

【別紙2】

審査の結果の要旨

氏名 中村 美穂子

本研究は、心筋虚血再灌流障害に対する保護効果を持つとされる一酸化炭素 (CO) の作用機序を明らかにするため、ラット心筋由来の H9c2 細胞を用い、CO により誘導されるシグナルの活性化を解析や、それらの CO の保護効果に対する役割を明らかにすることを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 虚血再灌流で起こる apoptosis は CO 前暴露により抑制される

細胞蛍光染色法により蛍光顕微鏡にて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。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。

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。

3. CO 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。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が、SB203580 は影響を与えなかった。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。

4. CO 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。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。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。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。

5. CO 前暴露中に O_2 が発生する。

DHE を用い細胞内の O_2 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 O_2 の scavenger である Tiron により抑えられた。 O_2 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 O_2 産生を阻害した。

6. CO は $O_2 \rightarrow H_2O_2$ 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。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。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。

以上、本論文はラット心筋由来細胞において、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。本研究は心筋細胞における CO の preconditioning 効果に、Akt が重要であることを初めて明らかにし、CO の虚血再灌流に対する保護効果の作用機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。