

氏 名 浦 本 裕 美

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第729号

学位授与の日付 平成15年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 A Role of CFTR Cl⁻ Channel in the
Protection from Ischemic Injury in
Neonatal Rat Ventricular Myocytes

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	井本 敬二
	教授	岡田 泰伸
	教授	岡村 康司
	教授	堀江 稔 (滋賀医科大学)

The physiological or pathophysiological function of cardiac CFTR (cCFTR) is not well known. In this study, we examined whether CFTR is expressed and functioning as a Cl⁻ channel in ischemic cardiomyocytes and whether cCFTR plays a role in protection from ischemic injury in neonatal rat ventricular cardiomyocytes in primary culture. After the cells were subjected to ischemia, time-dependent changes in CFTR expression were examined in the membrane fraction by western blot. A peak expression of mature CFTR protein was found at 3 h after ischemia (O₂ and glucose deprivation), and thereafter the signal disappeared gradually. Relative optical densities of these bands at 3 h and 8 h after ischemia were 166% (P<0.01) and 44% (P<0.01) of the control (0 h), respectively. In contrast, the results of RT-PCR indicated a same expression of CFTR mRNA between 0 h and 4 h after ischemia. Immunohistochemical examination showed that the expression of CFTR proteins on the plasma membrane was most prominent at 3 h after ischemia. However, the plasmalemmal CFTR signal was markedly reduced at 8 h after ischemia. The time-dependent downregulation was partially prevented by co-application of activators for PKA and PKC. Whole-cell recordings showed that cultured neonatal cardiomyocytes responded to cAMP with activation of time-independent, I-V linear currents which contained an anion-selective component sensitive to a CFTR Cl⁻ channel blocker but not to a stilbene-derivative conventional Cl⁻ channel blocker. This cAMP-activated Cl⁻ channel current was found to be enhanced by 3 to 4 h application of ischemic stress. Only blockers effective for the CFTR channel, among various Cl⁻ channel blockers tested, aggravated cell injury observed 4 days after 8-h ischemic treatment. In contrast, activation of CFTR by co-application of PKA and PKC activators was found to enhance cell viability after ischemic stress. The ameliorating effect of PKA and PKC activators was completely abolished by CFTR channel blockers, when applied simultaneously. Neither a CFTR inhibitor nor CFTR activators affected ischemic injury, when applied prior to or after, but not during, ischemic treatment. Rhythmic contractility of cultured monolayer cardiomyocytes was impaired during ischemic insult. Four days after reoxygenation contractility recovered partially. The post-ischemic recovery of contractility became perfect by CFTR activators applied during ischemic treatment, whereas this was abolished by a CFTR channel blocker. Taken together, it is concluded that expression of CFTR Cl⁻ channel on plasma membrane is transiently enhanced under glucose-free hypoxic conditions, and also that activation of CFTR Cl⁻ channels under ischemic conditions may play a crucial role in protection against injury in cardiomyocytes subjected to ischemic stress.

論文の審査結果の要旨

嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis) の原因遺伝子の産物である CFTR (CF trans-membrane regulator) は多くのクロライド分泌上皮に発現するサイクリック AMP 依存性クロライドチャンネルである。この CFTR のイソフォームが心筋にも発現していることが知られているが、その生理学的・病態生理学的な役割の詳細は不明であった。本研究で申請者の浦本裕美氏は、虚血条件下における心筋 CFTR の分子的・機能的発現変化と虚血性心筋細胞傷害における CFTR チャンネルの役割について初めて検討した。

申請者は、新生仔ラットの心室より得た心筋細胞を 4 日間初代培養し、酸素除去・グルコース除去による虚血負荷を与え、CFTR 遺伝子発現、CFTR タンパク質の発現、CFTR チャンネル活性、細胞収縮性、細胞生存率に対する影響を、それぞれ RT-PCR 法、western blot 及び蛍光抗体法、パッチクランプ全細胞記録法、顕微ビデオスコープ法、MTT アッセイ法を用いて調べた。その結果、虚血負荷 4 時間までは CFTR mRNA に目立った変化は認められないが、虚血 3 時間目をピークとする CFTR 蛋白の形質膜への発現の有意な亢進が認められることを明らかにした。またサイクリック AMP によって活性化される CFTR クロライドチャンネル電流も、虚血後 3-4 時間で亢進されることを明らかにした。CFTR 蛋白の形質膜への発現は 8 時間の虚血負荷によってはむしろ減弱化するが、CFTR を活性化させるジブチリルサイクリック AMP (dbcAMP) と蛋白キナーゼ C の刺激薬 PMA を虚血中に投与することにより、この減弱化は有意に阻止されることを示した。8 時間の虚血後に心筋細胞を正常の条件で 4 日間培養し、細胞の生存率を調べたところ、約半数の細胞のみが生存していたが、この生存率は dbcAMP と PMA の虚血中投与によって著しく改善し、この改善効果は CFTR チャンネルブロッカーの共添加によって完全に消失することを明らかにした。

本論文は、心筋細胞は *in vitro* 条件における短時間のグルコース除去・低酸素(虚血)負荷に対して形質膜における CFTR クロライドチャンネルの発現亢進で応答すること、そしてこの CFTR チャンネル活性が虚血性心筋細胞傷害に対して防御的役割を果たしている可能性のあること、の 2 点を初めて明らかにしたもので、この研究分野に優れた貢献をしたものと認められる。従って、申請者による本論文は学位論文として十分ふさわしいものであると審査委員会は判定した。

学位論文として提出された研究結果について説明した後、審査委員が研究の内容および周辺の知識について試問を行った。その結果、研究内容の把握、位置付け、結果の考察、基礎知識ともに、博士号を授与するに足るレベルにあると判断された。また、本論文は平易な英語で書かれており、また論文の前半にあたる部分は英文学術誌に近く掲載される予定であることから、申請者の語学能力は十分であると判断された。以上、総合的に判断し学位を取得するに足る水準に達しているものと判断した。