

氏名・(本籍)	前 田 士 郎 (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第78号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与年月日	平成2年3月24日
学位論文題目	腎糸球体メサングウム細胞に於けるアンジオテンシンIIの抗ANP作用について — 細胞内 cyclic GMP 蓄積の抑制 —

審 査 委 員	主査 教授	戸 田 昇
	副査 教授	繁 田 幸 男
	副査 教授	野 崎 光 洋

## 論 文 内 容 要 旨

### 〔目 的〕

腎糸球体メサングウム細胞 (M細胞) に於ける angiotensin II (AII) と心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の相互作用を知る目的で、AIIのANPによる細胞内 cyclic GMP (cGMP) 蓄積に及ぼす効果を検討し、同時に種々の薬剤を用いてAIIの作用機序についても検討を加えた。

### 〔方 法〕

#### 1. M細胞の培養

100 - 150 g のSD系雄性ラットより、腎糸球体を Sieving 法にて 4℃ の条件下で無菌的に単離した。単離した糸球体を培養液 (RPMI 1640, 2g/L NaHCO<sub>3</sub>, 100 U/ml ペニシリン, 100 μg/ml ストレプトマイシン, 20% 牛胎児血清) にて 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ で培養し、約 4 週後に均一な M細胞を得た。実験には、5 - 15 継代の培養 M細胞で AII の specific binding が non-specific binding の 10 倍以上を示すものを用いた。

#### 2. 細胞内 cGMP の測定

Confluent に達した M細胞を孵置液 (balanced salt solution) にて洗浄後、37℃、15 分間前孵置し、ANP を 1 分間作用させ、AII 存在下及び非存在下での細胞内 cGMP 含量を測定した。反応は氷冷した TCA 溶液を加える事により停止し、細胞内 cGMP 含量は radioimmunoassay で測定した。又、AII の作用機序を知るために 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 存在下での AII の効果、及び A23187, 12-o-tetradecanoyl phorbol-

13-acetate (TPA) の ANP による細胞内 cGMP 蓄積に及ぼす効果等についても同時に検討を加えた。

#### 〔結果〕

##### 1. ANP 刺激による cGMP 蓄積に対する AII の効果

M細胞において、ANP は濃度依存性に細胞内 cGMP 含量を増加させた。この ANP の効果は孵置時間 1 分で peak に達し以後減少がみられたため、以下の実験では ANP との孵置時間を 1 分とした。

AII は ANP と同時に 1 分間投与した場合、濃度依存性に ANP による細胞内 cGMP 蓄積を抑制した。

##### 2. Sodium nitroprusside (NP) の cGMP 蓄積作用に対する AII の効果

AII は、可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化剤である NP による細胞内 cGMP 蓄積をも有意に抑制した。

##### 3. IBMX の影響

ANP による細胞内 cGMP 蓄積作用に対する AII の効果は、phosphodiesterase (PDE) の阻害剤である IBMX で細胞を前処理する事により、IBMX の濃度依存性に減弱し、IBMX 1mM 以上では完全に阻止された。

##### 4. Ca ionophore (A 23187) 及び TPA の効果

A 23187 は単独で AII と同様の効果を示したが、TPA は効果なく、A 23187 と併用した際にも付加効果を認めなかった。

##### 5. 細胞外 $Ca^{2+}$ の影響

孵置液の  $Ca^{2+}$  を free にし、15 分間前孵置した場合には、AII の作用は  $Ca^{2+}$  1mM 存在下の場合に比し有意に抑制された。

これらの事から、AII は短時間では細胞内遊離  $Ca^{2+}$  の上昇を介した PDE の活性化により、cGMP 分解を亢進し ANP の作用を抑制するものと考えられた。

#### 〔考察〕

M細胞に於いて、ANP は膜結合型のグアニル酸シクラーゼを活性化し細胞内 cGMP の増加を引き起こし、生じた cGMP は PDE により分解される。従って、今回観察された AII の ANP 作用抑制効果の機序としては、1) ANP の細胞膜受容体への結合の阻害、2) 膜結合型グアニル酸シクラーゼの阻害、3) cGMP 分解の亢進、のいずれかが考えられる。AII は ANP による細胞内 cGMP 蓄積を抑制するのみならず、可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化剤である NP による cGMP 蓄積をも抑制した。この事は AII の効果が膜結合型グアニル酸シクラーゼに特異的なものではなく 1) の可能性は否定的である。更にこの AII の効果は PDE の阻害剤である IBMX にて完全に阻止された事よりグアニル酸シクラーゼの抑制、即ち 2) の可能性よりも、むしろ

る PDE 活性の亢進による cGMP 分解の促進に基づいている、即ち 3) の可能性が考えられた。

A II は M 細胞に於いて、細胞膜受容体に結合後、phospholipase C を活性化する事により、inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) と diacylglycerol (DG) を上昇させる。前者は細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup> を上昇し後者は PKC を活性化すると考えられている。今回の検討では、Ca ionophore である A 23187 は単独で A II と同様の効果を示した事、及び孵置液中の Ca<sup>2+</sup> を free とした状態で前孵置する事により A II の作用が減弱した事より、細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup> の上昇が PDE の活性化には重要であると考えられた。一方、TPA は全く効果なく少なくとも短時間 (1 分) ではその関与は少ないものと考えられた。

#### 〔結論〕

M 細胞に於いて、A II は ANP による細胞内 cGMP 蓄積を抑制し、それは短時間 (1 分) では細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup> 上昇を介した PDE 活性化による cGMP 分解の亢進に基づいているものと考えられた。

#### 学位論文審査の結果の要旨

本論文は、腎糸球体メサンギウム細胞に於ける心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 刺激時の細胞内 cyclic GMP 蓄積に及ぼすアンジオテンシン II の影響と、その作用機序について検討したものである。

培養ラットメサンギウム細胞に於て、アンジオテンシン II は ANP による細胞内 cyclic GMP 蓄積を濃度依存性に抑制した。このアンジオテンシン II の効果は、メサンギウム細胞を、phosphodiesterase (PDE) の阻害剤である 3-isobutyl-1-methylxanthine で前処理することにより完全に阻止された。したがって、ANP の細胞内 cyclic GMP 蓄積作用のアンジオテンシン II による抑制効果は cyclic GMP 分解酵素である PDE の活性化に基づくことが結論される。さらに、ANP の細胞内 cyclic GMP 蓄積作用のアンジオテンシン II による抑制の機序を細胞内情報伝達系との関連に於て検討を加えた。アンジオテンシン II はメサンギウム細胞に於て細胞内遊離カルシウムの上昇及びプロテインキナーゼ C の活性化を引き起こすことがすでに知られているが、Ca ionophore 投与及び細胞外カルシウムを除去した条件下での今回の検討より、細胞内遊離カルシウムの上昇が PDE の活性化をもたらす事を示唆する結果が得られた。

メサンギウム細胞はアンジオテンシン II、ANP などの血管作動性ホルモンの刺激により、糸球体有効濾過面積を変化させて糸球体濾過率を調節する。本論文に示されたアンジオテンシン II の作用は、生理的及び病的条件下での腎血行動態と糸球体濾過を考察する上で重要な意味をもつものと考えられることから、本研究は医学博士の学位に値すると評価された。