

氏名・(本籍)	宇津 貴 (兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第154号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成6年3月24日
学位論文題目	高糖濃度条件下培養メサンギウム細胞におけるプロテインキナーゼCの変化
	審査委員 主査 教授 大久保 岩 男
	副査 教授 戸 田 昇
	副査 教授 繁 田 幸 男

論 文 内 容 要 旨

[目 的]

糖尿病における腎病変の発症及び進展に、早期より生じる糸球体血行動態の異常が重要な原因であるとの考えが提唱されており、高血糖によるメサンギウム細胞の収縮応答性異常がその一因と考えられている。細胞増殖及び収縮に重要なセカンドメッセンジャーであるプロテインキナーゼC (PKC) 活性が、高糖度で培養した種々の細胞で亢進していると報告されており、この異常が糖尿病合併症の発症に関与している可能性が提唱されている。しかし、PKCには多種のアイソエンザイムがあり、糖尿病状態におけるPKCの変化を検討するためにはアイソエンザイムの検討が重要と考えられる。そこで、PKC活性及びPKCアイソエンザイムに着目し、その高糖濃度条件下での変化を検討した。

[方 法]

ラット (SD系雄性) よりsieving法にて単離した糸球体を培養し、均一なメサンギウム細胞を得た。confluentに達した後に以下の実験を行った。

1. メサンギウム細胞のPKC活性を、細胞質分画及び膜分画に分けて測定し、高糖濃度条件下 (27.8mM glucose) で培養した細胞での変化を調べた。
2. メサンギウム細胞に存在するPKCアイソエンザイムを、PKC- α 、 β 、及び γ に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて調べた。
3. メサンギウム細胞に存在するPKCアイソエンザイム量を、細胞質分画及び膜分画に分けてウエスタンブロッティング法およびdensitometerにて測定し、高糖濃度条件下で培養した細胞での変化を調べた。

[結 果]

1. メサンギウム細胞のPKC活性は、高糖濃度条件下で培養することにより、膜分画では約1.9倍と有意に上昇していた。この高糖濃度条件の影響は、1時間ないし1日の培養ではみられず、3日間の比較的長時間培養後より有意に増加していた。細胞質分画のPKC活性は、高糖濃度条件下培養にて変化しなかった。なお、trypan blueの取り込みで判定したcell viabilityは高糖濃度培養による影響をうけなかった。
2. メサンギウム細胞では、PKC- α に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングにて単一のバンドが検出された。このバンドはPKC刺激剤であるtetradecanoyl phorbol acetate (TPA) にて細胞質分画

から膜分画へ移動した。PKC- β 、及び γ に対する抗体を用いたウエスタンブロットロイグ法にては陽性のバンドを検出し得なかった。

3. メサンギウム細胞のPKC- α は、高糖濃度条件下で培養することにより、膜分画で約2倍と有意に上昇し、細胞質分画では約0.9倍と有意に減少していた。

[考 察]

PKCは、静止期の細胞ではその多くが細胞質分画に存在し、刺激に反応して細胞質分画から膜分画へと移動 (translocation) することにより活性化されると考えられている。本研究では、PKCのアイソエンザイム α が主として存在するメサンギウム細胞を高糖濃度条件下で培養し、PKC活性とともにPKC- α の膜分画での増加を観察し得た。つまり、高糖濃度条件下でPKC- α のtranslocationを介したPKCの活性化が生じており、この異常が糖尿合併症の発症・進展に関与している可能性が示唆された。高糖濃度条件下でPKCが変化する機序については、ブドウ糖から合成されるジアシルグリセロールの増加が考えられているがその詳細はあきらかではない。また高糖濃度条件下で上昇したPKC活性が、細胞の増殖反応や収縮反応に対しどのように関与しているかも十分には知られていない。これらの点を含め、今後、糖尿病状態でのPKCおよびその反応性の変化をさらに詳細に検討する必要があるものと考えられる。

[結 論]

高糖濃度条件下で培養したメサンギウム細胞において、PKCの活性化がおこっており、この活性化は高糖濃度によるPKC- α のtranslocationを介していた。

学位論文審査の結果の要旨

糖尿病性腎症においては、糸球体濾過値の増加が知られており、高血糖状態での糸球体メサンギウム細胞の収縮障害が示唆されている。細胞内情報伝達物質であるプロテインキナーゼC (PKC) が、高糖濃度状態で活性化されるとの報告がなされているが、メサンギウム細胞における知見は少なく、またPKCのアイソエンザイムに対する高糖濃度の影響はほとんど知られていない。本論文は、培養メサンギウム細胞におけるPKC活性、及びPKCのアイソエンザイムに対する高糖濃度の影響について検討したものである。

本論文では、培養ラットメサンギウム細胞において、1) 高糖濃度条件下で培養することにより膜分画PKC活性が増加すること、2) PKCアイソエンザイムとして、 $\alpha \cdot \delta \cdot \epsilon \cdot \zeta$ が存在し、高糖濃度条件下培養にて膜分画のアイソエンザイム $\alpha \cdot \zeta$ の量が増加すること、3) 細胞のPKC基質のリン酸化が、高糖濃度条件下培養にて増加することを確認した。さらに、糖尿病状態での糸球体濾過値増大の機序解明の基礎検討として、高糖濃度条件下で培養したメサンギウム細胞のイノシトール (1, 4, 5) 3リン酸産生量を検討した。その結果、4) アンジオテンシンII及びエンドテリンI刺激によるイノシトール (1, 4, 5) 3リン酸産生は、高糖濃度条件下で培養したメサンギウム細胞にて低下していること、5) PKC阻害剤の添加にて、高糖濃度条件下と正常糖濃度条件下におけるイノシトール (1, 4, 5) 3リン酸産生量の差異が消失することが確認された。これらの結果は、高糖濃度条件下で生じたPKCの活性化が、メサンギウム細胞のイノシトール (1, 4, 5) 3リン酸産生の抑制を介して、収縮応答性異常に関与していることを示唆している。

