

Title	ラット培養メサンギウム細胞イノシトールリン脂質代謝に対するangiotensin IIの効果
Author(s)	田中, 善
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35796
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【24】

氏名・(本籍)	たなか よしむ 田 中 善
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7823 号
学位授与の日付	昭和62年7月9日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	ラット培養メサンギウム細胞イノシトールリン脂質代謝に対する angiotensin II の効果
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 熊原 雄一 教授 吉田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

腎糸球体メサンギウム細胞はangiotensin II (A II) の特異的結合部位を有し、その収縮を介して、糸球体濾過過程の調節に重要な役割を果たすと考えられている。しかし、A IIがメサンギウム細胞の受容体に結合後、いかなる情報伝達機構が作動するかについては、完全には解明されていない。一方、A IIは種々の標的細胞、さらにラット単離糸球体において、細胞膜イノシトールリン脂質代謝を促進することが報告されており、その結果生じる細胞内Ca²⁺濃度の上昇やprotein kinase Cの活性化を介して、ホルモン作用を発揮するものと推定されている。本研究では、ラット培養メサンギウム細胞を材料として、A IIがイノシトールリン脂質代謝に与える効果を検討した。

〔方 法〕

1. 培養メサンギウム細胞の調製

雄性Sprague-Dawleyラット(体重70-90g)より腎を摘出し、外側皮質をミンチし、sieving methodにより糸球体を単離した。その糸球体懸濁液を20% decomplexed fetal calf serum, 1 μg/ml insulinを添加したRPMI 1640を培養液として、37°C, 95% air, 5% CO₂の条件下で培養した。初代培養21日目には、その成育細胞の殆どが、樹枝状の細胞突起と豊富なstress fiberを有し、メサンギウム細胞由来と考えられるところから、その時点で継代した。実験には、2代継代14日目の培養メサンギウム細胞を用いた。

2. ³H標識実験

培養細胞5 × 10⁵個当たり、〔5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H〕arachidonic acid 5 μCi添加し、

37°C, 95% air, 5% CO₂の条件下, イノシトールリン脂質の³H標識が平衡に至るまで48時間培養した。(Ca²⁺, Mg²⁺ freeのphosphate buffered salineで3回洗浄後, 0.02% EDTA溶液で処理した後, 380 IU/ml collagenase, 1 mg/ml trypsin inhibitor含有のHanks液を添加, 37°C, 95% air, 5% CO₂の条件下で20分間放置した。ピペッティング操作により細胞を剥離, 分散させた。遠心(1000rpm, 5分間)後の沈渣を0.2% essentially fatty acid freeのbovine serum albumin含有のHepes緩衝Hanks液(Ca²⁺ 1.3mM含有)に懸濁し, 同様の遠心操作により2回洗浄した。径35 μmのstainless sieveに通し細胞塊を除去後, 0.5% trypan blue染色によりviability 95%以上の標品を実験に供した。この細胞浮遊液(細胞数5 × 10⁵個/0.5ml)を37°C, 10分間preincubateした後, A IIまたはvehicleの添加により反応を開始した。なお, Ca²⁺ free mediumの実験では, 最後の遠心の際にCa²⁺ free mediumに置換し, 反応開始5分前に, 0.5mM EGTAを添加した。一定時間経過後, chloroform : methanol : concentrated HCl (1 : 2 : 0.02, V/V/V)の添加により反応を停止させた。

3. 脂質の抽出と分離

脂質の抽出はBillah and Lapetinaの方法に従った。Thin layer chromatographyにより各脂質成分を分離し, ヨウ素発色により脂質のspotを検出した。

4. Radioactivityの測定

各脂質成分のspotをかきとり, liquid scintillation counterによりradioactivityを測定した。

[結果]

1. A II添加による³H標識脂質の変化

10⁻⁶ M A II添加により, phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂)の [³H] radioactivityは15秒で有意に減少し, 30秒で最大減少を示し, 120秒で元のレベルへ復した。これと同一の時間経過でdiacylglycerol (DG)の [³H] radioactivity増加反応が認められた。Phosphatidylinositol 4-monophosphate (PIP)の [³H] radioactivityの変化は60秒で始めて有意に減少し, phosphatidylinositol (PI)の [³H] radioactivityの変化は120秒以内では認められなかった。PIP₂, DGの30秒における [³H] radioactivityの変化はA II濃度依存性を示した。

2. Saralasinの効果

A IIの受容体拮抗薬である [1-Sar, 8-Ala] A II (saralasin) (10⁻⁵ M) はA II (10⁻⁷ M) 添加後30秒におけるPIP₂の [³H] radioactivityの減少を完全に抑制した。

3. EGTA含有Ca²⁺ free mediumでの効果

EGTA (0.5mM) 存在下, Ca²⁺ free mediumにおいてA II (10⁻⁶ M) 添加後30秒におけるPIP₂の [³H] radioactivityの減少は, Ca²⁺含有medium使用時と同程度であった。

[総括]

1. ラット単離系球体培養により得られた培養メサンギウム細胞を用いて, そのイノシトールリン脂質代謝に対するA IIの効果を検討した。

2. ³H-arachidonic acid標識培養メサンギウム細胞にA IIを作用させた際, 最も早期にみられる変化は, ³H-PIP₂の減少と³H-DGの増加であり, これに遅れて³H-PIPの減少が生じたが, ³H-

PIの変化は120秒以内には認められなかった。

3. AIIの $^3\text{H-PIP}_2$ 減少効果は、濃度依存性を示し、AIIの特異的受容体拮抗薬である saralasin で完全に阻害され、細胞外 Ca^{2+} freeの条件下でも同様に観察された。

4. したがって、AIIは培養メサンギウム細胞の受容体に結合後、phospholipase Cの活性化により、まず PIP_2 の分解を起こし、DGを生成するものと考えられた。また、これらの反応は、AIIの特異的受容体との結合を介するものであり、細胞外 Ca^{2+} の流入の結果により起こる現象ではないことが示された。

論文の審査結果の要旨

腎糸球体メサンギウム細胞は、angiotensin IIの特異的結合部位を有し、その収縮を介して糸球体濾過過程の調節に重要な役割を果たすと考えられているが、そのpost-receptor mechanismについては完全には解明されていなかった。本研究では、培養メサンギウム細胞におけるangiotensin II作用時のイノシトールリン脂質代謝を検討し、初期反応としてphosphatidylinositol 4, 5-bisphosphateの分解と、protein kinase Cの活性化物質であるdiacylglycerolの産生が生じることを初めて明らかにした。この成果は、糸球体機能の調節機構解明に関する今後の研究にも重要な示唆を与えるものであり、学位に値するものと評価される。