

Title	A role for local calcium gradients upon hypoxic injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).
Author(s)	池田, 正孝
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42934
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	池田まさ孝
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14957 号
学位授与年月日	平成 11 年 9 月 30 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	A role for local calcium gradients upon hypoxic injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞における虚血障害時の細胞内局所遊離カルシウム濃度勾配の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 高井 義美 教授 堀 正二

論文内容の要旨

<目的>

虚血細胞障害時に細胞膜のブレブ形成が初期の段階より起こることが知られている。細胞外のカルシウムの除去、カルシウムブロッカー添加による虚血時の細胞質内遊離カルシウム濃度低下作用がブレブ形成を抑制するため、ブレブ形成には細胞質内のカルシウム濃度が重要な働きをしていると考えられているが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。近年、デジタル画像処理と細胞内遊離カルシウム濃度測定用蛍光色素の進歩により、細胞質、核内の遊離カルシウム濃度の詳細な分析が可能となった。そこで本研究では、これまで我々が確立してきたカルシウム蛍光色素 fluo-3 を用いた共焦点レーザー顕微鏡による細胞内遊離カルシウム測定システムを用いて虚血時のブレブ形成における細胞内遊離カルシウム動態について検討した。

<方法>

初代培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞をカルシウム濃度測定用蛍光色素である fluo-3 で標識した後、共焦点レーザー顕微鏡に固定した虚血チャンパー内に設置、虚血状態または非虚血状態とし、細胞の形態ならびに細胞内遊離カルシウム濃度をそれぞれ微分干渉法ならびに共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察した。細胞内の ATP 欠乏の指標であるミトコンドリア膜電位は rhodamine 123 で標識した細胞を用い、共焦点レーザー顕微鏡にて経時的に観察した。細胞の viability は propidium iodide (PI) を還流液中に用い、同時に経時的に観察し、PI にて核が染色された時点をもって細胞死とした。

<成績>

非虚血細胞では還流30分後でもミトコンドリア膜電位の変化はほとんど認められなかったが、虚血細胞では還流開始後10分より著明な低下が認められた。細胞の viability は虚血開始後25分より低下し始め30分後では約30%の細胞が PI 陽性となった。以上の結果よりこのシステムにより虚血細胞に対しては細胞内 ATP の低下を伴う虚血障害が加わっていると考えられた。細胞質内及び核内の遊離カルシウム濃度は非虚血還流下においては変化を認めなかったが、虚血下では虚血開始後5分より細胞内及び核内遊離カルシウム濃度の上昇が認められ、15分後に最高値に達し、それぞ

れの濃度は 447 ± 62 、 516 ± 105 nM となった。ブレブ形成はカルシウム濃度が最高値に達した15分後より出現し始めその後増加した。共焦点画像にてブレブ形成部分に局所的な遊離カルシウム濃度の増加が認められた。また、さらに詳細な経時的なブレブ形成と局所遊離カルシウム濃度の観察により、局所遊離カルシウム濃度の上昇が先行した後にその一部に一致してブレブが形成されることを明らかにした。

〈総括〉

共焦点レーザー顕微鏡を用いた血管内皮細胞における虚血時の形態変化ならびに細胞内遊離カルシウム濃度変化の検討により細胞内の局所遊離カルシウム濃度増加がブレブ形成に重要な働きをしていることが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、共焦点レーザー顕微鏡を用い、虚血細胞障害時のブレブ形成とカルシウム濃度動態を観察したものである。

カルシウム蛍光色素である fluo-3 で細胞を標識した後、細胞の虚血障害を確認するため細胞形態ならびに ATP 欠乏の指標であるミトコンドリア膜電位を同時に観察した。

細胞内カルシウム濃度は虚血開始後より上昇開始し、15分後には最高値に達した後、次第に低下した。ミトコンドリア膜電位は虚血開始後10分後より著明に低下、30分後にはほぼ消失し、細胞に虚血障害による ATP 欠乏が起こっていることが示唆された。ブレブ形成はカルシウム濃度が上昇した15分後より見られはじめ、以降次第に増加した。また局所カルシウム濃度上昇がブレブ形成に先行し、細胞内局所でのカルシウム濃度上昇がブレブ形成に重要な働きをしていると考えられた。

本研究にはこれまでブレブ形成にカルシウムが重要な働きをしていることに加え、局所カルシウム濃度がブレブ形成に関与していることを示したものであり、学位に値する業績と考える。