

平成21年4月15日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2007～2008
課題番号：19890042
研究課題名（和文） 虚血・再灌流における細胞死の機序の解明
研究課題名（英文） Analysis of mechanism of cell death during ischemia-reperfusion
研究代表者
氏名（ローマ字）：矢島 大介 (YAJIMA DAISUKE)
所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・特任教員
研究者番号：60451754

研究成果の概要：

心臓や脳は、梗塞や梗塞後の血流の再開によって障害をうけるが、その機序に関しては解明されていないことが多い。今回、臓器の血流の停止・再開という現象を、細胞を使った虚血・再灌流という実験で擬似させて、細胞死の機序の解明を行った。その結果、細胞内の脂質が過酸化されると細胞死が起こることから脂質過酸化と細胞死が関連していることが示唆され、細胞死と脂質過酸化は虚血の間に発生することが明らかとなった。また数種の電子伝達系阻害剤を添加すると様々なパターンで脂質過酸化と細胞死を抑制し、電子伝達系が脂質過酸化と細胞死に密接に関連していることが示された。この結果は、科学雑誌に採用された。さらに、細胞中のどのような脂質が過酸化を受けているかを調べたが、容易に結果を得ることは困難であり、今後、検出方法など改良を加え検討を続けていく。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,230,000	0	1,230,000
2008年度	90,000	27,000	117,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,320,000	27,000	1,347,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：法医学、細胞死、脂質過酸化、虚血・再灌流

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞さらには梗塞後の再灌流によって、各臓器の細胞が障害をうける。この細胞障害を起こす原因の一つに活性酸素種による酸化ストレスの発生やそれによる脂質過酸化の関与が言われている。そして、その細胞障害の機序として、酸化ストレスを

引き起こす何らかの酸化性物質が細胞内で産生され、これらがミトコンドリアなどの膜脂質を酸化し、その機能を障害し、細胞死を引き起こすとされている。これらの活性酸素種の発生部位として、呼吸で取り入れた酸素を利用するミトコンドリア内の電子伝達系などがあるとされており、これが脂質の過酸

化を生じさせていると考えられている。また、電子伝達系酵素に含まれるチトクロム C と脂質過酸化との関連も報告されている。

細胞が虚血状態に曝露された時、どのような酸化性物質が発生しているのかに関しては多数の報告がなされているが、これら酸化性物質を直接測定・観察する手段はまだ少なくその本体は解明されていない。また、これらの酸化性物質がいつ発生しているのか、虚血時か再灌流時かも、多数の報告がなされているが、一定した見解はない。さらに、酸化されている脂質に関しても、どの部位のどの脂質がどの程度酸化を受けているかは、ほとんど未解明である。

そこで、我々は脂質に着目し、これらの組成や状態を分析することにより、細胞死の過程を解明しようと試みている。

細胞障害時にどのような現象が起こり、それが細胞死にどのように結びついて行くのかを解明することは、心筋梗塞・脳梗塞の分子レベルでの病態解明、さらには治療法の開発に貢献できるものと考えられる。また、ヒトの死がどのような過程で起こっていくのかの解明にも同時に関連し、生命科学の基盤的知識の確立にも役立つものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

①虚血・再灌流実験において脂質過酸化および細胞死がいつ発生するかを細胞を用いて調べること。

②抗酸化剤と電子伝達系阻害剤などの薬物の投与により、脂質過酸化および細胞死の状態がどう変化するかを観察し、それらの機序について考察すること。

③虚血・再灌流における各時期の過酸化脂肪酸の産生の状況を調べるために、種々の方法を用いて脂肪酸を分離し、定性・定量を行うこと、である。

3. 研究の方法

我々は現在までに、ウシ心臓ミトコンドリ

ア重分画を用いて、それらに含まれる脂質およびその過酸化物の分析を行い、これらが、抗酸化剤や電子伝達系阻害剤を適用することによりどのように変化するかについて検討してきた。今回は、これを培養細胞に応用し、マウス胚線維芽細胞 wild type mouse embryonic fibroblasts (MEFs) を用いて、これらを虚血・再灌流条件に曝露し、細胞の脂質過酸化の状態と細胞膜透過性変化の状態を分析し、抗酸化剤と電子伝達系阻害剤を適用したときの影響について調べることにし、細胞死の機序の解明を行った。

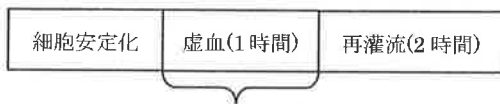
次に、虚血・再灌流条件に曝露した細胞から脂質を分離し、発生している過酸化脂質の定量を試みた。

①虚血・再灌流時の細胞死における過酸化脂質の発生と細胞膜透過性(細胞死)変化の分析

MEFs を本研究室で用いている虚血・再灌流装置を用いて虚血・再灌流状態に曝露し、脂質過酸化と細胞膜透過性の変化を蛍光試薬を用いて、顕微鏡下で経時的に観察した。

細胞を装置にセットした後、30～90 分間細胞を安定化させ、虚血条件の灌流液で 60 分、その後通常酸素状態条件の灌流液で 2 時間灌流した。この間、1 分間隔で顕微鏡下で蛍光を測定した。最後に digitonin で全ての細胞を死滅させ、全細胞数を数えた。対照実験は、通常酸素状態の灌流液で 4 時間灌流したものとした。虚血・再灌流の方法は以下の方法で行った。

通常の酸素状態のガス（酸素 20%、窒素 75%、二酸化炭素 5%）で平衡させた生理的緩衝液(pH7.4)で、細胞を灌流して安定させる。次に虚血ガス（酸素 0%、窒素 80%、二酸化炭素 20%）で平衡させた緩衝液(pH6.6)で 1 時間灌流を行い、さらにもとの通常酸素状態のガスで平衡させたものにもどし 2 時間反応させる（下図参照）。



電子伝達系阻害剤 KCN, antimycin A, rotenone
 抗酸化剤 N-acetylsistein

灌流液の組成は、120 mM NaCl, 18 mM NaHCO₃, 4 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.8 mM NaH₂PO₄, 1.4 mM CaCl₂, and 5.6 mM glucose とし、灌流速度は 0.5 mL/min とした。

脂質過酸化を検出する蛍光試薬として C11-BODIPY を 1μmol/L で、細胞膜透過性の変化を検出する蛍光試薬として Sytox Green を 0.1μmol/L で用いた。

②虚血時の抗酸化剤および電子伝達系阻害剤投与による脂質過酸化および細胞膜透過性変化への影響

虚血・再灌流実験において、虚血時の灌流液に抗酸化剤(N-acetylsistein)、電子伝達系阻害剤(KCN, antimycin A, rotenon)を添加した。薬物の最終濃度は以下のようにした。
 N-acetylsistein(抗酸化剤) 0.5mM
 KCN(複合体 IV 阻害) 100μM
 antimycin A(複合体 III 阻害) 10μM
 rotenone(複合体 I 阻害) 10μM

前述の実験と同様に各蛍光試薬を添加して、顕微鏡下に経時的に観察した。

③虚血・再灌流による細胞死において発生する過酸化脂質の分離および定性・定量

MEFs を用いての研究では、現在のところ蛍光色素を用いての分析であり、間接的に脂質酸化の状態や細胞膜透過性の状態を分析しているにすぎず、細胞死の機序の解明には過酸化脂質を直接に検出・定量することが必須であると考えている。

虚血・再灌流状態に暴露した MEFs から直

接脂質を抽出し分析を行った。多種類の脂質が含まれるが、特にミトコンドリアに多く含まれ、ミトコンドリア膜機能の主要な部分を担っていると考えられるカルジオリピン(CL)に注目し、CLおよび過酸化 CL の定性・定量を行った。

(脂質の抽出)

虚血・再灌流状態に暴露した細胞を集め Bligh-Dyer 法にて脂質を抽出後、薄層クロマトクロマトグラフィーで展開。0.001%プリムリン噴霧後、UV(253.7nm)照射下で中性脂肪、カルジオリピン CL、フォスファチジン酸 PA、フォスファチジルグリセロール PG、フォスファチジルエタノールアミン PE、フォスファチジルセリン PS+イノシトール PI、フォスファチジルコリン PC+スフィンゴミエリン SM を確認した。このうち CL 分画をクロロホルムに溶解し-20°Cで保存した。

(脂質の分析)

分離した CL 分画のクロロホルムを蒸発させ、70%HClO₄ を加え 2 時間灰化した。その後 2.5%モリブデン酸アンモニウム、10%アスコルビン酸を加え沸騰水浴中で 5 分加熱後、820nm の吸光度を測定した。

(過酸化脂質の分析)

分離した CL 分画のクロロホルムを蒸発させ、0.1mg/mL DPPPP を加え、遮光下で 60°C、60 分間反応させた。3 分間水中で冷却しメタノールを加え、352/380nm の蛍光を測定し、過酸化脂質を算出した。

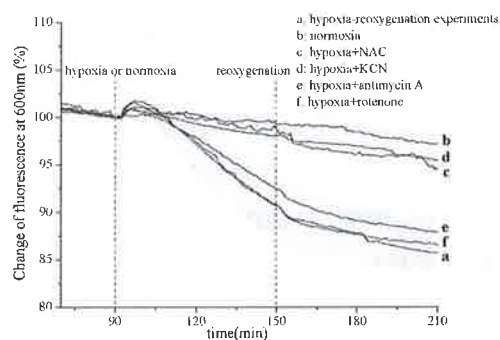
さらに、各条件に暴露した細胞を直接ホモジナイズし、CL 分画を抽出した後、リン酸緩衝液に溶解させ、ホスホリパーゼ A₂ を用い脂肪酸に分解し、分解後の試料から脂肪酸を抽出後エタノールに溶解して、HPLC を用いて CL を構成する脂肪酸の定性・定量を試みた

4. 研究成果

①虚血・再灌流条件下の脂質過酸化と抗酸化剤および電子伝達系阻害剤の影響

脂質過酸化を検出する蛍光試薬 C11-BODIPY は過酸化を受けると蛍光が減少する試薬であり、虚血条件下で蛍光の減少、すなわち脂質過酸化が認められ、再灌流で脂質過酸化は停止した。さらにこの脂質過酸化は抗酸化剤の *n*-アセチルシステイン(NAC)と KCN で抑制された(図 1)。このことから脂質過酸化は虚血状態で開始され、虚血条件下で酸化ストレスが発生し、過酸化脂質が形成されることが示唆された。また、電子伝達系が酸化ストレス発生に関与していることが示唆された。

(図 1)

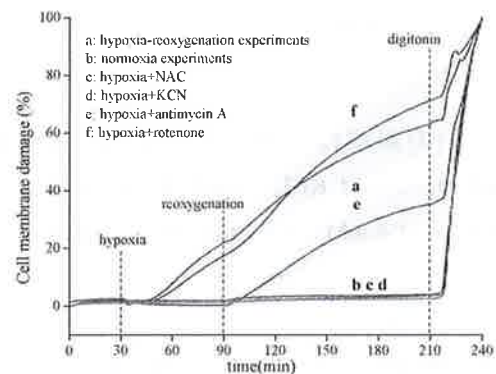


②虚血・再灌流条件下の細胞死と抗酸化剤および電子伝達系阻害剤の影響

Sytox Green は細胞膜透過性亢進により細胞内に侵入し核を染める。細胞膜透過性の亢進は細胞死の1つの指標である。虚血条件の開始とともに細胞死が始まり、再灌流をしても細胞死は増加し続け、これは NAC と KCN で抑制され、ロテノンで抑制されなかった。アンチマイシン A は虚血時では細胞死を抑制したが、再灌流時では細胞死を発生させた(図 2)。このことから、細胞死が酸化ストレス発生と関連していること、電子伝達系とも関連し、電子伝達系の阻害部位により細胞死を誘発する状況が異なることが示唆された。さらに、脂質過酸化と細胞死はほぼ一致して認められたことより、脂質過酸化は細胞死と関連していること、脂質過酸化は再灌流では停止するが、細胞死は停止しないことより脂質過

酸化は細胞死のトリガーとなっている可能性があることが示唆された。

(図 2)



③CL および過酸化 CL の分離・定量

虚血・再灌流に暴露した MEFs から、CL を分離し、定量を行ったところ、直径 2.5 cm のカバーガラス上に培養した MEFs4 枚について 2.6~0.079nmol の CL を得た。また、残余の CL を過酸化脂質検出蛍光試薬 DDDP を用いて分析したところ、一部の試料では虚血に暴露したもので過酸化脂質量の増加を認めたが、結果にばらつきが多く統計的に有意な差は認められなかった。HPLC を用いた CL を構成する脂肪酸の定性・定量では、ピークの不分離および流出時間の不安定などがあり、良好な結果を得ることはできなかった。今回の DDDP を用いた検出法での測定値ばらつきの原因は明らかにはできなかった。今後は検出法の改良を試みていく。また、HPLC での検出では、脂質抽出・分離法及び移動層・カラム条件が不相当である可能性が高いため、今後はこれらの検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Daisuke Yajima, Hisako Motani, Mutsumi Hayakawa, Yayoi Sato, Kaoru Sato, Hirotarō

Iwase. The relationship between cell membrane damage and lipid peroxidation under the condition of hypoxia-reoxygenation: Analysis of the mechanism using antioxidants and electron transport inhibitors. Cell Biochemistry & Function (掲載は決定しているが巻は未定)
査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 矢島 大介、岩瀬 博太郎、虚血・再灌流における細胞死の機序の解明、第91次 日本法医学会総会、2007年5月18日(秋田)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢島 大介 (YAJIMA DAISUKE)
千葉大学・大学院医学研究院・特任教員
研究者番号：60451754

(2) 研究協力者

幸村 知子 (KOUMURA TOMOKO)
北里大学・薬学部 衛生化学・助教
研究者番号：30337985

