



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Apoptosis, rather than oncosis, predominantly affects spontaneous death of isolated adult rat cardiac myocytes in culture

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 加藤, 悟司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14960

氏名 (本籍)	加藤 悟司 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1312 号
学位授与日付	平成 14 年 7 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Apoptosis, rather than oncosis, predominantly affects spontaneous death of isolated adult rat cardiac myocytes in culture
審査委員	(主査) 教授 藤原 久義 (副査) 教授 広瀬 一 教授 國貞 隆弘

論文内容の要旨

アポトーシスは、核のクロマチンの凝縮、核や細胞質の断片化で特徴付けられ、プログラム細胞死とも呼ばれる。一方、細胞の膨潤、細胞膜の崩壊を伴う病理的な細胞死のネクローシスと区別される。培養成獣ラット分離心筋細胞においても、誘導因子の暴露によってアポトーシスが発現することを証明してきた。しかし、経験的にいかなる培養成獣ラット分離心筋細胞においても時間とともにその全てが細胞死を迎えることも事実である。果たしてそれらは全てネクローシスであるのか。もしアポトーシスが混在するのであれば、その比率はいかなるものであるのか。今後も培養成獣ラット分離心筋細胞を用いて細胞死 (アポトーシス&ネクローシス) を評価する上で、ベースラインを知る必要がある。

われわれは、酵素法で成獣ラット心筋細胞を分離し、7日間血清無し状態で培養し、その間の細胞死を評価した。第1, 2, 3, 5, 7日目のそれぞれで、浮遊細胞と培養細胞を取り出した。トリパンブルー染色によって type 1 は rod (桿状) で細胞膜傷害のないもの、type 2 は non-rod (非桿状) で細胞膜に障害のないもの、type 3 は非桿状で細胞膜が傷害されているもの。7日間の培養で、桿状細胞は17%にまで減少していた。

また電子顕微鏡で以下のことを確認した。Type 1 は生存、type 2 は生存またはアポトーシス、type 3 はオンコシスまたはアポトーシス後のネクローシスとした。オンコシスによる細胞死は培養初期に集中するが、アポトーシスは培養中に継続して見られる。

方法

- (1) 成獣ラット分離心筋細胞をMEM/F-12培養液で0, 1, 2, 3, 5, 7日間培養した。35 mmのdishで、光学顕微鏡でその形態と細胞膜を評価した。また、TUNEL染色し電子顕微鏡で観察した。100 mm dishでDNAを抽出した。それぞれにつき、3回調べた。なお、dishより脱落した浮遊細胞についても、その数と形態を検討した。
- (2) dish上に置いた1 mm gridを用いて、光学顕微鏡でdish上の細胞数と定量した。浮遊細胞は、血球計算盤を用いた。これらの細胞を位相差顕微鏡により2群に分けた。長径/短径比が、3以上のものをrod cell, 3以下のものをnon-rod cellとした。細胞膜の質的な評価をするために、0.1% trypan blue染色した。浮遊細胞においても同様に検討した。
- (3) それぞれの群の細胞200個を電子顕微鏡を用いて、細胞膜が温存されているか、核が分断されているかによってliving, apoptosis, oncosisにクラス分けした。
- (4) apoptosis検出目的で、それぞれの群にTUNEL染色を施行した。

結果

- (1) 35mm-dishの 55×10^4 cellsが、 $55 \pm 27 \times 10^3$ cellsがdish内に生着した。この内の86%がrod-shapeで、98%が

トリパンブルーで染色されなかった（すなわち細胞膜に障害がなかった）。培養第一日で32%の細胞減少が観察された。第7日目では、 $8.3 \pm 2.1 \times 10^3$ cellsとなり88%の減少となった。

- (2) 死細胞の判断に染色法だけではapoptotic cell death過程があるため評価として不十分であると考えられる。このため、細胞を3種類に分類した。type 1は、rod cellで細胞膜が保持されているもの。type 2はnon-rod cellで細胞膜が保持されているもの。type 3は、non-rod cellで細胞膜が崩れているもの。type 1は、経過とともに減少した。type 2は、常に一定の割合で存在した。type 3は、経過とともに増加した。
- (3) 電子顕微鏡で細胞死をliving, apoptosis, oncosisに区別した。光学顕微鏡でtype 1としたcellは、livingであった。type 2は、livingとapoptosisであった。type 3はoncosisと二次性のapoptosisであった。
- (4) day 0では認められなかったが、それ以降においては経過とともにTUNEL染色陽性細胞が増加した。また電気泳動法でもDNAのladderが2日目以降で認められた。

考察および結論

本研究は、成獣ラット分離心筋細胞を用いた研究において、細胞の質を見極める必要があることを明らかにした。cardiomyocytesは、分離したときから細胞死が始まっている。急性期には、oncosisであり、少し遅れてかつ持続的にapoptosisによる細胞死が表現される。

論文審査の結果の要旨

申請者 加藤悟司は、成獣ラット心筋細胞が分離したことで培養の経過中一定の割合でapoptosis誘導されることを明らかにした。

これらの新知見は、細胞生物学ならびに心臓病学の発展に寄与すると認める。

[主論文公表誌]

Apoptosis, rather than oncosis, predominantly affects spontaneous death of isolated adult rat cardiac myocytes in culture

Japanese Circulation Journal 2001 ; 65 : 743~748