

IB-21

ラット角膜内皮細胞の創傷治癒過程におけるギャップ結合蛋白質の発現変化と細胞増殖、ポンプ機能

中野 由起子、小山田 正人、戴 平、高松 哲郎
京都府立医科大学大学院医学研究科 細胞分子機能病理学

【目的】角膜内皮細胞は、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 等によるポンプ機能と、タイト結合によるバリア機能を有し、角膜の透明性を維持している。しかし、手術侵襲などで細胞数が減少した場合、角膜内皮細胞は増殖能が低いため、創傷治癒過程が進行しにくい。そのため細胞数のロスが多い場合、角膜浮腫が発生し不可逆的な視力低下を招く。このように、角膜内皮の創傷治癒過程は、視力回復に密接に関連しており、そのメカニズムを理解することは重要である。

ギャップ結合は細胞間コミュニケーションを担っており、細胞の遊走、増殖、分化の過程に関与している。われわれは、角膜内皮細胞の創傷治癒過程で、ギャップ結合蛋白質 connexin (Cx)の発現が変化し、その変化が創傷治癒過程に影響を及ぼすという仮説を立てた。今回、創傷治癒過程における角膜内皮細胞の増殖とポンプ機能の変化を、Cxの発現変化と比較し、それらの関係を検討した。

【方法】ラット角膜輪部より前房内へ30G針を刺入し、角膜内皮に擦過創を作成、一定期間の後(3時間後から21日後)、眼球を摘出した。角膜内皮細胞でのCx43の発現、Ki-67陽性細胞の出現、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaseの発現を、免疫組織化学を用いて検討した。

【結果】創作成後3時間で創周囲のCx43の発現は減少し始めたが、それより遅れて1日後に創周囲の細胞群がKi-67陽性となった。3日後にCx43の発現が最も減少した時、Ki-67陽性の細胞数は最大となった。Cx43の発現の回復とともにKi-67陽性の細胞数も減少した。 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaseの発現は、Cx43の低下に続いて減少し、5日後以降Cx43の発現が回復した後に、遅れて回復した。

【結論】角膜内皮細胞の創傷治癒過程において、角膜内皮細胞の増殖及びポンプ機能が、Cx43の発現変化に密接に関係することが分かった。

IB-22

心筋細胞におけるギャップ結合蛋白(コネキシン 43)とカルシウム動態の同時観察の試み

中上拓男^{1,2)}、田中秀央¹⁾、戴平¹⁾、田邊卓爾^{1,2)}、藤原克次^{1,3)}、万井弘基^{1,2)}、小山田正人¹⁾、高松哲郎¹⁾
京都府立医科大学 大学院医学研究科 ¹細胞分子機能病理学、²循環器病態制御学、³心臓血管呼吸器機能制御外科学

【目的】心臓における主たるギャップ結合蛋白であるコネキシン 43(Cx43)の発現異常が致死性不整脈の重要な病態基盤になると考えられており、その一つとして不整脈の発生源である心筋梗塞境界部におけるCx43の発現異常が報告されている。また他方で心筋細胞内カルシウムの動態異常が不整脈源性を有することも知られている。生きた心筋細胞、組織においてCx43とカルシウム動態を同時に観察することが困難であったため、Cx43の発現異常と細胞内カルシウム動態異常の関係については十分検討されていない。そこで我々は両者を同時に観察検討することを試みた。【方法】アデノウイルスベクターを用い、赤色蛍光蛋白(mRFP1)をCx43のC端に付加した発現ベクター(Adv.CMV.Cx43.mRFP1)を作製した。哺乳1日齢新生仔ラットの心筋細胞を単離培養し、培養2日目にアデノウイルスベクターによる遺伝子導入を行い、培養4日から6日の間にカルシウムインジケータ(fluo3AM)をloadし、リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。【結果】培養心筋においてCx43過剰発現プラークおよび細胞内カルシウム動態(カルシウムトランジェント(以下CaT)、カルシウムウェーブ(以下CaW))を同時に観察することに成功した。個々の心筋細胞で興奮に伴った細胞内に均一なCaTを生じ、ほぼ細胞間で同期しており、異常なカルシウム動態であるCaWも一部の細胞で観察された。しかし、CaTの同期性、CaWの細胞間伝播性についてはwild typeと比較してCx43増加に伴う変化は認めなかった。【総括】ギャップ結合蛋白および細胞内カルシウム動態の同時観察に成功した。今後、ギャップ結合蛋白の発現異常と不整脈の関連を究明する有用なツールになるものと期待される。