

9236 メサングウム細胞機能異常による食塩排泄低下を介した高血圧発症機構に関する研究

助成研究者:藤原 芳廣(大阪大学 医学部)

共同研究者:鎌田 武信, 上田 尚彦(大阪大学)

:甲 性孝, 越智 聡(大阪大学)

研究報告の要旨

【目的】糸球体のメサングウム細胞はその収縮による糸球体限外濾過係数(Kf)の変動を介して糸球体濾過の調節に関与すると考えられており、その増殖は糸球体濾過過程の異常をきたして尿中Na排泄の低下により高血圧発生の一因となりうる。実際、高血圧の確立していない6週令の高血圧自然発症ラット(SHR)において正常血圧対照のWistar-Kyoto rat(WKY)に比して有意なKfの低値が報告されており、本態性高血圧のモデル動物とされるSHR系において高血圧発生におけるメサングウム細胞機能異常の関与が考えられる。今回我々は生後4週令の脳卒中易発症SHR(SHRSP)からメサングウム細胞を培養し、同週令のWKYから培養したメサングウム細胞とその増殖能に関して比較検討した。

【方法】生後4週令のSHRSPとWKYから篩法により糸球体を単離し、糸球体の組織培養によりメサングウム細胞を培養、継代し以下の実験に使用した。細胞増殖は細胞数の測定または細胞酸不溶性画分への<sup>3</sup>H-thymidine取り込みの定量により測定した。

【結果】20%牛胎児血清(FCS)存在下での細胞増殖は今回調べた2、3、5代目のすべての代数でSHRSPメサングウム細胞がWKYメサングウム細胞に比して亢進を示した。血管作動性ペプチドのendothelin-1(ET-1)は今回調べた $10^{-9}$ M~ $10^{-7}$ Mの濃度でSHRSPメサングウム細胞の<sup>3</sup>H-thymidine取り込みを促進したが、WKYメサングウム細胞では有意な作用は示さなかった。Cキナーゼの活性化因子であるホルボールエステルphorbol myristate acetate(PMA)によりWKY、SHRSPメサングウム細胞の両方で<sup>3</sup>H-thymidine取り込みは促進したが、後者は前者に比しより低濃度のPMAで<sup>3</sup>H-thymidine取り込みの促進を示した。

【考察】SHRSPメサングウム細胞はWKYメサングウム細胞に比してFCSとET-1に対する増殖反応性が亢進している。ET-1に対する反応亢進の少なくとも一部はSHRSPにおけるCキナーゼまたはCキナーゼ以後の細胞内情報伝達機構の異常の関与が示唆される。

【結論】SHRSP由来のメサングウム細胞はWKY由来のメサングウム細胞に比して細胞増殖因子に対する細胞増殖反応性が有意に亢進しており、糸球体濾過機能異常を介して高血圧発生過程に重要な関与をしている可能性が考えられる。



## 9236 メサングウム細胞機能異常による食塩排泄低下を介した高血圧発症機構に関する研究

助成研究者: 藤原 芳廣(大阪大学 医学部)

共同研究者: 鎌田 武信, 上田 尚彦(大阪大学)

: 甲 性孝, 越智 聡(大阪大学)

## 1. 研究目的

糸球体メサングウム細胞は糸球体毛細血管を束ねる支持細胞であるだけでなく、その収縮や増殖により糸球体毛細血管の有効濾過面積を減少し、その結果限外濾過係数 (Kf) を低下させ、糸球体濾過値を低下させる作用を有する。最近、このメサングウム細胞の機能によって調節されているKfの低下がNa排泄量の低下を介した高血圧の発症や維持の主因として注目され始めている。すなわち、Kfの低下、つまりはGFR低下に伴うNa排泄量の低下を代償する機転として、糸球体毛細血管圧上昇、さらには血圧上昇がもたらされるとする考えであり、実際、高血圧のモデル動物である高血圧自然発症ラットで、高血圧の確立以前にKfの低下が報告されている。したがってメサングウム細胞の機能異常すなわちメサングウム細胞収縮や増殖の亢進が高血圧自然発症ラットでの高血圧の発生と維持に重要な役割を果たしている可能性があり、このモデル動物のメサングウム細胞機能について研究することはヒトでのNa排泄調節機構ならびに本態性高血圧の発症機序を解明し、本態性高血圧の新たな治療法開発につながることを期待される。そこで本研究では、高血圧自然発症ラットのメサングウム細胞を培養し、その増殖能の異常の有無について検討する。

## 2. 研究方法

## 2. 1 メサングウム細胞の培養

生後4週令のWistar-Kyoto rat (WKY)、stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) から腎を摘出し、皮質部分をペースト状にミンチした。皮質ミンチを#120のステンレスメッシュに押し通し、その通過成分を#200、#280の2種類のステンレスメッシュに通した。糸球体は#280メッシュ上に残るので、それを回収し、直径10cmの培養用プレート (Falcon, No.3003) に蒔いた (約5000個/プレート)。培養液として最終濃度20%となるように牛胎児血清 (FCS) を添加したRPMI1640を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95% air下で組織培養を行なった。最初の1週間は培地を交換せず、その後は週に2回の頻度で培地交換した。Sprague-Dawleyラットでの初代培

養と同様、培養開始後1~2週は敷石状配列を示す細胞の増殖が盛んであり、その後細胞質突起を有する矩形の大型な細胞の増殖が盛んとなり、この細胞が主体となる初代培養3週目に継代を実施した。メサンギウム細胞をphosphate-buffered saline(PBS)で洗浄した後、0.5mlの0.25%トリプシン溶液と37°Cで20分間インキュベートし、4.5mlの培養液を添加後ピペッティングにより細胞を剥離分散した。10分間の低速遠心後細胞を培養液に懸濁し#400のステンレスメッシュに通して細胞塊を除去し、継代した。さらに継代を進める場合は10cm培養プレートに $5 \times 10^5$  /プレートの密度で細胞を蒔き、細胞数の経時的測定、DNA合成の測定に使用する場合は96-multiwell culture plate (Costar, No.3596) に $10^4$ 細胞/wellの密度で継代した。なお、メサンギウム細胞であることの同定は位相差顕微鏡によるhill and valley様の増殖形態と豊富なstress fiberの存在、間接蛍光抗体法による抗desmin抗体反応陽性像から行なった。

## 2. 2 メサンギウム細胞の細胞増殖速度の測定

剥離分散した初代、2代、4代目のメサンギウム細胞を96-multiwell culture plate (Costar, No.3596) に $10^4$ 細胞/wellで蒔き、20%FCS存在下に細胞を培養し以後毎日well内の細胞数を測定した。メサンギウム細胞を $100 \mu\text{l}$ のphosphate-buffered saline(PBS)で2回洗浄後、 $50 \mu\text{l}$ の0.25%トリプシンと37°Cでインキュベートし、ピペッティングにより剥離分散した。細胞数はBurker-Turk計数盤で測定した。細胞倍加時間は細胞増加の対数的な時期から算出した。また、経時的に細胞数を測定しそれ以後増加の見られない時点を細胞がコンフルエントな状態とみなし、コンフルエント時の細胞数を求めた。

## 2. 3 メサンギウム細胞DNA合成のホルボールエステル反応性の測定

剥離分散した4代目のメサンギウム細胞を96-multiwell culture plate (Costar, No.3596) に $10^4$ 細胞/wellで蒔き、ほぼコンフルエントに生育後、 $^3\text{H}$ -thymidineの取り込みによりDNA合成を測定した。メサンギウム細胞をFCS無添加のRPMI1640中で3日間培養後、培地をphorbol myristate acetate (PMA) を溶解したRPMI溶液 $90 \mu\text{l}$ に置換し24時間後 $10 \mu\text{l}$ の $^3\text{H}$ -thymidine溶液 ( $10 \mu\text{Ci/ml}$ ) を添加した。さらに24時間のインキュベーション後、 $100 \mu\text{l}$ のPBSで2回洗浄し、 $100 \mu\text{l}$ の5% trichloroacetic acid (TCA)中氷上で30分間静置し、さらに $100 \mu\text{l}$ の5% TCAで1回洗浄後、 $50 \mu\text{l}$  1N NaOHを添加し細胞を溶解した。 $50 \mu\text{l}$  1N HClを添加し中和後、液体シンチレーションカクテルACSII 10ml中で $^3\text{H}$ 放射能を測定した。

## 2. 4 メサンギウム細胞DNA合成の血管作動性物質反応性の測定

2. 3で述べたのと同様な方法で96-multiwell culture plate (Costar, No.3596) にほぼコンフルエントに生育した5代目メサンギウム細胞を用いて $^3\text{H}$ -thymidineの取り込みに与える血管作動性物質の効果を調べた。2. 3でのPMAの代わりに、血管作動性物質であるアンジオテンシンII (Ang II)、アルギニンバズプレッシン (AVP) またはエンドセリン-1 (ET-1) を使用した。

なお、従来よりSprague-Dawley (SD) ラット由来培養メサンギウム細胞で増殖補助因子として使用されている低濃度FCSやインスリン、インスリン様成長因子などは添加しなかった。

## 2. 5 メサンギウム細胞DNA合成に対するCa拮抗薬マニジピンの効果の検討

2. 3で述べたのと同様な方法で96-multiwell culture plate (Costar, No.3596) にほぼコンフルエントに生育した5代目メサンギウム細胞を用いて<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みに与えるCa拮抗薬マニジピンの効果を調べた。FCS無添加のRPMI1640中で3日間培養後、10%FCSのある状態とならない状態でのマニジピンの影響を測定した。

## 2. 6 検定方法

結果は分散分析法とDunnett検定法により検定し、 $p<0.05$ の場合有意の差とした。

## 3. 研究結果

### 3. 1 メサンギウム細胞増殖速度の比較

2代目、3代目、5代目のSHRSPメサンギウム細胞とWKYメサンギウム細胞について20% FCS存在下での増殖速度を比較した。いずれの代数でもSHRSPメサンギウム細胞は同代数のWKYメサンギウム細胞に比して有意な細胞増殖の亢進を示した。Fig-1にその中で5代目メサンギウム細胞の増殖速度をWKYとSHRSPで比較した結果を示す。上段のFig-1Aは細胞の絶対数を示したものである。1日目では有意差はないもののすでにSHRSPメサンギウム細胞数がWKYメサンギウム細胞数より多く、2日目以後はSHRSPメサンギウム細胞数がWKYメサンギウム細胞数より有意に多かった。また下段のFig-1BはFig-1Aの1日目から4日目のWKY、SHRSPメサンギウム細胞数をそれぞれ1日目の細胞数に対するパーセントで表示したものであり、この場合は3日目以後WKYメサンギウム細胞よりSHRSPメサンギウム細胞の値が有意に大きかった。対数増殖期より細胞倍加時間を計算するとWKYメサンギウム細胞では29時間であるのに対してSHRSPメサンギウム細胞では23時間であり、SHRSPメサンギウム細胞の方が増殖サイクルが速かった。同様の検討を2代目細胞で行なった結果はWKYとSHRSPメサンギウム細胞それぞれ158時間と52時間であり、また3代目細胞ではそれぞれ98時間と40時間であり、代数にかかわらずSHRSPメサンギウム細胞の細胞倍加時間の方がWKYメサンギウム細胞に比して短いことが明らかとなった。また細胞倍加時間は継代を経るにつれてWKYメサンギウム細胞、SHRSPメサンギウム細胞ともに短くなり、その傾向は前者において大きいことが明らかとなった。さらに、細胞数の増加がみられなくなる時点をコンフルエントの状態と考え、コンフルエント時の細胞数を比較した。Fig-2がその結果で、検討した2、3、5代目のすべての代数でコンフルエント時の細胞数はWKYメサンギウム細胞に比してSHRSPメサンギウム細胞において有意に多かった。

### 3. 2 メサンギウム細胞DNA合成のホルボーラエステル反応性の測定

WKYならびにSHRSPメサンギウム細胞のPMAによるDNA合成促進反応を比較した (Fig-3)。WKY、SHRSPメサンギウム細胞のいずれにおいてもPMA濃度依存性にDNA合成の亢進が観察されたが、1~100ng/mlの濃度範囲のPMAで両者に有意な反応性の違いが認められた。すなわちWKYメサンギウム細胞では1、10ng/mlでは有意な亢進がなく100ng/mlで初めて有意な亢進が認められたのに対して、SHRSPメサンギウム細胞ではすでに1ng/mlでその亢進は有意であり、SHRSPメサンギウム細胞はWKYメサンギウム細胞に比しPMAに対する反応性の亢進があることが明らかとなった。

### 3. 3 メサンギウム細胞DNA合成の血管作動性物質反応性の測定

WKYならびにSHRSPメサンギウム細胞の血管作動性物質AII、AVP、ET-1によるDNA合成促進反応を比較した (Fig-4)。AIIはWKY、SHRSPメサンギウム細胞のいずれにおいても $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ Mの濃度範囲で有意なDNA合成促進反応を示さなかった。AVPはWKYメサンギウム細胞、SHRSPメサンギウム細胞の両者で有意なDNA合成反応の促進効果を示したが、その促進度はSHRSPメサンギウム細胞で有意に大であった。ET-1はWKYメサンギウム細胞ではDNA合成促進効果はなかったが、SHRSPメサンギウム細胞では $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ Mの濃度で有意なDNA合成促進効果を示した。

### 3. 4 メサンギウム細胞DNA合成に対するCa拮抗薬マニジピンの効果の検討

WKYならびにSHRSPメサンギウム細胞のDNA合成に対するCa拮抗薬マニジピンの効果を比較した (Fig-5)。まず、増殖刺激因子を添加しない状態でのマニジピン単独の効果を調べた結果がFig-5Aである。WKYメサンギウム細胞では $10^{-10}$ ~ $10^{-6}$ M、SHRSPメサンギウム細胞では $10^{-9}$ ~ $10^{-6}$ Mの濃度のマニジピンによりDNA合成反応の亢進が観察された。このDNA合成反応の亢進率はWKYメサンギウム細胞の方がSHRSPメサンギウム細胞よりも有意に大きかった。 $10^{-5}$ Mの濃度では両細胞でDNA合成反応は著明に抑制された。次に10%FCSを添加し増殖を刺激した実験条件でのマニジピンの効果を検討した。なお10%FCSにより $^3\text{H}$ -thymidineの取り込みはWKYメサンギウム細胞で5.2倍、SHRSPメサンギウム細胞で7.0倍に増加した。Fig-5BのようにWKYメサンギウム細胞では $10^{-11}$ ~ $10^{-6}$ Mのマニジピンにより有意な影響がないのに対して、SHRSPメサンギウム細胞において $10^{-9}$ ~ $10^{-6}$ Mのマニジピンにより濃度依存性にDNA合成が抑制された。 $10^{-5}$ Mマニジピンでは両細胞ともにDNA合成反応は著明に抑制された。

## 4. 考察

従来より高血圧自然発症ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞では正常血圧対照のWKY由来

の同細胞に比して増殖の亢進があることが報告されており、動脈硬化発生との関係より注目されてきた。大動脈平滑筋細胞培養系での細胞増殖の亢進は明瞭な高血圧の存在する時期である10週以後の高血圧自然発症ラットにおいて観察されるのみならず、4週令のような血圧の上昇が起り始めるラットにおいても存在することから血圧上昇による表現型の変化ではなく血圧上昇とは独立した特質、あるいはより積極的に血圧上昇の一因となりうる特質と考えられるに至っている。今回の我々の研究においても高血圧による表現型の変化を除外する目的で著明な血圧上昇のない4週令のSHRSPからメサンギウム細胞を培養し、正常血圧対照としての同週令WKY由来のメサンギウム細胞と細胞増殖反応性を比較した。

まず、著明な細胞増殖効果のあるFCSに対する細胞増殖反応を細胞数の測定により検討した。その結果、代数にかかわらずWKYメサンギウム細胞に比しSHRSPメサンギウム細胞の増殖反応が亢進していることが明らかとなった。ただし、継代数が増すとWKY、SHRSPいずれのメサンギウム細胞も細胞増殖が速くなり、特にこの傾向はWKYメサンギウム細胞においてより顕著に観察された。この傾向は培養血管平滑筋細胞での報告と同様であり、培養による細胞の脱分化も原因と考えられるが、単に継代に伴うより増殖能の高い細胞の選択が関係しているのかもしれない。さらに代数にかかわらずコンフルエント時の細胞数はSHRSPメサンギウム細胞で有意に多く、接触阻害にもWKYとSHRSP間で何らかの違いがあると考えられる。

さらに近年SDラット培養メサンギウム細胞の増殖因子として注目されている血管作動性物質であるAng II、AVP、ET-1に対する細胞増殖反応性をDNA合成測定により比較した。なお、実験条件を単純化するためにSDラット培養メサンギウム細胞で頻用される増殖補助因子としての低濃度FCS、インスリン、IGF-1は添加しなかった。この実験条件下ではWKYメサンギウム細胞はSDラットメサンギウム細胞での報告と同様Ang IIとET-1に対しては有意な増殖反応を示さなかったが、SHRSPメサンギウム細胞はAng IIには反応しないもののET-1に対しては著明な増殖反応を示した。また、AVPに対してはWKYメサンギウム細胞もSHRSPメサンギウム細胞も増殖反応を示したが前者よりも後方で反応の程度は強かった。このように、WKYとSHRSPのメサンギウム間で反応性の異なる原因としてそれぞれの血管作動性物質に対する受容体の発現レベルの違いは否定できない。さらに、これら血管作動性物質の共通の細胞内情報伝達酵素であるCキナーゼの活性化因子PMAに対する細胞増殖反応性の亢進がSHRSPメサンギウム細胞で認められたことはCキナーゼ自体の異常（量的、サブタイプの違い）またはCキナーゼよりDNA合成にまで至る経路の異常がSHRSPに存在し、血管作動性物質に対する反応性亢進の少なくとも一因を担っているものと考えられる。（結果には示さなかったが、PMA前処置によりSHRSPメサンギウム細胞におけるAVP、ET-1に対するDNA合成反応が完全に抑制されることを確認しており、SHRSPメサンギウム細胞においてCキナーゼがAVP、ET-1による細胞増殖の細胞内情報伝達に関与していると考えられる。）このようなPMAに対する反応性の亢進はspontaneously hypertensive rat (SHR)の大動脈の等尺性収縮反応においても報告され

ており、そこではCキナーゼの活性やホルボールエステル結合容量に SHRとWKYで差がみられないことからCキナーゼ以後の細胞内情報伝達機構の異常を提起している。さらに今後はCキナーゼのサブタイプやその転写調節の違いについても検討する必要がある。。

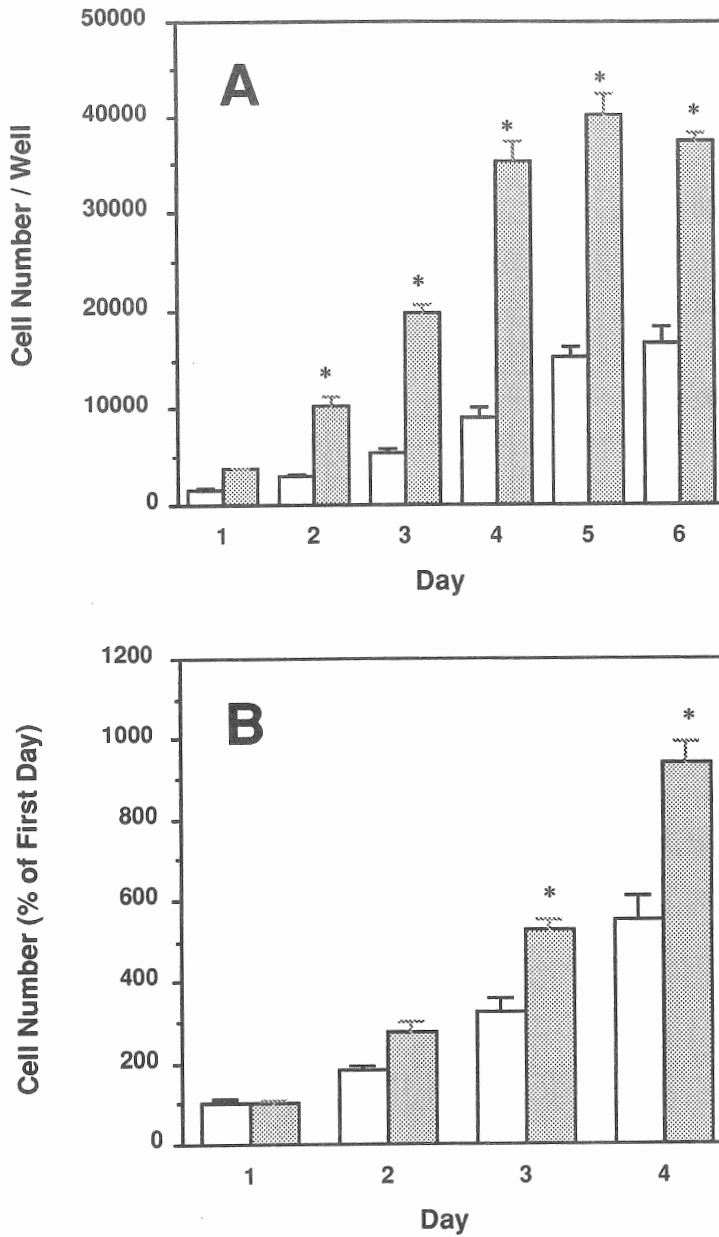
また、Ca拮抗薬マニジピンはFCSによるWKYの細胞増殖反応を抑制しないけれどもSHRSPメサンギウム細胞に対しては抑制的に作用した。細胞増殖におけるCa代謝に関与する電位依存性CaチャンネルのWKYとSHRSP間での違いを示唆するデータとして興味深い。ただここで注意すべきなのは細胞増殖因子を添加しない条件では、マニジピンによりWKY、SHRSPいずれにおいても逆にDNA合成が亢進し、その程度はWKYメサンギウム細胞において大きかった点である。この機序に関しては不明であるが、程度の差はあれnifedipine、nitrendipineによっても同様な傾向が観察され、少なくともdihydropyridine系のCa拮抗薬に共通の作用と考えられる。電位依存性Caチャンネル以外の作用点も含め、Ca拮抗薬の作用機序は今後さらに検討の必要性がある。

今回の我々の検討により、殆ど血圧上昇のみられない4週令SHRSPより培養したメサンギウム細胞に細胞増殖能の亢進が確認された。このことは、血管平滑筋細胞と同様、SHRSPにおけるメサンギウム細胞の増殖能亢進は高血圧による二次的な表現型の変化ではなく遺伝的に規定された性質であることを示している。血管抵抗の上昇を招く血管平滑筋細胞増殖と同様、メサンギウム細胞の増殖は糸球体濾過機能の低下によるNa貯留をきたして高血圧の発生に関与する可能性があり、今後メサンギウム細胞増殖亢進をきたす遺伝的因子の解明が本態性高血圧の原因の究明に重要な鍵となるものと期待される。さらにCa拮抗薬がSHRSPメサンギウム細胞の増殖を抑制する効果があり、高血圧の進展抑制におけるその有用性についても今後の実験動物レベルならびに臨床レベルでの検討が期待される。

## 5. 今後の課題

今回細胞培養系において、SHRSPメサンギウム細胞の増殖はWKYメサンギウム細胞に比べて有意に亢進していることを明らかとし得た。今後の課題は高血圧がまだ確立していない時期、たとえばKfの低下が報告されている時期である6週令に、*in situ*でメサンギウム細胞の増殖が実際に起こっていることを確認することが重要である。さらに生後初期よりSHRSPに薬剤を投与してメサンギウム細胞の増殖のみを抑制した際に高血圧の発生が阻止され得るか否かを検討することにより、SHRSPでの高血圧発生におけるメサンギウム細胞増殖の役割を明らかとすることも必要である。そのためには実験動物でメサンギウム細胞の増殖を選択的に調節可能な手法の確立が待たれる。





**Fig-1 Enhanced Growth of SHRSP Mesangial Cells Compared to WKY Mesangial Cells.**

Number of fourth-passaged mesangial cells was counted after subculture. Data were shown as percent of first day in B. □ WKY; ▨ SHRSP. Mean+SEM. \* : p<0.01 vs WKY.

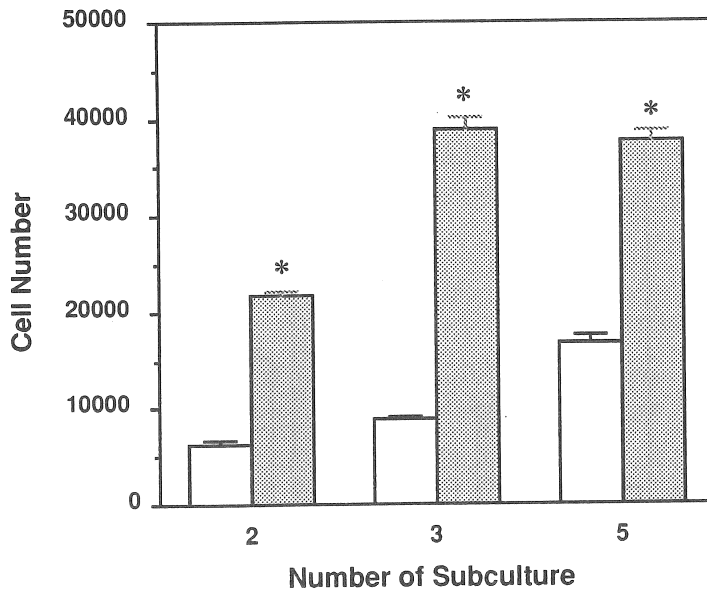


Fig-2 Cell Number at Confluence of Various Passages.   
 □ WKY; ▨ SHRSP. Mean±SEM. \* : p<0.01 vs WKY.

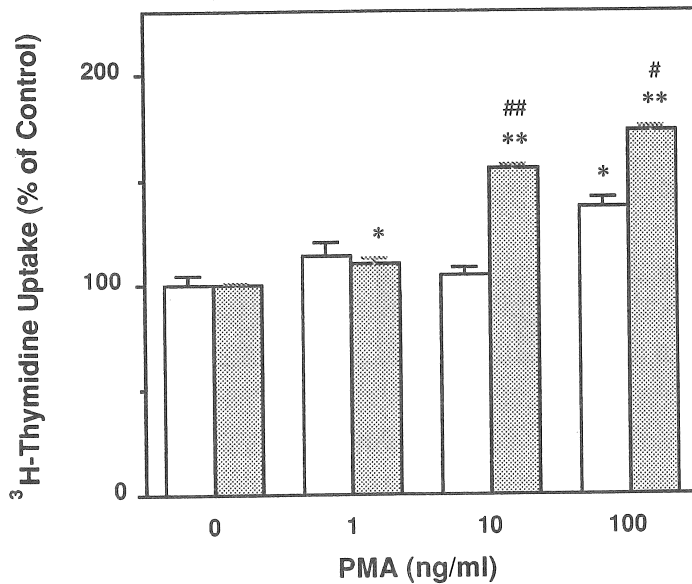


Fig-3 Effect of PMA on <sup>3</sup>H-Thymidine Uptake in WKY and SHRSP Mesangial Cells.   
 □ WKY; ▨ SHRSP. Mean±SEM. \* : p<0.05 vs without PMA; \*\* : p<0.01 vs without PMA; # : p<0.05 vs WKY; ## : p<0.01 vs WKY.

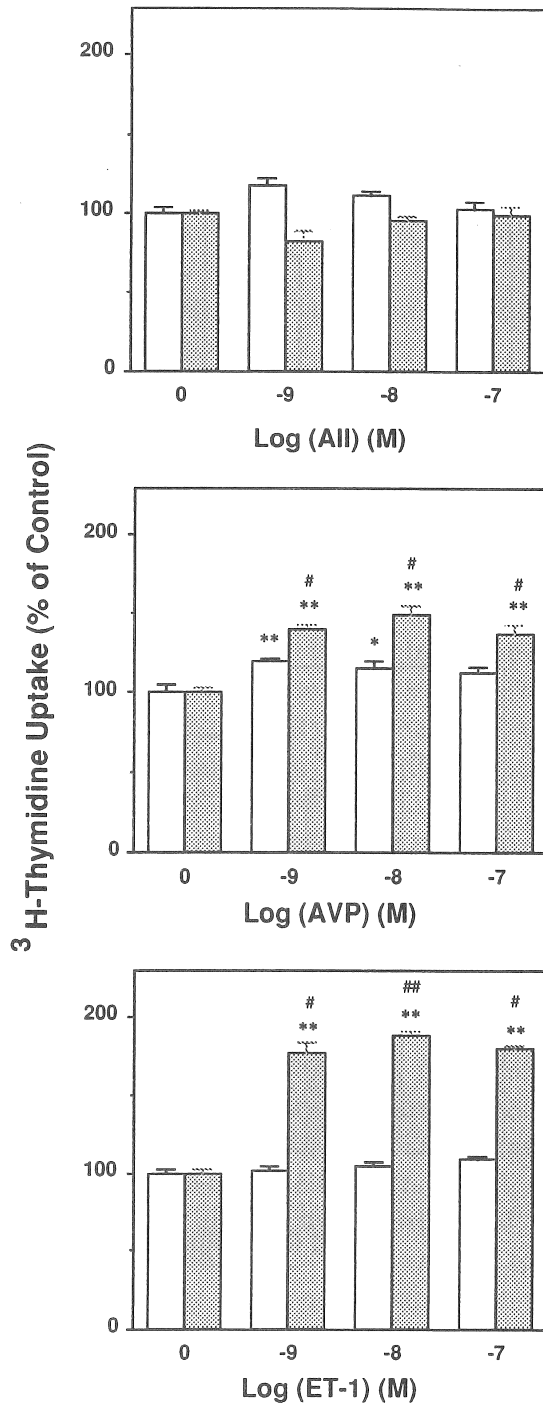
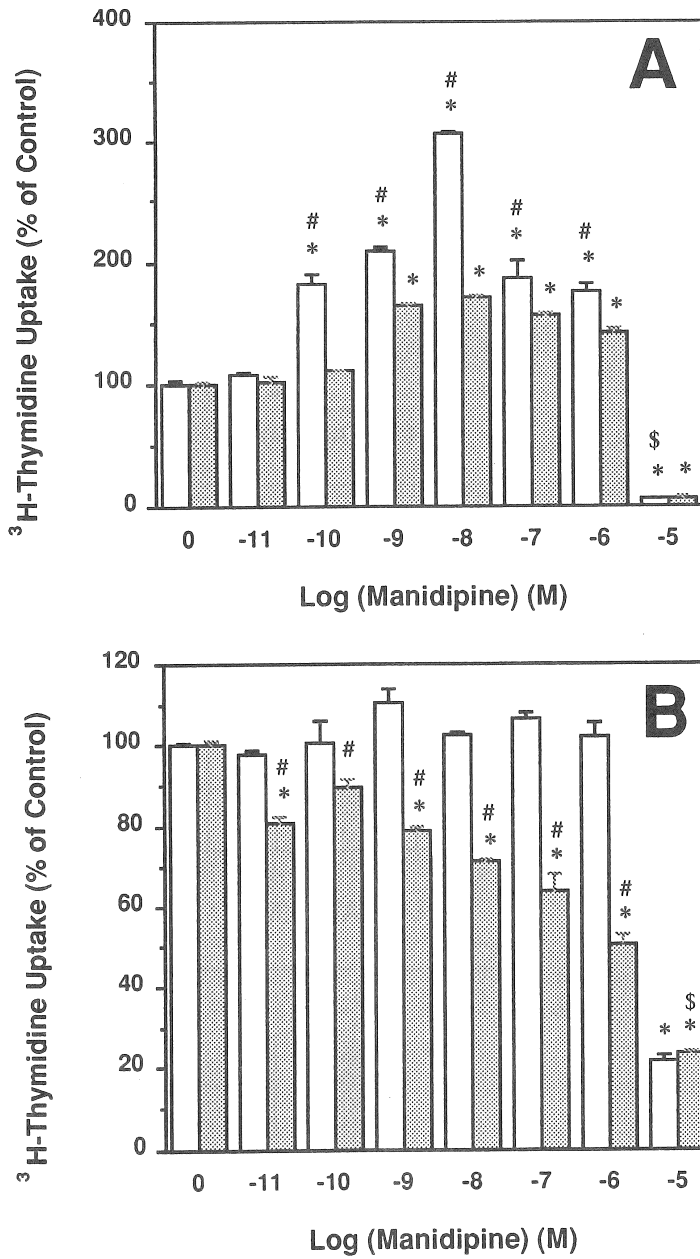


Fig-4 Effect of Various Vasoactive Peptides on <sup>3</sup>H-Thymidine Uptake in WKY and SHRSP Mesangial Cells.

□ WKY; ▨ SHRSP. Mean+SEM. \* : p<0.05 vs without ligand; \*\* : p<0.01 vs without ligand; # : p<0.05 vs WKY; ## : p<0.01 vs WKY.



**Fig-5 Effect of Manidipine on <sup>3</sup>H-Thymidine Uptake in WKY and SHRSP Mesangial Cells.**

<sup>3</sup>H-Thymidine uptake was measured in the absence (A) or presence (B) of 10% FCS. □ WKY; ▨ SHRSP. Mean+SEM. \* :p<0.01 vs without manidipine ; #:p<0.01 vs another strain ; \$: p<0.05 vs another strain.

## The Research about Mesangial Cell Function Abnormality which may be involved in The Development of Hypertension through Decreased Salt Excretion

Yoshihiro Fujiwara<sup>1</sup>, Satoshi Ochi<sup>2</sup>, SungHyo Shin<sup>1</sup>,  
Naohiko Ueda<sup>1</sup>, Takenobu Kamada<sup>1</sup>,

*1 First Department of Medicine, Osaka University  
Medical School*

*2 Medical Science of Health, 2nd Division, Osaka  
University*

### Summary

Mesangial cells play an important part in physiological and pathophysiological regulation of glomerular filtration, a main determinant of salt excretion. To explore the involvement of deranged mesangial cell functions in the pathogenesis of hypertension, the growth activity of mesangial cells was compared in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) and Wistar-Kyoto rats (WKY). Upon exposure to fetal calf serum, arginine vasopressin, or endothelin-1, the growth response was significantly higher in mesangial cells cultured from glomeruli of 4-week old SHRSP than in those of age-matched WKY. SHRSP mesangial cells showed higher growth in response to phorbol myristate acetate than WKY cells, which indicates the abnormality of protein kinase C (PKC) and/or post-PKC signal transduction mechanism in SHRSP mesangial cells. It is considered that this contributes at least in part to the enhanced response to above-mentioned vasoactive peptides in SHRSP mesangial cells. Abnormally high growth of SHRSP mesangial cells in the presence of fetal calf serum was significantly inhibited by dihydropyridine calcium antagonist, manidipine. Calcium antagonist may prevent or delay the development of hypertension not only through vasodilation but also through inhibition of mesangial cell growth. Furthermore, by slowing mesangial cell proliferation, calcium antagonist also may slow the progression of hypertension-induced glomerular sclerosis.