

Title	Kupffer Cells Contain Voltage-Dependent Calcium Channels
Author(s)	肱岡, 泰三
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38255">https://hdl.handle.net/11094/38255</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	ひし おか たい ぞう 三	肱岡泰三
博士の専攻分野の名称	博 士	(医 学)
学位記番号	第 1 0 5 2 7	号
学位授与年月日	平成 5 年 2 月 5 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当	
学位論文名	Kupffer Cells Contain Voltage-Dependent Calcium Channels (クッパー細胞における電位依存性カルシウムチャンネルの存在の証明)	
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信	
	(副査) 教授 多田 道彦	教授 祖父江憲治

## 論文内容の要旨

### [目的]

クッパー (Kupffer) 細胞は、肝類洞に局在するマクロファージであり、各種の刺激に応答して tumor necrosis factor やラジカル等の生理活性物質を産生し、肝障害の発生・進展機序に関与していると考えられている。一方、 $Ca^{2+}$  は、Kupffer 細胞の活性化における重要なセカンドメッセンジャーであることが知られており、近年、Dihydropyridine (DHP) 型  $Ca^{2+}$  チャンネル拮抗剤が、冷保存、移植後の移植肝内 Kupffer 細胞の活性化を抑制し、グラフトの予後を改善することが報告されている (Transplantation 1990 ; 50 : 14-20)。しかし、Kupffer 細胞における電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルの存在は未だ証明されていない。本研究では、Kupffer 細胞に電位依存性の  $Ca^{2+}$  チャンネルが存在するか否かを検討した。

### [方法]

#### (1) Kupffer 細胞の分離・培養

Sprague-Dawley 系雌性ラット (220~280 g) をペントバルビタールにて麻酔 (60mg/kg 体重, i.p.) 後、その肝を摘出し、コラゲナーゼ灌流法 (0.016% collagenase B, Boehringer Mannheim Biochemicals) により消化した。肝細胞 (実質及び非実質細胞) を phosphate-buffered saline 中に分散した後、Pertoft らの方法に準じて肝非実質細胞を Percoll 密度勾配法にて分離した。さらに肝非実質細胞より differential adhesion 法を用いて、Kupffer 細胞を純化・培養した。すなわち、培養液 RPMI1640 中に  $2.0 \times 10^6$  cells/ml の密度で浮遊させた非実質細胞を直径 25 mm のカバーグラス上に播種し、37°C で培養した。1 時間後、非接着細胞を除去し、新鮮な培養液に交換した。

#### (2) 細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の測定

$[Ca^{2+}]_i$  の測定には、蛍光カルシウム指示薬 fura-2 と蛍光顕微分光システム (Spex analytical system) を用いた。カバーグラスに接着した Kupffer 細胞を fura-2/AM (5  $\mu$ M) を含有する Krebs-Ringer-HEPES 緩衝液 (KRH ; 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $KH_2PO_4$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgSO_4$ , 5 mM glucose, 25 mM HEPES ; pH 7.4) 中でインキュベーション (37°C 15 分間後, 25°C 30 分) することにより、fura-2 を Kupffer 細胞内へ導

入した。KRHにて洗浄後カバーガラスをチャンバーに装着し、340 nm 及び380 nm 励起光により単一細胞から発生する505 nm 蛍光を倒立顕微鏡下、KRH (25°C) 中で経時的に測定した。 $[Ca^{2+}]_i$ の算出は、Grynkiewicz ら及びRatto らの方法に従い以下の式によった。

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \{ (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \} (F_o / F_s)$$

Kd ; fura-2 と  $Ca^{2+}$  の解離定数, 135 nM                      R ; 340 nm / 380 nm の蛍光強度比  
Rmin ; 無  $Ca^{2+}$  下での fura-2 / 5K の R                      Rmax ; 飽和  $Ca^{2+}$  下での fura-2 / 5K の R  
F<sub>o</sub> ; 無  $Ca^{2+}$  下での380nm 励起時の蛍光強度              F<sub>s</sub> ; 飽和  $Ca^{2+}$  下での380 nm 励起時の蛍光強度  
薬剤の投与は、各種濃度に調整した緩衝液に用手置換することにより行った。

#### [成績]

- (1) カバーガラス上に接着・伸展した細胞は、直径 1  $\mu$ m のラテックスビーズを貪食したことより、これらの細胞が Kupffer 細胞であることが同定された。
- (2) KRH 中の NaCl を KCl と置換することにより細胞外  $K^+$  濃度を上昇させると、 $[Ca^{2+}]_i$  は 75~95mM  $K^+$  の間で濃度依存性の上昇を示した ( $EC_{50}$  ;  $81 \pm 1$  mM  $K^+$ , n=4)。
- (3) DHP 型  $Ca^{2+}$  チャンネルアゴニスト BAY K 8644 (1  $\mu$ M) 存在下では、細胞外  $K^+$  に対する  $[Ca^{2+}]_i$  の濃度依存曲線は、左方に偏位し ( $p < 0.001$ , Student's t test), その  $EC_{50}$  は  $61 \pm 1$  mM  $K^+$  (n=4) であった。また、 $[Ca^{2+}]_i$  の最大変化は 65mM  $K^+$  緩衝液中にて観察された。
- (4) 65 mM  $K^+$  緩衝液中で BAY K 8644 は 1 nM ~ 10  $\mu$ M の間で  $[Ca^{2+}]_i$  を濃度依存性に上昇させた ( $EC_{50}$  ; 400 nM)。
- (5) DHP 型  $Ca^{2+}$  チャンネル拮抗剤 Nitrendipine は、BAY K 8644 (1  $\mu$ M) 存在下における高  $K^+$  (65mM) による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を濃度依存性に抑制した ( $IC_{50}$  ; 25nM)。
- (6) 細胞外  $Ca^{2+}$  を除去した条件下では、BAY K 8644 感受性の高  $K^+$  による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は認められなかった。
- (7) 細胞内  $Ca^{2+}$  貯蔵部位からの  $Ca^{2+}$  の放出を抑制することが知られている TMB-8 (200  $\mu$ M) による前処置は、BAY K 8644 感受性の高  $K^+$  による  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇に影響を及ぼさなかった。

#### [総括]

以上の結果より、Kupffer 細胞には DHP 誘導体に感受性を示す、電位依存性の細胞外より細胞内への  $Ca^{2+}$  流入機構、すなわち L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルの存在が示された。DHP 誘導体は、L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルに作用することにより Kupffer 細胞機能を修飾しうるものと考えられる。今後、DHP 型  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーによる Kupffer 細胞機能の抑制と各種肝障害の関連を詳細に検討することにより治療への新しいアプローチが開かれるものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

肝類洞に局在するマクロファージである Kupffer 細胞は、各種の刺激にตอบสนองして tumor necrosis factor やラジカル等の生理活性物質を産生し、肝障害の発生・進展機序において重要な役割を果たしている。一方、 $Ca^{2+}$  は、Kupffer 細胞活性化におけるセカンドメッセンジャーの一つであり、Dihydropyridine (DHP) 型  $Ca^{2+}$  チャンネル拮抗剤が、Kupffer 細胞の活性化を抑制することから、Kupffer 細胞に電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルが存在することが推測される。しかし、その証明は、未だなされていない。

本論文は、Kupffer 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に対する細胞膜脱分極及び DHP 誘導体の影響を検討することにより、Kupffer 細胞には DHP 誘導体に感受性を示す、電位依存性の細胞外より細胞内への  $Ca^{2+}$  流入機構、すなわち L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルが存在することを証明した。この知見から、DHP 誘導体は、L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルに作用することにより Kupffer 細胞機能を修飾しうるものと考えられ、DHP 型  $Ca^{2+}$  チャンネルブロッカーに

よる Kupffer 細胞機能の抑制という肝障害に対する治療への新しいアプローチを開くものと期待される。よって学位を授与するに値すると思われる。