

学位授与番号：甲 972 号

氏 名：加藤 大介

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 26 年 6 月 25 日

学位論文名：

新生児ラット培養心筋細胞における副腎皮質ステロイドの細胞内ナトリウムイオン濃度に及ぼす影響に関する検討

主論文名：

Corticosteroids increase intracellular free sodium ion concentration via glucocorticoid receptor pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes.

(新生児ラット培養心筋細胞において副腎皮質ステロイドはグルココルチコイド受容体を介して細胞内ナトリウムイオン濃度を上昇させる)

学位審査委員長：教授 横尾隆

学位審査委員：教授 南沢享 教授 宇都宮一典

論文要旨

(2部提出)

論文提出者名	加藤 大介	指導教授名 吉村 道博
<p data-bbox="236 443 481 481">主論文題名</p> <p data-bbox="225 495 1410 577">Corticosteroids increase intracellular free sodium ion concentration via glucocorticoid receptor pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes</p> <p data-bbox="225 633 1410 716">(新生仔ラット培養心筋細胞において副腎皮質ステロイドはグルココルチコイド受容体を介して細胞内ナトリウムイオン濃度を上昇させる)</p> <p data-bbox="256 779 887 817">IJC Heart & Vessels 3巻 49～56頁, 2014年</p> <p data-bbox="225 875 1410 1243">背景: 細胞膜を隔てた細胞内外の Na^+ の濃度勾配は細胞内の他のイオン濃度や代謝物の主要な調節因子である。心臓においては、虚血、心不全、心肥大などの病的状態において、細胞内ナトリウムイオン濃度 ($[\text{Na}^+]_i$) は上昇することが知られている。これら病的状態と $[\text{Na}^+]_i$ 上昇の因果関係や、$[\text{Na}^+]_i$ が上昇する分子的機序については未解明な点が多いものの、$[\text{Na}^+]_i$ 上昇が心筋細胞にとって好ましくない影響を及ぼすことが報告されている。近年、副腎皮質ステロイドホルモンの心血管系に及ぼす作用が注目されている。本研究では、コルチコステロン、アルドステロン、および合成グルココルチコイドのデキサメサゾンが心筋細胞の $[\text{Na}^+]_i$ に及ぼす作用について定量的に検討した。</p> <p data-bbox="225 1305 1410 1720">方法と結果: 我々はマイクロプレートリーダーを用いて接着培養細胞の $[\text{Na}^+]_i$ を効率的に測定する実験手法を確立した。この手法を用いて、新生仔ラット培養心筋細胞において 24 時間の副腎皮質ステロイドホルモン添加が $[\text{Na}^+]_i$ に及ぼす作用を定量的に測定した。生理的濃度のグルココルチコイドは $[\text{Na}^+]_i$ を濃度依存的に上昇させた。ブロッカーを用いた検討により、これは GR を介した作用であることを確認した。一方、グルココルチコイドは GR を介して肥大関連遺伝子の発現を亢進させ、形態学的にも細胞肥大を誘導することを確認した。細胞内への Na^+ 流入に関与する主なイオントランスポーターについて、遺伝子および蛋白レベルでの発現を検討した結果、デキサメサゾンにより mRNA および蛋白レベルで NCX1 の発現が亢進することを確認した。</p> <p data-bbox="225 1783 1410 1865">結論: 生理的濃度のグルココルチコイドは GR を介して $[\text{Na}^+]_i$ を上昇させた。この反応には NCX1 の発現亢進が関与している可能性が示唆された。</p>		

論文審査の結果の要旨

加藤大介氏の学位申請論文は、Corticosteroids increase intracellular free sodium ion concentration via glucocorticoid receptor pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes (新生児ラット培養心筋細胞において副腎皮質ステロイドはグルココルチコイド受容体を介して細胞内ナトリウムイオン濃度を上昇させる)と題する、2014年 IJC Heart & Vessels に掲載された、内科学講座循環器内科 吉村道博教授指導による研究である。以下に論文内容の要旨と審査委員会の結果を報告する。

細胞内ナトリウムイオン $[Na^+]_i$ は心筋細胞において虚血、心不全、心肥大等の病的状況下で上昇することが報告されているが、その分子的機序については未解明な点が多い。一方ナトリウムイオンの再吸収を調節する副腎皮質ホルモンが近年心血管系イベントのリスクホルモンとして認知されるようになった。しかし副腎皮質ホルモンと $[Na^+]_i$ の関係は明らかでなかった。その背景には、従来 $[Na^+]_i$ の測定はナトリウムイオンに対する蛍光プローブを細胞内に導入し、蛍光顕微鏡で蛍光強度を測定していたが、定量的な測定が難しかったことがある。そこで加藤氏はまず、 $[Na^+]_i$ を定量的に測定する為に、同法を改変し、フィルター式マイクロプレートリーダーを用いて 96well マイクロプレート上に培養した心筋細胞の $[Na^+]_i$ を測定する系を開発した。そしてこれを用いて、副腎皮質ホルモンであるコルチコステロン、アルドステロン、および合成グルココルチコイドのデキサメサゾンが長期的に心筋細胞の $[Na^+]_i$ および細胞肥大に及ぼす作用について定量的評価を行った。その結果、新生児ラット培養心筋細胞において副腎皮質ステロイドホルモンはグルココルチコイド受容体(GR)を介して $[Na^+]_i$ の上昇と心筋肥大をもたらし、そのメカニズムの一部にナトリウムトランスポーターの NCX1 が関与している可能性があることを明らかとした。

本論文に対し、平成 26 年 6 月 9 日、宇都宮一典教授、南沢享教授ご臨席のもと公開学位論文審査会を開催した。

席上、1) $[Na^+]_i$ の測定系の開発については自己の論文を引用しているだけであるが、この部分は学位申請内容としては非常に重要な部分であるため、学位論文には測定系開発の論文もあわせて方がよいのではないか、2) $[Na^+]_i$ の上昇に伴って $[Ca^+]_i$ の変化はどのように変化したか、3) 細胞外ナトリウム濃度をふって実験をやったのか、4) 時間経過によって $[Na^+]_i$ の推移を調べたのか、5) 肥大心筋を定量的に測定したのか、6) 提示した結果からアルドステロンの作用は MR ではなく GR を介していると言い切れるのか、7) トランスポーターの作用は mRNA や蛋白発現で評価するのではなくリン酸化でみるべきではないのか、またその場合もっと早い時間で測定すべきでないのか、8) 新生児心筋細胞でなく、成獣の心筋細胞でも同様の反応があると考えられるのか、などの質問、指摘があった。また学位論文の図説には N 数が抜けている等の不備が指摘された。このためこれらをふまえて学位論文に加筆することが指示された。これに対し加藤氏は適切に論文を訂正したため、慎重審議の結果、学位論文として価値があるものと判断された。