

論文内容の要旨

論文題目 : Carbon monoxide suppresses cardiomyogenic cell apoptosis
in ischemia-reperfusion

(一酸化炭素の心筋細胞における虚血再灌流アポトーシス抑制)

指導教員 : 吉田 謙一 教授

専攻名 : 東京大学医学系研究科社会医学専攻

入学年 : 平成 16 年 4 月入学

氏名 : 中村 美穂子

【背景と研究の目的】

一酸化炭素(CO)は、mitochondria 電子伝達鎖の構成分子である cytochrome c oxidase や NADPH oxidase、NO 合成酵素と結合し活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)を産生する。

臓器移植や心臓外科手術において問題となる虚血再灌流では、主に再灌流初期の ROS 発生に続き apoptosis 障害が引き起こされる。また心筋細胞の apoptosis は主に mitochondria 経路と death-receptor 経路によるとされている。

短時間の虚血再灌流が先行することにより組織が虚血耐性を獲得し、その後の長時間の虚血障害に対し保護的に作用することを ischemic preconditioning (IPC)という。IPC の作用機序としては先行する短時間の虚血再灌流により mitochondria の K_{ATP} (mito K_{ATP})チャンネル開口や膜透過性亢進により産生される適度の ROS による生存シグナル伝達によるものとされている。上述のように CO も ROS を産生することから、CO も PC 効果を持つと予想され、実際低濃度の CO を前暴露することで、動物モデルで臓器移植や心臓手術後の apoptosis を抑制した臨床報告がある。また、CO の心筋細胞虚血再灌流に対する細胞死保護が ROS を介したものだとする報告があるが、どの生存因子が関与するか詳細は不明である。そこで、本研究の目的は再灌流障害に注目し、ラット心筋由来の H9c2 細胞を用いて CO の PC 効果とその作用機序を明らかにすることにある。

【材料と方法】

虚血再灌流、CO 暴露

虚血にするため、N₂ ガスを吹き込んだ Hanks' balanced salt solution (HBSS) に H9c2 細胞の培養液を置換し、低酸素インキュベータ内に 10 分おいた。再灌流とするため上清を培養液に戻し空気に暴露した。CO 暴露群は、虚血前に 1%CO を吹き込んだ培養液で細胞を 10 分間処理し、虚血再灌流のみの群は培養液を入れ替えるのみとした。なお、虚血再灌流によるキナーゼ活性化を顕著にするため、実験の 1 時間前から全工程において血清を除去した(図 1)。

CO pretreatment



Control



serum deprivation (1 h) CO pre-treatment (10 min) ischemia (10 min) reperfusion (6 h)

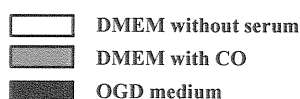


図1 実験条件

細胞死の評価

細胞蛍光染色法によりヘキストと propidium iodide (PI) を用い蛍光顕微鏡にて観察した。

Western blot

細胞回収後、プロテアーゼ・ホスファターゼ阻害剤入りのバッファー下で超音波破壊した。細胞質分画は、同バッファー下でホモジナイザーにて破壊後、100,000 g・1 時間遠心し上清を用いた。タンパク定量は Coomassie 法を用い、その後共に SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。またバンドの濃度はイメージ分析機(Densitograph, Atto)を用い定量した。

ROS 定量

CO 暴露前に 1 時間 Dihydroethidium(DHE) を細胞にローディングした。CO 暴露は phenol-red 抜きの培養液で行い、DHE が O₂ により酸化されることで生じる ethidium(Eth) の蛍光をプレートリーダー(GENions, Tecan, Mannedorf)を用いて定量した。

【結果】

①虚血再灌流で起こる apoptosis は CO 前暴露により抑制される

ヘキストと PI の二重染色により細胞死を評価したところ、再灌流 6 時間で apoptosis 初期、12 時間で apoptosis 後期の形態が観測された。この再灌流 6 時間による apoptosis は CO 前暴露によって抑制された(図 2A, B)。また、apoptosis の実行分子の代表的プロテアーゼである Caspase-3 が再灌流によって活性化することを Western blot によって確認されたが、この活性化も CO により抑制された(図 2C)。

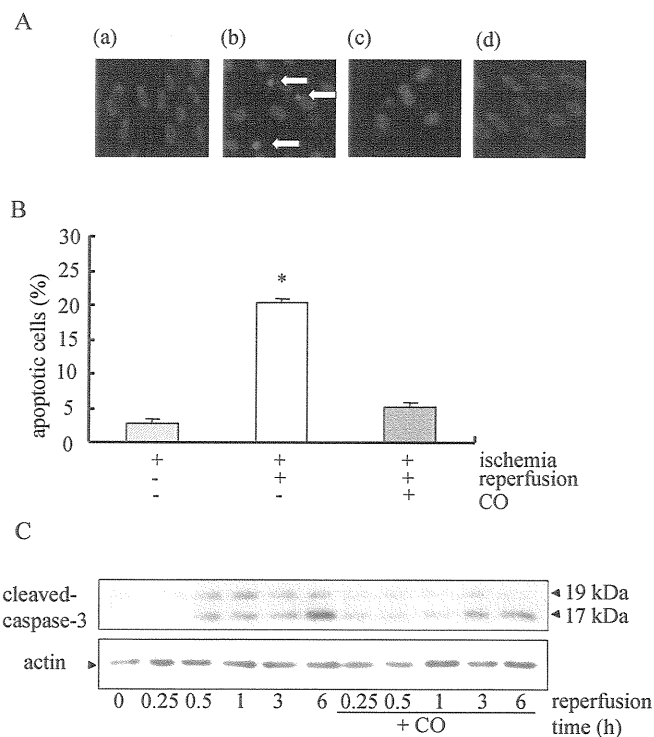


図2 虚血再灌流時のapoptosis評価

A. (a) 虚血10分のみ (b) 再灌流6時間 (c) 再灌流12時間

(d) CO前暴露(再灌流6時間)

B. apoptosis 細胞数定量 (n=4, *p<0.001 vs. ischemia or COpretreatment)

C. Caspase-3活性化

②再灌流時に CO 前暴露により、Akt・p38MAP kinase の活性化が増強する

リン酸化抗体を用いた Western blot にて Akt と MAP kinase family(ERK、JNK および p38 MAP kinase)の活性化を解析した。Akt は再灌流 30 分後から緩やかに活性化され、CO 前暴露がそれを増強した。p38 MAP kinase は CO 前暴露により活性化したが、その他の MAP kinase は CO の影響を受けなかった(図 3)。

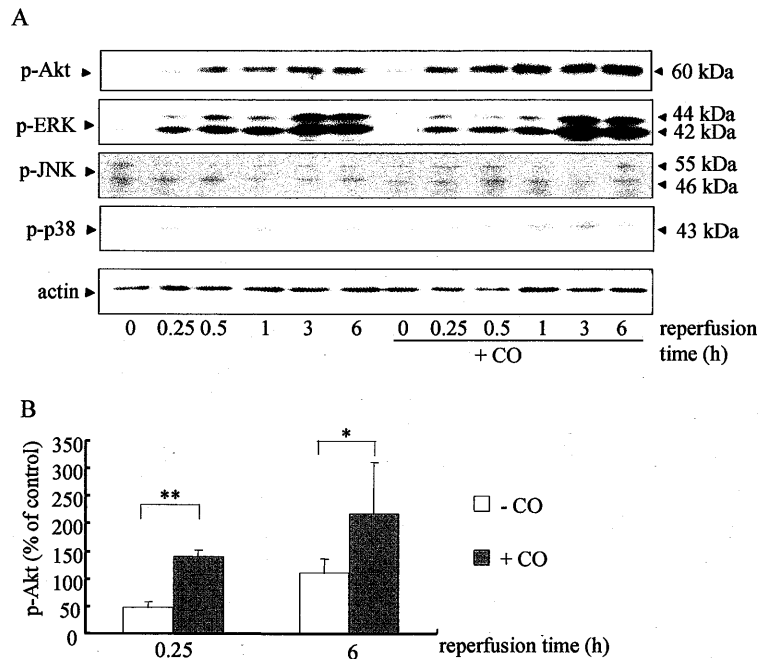


図3 Akt, MAP kinase の活性化

A. Akt, MAP kinase の活性化

B. Akt活性化定量 (n=4, means±SD, *p<0.001, **p<0.05)

③CO は Akt を介して apoptosis を抑制する

CO 前処置によって活性化される Akt と p38 MAP kinase の関係について検討した。Akt 阻害剤である API-2 は CO による p38 MAP kinase の活性化を抑制したが、p38MAP kinase 阻害剤である SB203580 は Akt の活性化を抑制しなかった(図 4A)。また API-2 は CO 前暴露による apoptosis 抑制効果を完全に阻害した(図 4B)が、SB203580 は影響を与えなかった(図 4C)。これらの結果より、1) CO の再灌流による apoptosis 抑制効果は Akt の活性化が必須であること、2) p38 MAP kinase は Akt によって活性化されるが、apoptosis 抑制効果には関与していないことが分かった。

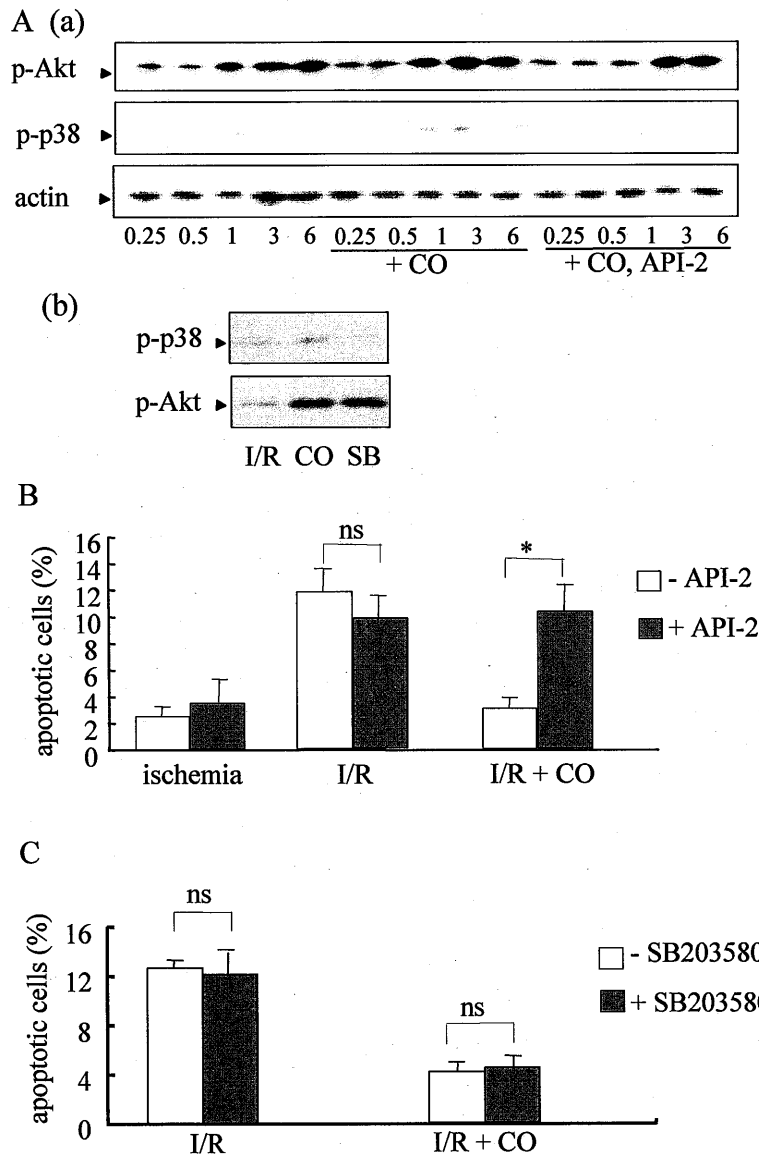


図4 Akt・p38 MAP kinase のcross-talk,

COの保護効果への影響

A. (a) p38 MAP kinase活性化に対するAPI-2 の効果

(b) Akt活性化に対するSB203580 の効果

B. アポトーシス細胞数に対するAPI-2 の効果

(n=4, means±SD, *p<0.001, ns: not significant)

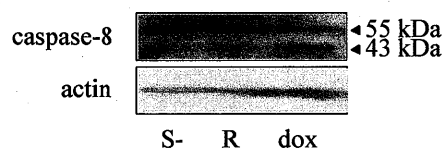
C. アポトーシス細胞数に対するSB203580 の効果

(n=4, means±SD, ns: not significant)

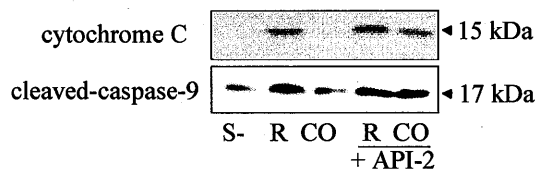
④COはAkt活性化を介して再灌流における mitochondria 経由の apoptosis を阻害する。

再灌流時の apoptosis 経路を同定するために、caspase-9 (mitochondria 経路) と caspase-8 (Fas-receptor 経路) の活性化を Western blot で解析したところ、caspase-8 ではなく caspase-9 の活性化が見られた。また、caspase-9 の上流に位置する cytochromeC の細胞質への流出も確認された(図 5A, B)。Caspase-8 阻害剤 (Z-IETD-FMK) は再灌流による apoptosis を減少させたが、Caspase-9 阻害剤 (Z-LEHD-FMK) は効果がなかった(図 5C)。CO 前暴露はこの cytochromeC の流出や Caspase-9 活性化を阻害したが、これらの阻害効果は API-2 によって消失した(図 5A)。以上より、H9c2 細胞における再灌流時の apoptosis は、mitochondria を介するものであり、CO は Akt の活性化を介してそれを抑制することが分かった。

A



B



C

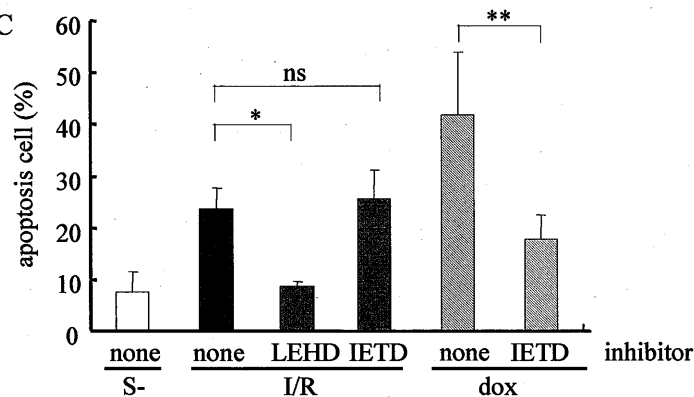


図5 Caspase-8/9活性化, cytochromeCの流出

A. Caspase-8活性化

s-: 血清除去, R: 虚血再灌流, dox: doxorubicin

B. cytochrome C の流出(細胞質分画), Caspase-9活性化

C. アポトーシス細胞数定量

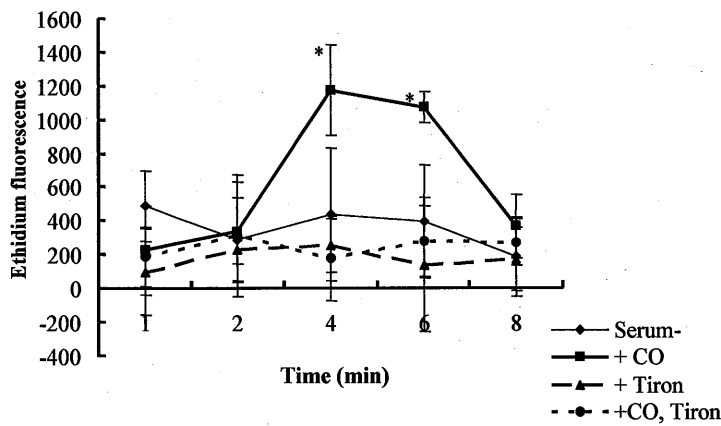
(n=4, means±SD, *P<0.005, **p<0.001, ns: not significant)

SB21: SB216763, LEHD: Z-LEHD-FMK, IETD: Z-IETD-FMK

⑤CO 前暴露中に O₂⁻が発生する。

DHE を用い細胞内の O₂⁻を定量したところ、CO 暴露 4 分で baseline の 3 倍に増加した。この増加は O₂⁻の scavenger である Tiron により抑えられた (図 6A)。O₂⁻の産生源を特定するために、CO 暴露 5 分での mitochondria 呼吸鎖阻害剤 AntimycinA と NADPH 阻害剤 apocynin の効果を調べたところ、AntimycinA のみ O₂⁻産生を阻害した。

A



B

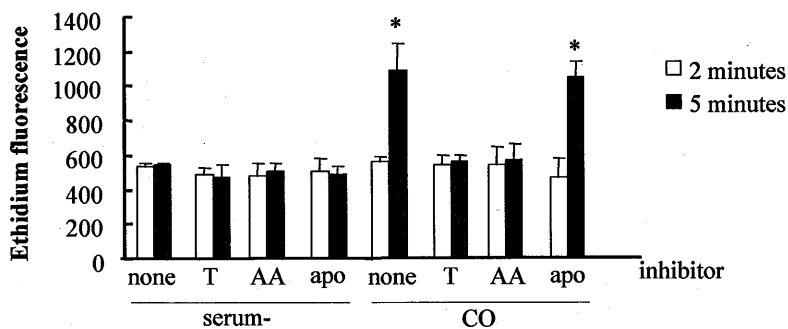


図6 CO前処置中におけるROS発生

A. COによるROS発生 (n=4, means±SD, *P<0.005)

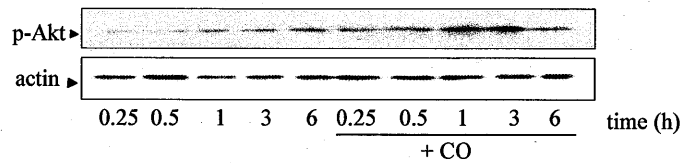
B. COによるROS発生に対するTiron (T), AntimycinA (AA), apocynin (apo) の影響 (n=4, means±SD, *P<0.005)

⑥CO は O₂⁻→H₂O₂ を介して Akt を活性化する

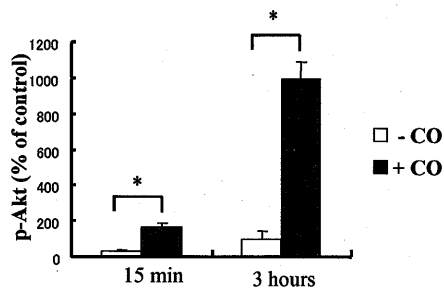
CO 暴露後血清除去培養液に戻すと、3 時間をピークとして baseline の 10 倍近く Akt が活性化された(図 7A, B)。この Akt を活性化する ROS 種を同定するために

CO 暴露後の Akt 活性化に対する O_2^- (Tiron) あるいは H_2O_2 (catalase) スカベンジャー、CuZn-SOD 阻害剤 (DETC) の影響を調べたところ、Akt 活性化はこれらの全てで抑制された(図 7C)。これらの結果より、mitochondria で産生された O_2^- は CuZn-SOD により H_2O_2 へ転換された後、Akt を活性化することが示唆された。

A



B



C

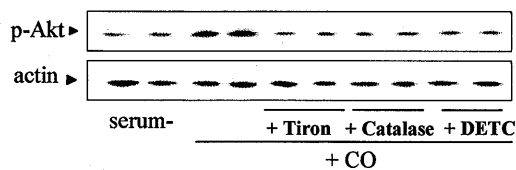


図7 COによるAkt 活性化

A. COによるAkt 活性化

B. Akt活性化定量 (n=5, means±SD, *p<0.001)

C. Akt活性化に対するTiron, catalase, DETCの影響

【考察】

本研究は、CO 前暴露は 1) 虚血再灌流による apoptosis を抑制する preconditioning 効果を有すること、2) mitochondria から O_2^- を産生して Akt を活性化すること、3) Akt の活性化を介して mitochondria 経路の apoptosis を抑制することを明らかにした。

ROS による Akt 活性化の機序として、phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) の関与が疑われる。PTEN は PI_3 kinase/Akt の活性を抑制するが、ROS による酸化によって不活性化される。IPC は ROS 産生を介して PTEN 酸化不活性化により Akt を活性化するという報告があることから、CO 前暴露も同様の機序が働いている可能性がある。

心筋細胞において、再灌流による apoptosis は mitochondria 経路と Fas などの death receptor 経路を介することが報告されているが、本研究では前者のみが進行していた。この mitochondria 経路は glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) による mitochondria の膜透過性亢進がトリガーとなるという報告がある。GSK3 β は Akt により不活性化されることから、Akt が mitochondria 経路の抑制に重要であると思われる。また、p38 MAP kinase は血管内皮細胞や動物モデルにおいて Fas 経路の抑制を介して CO の保護効果を担っているという報告があるが、本研究では CO 前暴露により p38 MAP kinase が活性化していたが、Fas 経路が再灌流時に進行していなかったため保護効果に関与しなかったと推測される。冠動脈結紮によるラット虚血再灌流モデルにおいて、CO が Akt を介して eNOS を活性化し、梗塞サイズを抑制するという報告がある。このモデルでは CO の血管に対する作用がその保護効果に大きく貢献していると考えられるが、本研究により心筋細胞に対しても Akt が CO の保護効果に重要であることが明らかにされた。