京都大学	博士（医学）	氏　名	平海　良美
論文題目	Granulocyte colony-stimulating factor protects cardiac mitochondria in the early phase of cardiac injury. (G-CSF は心筋障害の早期において心臓ミトコンドリアを保護する。)		

（論文内容の要旨）

最近、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は様々な心不全の実験動物モデルで心保護作用があることが証明されており、心筋梗塞モデルにおいては著明な心機能と死亡率の改善を示した。実際の臨床試験では心筋障害をきたした患者に対する効果の評価は一定ではないが心筋障害早期に G-CSF を投与した研究では、障害から時間を経て投与された研究に比べて心機能に改善がみられたとされている。

一方でミトコンドリアは心筋のエネルギー供給の中心的役割を司るオルガネラである。心臓は一定の高いエネルギー供給を必要としており、心筋ミトコンドリアの電子伝達系を介する呼吸鎖で ATP が効果的に産生されないと心筋のポンプ機能は急速に低下する。この心筋ミトコンドリアに対する G-CSF の効果は証明されていない。

本研究の目的はin vivo, in vitroで用量依存性に心筋障害をきたす抗腫瘍薬のドキソルビシンを用いて心筋ミトコンドリア障害モデルを作成し、ミトコンドリア障害に対するG-CSFの効果を調べることである。

in vivo では 8 週の BL6 マウスに 5mg/Kg のドキソルビシンを 6 回、2 週間で投与した。ドキソルビシンを最後に投与した 24 時間後に G-CSF100μg/Kg を 5 日間連続で皮下注射した。対象のマウスには同量の生理食塩水を投与した。すべてのマウスは投薬前に心エコー検査を行った。G-CSF を投与した 4 週間後に心エコー検査、心臓カテーテル検査を施行し、その後 sacrifice した。in vitro では生後 1-3 日目の SD ラットより心筋細胞を分離して使用した。心筋細胞にドキソルビシン、G-CSF を加え 24 時間培養後に TUNEL 染色、フローサイトメトリー、Masson trichrome 染色、電子顕微鏡検査、ミトコンドリア酸素消費量の測定を行った。

マウスの心エコー所見では、すべてのグループにおいて対照群と比較して心収縮障害や左心室の拡大はみられなかった。しかし、心臓カテーテル検査ではドキソルビシン群で左室拡張末期圧の上昇と-dP/dt の上昇がみられ、心不全の早期の指標である拡張障害を示した。G-CSF の投与により、これらの障害は対照群と同等のレベルまで改善した。Masson trichrome 染色、TUNEL 染色でははすべての群においてコントロール群と差はなく、ドキソルビシンによる心筋線維化やアポトーシスは見られなかった。心筋組織の電子顕微鏡所見では、ドキソルビシン投与群でミトコンドリアの配列異常を認めたが、G-CSF の投与により改善していた。培養心筋細胞ではドキソルビシン 0.3uM で対照群と比較して TUNEL 陽性細胞数に差がなかったので、本実験に使用するドキソルビシンの濃度は0.3uMとした。in vitro の電子顕微鏡の所見では、ドキソルビシン投与群で心筋細胞はミトコンドリアの著明な拡大、腫脹等を示した。この変化は G-CSF の投与により改善した。ミトコンドリア膜電位はドキソルビシン投与群で有意に低下し、G-CSF 投与によって改善していた。心筋 ATP の産生に関与するミトコンドリア電子伝達系の酸素消費を酸素電極を使用して計測した。ドキソルビシンによる complex IV の活性低下は G-CSF によって劇的に改善していた。

今回の実験結果で、G-CSF を早期投与することによって心筋細胞の重要なオルガネラであるミトコンドリアへのダメージは防御され、心筋障害の発生を予防していると推察する。

（論文審査の結果の要旨）

心不全は、治療法が進歩しているにもかかわらず今なお罹患率、死亡率が高い。最近、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の心保護作用が心不全実験動物モデルで検討されているが、心筋のエネルギー供給を司るミトコンドリアに対する効果はよくわかっていない。申請者は心筋ミトコンドリア障害に対するG-CSFの効果を検討した。

In vivoでは8週のBL6マウスにドキソルビシン(Dox)5mg/Kgを6回2週間で投与し、24時間後にG-CSF100μg/Kgを5日間連続皮下注射した。In vitroでは新生児SDラットより心筋細胞を分離、Dox0.3uM、G-CSF100ng/mlを加え24時間培養した。

In vivoの心機能検査ではDox投与群で心収縮障害や左心室の拡大はなかったが左室拡張末期圧の上昇と−dP/dtの上昇がみられ、早期拡張障害を示した。組織検査でDoxによる繊維化やアポトーシスは見られず電子顕微鏡所見でミトコンドリアの形態異常を認めた。

これらの変化はG-CSFの投与で改善した。In vitroでDox投与群では、電子顕微鏡で心筋ミトコンドリアの著明な膨大を示した。ミトコンドリア膜電位、ミトコンドリア酸素消費の有意な低下がみられ、これらの変化はG-CSFによって改善していた。

G-CSFが心筋ミトコンドリア障害を改善し、早期心筋障害の発生を予防していると考えられ、今後臨床応用の拡大に寄与する。

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21年7月6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。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降