

[別紙1]

論文の内容の要旨

[背景] 低酸素はアポトーシスやネクローシスを起こすことが知られており、最近この機序として酸化ストレスがこの経路に関与していることがいわれてきた。ヘム・オキシゲナーゼ-1 heme oxygenase-1 (HO-1)は低酸素などの種々のストレス・炎症などで増加することが知られており、この増加における意味については完全には解明されていない。一酸化炭素 carbon monoxide (CO)はHO-1によるヘム heme 代謝産物であり、それ自体は生体にとって毒ガスであるが細胞の種々の機能に重要な役割を持つことが報告されてきている。

[目的] 我々は今回、低濃度COの低酸素下での内皮細胞保護効果および細胞内酸化ストレス抑制効果についての検討を行った。

[方法] ウシ大動脈内皮細胞 bovine arterial endothelial cells (BAECs)・ヒト臍帯静脈内皮細胞 human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)は低酸素下で培養され、それにCOを同時に低酸素ガスに250～1000ppmを付加するという条件下で実験を行った。Cell viabilityはトリパン・ブルー

阻害試験や WST-1 を用いたアッセイで評価し、アポトーシスはヨウ化プロピディウムおよびアネキシン V-FITC を用いてフローサイトメトリーで評価を行った。細胞内酸化ストレスの増加については酸化状態感受性蛍光プローブである dichlorofluorescein diacetate を用いたフローサイトメトリーで評価した。アポトーシス関連タンパクである Bcl-2、Bax、NAD(P)H oxidase のサブユニットである p22-phox、gp91-phox、あるいは HO-1 のタンパク発現はウェスタンブロッティングを用いて解析を行った。

[結果] CO 付加により特に 500ppm の濃度のときに低酸素下での内皮細胞は生存率の増加が見られた。ヨウ化プロピディウムおよびアネキシン V を用いたフローサイトメトリーでも CO は低酸素下でのアポトーシス・ネクローシス細胞を減少させた。ウェスタンブロッティングでは CO 500ppm 付加で有意にアポトーシス関連タンパクである Bcl-2/Bax の発現比が低酸素下で増加するのが見られた。DCF を用いた細胞内酸化ストレスの評価を行ったところ、低酸素では DCF 蛍光が著明に増加し、これは CO 付加により抑えられた。また外的過酸化水素添加 1mM による DCF 蛍光の増加も CO 500ppm を 24 時間前より前投与することにより抑えられた。このことより低酸素及び過酸化水素投与による細胞内酸化ストレスが CO の投与によ

り抑えられることが示された。また CO および HO-1 adenoviral gene transfer は細胞内スーパーオキシド産生の原因となる NAD(P)H オキシダーゼ活性が低酸素下 24 時間後に増加するのを抑制し、NAD(P)H オキシダーゼの membranous component である p22-phox および gp91-phox の低酸素下 24 時間後の発現をほぼ完全に抑制した。

[結語] 低酸素下にある内皮細胞において、CO は 500ppm の濃度で細胞保護効果を発揮した。この細胞保護効果の一因として、CO の低酸素下での細胞内酸化ストレス抑制作用が今回示され、スーパーオキシド産生の原因となる NAD(P)H オキシダーゼ活性抑制効果も認められた。CO および HO-1 は NAD(P)H オキシダーゼ活性を抑制することにより細胞内酸化ストレス増加を抑制して細胞保護効果を発揮している作用があることが示唆された。