

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 中 島 啓 喜

本研究は、ヒト・リコンビナント活性酸素消去酵素 (rhSOD) をレシチン誘導体で修飾すること (レシチン化 SOD) により、ラット培養心筋細胞内に SOD を運搬することを可能にしたことを示した。同時に、レシチン化 SOD にて低酸素誘導の細胞障害が軽減されることを示し、さらに、レシチン化 SOD の抗アポトーシス効果を示唆している。

本研究で得られた、主な結果は以下の通りである。

1. レシチン化 SOD を作製し、その SOD の細胞移行を検証する目的で、ウェスタン・ブロッティングおよび SOD activity gel assay を施行した。その結果、レシチン化 SOD が細胞に取りこまれ、酵素活性も維持することを証明した。さらに、レシチン化 SOD 処理培養心筋細胞に対して、抗 SOD 抗体を使用した免疫細胞化学染色を施し、共焦点レーザー走査顕微鏡法を行った。共焦点レーザー走査顕微鏡法では、光学的断層分析が可能となるため、外から加えた外因性 SOD の細胞内移行を検証可能である。その結果、細胞内への SOD の運搬が確実であることを証明した。
2. レシチン化 SOD の細胞内分布に関する検討をした。活性酸素の産生部位としてミトコンドリアは重要な細胞内小器官であるが、細胞のミトコンドリア分画に対するウェスタン・ブロッティングでミトコンドリアに豊富な SOD が認められた。上述の共焦点レーザー走査顕微鏡法でも、SOD は顆粒状に細胞全体に広く認められ形態的にもミトコンドリアに SOD が移行したことが示唆された。
3. 次に、レシチン化 SOD の低酸素誘導細胞死に関する保護効果に関して検討

した。細胞死に関しては、trypan blue 除外法で、生化学マーカーとして LDH を指標として定量し、双方の実験でレシチン化 SOD の低酸素障害に対する保護効果を示した。

4. レシチン化 SOD の低酸素障害に対する保護効果の機序の解析するため、抗アポトーシス効果を検討した。レシチン化 SOD の処理により、低酸素にて誘導される細胞核の断片化の減少、DNA ラダーの減弱が示された。心筋虚血時にアポトーシス調節タンパクである Bcl-2、Bax が関与するかを検討し、レシチン化 SOD により抗アポトーシス効果を持つ Bcl-2 が細胞内で保持されることを示した。

上記のように、本論文はラット培養心筋細胞において、外因性の SOD をレシチン化することにより細胞内移行を可能にし、さらに、細胞内移行した SOD が低酸素障害による心筋細胞障害を軽減することを検証した。Drug delivery system としてのレシチン化が、培養心筋細胞に対して有効であることを証明し、今後多岐の分野での応用が期待される。以上より、本研究は学位授与に値すると考えられる。