

氏 名	井 田 円 <small>い だ まどか</small>
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3029 号
学位授与の日付	平 成 19 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Real-time two-photon imaging of mitochondrial function in perfused rat hearts subjected to ischemia/reperfusion (ラット灌流心を用いた虚血/再灌流におけるミトコンドリア機能の二光子励起共焦点顕微鏡による観察)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 間 昭 典 教 授 米 田 正 始 教 授 松 田 道 行

論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアは細胞死において重要な役割を担っており、ミトコンドリアの機能障害を克明に観察することは、細胞死を理解する有意義な手段となりうる。これまでも培養細胞レベルでのミトコンドリアの観察は行われてきたが、組織レベルでの観察は困難であった。そこで二光子共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより、ラットのランゲンドルフ灌流心におけるミトコンドリア機能をリアルタイムに観察する事に成功し、また、灌流心での虚血/再灌流時におけるミトコンドリアの機能障害を観察することに成功した。

ミトコンドリア内膜電位を標識する蛍光色素である TMRE (テトラメチルローダミンエチルエステル) で染色した後、BDM (2,3-ブタネジオンモノキシム) を用い、心拍動を抑制した灌流心を観察したところ、心外膜側より約 50 μ m 程度の深さまで画像を取得することができ、3, 4 層の心筋細胞層が観察可能であった。

灌流心において、灌流停止による60分間虚血を行ったところ、虚血20分後より数個の心筋細胞で TMRE 蛍光強度の低下を認めた。30分間虚血/30分間再灌流でも、虚血20分後、および再灌流直後より TMRE の低下する細胞を認め、最終的にはほとんどの細胞で TMRE 低下を認めた。TMRE の低下は5分以内に完成しかつ非可逆的であり、虚血時でも再灌流時でもその時間経過に変化は無かった。このため、虚血時でも再灌流時でも同じ機序にて TMRE の低下が起こっていると考えられる。TMRE の低下は、1つの細胞内ではある領域のミトコンドリアから細胞の縦軸方向にドミノ倒しのように伝播していたが、細胞を超えて伝播することはなく、近接する細胞には影響を与えなかった。このため心筋内に壊死した細胞と生存する細胞が混在するまだら模様となり、この結果生じる心筋層における電氣的・代謝的ばらつきが心筋梗塞時の不整脈発生の一因であることが示唆された。

TMRE 低下と細胞死の関連を確認するために、細胞質に蓄積する BCECF (2,7-ビス2カルボキシル5,6-カルボキシフルオレセンス, アセトキシメチルエステル) および細胞膜の破綻した細胞の核を染色する PI (プロピジウムイオダイド) を用いたところ、TMRE が低下した細胞は PI 陽性であり、BCECF の細胞外流出が認められた。

TMRE の低下として表現されるミトコンドリア内膜電位消失の機序として、MPTP (ミトコンドリアの透過性遷移孔) の開口が考えられている。MPTP の阻害剤である CsA (サイクロスポリン A) 0.2 μ mol/L および 1.0 μ mol/L を虚血前に投与したところ、TMRE 低下の程度が部分的に抑制された。Ischemic preconditioning (IPC) すなわち、5分の虚血と5分の再灌流を3回繰り返した後に虚血/再灌流を行ったところ、TMRE の低下に陥る細胞数が減少し、その低下が開始するまでの時間も延長した。これらのことにより、CsA と IPC は共に虚血/再灌流時におけるミトコンドリア傷害を抑制する効果があるが、その心筋保護効果は異なった機序に基づくと推測される。この新しいイメージング系は、心筋の虚血/再灌流時におけるミトコンドリア傷害のメカニズムのさらなる解明に役立ち、ミトコンドリアを標的とした心筋保護治療戦略の確立に有用であると思われる。

論文審査の結果の要旨

虚血/再灌流時の心筋傷害にミトコンドリアは中心的に関与している。本論文はミトコンドリア機能を二光子共焦点レーザー顕微鏡により灌流心でリアルタイムに観察した研究である。

ミトコンドリアの内膜電位 ($\Delta\Psi$) を標識する蛍光色素で染色した灌流心にて3,4層の心筋細胞層が観察された。

灌流を停止する60分間の虚血にても、30分間の虚血/30分間の再灌流にても、経時的に $\Delta\Psi$ の消失を認めた。 $\Delta\Psi$ の消失は再灌流時により多数の細胞で認めた。 $\Delta\Psi$ の消失は虚血時でも再灌流時でも、ある一定時間（潜伏期）経過の後、突然始まり、3、4分で完了し、不可逆的であった。 $\Delta\Psi$ の消失速度は潜伏期には無関係であった。

$\Delta\Psi$ の消失は、細胞内のあるミトコンドリアから細胞全体に細胞の長軸方向に沿って伝播していたが、近接する細胞には影響を与えなかった。そのため心臓内に壊死細胞がまばらに存在し、不整脈の発生の一因となる可能性が示唆された。

ミトコンドリア内膜透過性を抑制する CyclosporinA 0.2/1.0 μ M, 及び Ischemic preconditioning は、共に $\Delta\Psi$ の消失を抑制したが、前者は多数の細胞の $\Delta\Psi$ の消失速度を低下し、後者は潜伏期を延長し、その作用機序は異なることが示唆された。

以上の研究は虚血/再灌流時の心筋傷害のメカニズム解明に役立ち、ミトコンドリアを標的とした心筋保護治療戦略の確立に有用であると思われる。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成18年12月13日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。