

9844 細胞内Ca²⁺濃度増加に伴う膜電位及び膜イオン電導度変化のSHRSP由来メサンギウム細胞による検討

助成研究者：家森 幸男 (京都大学大学院 人間・環境学研究所)
 共同研究者：池田 克己 (京都大学大学院 人間・環境学研究所)
 沢村 誠 (京都大学大学院 人間・環境学研究所)
 上田 俊二 (京都大学大学院 医学部 第一内科)
 中川 清 (京都大学大学院 人間・環境学研究所)

血圧の調節に直接関与するのは細胞外液量であり、その電解質組成の大部分はNaClから成る。そして生体が体内のNaCl量を調節するメカニズムは主として腎臓での排泄量の調節により行われており、その腎の血圧調節機構の一つとして尿細管糸球体フィードバック(TGF)がある。このTGFの発現メカニズムにはCl⁻の重要性が数多く報告されている。このTGFの異常が自然発症高血圧ラット(SHR)等の高血圧モデルラットで生じており、しかもGFR調節に関与するメサンギウム細胞においても細胞外Cl⁻の変化による反応性の異常がSHR等の高血圧モデルラットで報告されている。そこで高血圧ならびに高血圧性腎障害におけるメサンギウム細胞の役割を明らかにするため、遺伝的に重症高血圧ならびに高度腎合併症を発症するSHRSP/Izm、および遺伝的背景の近い正常血圧のWKY/Izmよりメサンギウム細胞を単離して、細胞内Ca²⁺濃度変化による膜電位と膜イオン電導度に対する影響を検討した。

腎糸球体メサンギウム細胞は、10~12週齢雄性のSHRSP/Izm(以下SP)及びWKY/Izm(以下W)から単離し、20%FCS/RPMI1640で培養した。本実験では、基本的に2代目までの細胞を用いた。膜電位と膜イオン電導度測定は、Patch clamp全細胞記録法を用いて測定した。細胞内Ca²⁺濃度増加は、5 μMのイオノマイシン刺激により引き起こした。

本実験においてWKYのCa²⁺依存性Cl⁻チャネルの存在が示されたが、SP由来細胞では、Ca依存性Cl⁻チャネルの存在は示されなかった。この結果は、SP由来メサンギウム細胞での細胞外Cl⁻濃度による感受性の欠損報告があることから、極めて注目すべきことである。またCa²⁺依存性K⁺チャネルがSP由来細胞で示されたが、WKY由来細胞では示されなかった。本研究により、細胞内Ca²⁺の上昇でSP由来メサンギウム細胞は、WKY由来細胞と異なるチャネル活性化の存在が示唆された。このことは、ヒト高血圧と同様の進展機序を示すSPにおいて、高血圧の進展が、本来持つ糸球体制御機構における異常性との関与の可能性を示唆している。

9844 細胞内Ca²⁺濃度増加に伴う膜電位及び膜イオン電導度変化のSHRSP由来メサンギウム細胞による検討

助成研究者：家森 幸男 (京都大学大学院 人間・環境学研究科)
共同研究者：池田 克己 (京都大学大学院 人間・環境学研究科)
 沢村 誠 (京都大学大学院 人間・環境学研究科)
 上田 俊二 (京都大学大学院 医学部 第一内科)
 中川 清 (京都大学大学院 人間・環境学研究科)

1. 研究目的

血圧の調節に直接関与するのは細胞外液量であり、その電解質組成の大部分はNaClから成る。そして生体が体内のNaCl量を調節するメカニズムは主として腎臓での排泄量の調節により行われており、その腎の血圧調節機構の一つとして尿細管糸球体フィードバック (TGF) がある。このTGF機構には、メサンギウム細胞の収縮、弛緩による糸球体濾過率 (GFR) の調節が重要な役割を果たしている (1, 2)。このTGFの発現メカニズムにはCl⁻の重要性が数多く報告されている。このTGFの異常が自然発症高血圧ラット (SHR) 等の高血圧モデルラットで生じており、しかもGFR調節に関与するメサンギウム細胞においても細胞外Cl⁻の変化による反応性の異常がSHR等の高血圧モデルラットで報告されている (3, 4)。SHR由来メサンギウム細胞のこのような異常はTGF異常、体液量の異常を介した高血圧発症の普遍的なメカニズムである可能性がある。

当研究室では遺伝的に高血圧を発症する高血圧自然発症ラット (SHR) (5) の中でも食塩負荷によって高血圧が重篤化する脳卒中易発症ラット (SHRSP) (6, 7) を開発し、さらにSHRSPのメサンギウム細胞の培養に成功して遺伝的食塩感受性のメカニズムを細胞分子生物学的に追及して来た。そこで高血圧ならびに高血圧性腎障害におけるメサンギウム細胞の役割を明らかにするため、遺伝的に重症高血圧ならびに高度腎合併症を発症するSHRSP/Izm、および遺伝的背景の近い正常血圧のWKY/Izmよりメサンギウム細胞を単離して、細胞内Ca²⁺濃度変化による膜電位と膜イオン電導度に対する影響を検討した。

2. 研究方法

2. 1 ラット由来腎糸球体メサンギウム細胞の初代培養

腎糸球体メサンギウム細胞は、10~12週齢雄性 (体重約170~200g) のSHRSP/Izm (以下SP) 及びWKY/Izm (以下WKY) から単離し、20% FCS/RPMI

1640で培養した（8）。本実験では、基本的に2代目までの細胞を用いた。

2. 2. 1 パッチクランプ記録法

膜電位と膜イオン電導度測定は、Patch clamp全細胞記録法を用いて測定した（9, 10）。膜電気容量は、電気的に補正した。細胞内Ca²⁺上昇における膜電流の変化を測定するため、0.5秒間隔で、かつ異なる電位（-80,-40,0mV）を交互にパルス刺激した。また刺激反応時には、-40mVの固定電位に-120~40mV（20mV間隔）幅で500msのステップ電圧パルスを刺激した。細胞内Ca²⁺濃度増加は、5 μMのイオノマイシン刺激により引き起こした。

2. 2. 2 溶液

細胞外溶液（mM）・・・140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 5 グルコース。NaOHでpH 7.3に調整。

細胞内溶液（mM）・・・140 KCl, 2 MgCl₂, 0.5 EGTA, 10 HEPES, 2 Na₂ATP, 0.05 Li₄GTP。KOHでpH 7.2に調整。

2. 2. 3 統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。統計学的検定はStudentの*t* testの方法で行った。

3. 研究結果

無刺激時の膜電位（V_m）は、WKY、SP由来細胞それぞれにおいて-32.1±5.4mV（n=7）、-32.2±5.0mV（n=6）を示し、両系統で有意な差は見られなかった。

またイオノマイシン刺激時の膜電位（V_m）は、WKY、SP由来細胞それぞれにおいて-9.2±3.7mV（n=7）、-70.5±2.8mV（n=6）を示し、両系統においては有意な差が見られた（Table 1）。

イオノマイシンによる細胞内のCaの上昇は、WKY由来細胞において、内向きの電流の著明な増加を引き起こしたが（-3.9±2.3 pA/pF → -42.1±4.1 pA/pF）、外向きの電流では変化が見られなかった（-2.2±1.2 pA/pF → -0.4±2.2 pA/pF）（Table 1）。

一方、SP由来細胞における内向きの電流は変化を示さなかったが（-3.7±2.2 pA/pF → -4.1±2.1 pA/pF）、外向きの電流に対しては著明な増加を引き起こした（-2.2±1.2 pA/pF → -26.8±3.5 pA/pF）（Table 1）。

Figure.1はWKY由来メサンギウム細胞の電流トレースを示す。Figure.1で明らかなように、イオノマイシン刺激による内向き電流で顕著な増加を示したが、外向き電流に対しては変化を示さなかった (Figure.1 top panel)。コントロールにおける電流トレースと電流・電圧曲線は、それぞれFigure.1 A,Cに示す。またイオノマイシン刺激時は、Figure.1 B,Dに示す。イオノマイシン刺激下の電流応答は、内向き電流が電圧及び時間依存的に抑制された。また逆転電位が右にシフトし、0mVに移行を示した。これらの結果は、細胞内のCa²⁺の上昇が、WKY由来メサンギウム細胞においてCl⁻チャネルの活性化を誘導したことを示す。

Figure.2はSP由来メサンギウム細胞の電流トレースを示す。Figure.2で明らかなように、イオノマイシン刺激による内向き電流での変化は示さなかったが、外向き電流においては顕著な増加を示した (Figure.2 top panel)。Figure.1と同様に、コントロールにおける電流トレースと電流・電位曲線は、それぞれFigure.2 A,Cに示す。またイオノマイシン刺激時は、Figure.2 B,Dに示す。逆転電位はイオノマイシン刺激下で左にシフトし、-65mVに移行を示した。この結果は、イオノマイシン誘導の外向き電流が、SP由来細胞においてK電流であることを示す。

4. 考察

Okudaらは、angiotensin IIやバソプレッシンによる一過性の細胞内Ca²⁺の上昇をWKY及びSHR由来メサンギウム細胞で報告している (11)。本研究では、細胞内Ca²⁺の上昇をカルシウム・イオノファーであるイオノマイシンを用い、膜電位と全細胞電流を検討した。細胞内Ca²⁺の上昇により、内向き電流はWKY由来細胞で有意に活性化し、外向き電流においてはSP由来細胞で有意に活性化させた。内向き電流は、K⁺の平衡電位に近い電位 (-80mV) で測定されていることと、電位依存性の活性化が示されていることから、Cl⁻電流の存在を現している。また外向き電流は、Cl⁻の平衡電位 (0mV) で測定され、時間及び電位非依存性であることから、K⁺電流の存在を現している。

本研究において、静止膜電位は両系統で有意な差が見られなかった。この結果は、以前より出されているパッチ・クランプ法を用いた報告に一致する (12, 13, 14, 15)。

Cl⁻は糸球体濾過のTGF機構調節で重要な役割を示している事は知られている (16)。Cl⁻チャネル活性化による膜脱分極は、血管収縮剤によるメサンギウム細胞の包括的な生理反応のなかで重要な役割が果たされていると言える (17, 18, 19)。また幾つか

のグループが、メサングウム細胞及び血管平滑筋細胞を用い、 Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルについて報告しており(20, 21)、 Cl^- チャネルの活性化に伴う脱分極がカルシウム情報伝達を調節していることを示している。本研究では、WKYにおいてCa依存性 Cl^- チャネルの存在が示された。しかし、SP由来細胞では、 Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルの存在が見られなかった。この結果は、SP由来メサングウム細胞での細胞外 Cl^- 濃度による感受性の欠損報告(11)があることから、極めて注目すべきことである。

一方、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルがSP由来細胞で示されたが、WKY由来細胞では示されなかった。Matsunagaらは、ウイスター系のメサングウム細胞において、細胞内 Ca^{2+} 上昇に伴う40 pS K^+ チャネルの存在をパッチクランプ法を用いて示している(22)。また、Stockand J.D.らは、ヒト由来メサングウム細胞において、 Ca^{2+} 感受性 K^+ チャネルの存在を言及している(23)。これは両者ともイオノマイシンによる細胞内 Ca^{2+} の増加により、細胞膜電位で過分極していることと一致していると思われる。本細胞における特徴についてまだ不明瞭な部分はあるが、根本的な機能は、おそらく以前より出されている K^+ チャネルの報告に類似していると思われる。

本研究により、細胞内 Ca^{2+} の上昇でSP由来メサングウム細胞は、WKY由来細胞と異なるチャネル活性化の存在が示唆された。このことは、ヒト高血圧と同様の進展機序を示すSPにおいて、高血圧の進展が、本来持つ糸球体制御機構における異常性との関与の可能性を示唆している。

5. 文献

1. Ito, S., and Abe, K. (1997) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **24**, 532-5.
2. Goligorsky, M.S., Iijima, K., Krivenko, Y., Tsukahara, H., Hu, Y., and Moore, L.C. (1997) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **24**, 527-31.
3. Daniels, F.H., Arendshorst, W.J., and Roberds, R.G. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, F1479-F1489.
4. Boberg, U., and Persson, A.E. (1986) *Am. J. Physiol.* **250**, F967-F974.
5. Okamoto, K., and Aoki, K. (1963) *Jpn. Circ. J.* **27**, 282-293.
6. Okamoto, K., Yamori, Y., and Nagaoka, A. (1974) *Circ. Res.* **34/35**, Suppl. 1, 143-153.
7. Yamori, Y. (1994) in *Handbook of Hypertension* (Ganten, G. and W. de Jong, eds.) **16**, pp. 346-364, Elsevier, Amsterdam.
8. Yaoita, E., Kazama, T., Kawasaki, K., Miyazaki, S., Yamamoto, T., and Kihara, I. (1985) *Virchows Arch.* **49**, 285-294.

9. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981) *Pflügers Arch.* **391**, 85-100.
10. Imada, S.Y., Kotera, T., Ueda, S., and Okuma, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 437-441.
11. Okuda, T., Inishi, Y., Arakawa, T. Ohara, M., and Kurokawa, K. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**, F586-F591.
12. Gloy, J., Greger, R., Schollmeyer, P., Huber, M., and Pavenstadt, H. (1994) *Ren. Physiol. Biochem.* **17**, 62-72.
13. Ling, B.N, Matsunaga, H., Ma, H., and Eaton, D.C. (1995) *Kidney Int.* **48**, 1158-1166.
14. Pavenstadt, H., Glory, J., Leipziger, J., Klar, B., Pfeilschifter, J., Schollmeyer, P., and Greger, R. (1993) *Br. J. Pharmacol.* **109**, 953-959.
15. Pavenstadt, H., Ruh, J., Greger, R., and Schollmeyer, P. (1994) *Br. J. Pharmacol.* **113**, 7-12.
16. Schnermann, J., Ploth, D.W., and Hermle, M. (1976) *Pflügers Arch.* **362**, 229-240.
17. Kremer, S.G., Breuer, W.V., and Skorecki, K.L. (1989) *J. Cell Physiol.* **138**, 97-105.
18. Okuda, T., Kojima, I., Ogata, E., and Kurokawa, K. (1989) *J. Clin. Invest.* **84**, 1866-1872
19. Okuda, T., Yamashita, N., and Kurokawa, K. (1986) *J. Clin. Invest.* **78**, 1443-1448.
20. Kremer, S.G., Zeng, W., Sridhara, S., and Skorecki, K.L. (1992) *Am. J. Physiol.* **262**, F668-F678.
21. Kurokawa, K. (1993) *Ren. Physiol. Biochem.* **16**, 15-20.
22. Matsunaga, H., Yamashita, N., Miyajima, Y., Okuda, T., Chang, H., Ogata, E., and Kurokawa, K. (1991) *Am. J. Physiol.* **261**, F808-F814.
23. Stockand, J.D., and Sansom, S.C. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, C1080-C1086.

Table 1 Effects of ionomycin on the membrane potential and whole-cell current measured at 0 mV and -80 mV in MC from WKY and SHRSP rats.

		Control	Stimulated
WKY n=6	V _m (mV)	-32.1 ± 5.4*	-9.2 ± 3.7*
	I _m (pA/pF)	0 mV	0.4 ± 2.2
		-80 mV	-3.9 ± 2.3*
SHRSP n=7	V _m (mV)	-32.2 ± 5.0*	-70.5 ± 2.8*
	I _m (pA/pF)	0 mV	26.8 ± 3.5*
		-80 mV	-3.7 ± 2.2

V_m: membrane potential I_m: whole-cell current *P<0.005

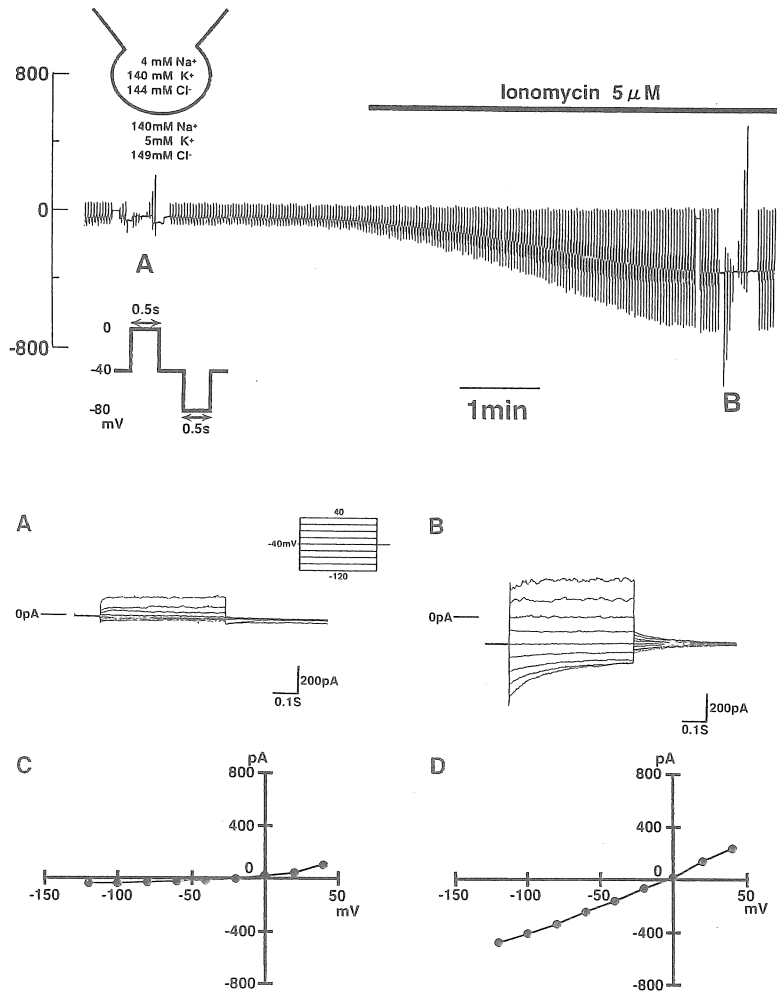


Figure.1 Effect of ionomycin on whole-cell currents of MC from WKY rats. Superfusion with ionomycin (5 μM) increased Cl⁻ (downward deflection) currents (Top Panel). Current profiles were recorded over a range from -120 to 60 mV before (A) and during (B) application of ionomycin. The current-voltage relationships shown in C and D, respectively correspond to A and B.

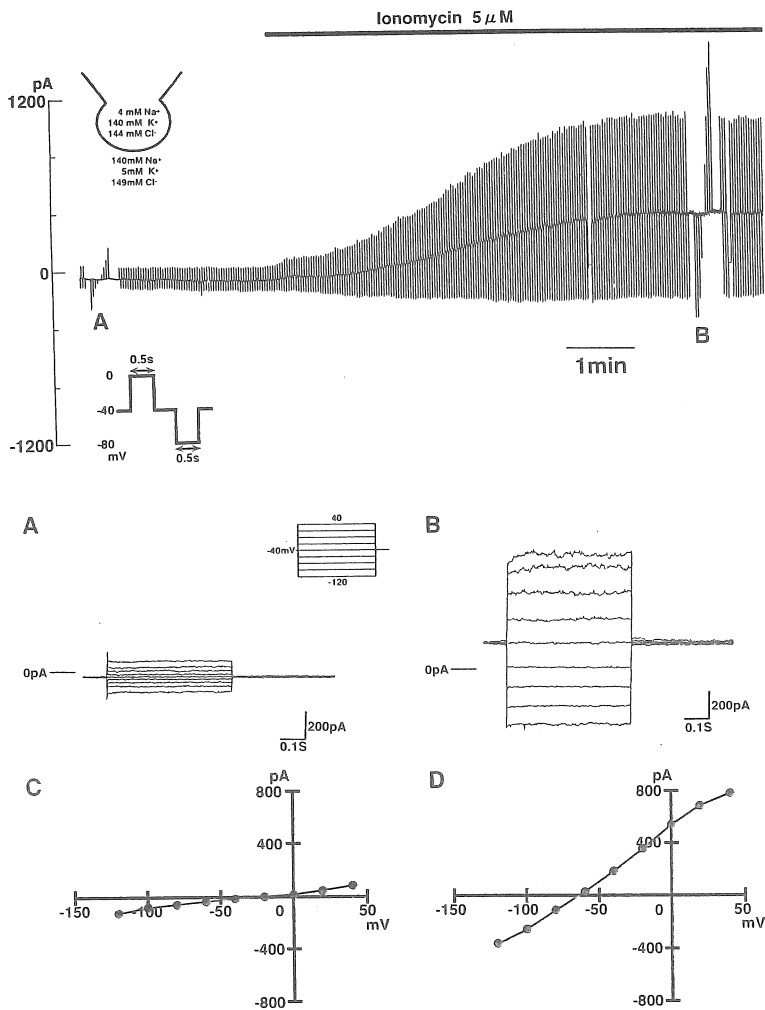


Figure.2 Effect of ionomycin on whole-cell currents of MC from SHRSP rats. Super-fusion with ionomycin ($5 \mu\text{M}$) increased K^+ (upward deflection) currents (Top Panel). Current profiles are shown before (A) and during (B) application of ionomycin. Current-voltage relationships shown in C and D, respectively correspond to A and B.

Effects of Cytosolic Ca^{2+} on Membrane Voltage and Conductance of Rat Renal Mesangial Cells from Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats

Yukio Yamori, Katsumi Ikeda, Makoto Sawamura, *Shunji Ueda and Kiyoshi Nakagawa
Graduate School Human & Environmental studies, *First Department of Internal Medicine,
Kyoto University

Summary

Although abnormalities in renal hemodynamics may be critically involved in the pathogenesis of hypertension, intrarenal regulation of glomerular filtration dynamics in genetic hypertension is poorly understood. Cl^- was recently indicated as an important mediator of tubuloglomerular feedback (TGF) regulation of glomerular filtration by distal tubular flow, and Ca^{2+} activated Cl^- channels were detected in mesangial cells by a patch-clamp method. The purpose of this study was to characterize the effects of cytosolic Ca^{2+} on membrane voltage and conductance of MC using stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) and Wistar Kyoto rats (WKY).

Mesangial cells were obtained from 11-wk-old SHRSP/Izm and WKY/Izm by culturing isolated glomeruli in RPMI1640 medium containing 20% fetal calf serum (FCS), as described previously. And we used mesangial cells under the primary culture. We applied the patch-clamp technique in the whole-cell configuration to measure the membrane voltage (V_m) and conductance (gm) of two strain cells. The cytosolic Ca^{2+} increase was induced by $5 \mu M$ ionomycin that was Ca^{2+} ionophore.

There was no significant difference in resting V_m values between MC from WKY and SHRSP. The cytosolic Ca^{2+} increase induced membrane depolarization and the increase of Cl^- currents in MC from WKY but not in MC from SHRSP. On the other hand, the Ca^{2+} increase induced membrane hyperpolarization and the increase of K^+ currents in MC from SHRSP but not in MC from WKY.

In conclusion, SHRSP-MC are under different regulations from WKY-MC. This may be related to abnormal regulation of glomerular function associated with the intrinsic renal mechanism of hypertension development in SHRSP suggesting the involvement of a similar mechanism in human hypertension.