

|         |  |
|---------|--|
| 氏名(本籍)  | いちむらひでお<br>市村秀夫(茨城県)   |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |
| 学位記番号   | 博乙第1964号   |
| 学位授与年月日 | 平成15年10月31日  |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当   |
| 審査研究科   | 人間総合科学研究科  |
| 学位論文題目  | <b>Mechano-oxidative coupling by mitochondria induces proinflammatory responses in lung venular capillaries.</b><br>(ミトコンドリアによる機械的刺激と酸化反応のカップリングは肺細静脈性毛細血管における前炎症性反応を惹起する) |
| 主査      | 筑波大学教授 医学博士 吉川裕之   |
| 副査      | 筑波大学教授 医学博士 関澤清久   |
| 副査      | 筑波大学教授 医学博士 宮内卓  |
| 副査      | 筑波大学講師 博士(医学) 谷中清之   |

## 論文の内容の要旨

### (目的)

成人呼吸促進症候群に代表される肺の急性炎症性疾患はいまだ治療困難な疾患であり、その病態メカニズムの解明はあらたな治療法確立への期待が持たれる。「炎症」を白血球の集積とすれば、内皮細胞における白血球集積を導きうる接着分子の制御シグナルは、「前炎症性」シグナルと定義できる。内皮細胞由来の白血球接着分子である P-selectin は、Weibel-Palade 小体と呼ばれる分泌小胞内に蓄えられ、開口分泌(exocytosis)によって内皮細胞表面に発現することが知られている。先に、我々は圧負荷が肺内皮細胞において、P-selectin の発現レベルを細胞質内カルシウム ( $Ca^{2+}_{\text{cyt}}$ ) 依存性に増加させることを報告した。

カルシウムは広汎な細胞機能を制御しているが、最近そのシグナル機構あるいはその恒常性維持機構にミトコンドリアが深く関わっていることが知られてきた。そこで、圧負荷モデルで観察された肺内皮細胞の  $Ca^{2+}_{\text{cyt}}$  依存性 P-selectin 発現増加を制御するシグナルにミトコンドリアが関与している可能性を考えた。さらにミトコンドリアはカルシウムシグナルを修飾するだけでなく、reactive oxygen species (ROS) 産生の主要な細胞内起源の1つであり、ミトコンドリア内カルシウム ( $Ca^{2+}_{\text{mit}}$ ) 依存性に産生が増加するとの報告もある。

我々は、ミトコンドリアが「前炎症性」シグナルに関連しているという仮説をたて、その可能性について研究・検討した。すなわち、「前炎症性」反応といえる P-selectin 発現増加を誘導する圧負荷モデルを用いて、 $Ca^{2+}_{\text{mit}}$  や ROS 産生レベルの変化を観察し、もし圧負荷に対する反応が得られたならば、さらに薬理的抑制実験で P-selectin 発現への関与やシグナル伝達の機序についてもより明確にしていくことを目的とした。

### (対象と方法)

肺内皮細胞における細胞質内カルシウム ( $Ca^{2+}_{\text{cyt}}$ )、ミトコンドリア内カルシウム ( $Ca^{2+}_{\text{mit}}$ )、reactive oxygen species (ROS) の産生、細胞表面の P-selectin 発現レベルを、ラット還流肺と蛍光顕微鏡を用い

て in vivo に観察した。Ca<sup>2+</sup><sub>cyt</sub>, Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub>, と ROS はそれぞれ fura2, rhod2 と DCF の蛍光によって、また P-selectin 発現レベルはモノクローナル抗体による免疫蛍光を用いて測定した。内皮細胞への圧負荷は、還流回路中の血液リザーバーの高さを上げることにより与えた。

#### (結果)

ラット還流肺において、capillary の圧負荷 (5 から 15cmH<sub>2</sub>O へ 10 分間上昇) は肺内皮細胞の Ca<sup>2+</sup><sub>cyt</sub> と Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub> を上昇させた。Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub> の反応は、小胞体からのカルシウム放出を抑制する xestospongine C と thapsigargin, ミトコンドリアの抑制剤である ruthenium red と FCCP によって抑制された。一方 Ca<sup>2+</sup><sub>cyt</sub> の反応においては、小胞体カルシウムを抑制する xestospongine C と thapsigargin によってのみ抑制され、ruthenium red と FCCP は効果がなかった。これらの結果から、圧負荷による Ca<sup>2+</sup><sub>cyt</sub> の反応が Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub> の反応を制御していることが示唆された。

同様に圧負荷は肺内皮細胞での ROS の産生を増加させた。この ROS 産生は、ミトコンドリアに対する抑制剤 (rotenone と FCCP) によって抑制されたが、その他の主要な ROS の起源酵素である NADPH 酸化酵素やキサンチン酸化酵素の抑制剤 (それぞれ DPI と アロプリノール) によっては抑制されなかった。加えて、Ca<sup>2+</sup> の抑制剤は、この反応を抑制しえたが、抗酸化剤 (ebselen) は Ca<sup>2+</sup><sub>cyt</sub> と Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub> の反応には効果が認められなかった。以上の結果は、圧負荷による内皮細胞の ROS の産生がミトコンドリア由来で、かつ Ca<sup>2+</sup> 依存性であることを示唆した。

圧負荷による P-selectin の発現レベル増加は、同様にミトコンドリアの抑制剤 (rotenone と FCCP), 抗酸化剤 (NAC と ebselen) によって抑制された。このことから、P-selectin の分泌制御にミトコンドリア由来の ROS が関与していることが示唆された。

また、細胞膜透過性 catalase によって反応は抑制された。

また、2 時間の圧負荷が肺での P-selectin mRNA レベルを増加させなかったことから、我々が観察した P-selectin の発現レベル増加は、遺伝子の転写誘導を介さず、既に産生貯蔵されていた P-selectin の開口分泌によると考えられた。

#### (考察)

今回我々は、圧負荷による肺内皮細胞の接着分子 P-selectin の開口分泌が Ca<sup>2+</sup> 依存性であるミトコンドリア由来の ROS によって制御されていることを示した。また、ROS の反応が catalase に感受性を示したことは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が主な責任分子であることを示している。

ミトコンドリアの抑制剤が Ca<sup>2+</sup><sub>cyt</sub> の反応に効果がなく、抗酸化剤が Ca<sup>2+</sup> の反応を抑制しなかったことは、Ca<sup>2+</sup><sub>cyt</sub> → Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub> → ROS と反応が段階的に伝達されたことを支持している。

また我々のデータは、ミトコンドリアにおける ROS 産生が Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub> 依存性であることを示した。ミトコンドリア内酵素のいくつかは、Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub> 依存性にその activity が制御されていることが報告されているが、ROS 産生の具体的な責任分子は不明のままであり、今後の検討が必要である。

加えて、機械的刺激である圧負荷によって誘導された一連の反応が、圧負荷に特異的なものか、あるいはその他の炎症性刺激に対しても同様に誘導されうるかについても更に検討を要する。

#### (結論)

肺内皮細胞において、圧負荷によって誘導される P-selectin 発現増加は、細胞質内 Ca<sup>2+</sup> → ミトコンドリア内 Ca<sup>2+</sup> → ミトコンドリアにおける ROS 産生というシグナル機構によって制御される。すなわち、ミトコンドリアは「前炎症性」シグナルに重要な役割を果たしている。

## 審査の結果の要旨

肺静脈性毛細管圧の上昇がその内皮細胞表面において白血球接着性受容体 P-selectin を発現させる、すなわち、内皮細胞は圧負荷に応じて前炎症性反応を生じることが知られている。しかし、そのメカニズムは解明されていなかった。本研究では、ラット還流肺の圧負荷モデルを用い、肺毛細血管を real time かつ in situ に蛍光顕微鏡で観察することにより、内皮細胞におけるシグナル伝達の機序を解明することを計画した。薬理的抑制実験を利用し、ミトコンドリア内の  $\text{Ca}^{2+}$ 、ROS および細胞表面の P-selectin のレベルの変化を観察、定量することにより、肺内皮細胞において、圧負荷によって誘導される P-selectin 発現増加は、細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  →ミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  →ミトコンドリアにおける ROS 産生というシグナル機構によって制御されるという結論を導いている。ミトコンドリアが「前炎症性」シグナルに重要な役割を果たしていることを解明した点が注目される。

考察、結論は全て本研究の結果から導き出されており、これまで未知のメカニズムを論理的に計画された十分な実験により解明している。独創性においても高く評価される論文である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。