

Title	Activation of voltage - dependent calcium channels in Kupffer cells by chronic treatment with alcohol in rats
Author(s)	後藤, 守孝
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39280">https://hdl.handle.net/11094/39280</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	こ 藤 守 孝 後 藤 守 孝
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 1 1 6 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 2 月 2 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	Activation of voltage-dependent calcium channels in Kupffer cells by chronic treatment with alcohol in rats (慢性アルコール投与の Kupffer 細胞に存在する L型電位依存性カルシウムチャンネルに及ぼす影響)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鎌 田 武 信 (副査) 教 授 松 沢 佑 次 教 授 祖 父 江 憲 治

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔背景と目的〕

肝固着のマクロファージである Kupffer 細胞は、活性化を受けるとプロテアーゼ、活性酸素、サイトカインなどの様々な toxic mediator を産生し、肝障害発生に深く関与していると考えられている。最近、Kupffer 細胞に L型電位依存性カルシウムチャンネルの存在することが報告されたが、このイオンチャンネルは、細胞内カルシウム濃度の調節を通じて Kupffer 細胞の機能発現に重要な役割を演じていると考えられる。一方、アルコール投与は、Kupffer 細胞の貪食能やサイトカインの産生などの細胞機能に影響を与え、肝障害を惹起することが知られている。著者らは、このチャンネルが急性アルコール投与により影響を受けることを報告したが、慢性アルコール投与のカルシウムチャンネルに対する影響は未だ明らかではない。そこで、慢性アルコール投与のラット Kupffer 細胞の L型電位依存性カルシウムチャンネルへの影響を検討した。

#### 〔対象と方法〕

##### (1) 対 象

雌性 Sprague-Dawley ラット (約150g) に、Lieber-DeCarli らの報告をした、総カロリーの36%のエタノールを含む高脂肪液体飼料を5-8週間与え、脂肪肝を主体とするアルコール性肝障害ラットを作成した (アルコール群)。対照として、エタノールを等カロリーのマルトースで置換した高脂肪食を pair で飼育した (コントロール群)。

##### (2) Kupffer 細胞の分離と培養

Kupffer 細胞の分離は Pertoft らの方法に準じて行った。すなわち、ラットの門脈より EGTA 添加  $Ca^{2+}$ -free Krebs-Ringer-HEPES (KRH) 溶液にて肝を灌流した後、0.02% collagenase を含む KRH 溶液に交換し、さらに肝を灌流した。灌流消化した肝より、Percoll 連続密度勾配法にて肝非実質細胞分画を得、ガラス付着法にて Kupffer 細胞を得た。Kupffer 細胞は DMEM/F12で、37°C、5%  $CO_2$  の条件下で培養し、7時間以内に実験に供した。

### (3) 細胞内カルシウム濃度の測定

一定時間培養した Kupffer 細胞を  $5 \mu\text{M}$  fura-2/AM を含む DMEM/F12 にて 30-40 分間 incubation して fura-2 を Kupffer 細胞に負荷した。fura-2 を負荷した細胞の蛍光を Spex 分析システム (Edison 社) を用いて測定し、340nm および 380nm 励起による 505nm の蛍光比から、各実験終了後に作成した標準曲線を用いて単一 Kupffer 細胞内カルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を算出した。すべての実験は室温  $25^\circ\text{C}$  において行った。基準の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  値は細胞外  $\text{K}^+$  濃度  $5\text{mM}$  の KRH 溶液にて得たものとし、高濃度  $\text{K}^+$  含有溶液は、 $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の総和が  $120\text{mM}$  となるように作成した。

#### [成績]

##### (1) 細胞外 $\text{K}^+$ 濃度の Kupffer 細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響

培養溶液の細胞外  $\text{K}^+$  濃度を  $5\text{mM}$  から  $80\text{mM}$  に置換し膜を脱分極させると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は、約  $60\text{nM}$  の基準値から即座に上昇しピーク値に達したが、アルコール群のピーク値 ( $333 \pm 14\text{nM}$ ) は、コントロール群のそれ ( $145 \pm 14\text{nM}$ ) より有意に高値を示した ( $P < 0.01$ )。さらに、細胞外  $\text{K}^+$  濃度は、コントロール群から得た Kupffer 細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を濃度依存性に上昇させ (half-maximal effect,  $83 \pm 1 \text{mM}$ )、アルコール群の  $\text{K}^+$  濃度反応曲線はコントロール群に比し有意に左シフトし (half-maximal effect,  $73 \pm 1 \text{mM}$ ,  $P < 0.01$ )、カルシウムチャンネルの活性化を示唆した。

##### (2) EGTA の膜脱分極による Kupffer 細胞内カルシウム上昇に及ぼす影響

コントロール群、アルコール群のいずれの群においても、高濃度  $\text{K}^+$  溶液による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇のピーク値は、細胞外溶液中  $\text{Ca}^{2+}$  を EGTA ( $1\text{mM}$ ) でキレートすることによって完全に抑制された。

##### (3) Nitrendipine の膜脱分極による Kupffer 細胞内カルシウム上昇に及ぼす影響

コントロール群、アルコール群のいずれの群においても、高濃度  $\text{K}^+$  溶液による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇のピーク値は、L 型に特異的なジヒドロピリジン型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル拮抗剤 Nitrendipine ( $10 \mu\text{M}$ ) を細胞外溶液に添加することによって、ほぼ完全に抑制された。

#### [総括]

$\text{K}^+$  濃度反応曲線が慢性アルコール投与によって左にシフトしたこと、並びに、その  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が、L 型電位依存性カルシウムチャンネルを介した細胞外カルシウムの細胞内への流入であったことより、慢性アルコール処置により Kupffer 細胞に存在する L 型電位依存性カルシウムチャンネルが活性化されたことが示された。また、このカルシウムチャンネルの活性化は、細胞内カルシウム濃度の上昇を増強させてカルシウム依存性の細胞機能を亢進させる結果、tumor necrosis factor などの toxic mediator の過剰産生を介してアルコール性肝障害発生に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

アルコールは、Kupffer 細胞のサイトカインの産生などの細胞機能に影響を与え、肝障害を惹起することが知られている。最近 Kupffer 細胞に L 型電位依存性カルシウムチャンネルが存在し、このイオンチャンネルが、急性アルコール投与により不活性化されることが報告されたが、慢性アルコール投与のカルシウムチャンネルに対する影響は未だ明らかではない。

本論文は、慢性アルコール処置により、Kupffer 細胞に存在する L 型電位依存性カルシウムチャンネルが活性化されることを示した。このカルシウムチャンネルの活性化は、細胞内カルシウム濃度の上昇を増強させてカルシウム依存性の細胞機能を亢進させる結果、tumor necrosis factor などの toxic mediator の過剰産生を介してアルコール性肝障害発生に関与する可能性を示唆した。この知見は、アルコール性肝障害発生のメカニズムの解明と将来の治療法の開発に寄与すると期待される。よって、学位を授与するに値すると思われる。