

## 審査の結果の要旨

氏名 小栗 岳

本研究はヒト心臓線維芽細胞において重要な役割を演じていると考えられる TRPA1 チャネルの発現およびカルシウムイオンシグナルを介したメチルグリオキサール(MG)との関与を明らかにすることを試みた研究であり、下記の結果を得ている。

1 Fura2-AM を用いた 2 波長励起法による細胞内カルシウム測定では、MG による細胞内カルシウム濃度上昇を誘発し、このカルシウム変化は MG 濃度依存的であった。さらにその効果は細胞外液にカルシウムイオンが存在するときに著明に認められた。このことから MG による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は、主に細胞外のカルシウムイオンが何らかのチャネルを介して細胞内に流入することによって起こることが示唆された。

2 MG スカベンジャーであるアミノグアニジンにより上記カルシウムイオン濃度上昇は抑制され、TRPA1 選択的拮抗薬である HC030031 投与によっても抑制され、非特異的な TRP チャネル拮抗薬であるルテニウムレッドによっても抑制された。また、TRPA1 アゴニストである AITC および 15d-PGJ2 投与によりカルシウムイオン濃度上昇を認めたことから、MG による細胞内カルシウムイオン濃度上昇が TRPA1 チャネルを介することが示唆された。

3 RT-PCR、免疫染色法、ウェスタンブロッティング法において遺伝子、蛋白レベルでの TRPA1 の発現が確認された。リアルタイム RT-PCR では TRPA1 の発現量は TRPV2、TRPC1、TRPV1、TRPM2 と比較しても多いことが確認された。

4 TRPA1 に対する siRNA を transfection させ、TRPA1 をノックダウンさせた細胞では、TRPA1 の mRNA 発現が抑制されるとともに、MG による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が抑制された。このことからヒト心臓線維芽細胞において MG による細胞内カルシウムイオン濃度上昇には TRPA1 が関与していることが裏付けられた。

5 フローサイトメトリーを用いて、MG の細胞周期に及ぼす効果について検証した結果、細胞に MG を 48 時間処理した群では、G0/G1 から S/G2, M 期の移行が増大した。一方、この変化は HC030031、及びルテニウムレッドを MG と併用投与した群ではその進行がそれぞれ抑制されることが確認された。

以上、本論文は MG によるヒト心臓線維芽細胞の活性化機構が TRPA1 チャンネルのカルシウムイオンシグナルを介していることを明らかにした。本研究は今後、糖尿病性心筋症の治療への重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。