

氏 名	たけ だ とし ひろ 武 田 敏 宏
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3042 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 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	Serofendic acid, a novel substance extracted from fetal calf serum, protects against oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes (ウシ胎仔血清由来新規物質であるセロフェンド酸の活性酸素に対する心筋 細胞保護効果)
論文調査委員	(主 査) 教 授 米 田 正 始 教 授 野 間 昭 典 教 授 淀 井 淳 司

論 文 内 容 の 要 旨

背景

培養細胞の維持に繁用されるウシ胎仔血清が神経保護活性を示すことが見いだされている。さらに NO 神経毒性に対する作用を基準に活性成分が絞り込まれ、分子量382の新規疎水性化合物であるセロフェンド酸が抽出された。その後の培養ニューロンを用いた *in vitro* の実験系において、NO だけではなく、グルタミン酸や活性酸素 (H_2O_2) により誘発される細胞毒性に対しても保護効果を示したと報告されている。

心筋の虚血・再灌流傷害の細胞死において、ミトコンドリアが深く関与している。その中でも、mitochondrial permeability transition pore (MPTP) の開口が重要な役割を果たすと考えられている。MPTP の開口により、ミトコンドリア膜電位の消失、ミトコンドリアの膨潤、アポトーシスシグナルの放出といった細胞死を誘発する現象が起こるとされている。

目的

内在性神経保護活性物質であるセロフェンド酸が、心筋細胞の酸化ストレスによる傷害に対して保護効果を発揮するかどうか検討した。

方法

ラット新生児心筋培養細胞を用いて、 H_2O_2 が引き起こす心筋細胞死に対するセロフェンド酸の効果を、細胞死のマーカーやミトコンドリア機能を指標として検討した。心筋細胞をコントロール群、 H_2O_2 群、セロフェンド酸群の3つのグループに無作為に分けた。 H_2O_2 群は、 $100\mu\text{mol/l}$ の H_2O_2 を60分間投与、セロフェンド酸群は30分間の薬剤前処理後に H_2O_2 を60分間投与した。細胞死は TUNEL 染色と MTS 解析によって評価した。ミトコンドリア膜電位の消失は、細胞死の経路において重要な段階であり、ミトコンドリアマトリックスのカルシウム過負荷や細胞内活性酸素の上昇が誘因となるとされている。そこで、ミトコンドリア膜電位の消失を蛍光色素である TMRE を用いて、フローサイトメトリー及び共焦点レーザー顕微鏡による経時解析により評価した。また、ミトコンドリアマトリックスのカルシウム及び細胞内活性酸素をそれぞれに特異的な蛍光色素を用いて、共焦点レーザー顕微鏡による経時解析にて評価した。

結果

セロフェンド酸 ($100\mu\text{mol/l}$) 群では、細胞死のマーカーである TUNEL 陽性細胞を有意に抑制し、MTS 解析において生存細胞が有意差をもって増加していることがわかった。セロフェンド酸は H_2O_2 によるミトコンドリア膜電位の消失を容量依存的に抑制した。また、セロフェンド酸は H_2O_2 が引き起こすミトコンドリアマトリックスのカルシウム過負荷及び細胞内活性酸素の上昇を抑制した。セロフェンド酸の保護効果は、ミトコンドリア KATP チャンネル開口薬であるジアゾキシドと比較してほぼ同等の効果があり、ミトコンドリア KATP チャンネル阻害剤である 5-ヒドロキシデカノエート ($500\mu\text{mol/l}$) によりセロフェンド酸の保護効果が消失した。セロフェンド酸 ($100\mu\text{mol/l}$) とジアゾキシド ($100\mu\text{mol/l}$)

の同時投与では、相加的効果を示さなかった。以上の結果より、セロフェンド酸は、酸化物質が誘発するミトコンドリア死の経路を阻害した。また、その効果はミトコンドリア KATP チャンネルの活性化を介しているものと考えられた。

結論

この研究より、心筋細胞において、セロフェンド酸がミトコンドリア機能を保持することによって、酸化物質が引き起こす細胞死に対して保護効果をもつことが示唆された。今後、虚血・再灌流傷害による心筋障害に対して、心筋を保護する有用な新しい薬剤となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

培養細胞の維持に繁用されるウシ胎仔血清が神経保護活性を示すことが見いだされている。さらに NO の神経毒性に対する作用を基準に成分が絞り込まれ、分子量382の新規疎水性化合物であるセロフェンド酸が抽出された。セロフェンド酸のように乳類の胎仔に由来する化合物は医薬品としての安全性の高いことが期待されるとともに、細胞保護を作用機序とする新しい疾患治療薬として臨床応用が期待されている。

心筋の虚血・再灌流傷害の細胞死において、ミトコンドリアに存在する mitochondrial permeability transition pore (MPTP) の開口が重要な役割を果たす。MPTP の開口により、ミトコンドリア膜電位の消失、ミトコンドリアの膨潤、アポトーシスシグナルの放出といった細胞死を誘発する現象が起こる。

セロフェンド酸が、心筋細胞の酸化ストレスによる傷害に対して保護効果を発揮するかどうか検討した。方法として、ラット新生児心筋培養細胞を用い、酸化ストレス刺激として H_2O_2 を用いて細胞保護効果を検討した。セロフェンド酸投与群では、TUNEL 陽性細胞を抑制し、MTS 解析において生存細胞が増加していた。さらに、 H_2O_2 によるミトコンドリア膜電位の消失を容量依存的に抑制した。また、セロフェンド酸は H_2O_2 が引き起こすミトコンドリアマトリックスのカルシウム過負荷及び細胞内活性酸素の上昇を抑制した。

以上の結果より、心筋細胞において、セロフェンド酸がミトコンドリア機能を保持することによって、酸化物質が引き起こす細胞傷害に対して保護効果をもつことが示唆された。

以上の研究は、心筋虚血再灌流傷害の病態の解明に貢献し、心筋保護の新しい治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年12月26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。