



Title	心筋虚血再灌流障害における iPLA2 β の機能解析
Author(s)	松賀, ひとみ
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59989
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【3】

氏名	まつが ひとみ 松 賀 ひとみ
博士の専攻分野の名称	博士（歯学）
学位記番号	第 25766 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	心筋虚血再灌流障害における iPLA2 β の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 豊澤 悟 講師 山田 聡 助教 佐伯 万騎男

論文内容の要旨

[研究背景・目的]

近年の心筋保護法の進歩により開心術の成績は向上したが、術中術後など虚血再灌流障害に起因する臓器機能低下は、心臓を含めた各種臓器において非常に重要な問題である。虚血再灌流障害による臓器機能低下の原因として、種々の因子を介した細胞死の関与が挙げられる。細胞死は大きくアポトーシスとネクローシスに分類され、前者は能動的、後者は受動的細胞死とされてきた。しかし私たちは、シクロフィリンD依存性のミトコンドリア膜透過性遷移がネクローシス性細胞死の主体であり、心筋虚血再灌流障害による細胞死に関与すること、すなわちネクローシス性細胞死も制御された分子機構を有することを報告した。さらに、低酸素刺激による非アポトーシス性細胞死誘導分子として、ホスホリパーゼA2 β (iPLA2 β)が関わるものが報告された。PLA2はリン脂質よりアラキドン酸やリゾリン脂質などの、脂質メディエーターを産生する一群の酵素ファミリーである。iPLA2 β は、Ca²⁺非依存性PLA2のサブタイプの1つである。しかしながら、iPLA2 β の虚血再灌流障害における機能は不明な点が多い。そこで私たちは、心筋細胞特異的iPLA2 β 欠損マウスを作製し、虚血再灌流障害におけるiPLA2 β の機能解析を行った。

[材料及び方法]

iPLA2 β のexon 10の前後にloxP配列を挿入したプラスミドを作製後、ES細胞にて相同

組み換えを行いマウス胚へ導入し、floxed *pla2g6*マウスを樹立した。本マウスを、心筋特異的プロモーターである α ミオシン重鎖プロモーター依存性にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配し、心筋特異的iPLA2 β 欠損マウス (*pla2g6^{lox/lox} α MHC-Cre⁺* : CKO)を作製した。*pla2g6^{lox/lox} α MHC-Cre*を対照群 (CTRL)とした。本研究には12週齢雄性CKOおよびCTRLを供した。CKOおよびCTRLに対して心臓超音波法を行い、心機能を検討した。マウス心臓虚血再灌流モデルとして、ランゲンドルフ灌流心モデルを用いた。ペントバルビタール腹腔内投与による麻酔後、開胸下に下大静脈よりヘパリン(300U)を投与して心臓を摘出した。大動脈に挿入したカニューレを介して経冠動脈順行性に37℃下で心筋灌流を行った後、30分間の灌流停止(虚血)と引き続いて30分間の再灌流を実施した。その間、左室内に挿入したバルーンカテーテルを用いて、経時的な血行動態計測による心機能測定を行った。虚血再灌流終了後に、再灌流心を短軸方向に複数面切断し、トリフェニルテトラゾリウムクロライド(TTC)染色による心筋梗塞領域定量評価を行った。滴下灌流液中の乳酸脱水素酵素(LDH)、トロポニンIの濃度を測定し心筋逸脱酵素を定量評価した。また再灌流後左心室を用いて組織学的評価としてヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、アザン-マロリー(AM)染色、TUNEL染色を行った。またCKOおよびCTRL単離心筋細胞を用い、ネクローシス細胞死、及びアポトーシス性細胞死に関する検討を行った。

[結果]

- ① CKOはメンデルの法則に則って出生し、心臓特異的にiPLA2 β タンパク質発現量がCTRLに比し有意に低下していた。
- ② 12週齢においてCKOはCTRLと比し、体重に有意差は認められなかった。心臓超音波法による検討においては、左室拡張末期内径、左室収縮末期内径、左室径短縮率、拡張末期心室中隔壁厚、左室拡張末期後壁厚に両群間で有意差を認めなかった。
- ③ ランゲンドルフ灌流心における検討では、虚血前に対する再灌流30分後の各血行動態指標の比は、最大左心室圧(CTRL群、KO群の順、以下同じ) : 56.0 \pm 6.0%, 71.7 \pm 1.7%, P=0.004)、左心室収縮期圧(66.7 \pm 4.73%, 75.4 \pm 3.40%, P=0.142)、左心室拡張末期圧(352 \pm 49.8%, 151 \pm 19.4%, P=0.0008)、Maximum dp/dt (2.2 \pm 4.24%, 84.7 \pm 3.32%, P=0.0005)、Minimum dp/dt (55.1 \pm 4.74%, 72.7 \pm 2.60%, P=0.003)、Rate pressure product(55.3 \pm 3.60%, 68.4 \pm 2.34%, P=0.006)と、CKO群はCTRL群に比し虚血再灌流障害の有意な軽減を認めた。
- ④ TTC染色による心筋梗塞サイズは、CKO群で、CTRL群に比べて縮小を認めた(CTRL群、CKO群、12.9 \pm 1.87%, 5.40 \pm 1.10%, P=0.002)。滴下灌流液中におけるLDH、Troponin I濃度に関しては有意な差を認めなかった。
- ⑤ HE染色、AM染色による組織学的評価では有意差を認めなかった。
- ⑥ CKOはCTRLと比し、アポトーシス性細胞死が抑制される傾向を認めたが、ネクローシス性細胞死では有意な改善は認められなかった。

[結論]

心臓虚血再灌流障害において、iPLA2 β は臓器傷害的に機能している事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、iPLA2 β の虚血再灌流障害における機能を解析することを目的として、心筋細胞特異的iPLA2 β 欠損マウスを作製 (*pla2g6^{lox/lox} α MHC-Cre⁺* : CKO, *pla2g6^{lox/lox} α MHC-Cre* : CTRL) し、ランゲンドルフ灌流心モデルと成獣単離心筋細胞を用いて研究を行った。

その結果CKOはCTRLに比し、虚血前に対する再灌流30分後の各血行動態指標の比は、虚血再灌流障害の有意な軽減を認めた。さらに、CKOはCTRLと比し、アポトーシス性細胞死が抑制される傾向を認めたが、ネクローシス性細胞死では有意な改善は認められなかった。

以上の結果より、iPLA2 β は心臓虚血再灌流障害に際して組織障害的に機能していることが示唆された。今後臨床などの現場に於いて虚血組織におけるiPLA2 β の適切な阻害が、臓器の機能障害予防や臨床的予後の改善に繋がることが期待される。また本知見は心臓においてのみならず、様々な臓器における効果が期待される。

よって、博士(歯学)の学位論文として価値のあるものと認める。