

氏 名	小 嶋 亜希子
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 2 8 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 3 年 3 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	Ca <sup>2+</sup> paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes.  (マウス心室筋細胞における TRPC チャンネルを介するカルシウムパ ドックス傷害)
審 査 委 員	主 査 教 授 三 ッ 浪 健 一 副 査 教 授 堀 江 稔 副 査 教 授 村 上 節

## 論文内容要旨

※整理番号	633	(ふりがな) 氏名	(こじま あきこ) 小嶋 亜希子
学位論文題目	Ca <sup>2+</sup> paradox injury mediated through TRPC channels in mouse ventricular myocytes (マウス心室筋細胞における TRPC チャンネルを介するカルシウムパラドックス傷害)		
<p><b>【研究の目的】</b> 心筋細胞をカルシウムを含まない溶液で灌流した後に再びカルシウムを含む溶液で灌流すると、拘縮を伴う急激な細胞内カルシウム濃度の上昇が認められる。この現象をカルシウムパラドックスといい、心臓や神経におけるカルシウム過負荷による細胞傷害に関連した重要な実験モデルである。今回の実験は、このカルシウムパラドックスの発生に関わる分子・細胞メカニズムを解明することを目的として行われた。</p> <p><b>【方法】</b> 酵素処理により単離したマウス心室筋細胞にカルシウム蛍光指示薬である fluo-3 を負荷して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて静止状態における細胞内カルシウムレベルのイメージング解析を行った。さらにパッチクランプ法を用いて、電流記録を行った。また、免疫細胞化学法によりマウス心室筋細胞における TRPC チャンネルタンパク質の発現を検討した。</p> <p><b>【結果】</b> 心室筋細胞を無カルシウムタイロード液で 10-20 分灌流した後に正常タイロード液 (1.8 mM のカルシウムを含む) で灌流すると、約 50% の細胞で拘縮を伴う急激な細胞内カルシウムレベルの上昇 (カルシウムパラドックス) を認めた。このカルシウムパラドックスの発生率は、カルシウム透過型カチオンチャンネルである transient receptor potential canonical (TRPC) チャンネルの阻害剤である 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), ガドリニウム, ランタンや、抗 TRPC1 抗体によって有意に減少した。全細胞型パッチクランプ法により、筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, SR) の Ca<sup>2+</sup> ATPase の阻害剤である thapsigargin により活性化され 2-APB により抑制される電流の存在を確認した。さらにこの電流は細胞を抗 TRPC1 抗体で前処置することにより有意に減少した。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

(続 紙)

免疫細胞化学法により、主に細胞膜に TRPC チャンネルタンパク質が発現 (TRPC1, 3, 4) していることを確認した。TRPC チャンネルは筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, SR) 内のカルシウム含量の低下によって活性化されることが知られている。カフェイン投与実験により、心室筋細胞を無カルシウムタイロド液で灌流する時間を長くしていくと、徐々に SR 内カルシウム含量が減少していくことが確認できた。この SR 内カルシウム含量の減少は ATP 合成の脱共役剤である 2,4-ジニトロフェノールによりさらに増悪した。SR からのカルシウムリークをテトラカインで阻害すると、カルシウムパラドックスの発生率は低下した。ナトリウム・カルシウム交換機転 (NCX) の阻害剤である KB-R7943 を全灌流中に投与した場合カルシウムパラドックスの発生率を有意に低下させたが、カルシウム再投与の 3 分前から投与した場合にはカルシウムパラドックスの抑制効果はなかった。無カルシウムタイロド液で灌流中に KB-R7943 を投与すると、NCX を介するカルシウムの細胞外への排出が抑制された結果、SR 内のカルシウム含量がコントロールより保たれた。

#### 【考察】

これらの結果より、(i)カルシウムパラドックスは SR 内カルシウム含量の減少により活性化される TRPC チャンネルを介するカルシウム流入により発生すること、(ii)NCX のリバースモードによるカルシウム流入のカルシウムパラドックスへの関与は少ない一方、無カルシウムタイロド液灌流中の NCX の阻害は SR 内のカルシウム負荷につながり、結果としてカルシウムパラドックスの発生率の減少させること、が明らかになった。

#### 【結論】

マウス心室筋細胞におけるカルシウムパラドックスの発生には、無カルシウム溶液灌流中に生じる SR 内カルシウム含量の減少により活性化される TRPC チャンネルを介するカルシウム流入が関わっている。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	633	氏名	小嶋 亜希子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>心筋細胞を <math>\text{Ca}^{2+}</math> を含まない溶液で灌流した後に再び <math>\text{Ca}^{2+}</math> を含む溶液で灌流すると、拘縮を伴う急激な細胞内 <math>\text{Ca}^{2+}</math> 濃度の上昇が認められる。この現象を <math>\text{Ca}^{2+}</math> パラドックスといい、<math>\text{Ca}^{2+}</math> 過負荷による心筋傷害を検討する重要な実験モデルであると考えられている。本研究は、単離マウス心室筋細胞に、共焦点レーザー顕微鏡による細胞内 <math>\text{Ca}^{2+}</math> 濃度のイメージング解析を行い、<math>\text{Ca}^{2+}</math> パラドックスの発生に関わる分子・細胞内メカニズムについて以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <math>\text{Ca}^{2+}</math> パラドックスの発生には TRPC (transient receptor potential canonical) チャネル (その中でも主に TRPC1 アイソフォーム) を介する <math>\text{Ca}^{2+}</math> 流入が関与している。</li> <li>2. その TRPC チャネルの活性化には筋小胞体内の <math>\text{Ca}^{2+}</math> 含量の減少が寄与している。</li> <li>3. リアノジン受容体もしくは <math>\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}</math> 交換機転を阻害することで、筋小胞体内 <math>\text{Ca}^{2+}</math> 含量が維持されると、<math>\text{Ca}^{2+}</math> パラドックスの発生率は減少する。</li> <li>4. 細胞内 ATP 産生を阻害するジニトロフェノールの投与により、筋小胞体内 <math>\text{Ca}^{2+}</math> 含量が減少し <math>\text{Ca}^{2+}</math> パラドックスの発生率は増加する。</li> </ol> <p>本論文は、心筋細胞の <math>\text{Ca}^{2+}</math> パラドックスの発生メカニズムについて新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 597 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 1 月 24 日)</p>			