリシンは、pH パラドックスを含めて、様々な原因による細胞傷害に対して強力な保護作用を示すが、肝移植においても、内皮細胞の細胞死を抑制し、またグラフト機能を改善することが示されている。一方、細胞骨格は、内皮細胞の細胞機能の発現と形態の保持に重要な役割を果たしている。ドナー肝の冷保存中には、類洞内皮細胞の形態変化が観察される。他臓器の細胞では、ATP の枯渇が細胞骨格の破壊につながることを示されているが、類洞内皮細胞では、ATP 枯渇時の細胞骨格の変化と細胞傷害の関連は充分検討されていない。類洞内皮細胞の形態変化と細胞死は、ドナー肝保存後の再灌流後グラフト不全につながる初期の変化であり、本研究では、類洞内皮細胞の虚血再灌流モデルにより、細胞死のメカニズムを、pH と細胞骨格の変化の関与を中心に解析し、また、細胞死を抑制する要因について検討した。

[方法並びに成績]

実験には、ラット肝より、コラゲナーゼ灌流法およびエルトリエーションにより得られた初代培養肝類洞細胞を用いた。臓器虚血のモデルとして、青酸カリウム (KCN) によるミトコンドリア呼吸抑制 (以下 chemical hypoxia) を、臓器再灌流のモデルとして、chemical hypoxia 後に KCN を除去した (以下 simulated reperfusion)。培養細胞の viability は propidium iodide の蛍光強度により測定した。Chemical hypoxia および simulated reperfusion 時のミトコンドリア膜電位を共焦点レーザー顕微鏡下に、tetramethylrhodamine methylester の蛍光を画像化することによ

り、解析した。また、actin および vinculin の抗体染色によって、細胞骨格の動態を検討した。

アシドーシスによって、chemical hypoxia 時の細胞死が抑制された。同様に、ブドウ糖に、chemical hypoxia による細胞死を抑制する働きが認められた。ブドウ糖による細胞死抑制は、解糖による細胞内の ATP 供給によるものであった。4 時間の chemical hypoxia (pH 6.2) に引き続いて、pH を 7.4 に戻すと、KCN の存在にかかわらず、急激な細胞死がみられた。この pH 依存性の再灌流障害 (pH パラドックス) は、KCN 除去時のバッファの pH を 6.2 にすることによって抑えられ、これらの結果より、pH の変化そのものが細胞死の引金となることが確認された。アシドーシスと同様に、グリシンにも pH パラドックスを抑制する働きが認められたが、ブドウ糖では、simulated reperfusion 後の細胞死の抑制はみられなかった。

細胞内のミトコンドリアは、chemical hypoxia の間に脱分極し、KCN の除去後、一部の細胞で早期にミトコンドリア膜の再分極とがみられたが、この再分極と、細胞死の間に、強い相関がみられた。すなわち、早期にミトコンドリアが再分極を示した細胞では、simulated reperfusion 後生存し続けたのに対し、再分極しなかった細胞は、細胞死に陥った。細胞死にいたる細胞の細胞骨格は chemical hypoxia 中に高度に破壊され、この細胞骨格破壊はブドウ糖によって抑制された。

[総括]

肝類洞内皮細胞において、虚血時にはミトコンドリアの膜電位の消失と細胞内 ATP の枯渇とが起こり、これらに引き続いて、細胞骨格の破壊がおこる。最終的には、ミトコンドリアの非可逆的な障害が起こるが、細胞死は、虚血中に生じるアシドーシスによって抑制されていると考えられた。再灌流後に pH が生理的な値に戻ると、アシドーシスによるサイトプロテクションがなくなり、細胞死の引き金になることが示された。ブドウ糖は、ATP の供給源となることで、虚血中の細胞死を抑制した。再灌流後の細胞死は、グリシンおよび、アシドーシスによって抑制された。

論文審査の結果の要旨

肝に対する虚血再還流傷害は、肝移植時を始めとする肝臓手術後、あるいは、全身ショック時に、臨床的に問題となる事象であり、この傷害においては、類洞内皮細胞に対する傷害が、主要な要因と考えられている。本研究は、虚血再灌流時の、内皮細胞傷害とそれに対する保護因子について検討することを目的として、培養類洞内皮細胞と KCN を用いた虚血再灌流モデルによって、詳細な研究をしたものである。その結果、類洞内皮細胞において、虚血時の ATP 減少と細胞骨格破壊は、ブドウ糖によって抑制されること、また、再灌流時の傷害は、pH の変化に依存し、この傷害に、ミトコンドリアの機能障害が関係すること、さらに、アシドーシスまたは、グリシンは虚血再灌流傷害を抑制するが、この保護作用には、細胞骨格破壊あるいは、ミトコンドリア機能障害の抑制を介するものではないことが示された。

虚血再灌流時の類洞内皮細胞傷害の詳細と、その傷害に対する細胞保護因子であるアシドーシス、ブドウ糖、グリシンの作用を明らかにしたという点において、臨床的にも非常に意義深く、学位の授与に値すると思われる。