
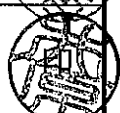






学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第535号	氏名	西尾 諭
審査委員会委員	主査氏名	宮本伸二 	
	副査氏名	井原健二 	
	副査氏名	新宮千尋 	
論文題目 Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart (糖尿病ラット心臓における CaMKII 活性化の活性酸素種産生について)			
論文掲載雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology			
論文要旨 【方法】新生仔ラットの心筋細胞を初代培養し、24、48、72 時間高グルコース培養液 (4500mg/L) に曝露した。酸化ストレスに対する脆弱性については H ₂ O ₂ (100μmol/L) で細胞障害を誘導しミトコンドリア膜電位を評価した。ROS の測定は心筋細胞を CM-H ₂ DCFDA で染色しフローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡で評価した。CaMKII の活性化は Western blotting を用いて検討した。Na ⁺ H ⁺ 交換機構 (NHE) 活性を定量するため BCECF-AM(2μmol/L)にて細胞内 pH をモニターし、酸性状態からの細胞内 pH 回復速度を計測した。糖尿病モデルラット実験ではストレプトゾトシン (STZ) (60mg/kg) をラットの尾静脈に注入し4週間後に実験を行った。ROS 評価のため心筋組織中の 8-OHdG 量を ELISA にて測定した。CaMKII、p47phox、p67phox の発現を Western blotting を用いて評価した。ミトコンドリアの形態変化について透過型電子顕微鏡を用いて検討した。 【結果・考察】高グルコース培養液に曝露された心筋細胞ではコントロール群に比べ ROS が有意に増加し、酸化ストレス刺激に対しより脆弱であった。高グルコースによる ROS 増加は Ca ²⁺ chelator である BAPTA を加えると著明に抑制された。また Na ⁺ -Ca ²⁺ 交換機構 (NCX) 阻害薬 KB-R7943 や CaMK II 阻害薬である AIP、NADHP oxidase 阻害薬の apocynin により中等度に抑制された。この結果より、高グルコースによる ROS 増加のメカニズムとして NCX、CaMKII、NADHP oxidase が関与することが示唆された。また、高グルコース曝露により細胞内 Ca ²⁺ 濃度の上昇を認め、BAPTA、KB-R7943 の前投与により細胞内 Ca ²⁺ 濃度の上昇は抑制された。つまり高グルコースに曝露された細胞内 Ca ²⁺ 濃度の上昇は NCX を介したものと考えられる。NHE 活性は正常グルコースに比べ高グルコースに曝露した細胞において有意に高く、NHE-1 蛋白の発現も高グルコースに曝露した細胞において有意に増加していた。これまでの培養細胞実験の結果を確認するため STZ 誘発糖尿病ラットを用いて実験を行った。ROS の指標である 8-OHdG では糖尿病ラットにて有意に増加し、CaMKII 阻害薬の KN-93 や apocynin により増加が抑制された。同様に CaMKII、p47phox、p67phox の発現も糖尿病ラットにて有意に増加し、KN-93 と apocynin により抑制された。さらに形態学的評価を行った結果、糖尿病ラットの心筋細胞ではミトコンドリアの膨化とクリステの破壊像を認め、この変化は KN-93 や apocynin により抑制された。 【結語】糖尿病の心臓では細胞内 Ca ²⁺ 代謝異常により CaMKII を活性化し、NADPH oxidase の増加を介して ROS を増加した。また ROS の増加はミトコンドリア機能障害を惹起し酸化ストレスに対する心筋の脆弱性を高めると考えられた。			
本研究は、糖尿病による心筋障害のメカニズムを明らかにし、今後の治療法につながる臨床上極めて有用な知見を呈している。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第535号	氏名	西尾 諭
審査委員会委員		主査氏名	宮本 伸二 
		副査氏名	井原 健二 
		副査氏名	新宮 千尋 
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 文献1,2の引用で Heart failure が DM の人多いとあるが、具体的にどのような心不全のことをいうのか。また文献2は diabetic cardiomyopathy というタイトルだがこれはどういった心筋症をいうのか。 2. 25mmol のグルコース溶液とは実際の血糖値としてどのくらいを想定したものか。 3. PH のレスポンスをみる実験で高血糖曝露した細胞のレスポンスが早いというが深くアシドーシスに傾いていた結果そう見えるのではないか。レスポンスの早さをいうのであれば1分間の変化ではなく、もっと短い30秒などで計算するとより違いが出たのではないか。 4. 酸化ストレスに対する細胞の脆弱性を評価した最初の Figure 1 の実験は、外から酸化ストレス(過酸化水素)を加えた場合に高血糖環境では細胞がアポトーシスを起こしやすいという結果であった。一方、以降の実験は高血糖環境の細胞内で ROS を生じる分子メカニズムを解析している。これらの研究のつながりがわかりにくいので説明してほしい。 5. 解析した細胞は心筋細胞を用いているが、糖尿病の場合、心筋障害よりも血管障害の方が一般的である。血管内皮細胞を用いた先行研究はあるのかどうか。 6. 動物実験も培養細胞実験も高血糖による細胞の急性毒性を評価しているように思われる。一方、イントロダクションで述べられた糖尿病の心筋障害は慢性的な高血糖による細胞障害を意味している。結果として、目的と研究方法の間に、少しフォーカスのずれを生じている印象があるが、それについてはどう考えるのか。 7. BAPTA や NAC など、ROS 産生抑制作用のある薬剤の投与量を決定する際に、滴定などの予備実験はどのようにして行ったか。 8. この論文では ROS の種類を特定せず、酸化ストレス全体としての抑制効果をみているが、ヒドロキシルラジカルやペルオキシナイトライトなど細胞毒性の強いラジカルは反映するが、イニシエーターであるスーパーオキシドは反映しない CM-H₂DCFDA による染色しか行っておらず、スーパーオキシドを反映する Dihydroethidium (DHE) などによる染色を行わなかったのは、何故か。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 西尾 諭

論 文 題 目

Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart(糖尿病ラット心臓における CaMKII 活性化の活性酸素種産生について)

要 旨

【緒言】糖尿病患者では冠動脈疾患や高血圧の合併とは独立して心不全の発症率が高く、糖尿病性心筋障害として知られている。その機序として活性酸素種(ROS)の増加が関与することが指摘されているが詳細は未だ解明されていない。本研究の目的は糖尿病の心臓における ROS 増加の機序を解明することである。これまでの報告より Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)の活性化が ROS 産生を増加させることや糖尿病の心筋細胞において細胞内 Ca^{2+} 代謝異常を生じることが知られている。そこで今回、高血糖による細胞内 Ca^{2+} 代謝異常によって誘発される CaMKII の活性化が ROS 増加の主要な機序であるかについて検討を行った。

【方法】新生仔ラットの心筋細胞を初代培養し、24、48、72 時間高グルコース培養液(4500mg/L)に曝露した。酸化ストレスに対する脆弱性については H_2O_2 (100 μ mol/L)で細胞障害を誘導しミトコンドリア膜電位を評価した。また、ROS の測定は心筋細胞を CM- H_2 DCFDA で染色し、フローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡で評価した。CaMKII の活性化は Western blotting を用いて検討した。 Na^+ - H^+ 交換機構(NHE)活性を定

量するため BCECF-AM(2 μ mol/L)にて細胞内 pH をモニターし、酸性状態からの細胞内 pH 回復速度を計測した。糖尿病モデルラットを用いた実験ではストレプトゾトシン(STZ)(60mg/kg)をラットの尾静脈に注入し4週間後に実験を行った。ROS 評価のため心筋組織中の 8-OHdG 量を ELISA にて測定した。CaMKII、p47phox、p67phox の発現を Western blotting を用いて評価した。ミトコンドリアの形態変化について透過型電子顕微鏡を用いて検討した。

【結果・考察】高グルコース培養液に曝露された心筋細胞ではコントロール群に比べ ROS が有意に増加し、酸化ストレス刺激に対しより脆弱であった。高グルコース曝露による ROS 増加は Ca²⁺ chelator である BAPTA を加えると著明に抑制された。また Na⁺-Ca²⁺交換機構(NCX)阻害薬 KB-R7943 や CaMKII 阻害薬である AIP、NADPH oxidase 阻害薬の apocynin により中等度に抑制された。この結果より、高グルコースによる ROS 増加のメカニズムとして NCX、CaMKII、NADPH oxidase が関与することが示唆された。また、高グルコース曝露により細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を認め、BAPTA、KB-R7943 の前投与により細胞内 Ca²⁺濃度の上昇は抑制された。つまり高グルコースに曝露された細胞内 Ca²⁺濃度の上昇は NCX を介したものと考えられる。NHE 活性は正常グルコースに比べ高グルコースに曝露した細胞において有意に高く、NHE-1 蛋白の発現も高グルコースに曝露した細胞において有意に増加していた。これまでの培養細胞実験の結果を確認するため STZ 誘発糖尿病ラットを用いて実験を行った。ROS の指標である 8-OHdG では糖尿病ラットにて有意に増加し、CaMKII 阻害薬の KN-93 や apocynin により増加が抑制された。同様に CaMKII、p47phox、p67phox の発現も糖尿病ラットにて有意に増加し、KN-93 と apocynin により抑制された。さらに形態学的評価を行った結果、糖尿病ラットの心筋細胞ではミトコンドリアの膨化とクリステの破壊像を認め、この変化は KN-93 や apocynin により抑制された。

【結語】糖尿病の心臓では細胞内 Ca²⁺代謝異常により CaMKII を活性化し、NADPH oxidase の増加を介して ROS を増加した。また ROS の増加はミトコンドリア機能障害を惹起し酸化ストレスに対する心筋の脆弱性を高めると考えられた。