Osaka University Knowledge Archive

Title	ラット培養メサンギウム細胞inositol phosphates代謝に及ぼすangiotensinⅡの効果 : 高速液体クロマトグラフィーによる解析
Author(s)	申, 性孝
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36648
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【62】

氏名・(本籍)	申(しん)　性(そん)　孝(ひょう)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	第　8352　号
学位授与の日付	昭和63年10月19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 inositol phosphates 代謝に及ぼす angiotensinⅡ の効果－高速液体クロマトグラフィーによる解析－**
論文審査委員	(主査) 教　授　鎌田　武信 (副査) 教　授　祖父江憲治　　教　授　田川　邦夫

論文内容の要旨

〔目　的〕

AngiotensinⅡ（AⅡ）は腎糸球体メサンギウム（M）細胞の収縮を介して糸球体濾過過程を調節するのみならず，M細胞の増殖にも関与し，糸球体病変の成立にも重要な役割を果たす可能性が示唆されている。本研究ではこれらAⅡのM細胞に対する作用における細胞内情報伝達機構を明らかにする目的で，phosphoionsitide cycle（PI cycle）の亢進により産生され，細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を来すとされている inositol 1，4，5－trisphosphate（Ins（1，4，5）P_3），およびそのリン酸化物で，細胞外からの Ca^{2+} 流入に関与する可能性のある inositol 1，3，4，5－tetrakisphosphate（Ins（1，3，4，5）P_4）を中心として，inositol phosphates（IPs）代謝について検討した。この際，IPs の分析は従来の測定方法のもつ種々の欠点を克服するため，今回新たに開発した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて行った

〔方　法〕

(1) M細胞培養：4週齢SD－rat kidney より sieving 法により糸球体を単離し，培養系へと移した。M細胞のみとなった時点（初代培養21日目）で，継代した。実験には2代継代細胞を用いた。

(2) 〔^{3}H〕－inositol による前標識：前標識24時間前に inositol-free MEMに置換し，10%透析ウシ胎児血清および〔^{3}H〕－inositol 25 μci／mℓを含む inositol-free MEN中で48時間前標識した。

(3) IPs 分析：反応はAⅡを含む Hanks-Hepes buffer および Hanks-Hepes buffer のみの添加により開始し，反応停止は反応液除去後，chloroform／methanol（1：2，vol vol）または15% trichloroacetic acid（TCA）添加により行った。chloroform／methanol によった場合，抽出は Blig & Dyer

らの方法により，2相に分離した水相をvacuum concentratorで乾燥させ，これを再溶解させ，ＨＰＬＣにて分析した。ＴＣＡによった場合，water-saturated diethyl etherによる洗浄によってＴＣＡを除去後，上記と同様の操作により分析した。

(4) ＨＰＬＣによるIPsの分析：カラムは陰イオン交換カラムＴＳKgel DEAE－2SW（TOSOH）を，移動相としてはリン酸ナトリウムpH6.8を用いた。retention timeの決定は，標準物質を用い，各分析の直前に行なった。この際の検出器としては，示差屈折計を用いた。但し，Ins（1，4，5）P_3の，isomerであるinositol 1，3，4－trisphosphate（Ins（1，3，4）P_3）のretention timeの決定に際しては，凍結・溶解を繰り返すことによりleaky としたM細胞に，Ins（1，3，4）P_3の前駆体である〔^{3}H〕－Ins（1，3，4，5）P_4を基質として加えて反応させ，その脱リン酸化物を分析することにより行った。

〔結　果〕

(1) 今回開発したＨＰＬＣは，従来の方法に比べinositol monophosphate（IP_1）からinositol hexakisphosphate（IP_6）までのIPsの分析に対し，短時間で良好な分離（理論段数：およそ4000）を示した。また，Ins（1，4，5）P_3とIns（1，3，4）P_3の分離も可能であった。

(2) ＡⅡ10^{-7} M添加により，15秒以内にinositol trisphosphate，inositol bisphosphateの増加がみられ，また，IP_1は30秒以降増加した。

(3) ＡⅡ添加によるIPsの増加は，ＡⅡに対し濃度依存性を示した。

(4) ＡⅡ$^{-7}$ M添加によるIPsの増加は，ＡⅡの受容体での拮抗薬であるサララシン10^{-5} Mにより完全に抑制された。

(5) IP_3 isomersおよびIns（1，3，4，5）P_4の検討から，ＡⅡ添加後，Ins（1，4，5）P_3は，10秒を最大とする一過性の増加を示し，60秒でほぼ対照に復した。Ins（1，3，4，5）P_4も10秒を最大とする一過性の増加を示し，以後若干の低下を見るもなお高値を示した。Ins（1，3，4）P_3は10秒以後60秒まで増加し続けた。

〔総　括〕

(1) 今回開発したＨＰＬＣは，IP_1からIP_6までのIPsの分析に有用であった。

(2) ラット培養M細胞においてＡⅡは，受容体結合後，phospholipase Ｃの活性化に始まるPI cycleの亢進によりIns（1，4，5）P_3の産生をきたし，さらに，このIns（1，4，5）P_3の3－kinaseによるリン酸化物と考えられるIns（1，3，4，5）P_4の増加をきたすことが明かとなった。

論文の審査結果の要旨

本研究は，重要な細胞内情報伝達物質であるinositol phosphatesの分析のため，簡便，精密な高速液体クロマトグラフィー法を新たに開発した。これを用いて腎系球体メサンギウム細胞におけるangiotensin Ⅱ作用時の動態を検討し，細胞内Ca濃度の調節に重要な役割を果たすと考えられるinositol

tris／tetrakisphosphate pathway の亢進を，初めて明かにした。メサンギウム細胞に対する angiotensin II の作用は糸球体疾患の病態にも重要な役割を果たすと考えられ，その制御法の研究に資するところ大であり，学位に値するものと考えられる。