

Title	Endothelin-1 Stimulates Prostaglandin E2 Production in an Extracellular Calcium-independent Manner in Cultured Rat Mesangial cells
Author(s)	福永, 恵
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37671">https://hdl.handle.net/11094/37671</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	福 永 恵
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9825 号
学位授与の日付	平成 3 年 6 月 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文名	Endothelin-1 Stimulates Prostaglandin E <sub>2</sub> Production in an Extracellular Calcium-independent Manner in Cultured Rat Mesangial cells (ラット培養メサンギウム細胞における endothelin-1 による prostaglandin E <sub>2</sub> 産生機構の解明)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 多田 道彦 教授 荻原 俊男

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

Endothelin-1 (ET-1) は、豚大動脈血管内皮細胞培養上清より分離精製された、最も強力な血管収縮性ペプチドの一つである。一方、腎糸球体メサンギウム(M)細胞は、各種の血管作動性ペプチドによる収縮を介して糸球体濾過値を調節し、さらに各種の growth factor に反応して増殖することが知られている。また、これらの物質の作用に際して、prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) が産生され、negative feed back系の一員として重要な役割を果たす可能性も報告されている。本研究では、M細胞機能の調節におけるET-1の役割を解析する目的で、M細胞におけるET-1受容体の存在、その細胞内情報伝達機構と生物学的作用、特にPGE<sub>2</sub>産生作用を検討した。

#### 〔方法〕

- ① M細胞培養：4週齢雄性Sprague-Dawleyラットの腎皮質から篩法により単離した糸球体を培養系(RPMI 1640+20%牛胎児血清)に移し、21日目以後優勢となるM細胞を1回継代して用いた。
- ② ET-1のbinding assay：subconfluentに達したM細胞に<sup>125</sup>I標識ET-1 10<sup>-11</sup>Mと10<sup>-10</sup>~10<sup>-7</sup>Mの濃度の非標識ET-1を添加、4℃、22時間incubateして細胞に結合した<sup>125</sup>Iの放射能を測定した。一部の実験では非標識ET-1の代わりに10<sup>-8</sup>~10<sup>-6</sup>M angiotensin II (All)、10<sup>-6</sup>M arginine vasopressin (AVP)、10<sup>-5</sup>M diltiazem、10<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup>M nicardipineを添加した。
- ③ ET-1によるinositol 1, 4, 5-trisphosphate (Ins 1, 4, 5-P<sub>3</sub>)の産生：M細胞をHanks-Hepes bufferで20分間preincubateした後、ET-1 10<sup>-7</sup>Mまたはvehicleを添加、所定の反応時間経過後、

15% trichloroacetic acid (TCA) にて反応を停止した。4倍量のwater-saturated diethyletherで4回洗浄してTCAを除去し、Ins 1, 4, 5-P<sub>3</sub>をAmersham社製の specific binding assay kit (TRK.1000) を用いて測定した。

- ④ ET-1による細胞内カルシウム濃度 (iCa<sup>++</sup>) の変化: 10×40mmのカバーガラス上に継代したM細胞にfura-2 4μMを添加し、60分間incubationの後、さらにKrebs-Henseleit-Hepes bufferで20分間incubateした。カバーガラスを石英キュベットに移し、蛍光分光分析装置 (Hitachi F4000) 内に設置、ET-1 10<sup>-7</sup>Mを添加して、励起波長340及び380nm、蛍光波長505nmで蛍光を測定した。iCa<sup>++</sup>はGrynkiewiczの式に基づいて算出した。
- ⑤ ET-1によるPGE<sub>2</sub>産生: M細胞をRPMI 1640で3時間incubateし、さらにHanks-Hepes bufferで30分間preincubationの後、ET-1またはvehicleを添加した。30分後反応液を採取し、NEN社製のradioimmunoassay kit (NEK.020) によるPGE<sub>2</sub>測定に供した。一部の実験では、反応液中にdiltiazem 1μM、またはnicardipine 1μMを添加した。

#### [成績]

- ① ET-1のbinding assayの結果: M細胞には2種のET-1結合部位が存在し、解離定数は各々0.24, 4.4nM, 最大結合能は130, 1070fmol/mg・proteinと計算された。AII, AVP, diltiazem, nicardipineはいずれもET-1のM細胞への結合に影響を与えなかった。
- ② ET-1によるIns 1, 4, 5-P<sub>3</sub>の変化: ET-1 10<sup>-7</sup>M添加後、Ins 1, 4, 5-P<sub>3</sub>は急速に増加して、10秒後に最大値に達し、以後漸減して60秒以内に前値に復した (0秒: 77.9±5.3 (mean±SE), 10秒: 106.7±5.1, 60秒: 63.3±3.1pmol/mg・protein)。ET-1添加後10秒におけるIns 1, 4, 5-P<sub>3</sub>の値はET-1の濃度に依存して増加し、有意な上昇は5×10<sup>-10</sup>M以上の濃度で認められた。
- ③ ET-1によるiCa<sup>++</sup>の変化: ET-1 10<sup>-7</sup>M添加後、iCa<sup>++</sup>は急速に増加、約15秒で最大値に達した後、速やかに減少したが、ET-1添加前の値までは戻らず、いわゆる“transient and sustained”のパターンを呈した。この“sustained phase”は、nicardipine 1μMの添加で消失した。
- ④ ET-1によるPGE<sub>2</sub>産生: M細胞におけるPGE<sub>2</sub>産生は、ET-1の濃度に依存して増加し、有意な増加は10<sup>-9</sup>M以上の濃度で、half maximal effectは3×10<sup>-10</sup>M付近で認められた。ET-1 10<sup>-9</sup>MによるPGE<sub>2</sub>産生は、diltiazem 1μM、或はnicardipine 1μM添加で影響を受けなかった。

#### [総括]

培養M細胞には、ET-1に特異な受容体が存在することが明らかとなった。ET-1は、この受容体に結合後、phospholipase Cの活性化によるphosphatidylinositol 4, 5-bisphosphateの加水分解を介して、Ins 1, 4, 5-P<sub>3</sub>を産生し、細胞内のカルシウム貯蔵部位からのカルシウム動員を来すものと考えられた。ET-1の生物学的作用として、PGE<sub>2</sub>産生が明らかとなり、この作用はカルシウムチャンネルを介した細胞外カルシウム流入には依存しないことが証明された。産生されたPGE<sub>2</sub>は糸球体機能の調節に関与するものと推定された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、最近発見された内皮細胞由来血管収縮性ペプチドである endothelin-1 が腎糸球体メサンギウム細胞において特異的受容体を介して phosphoinositide 代謝回転を亢進し、さらに、細胞外カルシウム非依存性、細胞内カルシウム依存性、protein kinase C非依存性の phospholipase A<sub>2</sub>活性化機構によって prostaglandin E<sub>2</sub> 産生を亢進することを初めて明らかにした。endothelin-1, prostaglandin E<sub>2</sub> は共にメサンギウム細胞機能調節を介して糸球体機能制御に重要な役割を果たしていることが考えられ、これらの作用機構解明は糸球体病変の制御法の研究に貢献するところ大であり、学位に値するものと考えられる。