京都大学	博士（医学）	氏　名	加藤　雅史
論文題目	The targeting of cyclophilin D by RNAi as a novel cardioprotective therapy: evidences from two-photon imaging (RNAi を用いたサイクロフィリン D の抑制による新たな心筋保護治療：２光子励起顕微鏡を用いての観察)		

（論文内容の要旨）

＜背景＞ミトコンドリアは細胞死において非常に重要な役割を担っている。虚血/再灌流や酸化ストレス刺激時には、MPTP （mitochondrial permeability transition pore）が開口することにより、ミトコンドリア内膜電位（$\Delta\Psi_m$）が消失し、ミトコンドリア機能不全から細胞が死に至る。MPTP はいくつかの分子から構成される複合体であり、Cyclophilin D （CypD） はその構成蛋白の 1 つである。MPTP の開口制御において、CypD は最も重要な役割を担っていると考えられている。今回 RNAi 用いた CypD の抑制による心筋虚血/再灌流に対する効果を、2 光子励起共焦点レーザー顕微鏡（two-photon laser scanning microscopy; TPLSM）を用いてラット灌流心でリアルタイムに観察した。

＜方法、結果＞CypD を標的とした siRNA 発現アデノウイルス（CypD-siRNA）を作製した。単離した新生児ラット心筋細胞に CypD-siRNA を導入することにより、蛋白レベル、mRNA レベルで有意に CypD が抑制された。CypD-siRNA が導入された心筋細胞は酸化ストレス刺激に対して、$\Delta\Psi_m$ の低下を軽減し、さらには細胞死も有意に抑制した。次に心筋虚血/再灌流時の $\Delta\Psi_m$ の空間的、時間的変化をランゲンドルフ灌流心モデルで TPLSM を用いてリアルタイムに観察した。CypD-siRNA アデノウイルスをラット心筋内に直接注入し、2～3 日後に心臓を摘出しランゲンドルフ灌流を行った。$\Delta\Psi_m$ のマーカーである TMRE で染色した後、心筋灌流を停止し TPLSM で観察を行った。アデノウイルスには GFP 発現カセットが組み込まれており、ウイルスが導入された細胞とされなかった細胞は GFP の蛍光により識別できるようにした。心筋虚血、あるいは虚血/再灌流により、多くの細胞で $\Delta\Psi_m$ が消失する様子が観察されたが、CypD-siRNA が導入された細胞では有意に $\Delta\Psi_m$ が保持され、しかもその効果は siRNA 発現量に比例していた。

＜考察、結論＞TPLSM は従来の共焦点顕微鏡に比べ長波長のレーザーを用いるため、低侵襲で組織の深部まで観察することができる。これを用いることにより、従来は困難であった厚みのある生きた心臓をミトコンドリアレベルでリアルタイムに詳細に観察することが可能となった。CypD を抑制することにより、酸化ストレス刺激や、カルシウム過負荷、虚血/再灌流などによる細胞障害が軽減されるということは、ノックアウトマウスや薬剤を用いた実験系で近年報告されている。しかし、その保護効果は血行動態や逸脱酵素、梗塞サイズといったラフなエンドポイントで判定されているものがほとんどであり、リアルタイムでミトコンドリア機能を評価した報告は今回が初めてである。また、CypD 抑制薬として従来の実験系で多く用いられてきた薬剤であるサイクロスポリン A は、その効果が非特異的であり、さらにその免疫抑制作用から引き起こされる組織傷害のため、臨床においての実用化には問題が残されている。RNAi は標的分子を特異的に抑制する強力な手法として近年注目されており、実験系のツールとしてのみならず、臨床においての治療的介入手段としてもいくつかの分野で有用性が期待されている。今回の研究で RNAi を用いての、CypD を標的とした介入が心筋虚血/再灌流に対しての新たな治療手段として有効であることを明らかにした。TPLSM を用いた観察は、虚血/再灌流障害におけるミトコンドリア機能の詳細な評価に有用であった。

（論文審査の結果の要旨）

ミトコンドリアは細胞死において重要な役割を担っている。虚血/再灌流や酸化ストレス刺激時には、MPTP （mitochondrial permeability transition pore）が開口することにより、ミトコンドリア内膜電位（$\Delta\Psi_m$）が消失し、ミトコンドリア機能不全から細胞が死に至る。今回の研究では、MPTP の構成蛋白である Cyclophilin D （CypD） を RNAi にて抑制し、心筋虚血/再灌流に対する効果を、2 光子励起レーザー顕微鏡（two-photon laser scanning microscopy; TPLSM）を用いてラット灌流心で観察した。

CypD を標的とした siRNA 発現アデノウイルス（CypD-siRNA）が導入された培養心筋細胞では、酸化ストレス刺激に対して $\Delta\Psi_m$ の低下が軽減され、細胞死も抑制された。TPLSM を用いたランゲンドルフ灌流心の系では、心筋虚血/再灌流により、多くの細胞で $\Delta\Psi_m$ が消失したが、CypD-siRNA が導入された細胞では有意に $\Delta\Psi_m$ が保持され、その効果は siRNA 発現量に比例していた。

これらの結果から、CypD を標的とした RNAi が、心筋虚血/再灌流に対しての新たな治療手段として有効であることが明らかとなった。

以上の研究は、心筋虚血/再灌流によるミトコンドリア機能障害の機序解明に貢献し、新たな心筋保護治療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 22 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