

Title	正常および糖尿病モデルラットの傍系球体細胞におけるレニン産生・分泌に及ぼす圧負荷の影響
Sub Title	
Author	廣田, 展久(Hirota, Nobuhisa) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.3 (2005. 9) ,p.T269- T283
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050901-0269

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

正常および糖尿病モデルラットの傍糸球体細胞における
レニン産生・分泌に及ぼす圧負荷の影響

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

ひろ た のぶ ひさ
廣 田 展 久

(平成 16 年 12 月 17 日受付)

Key Words : renin, juxtaglomerular cells, transmural pressure, phospholipase, streptozotocin

レニンは、343 個のアミノ酸からなる蛋白であり、肝臓で主に産生されるアンジオテンシノーゲンをアンジオテンシン I に変換する酵素である。アンジオテンシン I はさらに、主に肺に存在するアンジオテンシン変換酵素によって生理活性を有するアンジオテンシン II に変換されるが、レニンはこれら一連のレニン・アンジオテンシン系の活性を規定する最も重要な酵素である。レニンは、腎臓の傍糸球体 (JG) 細胞に存在するレニン遺伝子より産生された 406 個のアミノ酸からなるプレプロレニンが細胞内顆粒中で splicing enzymes の作用により 386 個のアミノ酸からなるプロレニンになり、さらには 43 個のアミノ酸がはずれて活性レニンとなる。活性レニンを有する細胞内顆粒は成熟顆粒と呼ばれ、exocytosis により活性レニンを細胞外へ分泌し、循環血中のレニン・アンジオテンシン系の賦活化に関与する。したがって、JG 細胞でレニン前駆体が産生されて活性レニンとして循環血中で作用するまでには、大きく分けて 2 つの段階、つまりプレプロレニン・プロレニンから活性レニンへのプロセッシングと活性レニンの細胞外への分泌が存在する。

1959 年に Tobian¹⁾ は、腎灌流圧と JG 細胞内成熟顆粒の間に、負の相関関係が存在することを発見した (圧負荷をかけた JG 細胞では、細胞内成熟顆粒の減少を認めた)。それ以来、圧負荷とレニン産生・分泌に関する研究が行われ、急速な動脈圧の上昇 (急性圧負荷) は、JG 細胞からのレニン分泌を抑制し、慢性圧負荷は JG 細胞からのレニン分泌のみならず、細胞内プロレニンの活性レニンへのプロセッシングも抑制することが示された²⁾。さらに、慢性圧負荷による JG 細胞における

レニン産生・分泌調節機序に細胞内カルシウム動員に関連する機構が重要な役割を担うことが示唆されている³⁾。

本研究では、正常または糖尿病ラットより採取した JG 細胞において、慢性圧負荷がレニン産生・分泌に与える影響とそれに関与するカルシウム関連機序について検討した。糖尿病患者におけるレニン・アンジオテンシン系の最も顕著な異常は、血中レニンの減少と血中プロレニンの増加であり³⁾、血中プロレニンの増加は糖尿病性微小血管障害の発症に関与する可能性を示唆する報告がある⁴⁾⁵⁾。一方、糖尿病患者では、降圧薬の種類に関係無く降圧そのものが血管合併症のリスクを減じることが明らかにされている⁶⁾⁷⁾⁸⁾。したがって、糖尿病病態において、慢性圧負荷のレニン産生・分泌への影響とその機序を解析することは、十分な降圧が糖尿病性血管合併症の発症を抑制するかを解明する鍵となる可能性がある。

腎動脈圧の上昇は、血管壁に対し垂直方向および正接方向の機械的圧力を生じ、各々 transmural pressure, shear stress (ずり応力) と呼ばれる。Shear stress は血管内皮細胞の nitric oxide 産生・放出を刺激する⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾。Nitric oxide は、急性期にはレニン分泌を抑制するが、慢性期にはレニン分泌を刺激する¹³⁾。ゆえに、shear stress による nitric oxide 増加は圧によるレニン分泌調節に関与していると考えられた¹⁴⁾¹⁵⁾。一方、transmural pressure は培養血管内皮細胞からの nitric oxide 放出を抑制することが示されている¹⁶⁾ ので、この機構を介してレニン分泌を調節すると考えられた。しかし、transmural pressure は血管壁に対し正接した緊張を引き起こす。この結果 stretch (伸展力) を生じさせる。現在までに、培養ラット JG 細胞において、20 時

間の伸展刺激がレニン分泌を抑制したことが描かれている¹⁷⁾。しかしながら、伸展刺激より分離された trans-mural pressure を得ることが技術的に困難であったため、純粋な trans-mural pressure によるレニン分泌調節への直接影響は解明されていない。

本研究では、shear stress や stretch の影響を極力除いた、壁に垂直に働く圧力 (trans-mural pressure) が JG 細胞のレニン産生・分泌におよぼす影響を検討した。さらに、phospholipase C (以下 PLC と略す) や phospholipase D (以下 PLD と略す) は血管作動性物質による細胞内カルシウム動員の second messenger であることが知られているので¹⁸⁾¹⁹⁾、本研究ではこの機序を PLC 阻害薬・PLD 阻害薬を用いて検討した。

方 法

本研究は慶應義塾大学医学部動物実験委員会のガイドラインに準拠し、これを遵守した。

1. 糖尿病および正常対照ラットの作成

糖尿病モデルおよびその正常対照モデルの作成のために、4週齢の雄 Sprague-Dawley ラットにストレプトゾトシン (Wako, Osaka, Japan) 65 mg/kg を含むクエン酸緩衝液 10 mmol/L またはストレプトゾトシンを含まないクエン酸緩衝液 10 mmol/L をそれぞれ腹腔内注射した。腹腔内注射後7日または28日経過した時点で早期および慢性期糖尿病モデルとして実験に供した。全てのラットは、温度管理され12時間明暗周期のあるケージ内で、飲水制限無く110 μmol/g のナトリウムを含む研究室用飼料にて飼育され、糖尿病の発症は腹腔内注射後、7日目と28日目における血糖値 300 mg/dl 以上をもって確認した。

2. JG 細胞の分離と初代培養

1回の初代培養細胞作成に付き、10匹の雄 Sprague-Dawley ラット (体重 100-150 g) の腎臓を 15 ml の緩衝液 A (1 g glucose, 12.11 g sucrose, 2.2 g NaHCO₃, 2.6 mmol/L L-glutamine, 0.84 g sodium citrate, 10 mg/L bovine serum albumin を含む Hank's balanced salt solution) で灌流した後摘出した。その髄質を取り除き、皮質を 1 mm³ 大にスライスして 0.25% trypsin (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) と 0.1% の collagenase A (from Clostridium histolyticum, Boehringer, Mannheim, Germany) を含む緩衝液 B (sodium citrate を含まない緩衝液 A) 内に置き、ゆっ

くり攪拌しながら 5% CO₂, 37°C に保たれた培養器内に 120 分置いた。それを 22 μm のナイロンメッシュで濾過し、分離された細胞を収集した。これを 50 G で 10 分間 5 mmol/L N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (以下 HEPES と略す) 緩衝液と L-glutamine を含む RPMI1640 にて遠心し 2 度洗浄した。さらに JG 細胞収集のため 35 ml の 25% Percoll 液にて 20000 G, 20 分間遠心し JG 細胞を分離した²⁰⁾²¹⁾。分離した JG 細胞は、その細胞数を血球算定盤 (Coulter counter; Coulter, Miami, USA) を用いて算定した後、8 ウェル培養スライドに 1 ウェル当たり 10⁶ cells/ml になるように分注され、実験前 48 時間を 37°C で、25 mmol/L HEPES 緩衝液, 0.3 g/L L-glutamine, 100 μg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 0.66 U/L insulin, 10% fetal bovine serum を含む RPMI1640 下で培養された。本研究で用いられた初代培養 JG 細胞のレニン陽性率は、細胞分離 60 時間後において 92 ± 2% であった (n=6)。

3. 細胞への圧負荷

あらかじめ 37°C に加温された圧負荷装置 (model DV-5-ST; Advantec Toyo) 内に、分離後 48 時間初代培養された JG 細胞を含む 8 ウェル培養スライドを置いた。圧負荷装置を密閉後、バルブに接続した三方活栓を通してヘリウムガスで加圧し、三方活栓の另一端に接続した水銀柱で内圧を監視し圧負荷を一定に保った。最後に圧負荷装置全体を 37°C に保たれた培養器内に静置し、ずり応力 (shear stress) や伸展力 (stretch) の影響を極力除いた、壁に垂直に働く圧力 (trans-mural pressure) を 12 時間負荷することにより、慢性的な圧負荷効果を評価した。なぜならば、予備実験において 3 時間の大気圧 (atmospheric pressure; 以下 AP と略す) および AP+40 mmHg の加圧では、レニン分泌率に有意差を認めなかった (7.9 ± 3.2%, 7.2 ± 3.5%, n=4) 一方、12 時間圧負荷は有意な変化を起こしたからである。加圧の間、培養液酸素分圧および pH は各々 155 ± 4 mmHg, 7.4 ± 0.1 に保たれていた。本研究において、trans-mural pressure 負荷は、AP および AP+40 mmHg にて行った。0 mmHg の加圧は大気圧を意味し、培養細胞にかけられた trans-mural pressure は *in vivo* での腎灌流圧を反映するものではない。ゆえに本研究は、大気圧下での trans-mural pressure 負荷が、JG 細胞のレニン産生・分泌に与える影響を検討したものである。また、圧の増加量 40 mmHg は、正常血圧者 (120/80 mmHg) と明らかな高血圧患者 (180/100

mmHg)における平均血圧の差(約 40 mmHg)が腎輸入細動脈レベルまで維持されたと仮定して設定され、実際に分離された腎臓において、腎灌流圧を 40 mmHg から 80 mmHg へ 40 mmHg 上昇させたとき、レニン分泌が著明に減少し、灌流圧を更に上昇させても、それ以上の減少を認めなかった。また、初代培養されたラット JG 細胞は confluent でないため、stretch や shear stress は技術上困難であり、transmural pressure を用いて圧による影響を検討した。各群は少なくとも 2 ウェル以上で構成され、測定された指標の平均値を結果として採用した。

4. レニン分泌率・プロレニン分泌率・細胞内活性レニン濃度・細胞内プロレニン濃度・細胞内総レニン濃度の測定

分離後 48 時間培養した JG 細胞は、培養液を除去し加温されたリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: 以下 PBS と略す) で 2 度洗浄を行った後、1 ml の Ca^{2+} 含有 PBS と共に圧負荷装置内に置かれた。この際、実験開始前 (0 hr) と後 (12 hr) の細胞を含む緩衝液は採取・遠心され、上清はレニン分泌率 (renin secretion rate: 以下 RSR と略す)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: 以下 PRSR と略す) 算出のために $-20^{\circ}C$ で保存された。また、12 時間圧負荷装置内に置かれた細胞は PBS で洗浄された後、細胞内活性レニン濃度 (active renin content: 以下 ARC と略す)・細胞内プロレニン濃度 (不活性レニン; prorenin content: 以下 PRC と略す)・細胞内総レニン濃度 (活性+不活性レニン; total renin content: 以下 TRC と略す) 測定のため、液体窒素で凍結し $-80^{\circ}C$ で保存された。凍結細胞は 1 ml の緩衝液 (pH: 6.0; 2.6 mmol/L ethylenediaminetetraacetate, 1.6 mmol/L dimercaprol, 3.4 mmol/L 8-hydroxyquinoline sulfate, 0.2 mmol/L phenylmethyl sulfonyl fluoride, 5 mmol/L ammonium acetate を含む) で溶解され 12000 G で 30 分遠心後、上清が採取された。TRC は検体内の不活性レニンを活性化し、全レニン活性を測定することにより求めた。実際には、上清検体 (900 μ l) を $0^{\circ}C$ 下で、4 mg/ml trypsin を含む 500 mmol/L Tris 緩衝液 (pH: 7.5; 5 mmol/L $CaCl_2$, 0.1% NaCl azide, 1% bovine serum albumin を含む) 100 μ l で処理し、60 分後に trypsin inhibitor (最終濃度 8 mg/ml; Sigma Chemical Co.) を加え反応を停止した。レニン活性は、両側腎摘出術後 24 時間経過した Sprague-Dawley ラットの血漿をレニン基質として検

体に加え、 $37^{\circ}C$ で 1 時間静置し、アンジオテンシノーゲンをアンジオテンシン I に変換する酵素活性をもって測定し、アンジオテンシン I は、radioimmunoassay (Dinabott Radioisotope Institute, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

RSR (%) は、以下の式を用いて、細胞に由来した全活性レニンのうち緩衝液中に分泌された活性レニンの比率を計算し求めた; $(12 \text{ 時間後の緩衝液中レニン活性} - 0 \text{ 時間での緩衝液中レニン活性}) / (12 \text{ 時間後の細胞内活性レニン濃度} + 12 \text{ 時間後の緩衝液中レニン活性} - 0 \text{ 時間での緩衝液中レニン活性})$ 。PRSR (%) は、以下の式を用いて、細胞に由来した不活性レニンのうち緩衝液中に分泌された不活性レニンの比率を計算し求めた; $(12 \text{ 時間後の緩衝液中不活性レニン活性} - 0 \text{ 時間の緩衝液中不活性レニン活性}) / (12 \text{ 時間後の細胞内不活性レニン濃度} + 12 \text{ 時間後の緩衝液中不活性レニン活性} - 0 \text{ 時間の緩衝液中不活性レニン活性})$ 。緩衝液中不活性レニン活性は、緩衝液中総レニン活性から活性レニン活性を引いた値として算出し、細胞内不活性レニン濃度は、細胞内総レニン濃度から活性レニン濃度を引いた値として算出した。

5. 実験プロトコール

実験 1. 正常および早期糖尿病モデルから分離した JG 細胞において慢性圧負荷がレニン産生・分泌におよぼす影響。

クエン酸緩衝液またはストレプトゾトシン (65 mg/kg) を腹腔内注射し、7 日経過した正常対照または糖尿病ラットより採取した JG 細胞を、12 時間の AP および AP+40 mmHg の環境下に置き、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRC を測定した。

実験 2. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞において慢性圧負荷がレニン産生・分泌におよぼす影響。

クエン酸緩衝液またはストレプトゾトシン (65 mg/kg) を腹腔内注射し、28 日経過した正常対照または糖尿病ラットより採取した JG 細胞を、12 時間の AP および AP+40 mmHg の環境下に置き、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRC を測定した。

実験 3. インスリン治療された慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞において慢性圧負荷がレニン産生・分泌におよぼす影響。

血糖上昇効果以外のストレプトゾトシンの直接作用が、

慢性圧負荷によるプロレニン活性化・分泌調節に影響をおよぼした可能性を検討するため、浸透圧ミニポンプ (model 2004; Alzet, Palo Alto, USA) を頸部背側と腹部の皮下に移植し、レギュラーインスリン (9 U/kg/day, Novolin R; Novo Nordisc Pharma, Tokyo, Japan) による治療を4週間行った。血糖コントロール状況を確認するため、血糖値を週2回測定した。28日経過後、同ラットより採取したJG細胞を、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの環境下に置き、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。

実験4. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離したJG細胞において慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節におけるPLC依存性経路の検討。

クエン酸緩衝液を腹腔内注射し28日経過した正常対照モデルラットより採取したJG細胞を、PLC阻害薬であるU73122 (10 μmol/L; Sigma Chemical Co.) と不活性アナログであるU73343 (10 μmol/L; Sigma Chemical Co.) を含む緩衝液に置き、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの負荷の後、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。また同細胞を、別のPLC阻害薬である2-nitro-4-carboxyphenyl-N, N-diphenyl-carbamate 200 μmol/L (以下NCDCと略す, Sigma Chemical Co.) を含む緩衝液に置き、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの負荷の後、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。さらに、ストレプトゾトシン (65 mg/kg) を腹腔内注射し28日経過した糖尿病モデルラットより採取したJG細胞においても同様に、200 μmol/LのNCDCを含む緩衝液に細胞を置き、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの負荷の後、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。本実験で用いた濃度のNCDCおよびU73122は、アンジオテンシン

II負荷や灌流圧上昇に対する輸入細動脈収縮反応を有意に抑制した^{22) 23)}。

実験5. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離したJG細胞において慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節におけるPLD依存性経路の検討。

生理食塩水またはストレプトゾトシン (65 mg/kg) を腹腔内注射し、28日経過した正常対照および糖尿病モデルラットより採取したJG細胞を、PLD阻害薬である4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride 100 μmol/L (以下AEBSFと略す, Sigma Chemical Co.) を含む緩衝液またはコントロール緩衝液に置き、12時間のAPおよびAP+40 mmHgの負荷の後、RSR, PRSR, ARC, PRC, TRCを測定した。In vitroの研究で、AEBSFはPLC, phospholipase A2活性に影響を及ぼすことなくPLD活性を阻害し、そのIC50は75 μmol/Lであることが示されている²⁴⁾。

6. 統計学的解析

すべての測定値は、平均±標準誤差で表した。統計学的解析にはtwo-way ANOVAを用いて群間比較を行った後、Scheffe's F-testを行った。P<0.05を統計学的有意差ありとした。

結 果

1. 正常および早期糖尿病モデルから分離したJG細胞への慢性圧負荷のレニン産生・分泌におよぼす影響。

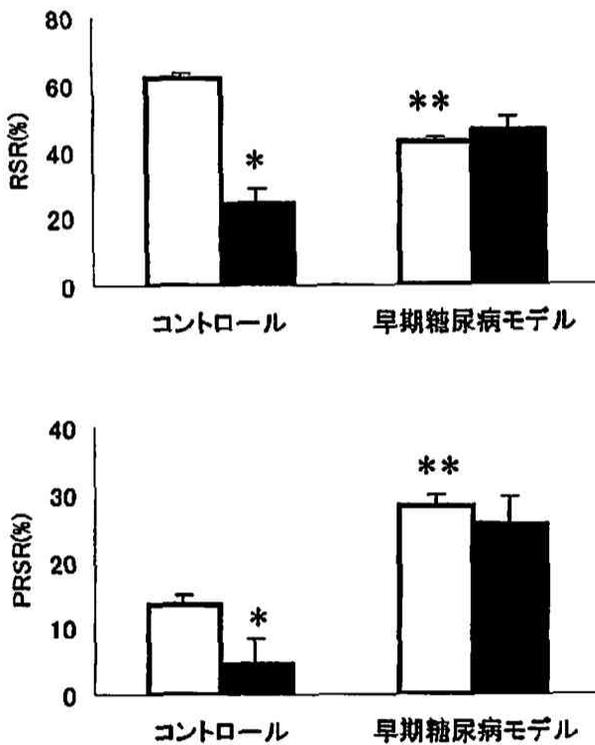
表1で示すように、ストレプトゾトシン腹腔内注射7日後の早期糖尿病モデルラットは、正常対照ラットに比べ低体重・高血糖であったが、収縮期血圧・尿蛋白量は両群間で差を認めなかった。

第1表 コントロールおよびストレプトゾトシン注射による糖尿病モデルラットの体重, 血圧, 尿蛋白量, 血糖値

モデル	体重 (g)	血圧 (mmHg)	尿蛋白量 (mg/day)	血糖 (mg/dl)
腹腔内注射後7日				
コントロール (n=6)	149±5	120±2	11.3±3.3	122±7
糖尿病 (n=6)	120±12*	116±2	14.9±0.8	362±24*
腹腔内注射後28日				
コントロール (n=6)	294±6	119±2	15.5±1.4	122±6
糖尿病 (n=6)	211±9*	118±2	34.8±4.0*	370±16*

平均±標準誤差で表した。*p<0.05 vs. コントロール (Hirota N et al: Hypertens Res 26: 493-501, 2003のTable1.を許可を得て改変, 転載)

第1図は、正常対照ラットおよび早期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷による RSR, PRSR の変化を示したものである。正常対照ラット JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷により、RSR が 61.8 ± 1.3 から $24.4 \pm 4.4\%$ へ、PRSR が 13.6 ± 1.5 から $4.5 \pm 1.5\%$ へ有意に減少した。一方、早期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の RSR は $42.5 \pm 3.5\%$ であり、正常対照ラット JG 細胞と比較し、有意に低値であった。また、大気圧下の PRSR は $28.3 \pm 4.0\%$ であり、正常対照ラット JG 細胞と比較し、有意に高値であった。早期糖尿病モデルラット JG 細胞の RSR, PRSR は共に、40 mmHg の慢性圧負荷によって変化せず、圧負荷後の RSR, PRSR はそれぞれ $45.9 \pm 3.7\%$ と $25.5 \pm 3.1\%$ であった。以上より、早期糖尿病モデルラットにおいて、慢性圧負荷による RSR, PRSR



第1図 正常対照ラットおよび早期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate : RSR)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate : PRSR) におよぼす影響。

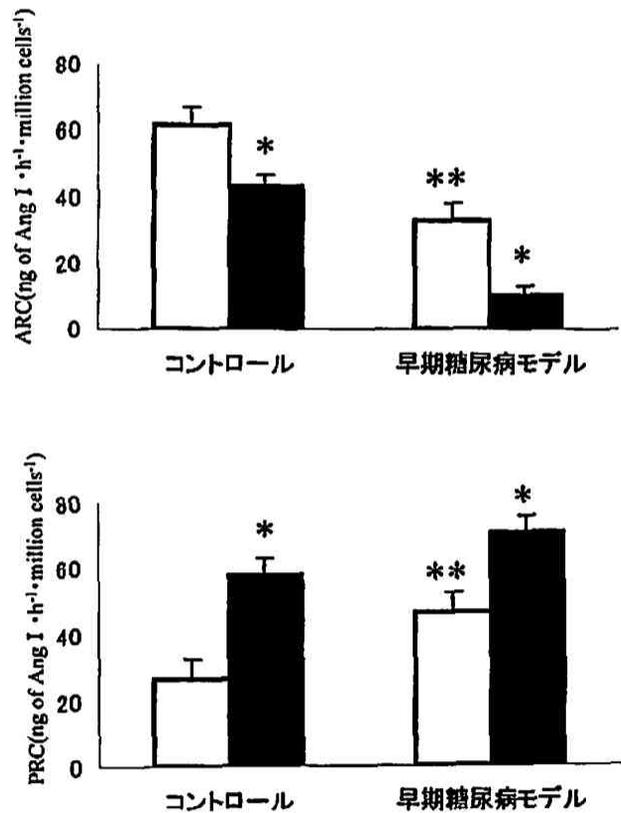
□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。

* $p < 0.05$ vs. 大気圧. ** $p < 0.05$ vs. コントロール大気圧.

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 1. を許可を得て改変, 転載)

減少反応が阻害されていることが明らかにされた。

第2図は、正常対照ラットおよび早期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷による ARC, PRC の変化を示したものである。正常対照ラット JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷により、ARC が 61.8 ± 4.9 から 43.3 ± 4.1 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に減少し、PRC は 26.7 ± 5.9 から 57.3 ± 7.0 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に増加した。早期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の ARC は 32.7 ± 3.1 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ と、正常対照ラット JG 細胞と比較し有意に低値



第2図 正常対照ラットおよび早期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷が細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC)、細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

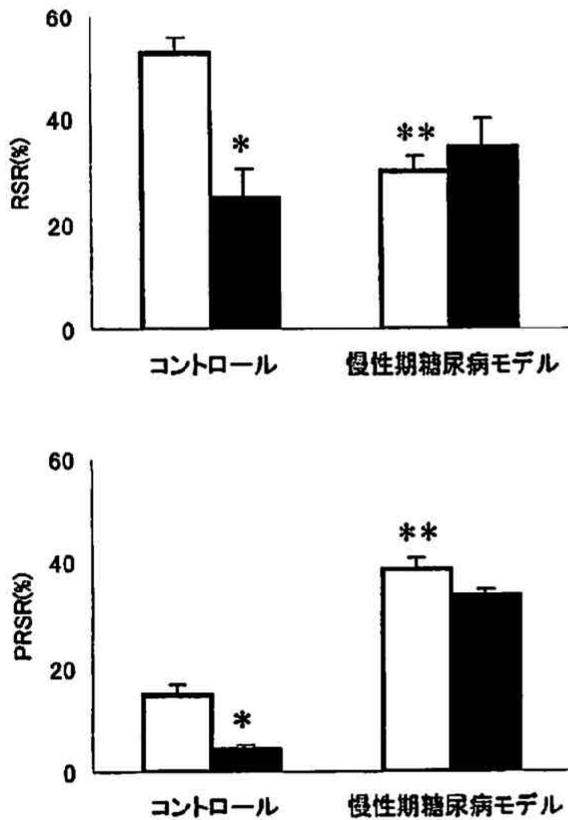
□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。

* $p < 0.05$ vs. 大気圧. ** $p < 0.05$ vs. コントロール大気圧.

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 2. を許可を得て改変, 転載)

であり、大気圧下の PRC は 46.4 ± 5.5 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ と、正常対照ラット JG 細胞と比較し有意に高値であった。大気圧に加えた 40 mmHg の慢性圧負荷は、ARC を 9.6 ± 1.4 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に減少させた。この慢性圧負荷による ARC の減少度 (23.8 ± 3.1 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹) は、正常対照ラット JG 細胞における ARC の減少度 (19.2 ± 5.2 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹) と同様であった。早期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧に加えた 40 mmHg の慢性圧負荷は、PRC を 70.1 ± 4.2 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に増加させ、この圧負荷による PRC の増加度

(23.7 ± 3.5 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹) は、正常対照ラット JG 細胞における PRC の増加度 (30.7 ± 6.3 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹) と同様であった。また、正常対照および早期糖尿病モデルラット JG 細胞間で、大気圧下の TRC に差はなく、いずれの JG 細胞においても 40 mmHg の慢性圧負荷によって TRC は変化しなかった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、早期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

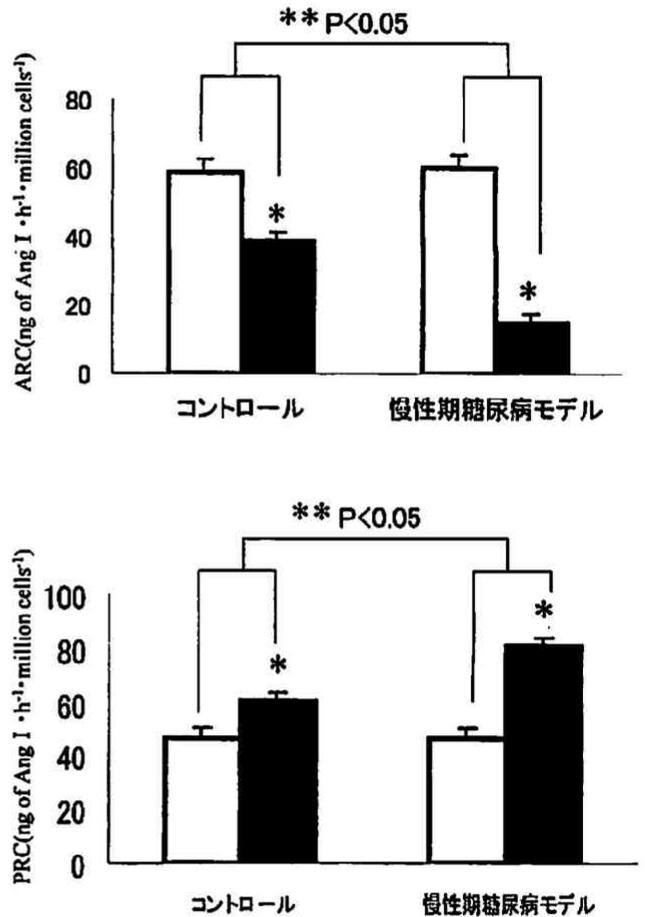


第3図 正常対照ラットおよび慢性糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate : RSR)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate : PRSR) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。

*p<0.05 vs. 大気圧. **p<0.05 vs. コントロール大気圧.

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 3. を許可を得て改変, 転載)



第4図 正常対照ラットおよび慢性糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷が細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC)、細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。

*p<0.05 vs. 大気圧. **p<0.05 vs. コントロールにおける圧負荷変化量.

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 4. を許可を得て改変, 転載)

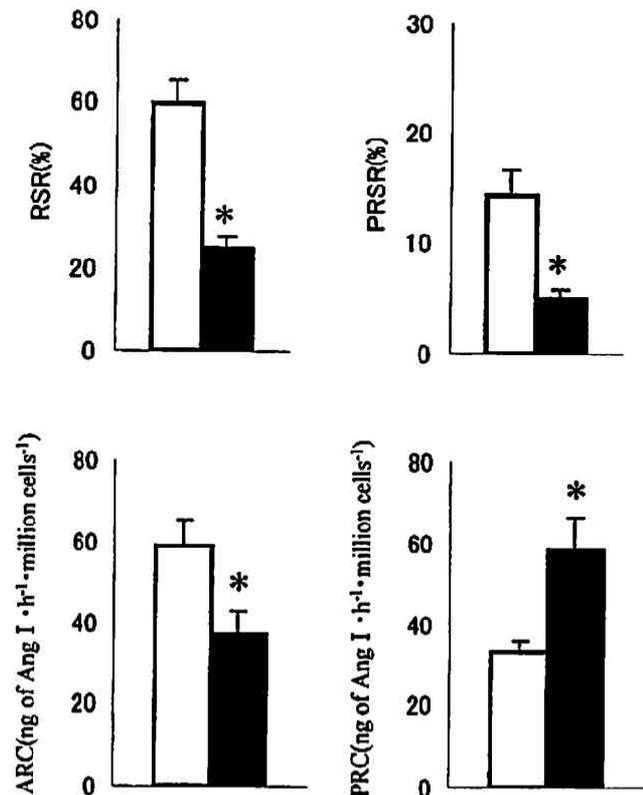
2. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞への慢性圧負荷のレニン産生・分泌におよぼす影響。

表 1 で示すように、ストレプトゾトシン腹腔内注射 28 日後の慢性期糖尿病モデルラットは、正常対照ラットに比べ低体重・高血糖・高蛋白尿であったが、収縮期血圧は両群間で差を認めなかった。

第 3 図は、正常対照ラットおよび慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷による RSR, PRSR の変化を示したものである。正常対照ラット JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷により、RSR が 52.8 ± 2.9 から $24.9 \pm 5.4\%$ へ、PRSR が 14.9 ± 2.2 から $4.1 \pm 1.0\%$ へ有意に減少した。一方、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の RSR は $29.9 \pm 3.1\%$ とコントロールラット JG 細胞と比較し有意に低値であり、大気圧下の PRSR は $38.7 \pm 4.0\%$ と正常対照ラット JG 細胞と比較し、有意に高値であった。慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、RSR, PRSR は共に 40 mmHg の慢性圧負荷によって変化せず、負荷後それぞれ $34.7 \pm 5.2\%$, $34.0 \pm 4.4\%$ であった。以上より、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞においても、慢性圧負荷による RSR, PRSR 減少反応が抑制されていることが示された。

第 4 図は、正常対照ラットおよび慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷による ARC, PRC への影響を示したものである。正常対照ラット JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷により、ARC が 58.5 ± 4.2 から 38.9 ± 2.2 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に減少し、PRC は 46.7 ± 4.4 から 60.7 ± 3.5 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に増加した。慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の ARC は 59.7 ± 6.2 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ であり、正常対照ラット JG 細胞と有意差を認めなかった。大気圧に加えた 40 mmHg の慢性圧負荷は、ARC を 15.1 ± 1.6 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に減少させ、この ARC の減少度 (44.5 ± 5.1 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹) は、正常対照ラット JG 細胞における ARC の減少度 (19.5 ± 4.2 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹) と比較し有意に大きかった。また、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、大気圧下の PRC は 46.7 ± 12.2 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ であり、正常対照ラット JG 細胞と同様であった。大気圧に加えた 40 mmHg の慢性圧負荷は、PRC を 80.7 ± 18.5 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に増加させ、この PRC の増加度 (34.1 ± 4.6 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹) は、正常対照

ラット JG 細胞における PRC の増加度 (14.0 ± 2.6 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹) と比較し有意に大きかった。以上より、慢性期糖尿病モデル JG 細胞では、慢性圧負荷による ARC の減少と PRC の増加が増強されていることが示された。また、大気圧下の TRC は、コントロールおよび慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞間に差を認めなかった。また、正常対照および慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞間で、大気圧下の TRC に差はなく、いずれの JG 細胞においても 40 mmHg の慢性圧負荷によって TRC は変化しなかった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。



第 5 図 インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate : RSR)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate : PRSR)、細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC)、細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ vs. 大気圧。

(Hirota N et al : Hypertens Res 26 : 493-501, 2003 の Fig. 5. を許可を得て改変、転載)

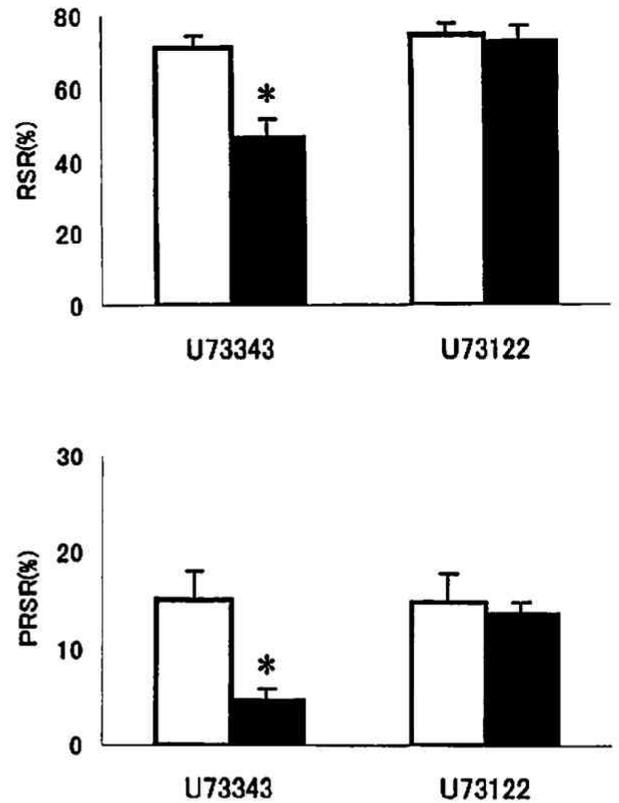
3. インスリン治療された慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞への慢性圧負荷のレニン産生・分泌におよぼす影響。

インスリンで治療された慢性期糖尿病モデルラットの血糖値は、4 週の間 124 ± 5 mg/dl (85-171 mg/dl に分布) であり、正常対照ラットの血糖値 108 ± 7 mg/dl (89-133 mg/dl に分布) と差を認めなかった。また、その体重・収縮期血圧・尿蛋白量は、それぞれ 280 ± 4 g, 115 ± 3 mmHg, 14.4 ± 1.4 mg/day であった。

第5図は、インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞における、12 時間の圧負荷が RSR, PRSR, ARC, PRC に及ぼす影響を示したものである。インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、大気圧に加えた 40 mmHg の 12 時間圧負荷は、RSR を 59.8 ± 5.2 から $24.5 \pm 2.8\%$ へ減少させ、PRSR を 14.3 ± 2.2 から $4.8 \pm 0.9\%$ へ減少させ、ARC を 58.5 ± 6.7 から 36.8 ± 5.7 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へ減少させ、PRC を 32.8 ± 2.6 から 58.0 ± 7.9 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へ増加させた。また、インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、慢性圧負荷は TRC に影響をおよぼさなかった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、インスリン治療された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

4. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞への慢性圧負荷のレニン産生・分泌調節における PLC 依存性経路の検討。

第6図は、正常ラットから採取した JG 細胞において、細胞を PLC 阻害薬である U73122 およびこの不活性アナログである U73343 (各 10 μ mol/L) で前処置した後、12 時間の圧負荷による RSR, PRSR を示したものである。大気圧下の RSR は U73122 および U73343 処置間で有意差を認めず、U73343 で前処置した JG 細胞では、40 mmHg の圧負荷により、RSR が $70.8 \pm 3.2\%$ から $46.5 \pm 4.6\%$ へ有意に減少した。一方、U73122 で前処置した JG 細胞では、RSR は 40 mmHg の慢性圧負荷による影響を受けず、大気圧下で $73.9 \pm 3.9\%$ 、大気圧+40 mmHg 下で $72.4 \pm 3.5\%$ であった。また、大気圧下の PRSR は U73122 および U73343 処置間で有意差を認めず、U73343 で前処置した JG 細胞では、40 mmHg の圧負荷により、PRSR が $15.1 \pm 2.9\%$ から $4.7 \pm 1.2\%$ へ有意に減少した。一方、U73122 で前処置した JG 細胞では、PRSR は 40 mmHg の慢性圧負荷に



第6図 正常ラットより採取した JG 細胞において、PLC 阻害薬である U73122, および不活性アナログである U73343 存在下で、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate: RSR), プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: PRSR) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg, 平均±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ vs. 大気圧。

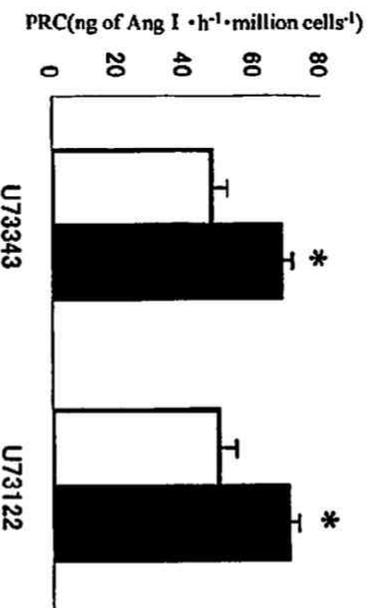
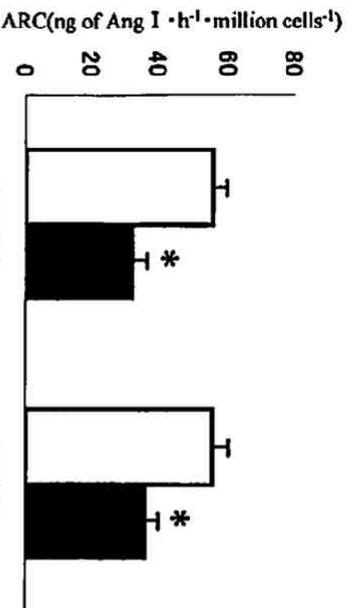
(Hirota N et al: Hypertension 39[part 2]: 363-367, 2002 の Fig. 2. の一部を許可を得て改変, 転載)

よる影響を受けず、大気圧下で $14.9 \pm 3.1\%$ 、大気圧+40 mmHg 下で $13.6 \pm 2.8\%$ であった。これら結果から、U73122 前処置による PLC 阻害は、慢性圧負荷によるレニンやプロレニンの分泌抑制を阻害すると考えられた。

第7図は、正常ラットから採取した JG 細胞において、細胞を PLC 阻害薬である U73122 およびこの不活性アナログである U73343 (各 10 μ mol/L) で前処置した後、12 時間の圧負荷による ARC, PRC を示したものである。U73343 前処置 JG 細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷は、ARC を 55.4 ± 4.4 から 31.9 ± 4.3 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へ減少させ、U73122 前処置 JG 細胞においても 55.5 ± 1.9 から 35.6 ± 2.0 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へ減少させた。これら慢性

荷前後でそれぞれ 107.0 ± 11.1 と 109.4 ± 17.1 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹であった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、U73343 前処置または U73122 前処置 JG細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

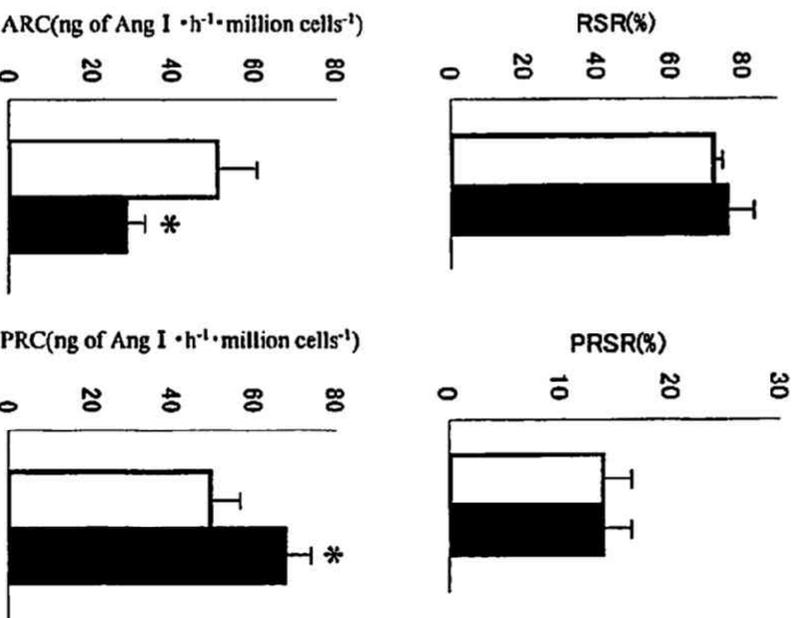
第8図は、正常ラットから採取した JG細胞において、200 μ mol/L NCDC で前処置した際の 12 時間の圧負荷による JG細胞の RSR, PRSR, ARC, PRC を示したものである。NCDC 前処置 JG細胞では、RSR は 40 mmHg の慢性圧負荷による影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ $71.6 \pm 2.9\%$ と $75.7 \pm 7.6\%$ であった。また、PRSR も 40 mmHg の慢性圧負荷による影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ $13.9 \pm 2.4\%$ と $13.8 \pm 2.6\%$ であっ



第7図 正常ラットより採取した JG細胞において、PLC 阻害薬である U73122、および不活性アラゴラゲである U73343 の存在下で、12 時間の圧負荷が細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ vs. 大気圧。

(Hirota N et al : Hypertension 39[part 2] : 363-367, 2002 の Fig. 2. の一部を許可を得て改変, 転載)



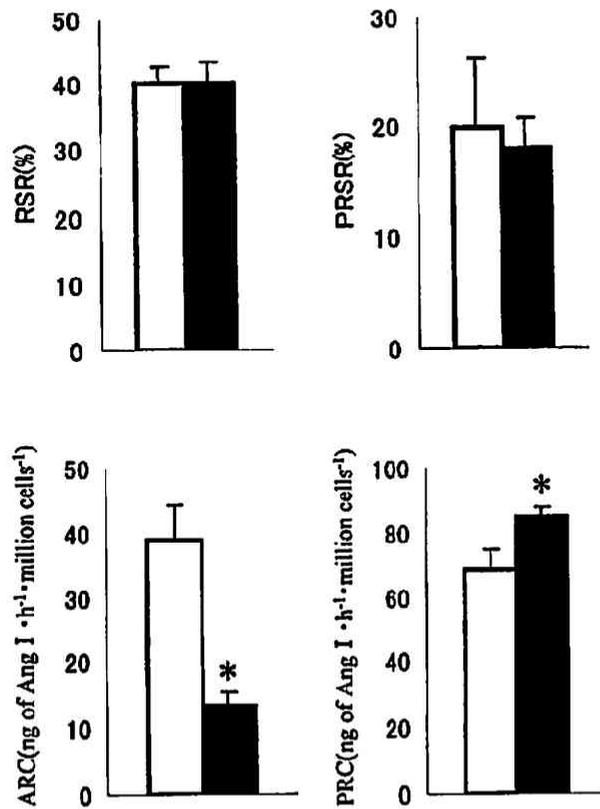
第8図 正常ラットより採取した JG細胞において、PLC 阻害薬である NCDC の存在下で、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate : RSR), プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate : PRSR), 細胞内活性レニン濃度 (active renin content : ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content : PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ vs. 大気圧。

(Hirota N et al : Hypertension 39[part 2] : 363-367, 2002 の Fig. 1. の一部を許可を得て改変, 転載)

圧負荷による ARC の減少度には、両処置間で差を認めなかった。さらに、U73343 前処置 JG細胞では、40 mmHg の慢性圧負荷は、PRC を 47.6 ± 4.8 から 68.2 ± 5.9 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹へ増加させ、U73122 前処置 JG細胞においても 49.8 ± 4.4 から 70.2 ± 6.1 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹へ増加させた。これら慢性圧負荷による PRC の増加度には、両処置間で差を認めなかった。また、U73122 処置および U73343 処置は、慢性圧負荷前後での TRC に影響を及ぼさず、U73343 前処置 JG細胞の TRC は圧負荷前後でそれぞれ 106.1 ± 6.6 と 104.8 ± 6.4 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹であり、U73122 前処置 JG細胞の TRC は圧負

た。以上より、NCDC 前処置による PLC 阻害も、慢性圧負荷によるレニンやプロレニンの分泌抑制を阻害することから、PLC が慢性圧負荷によるレニンやプロレニンの分泌抑制機序に関与すると考えられた。NCDC 前処置 JG 細胞において、ARC は慢性圧負荷によって 50.8 ± 9.5 から 28.0 ± 5.0 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へ減少した。また、PRC も慢性圧負荷によって 48.9 ± 7.6 から 67.2 ± 6.7 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へ増加した。NCDC 前処置 JG 細胞の TRC は、慢性圧負荷によって影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ 107.8 ± 8.9 と 93.5 ± 5.9 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ であった。これら ARC、PRC の変化の傾向は、



第9図 慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞において、PLC 阻害薬である NCDC の存在下で、12 時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate: RSR)、プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: PRSR)、細胞内活性レニン濃度 (active renin content: ARC)、細胞内プロレニン濃度 (prorenin content: PRC) におよぼす影響。

□大気圧 ■大気圧+40 mmHg。平均±標準誤差で表した。*p<0.05 vs. 大気圧。

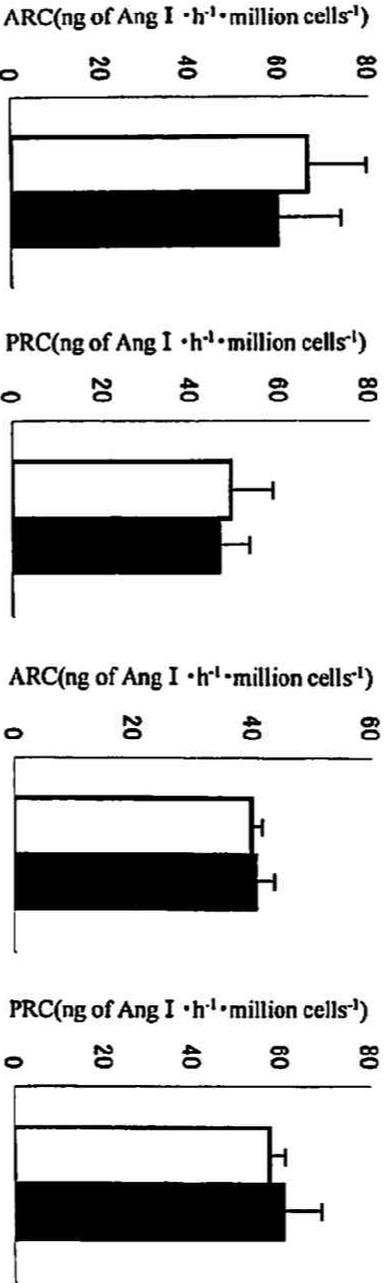
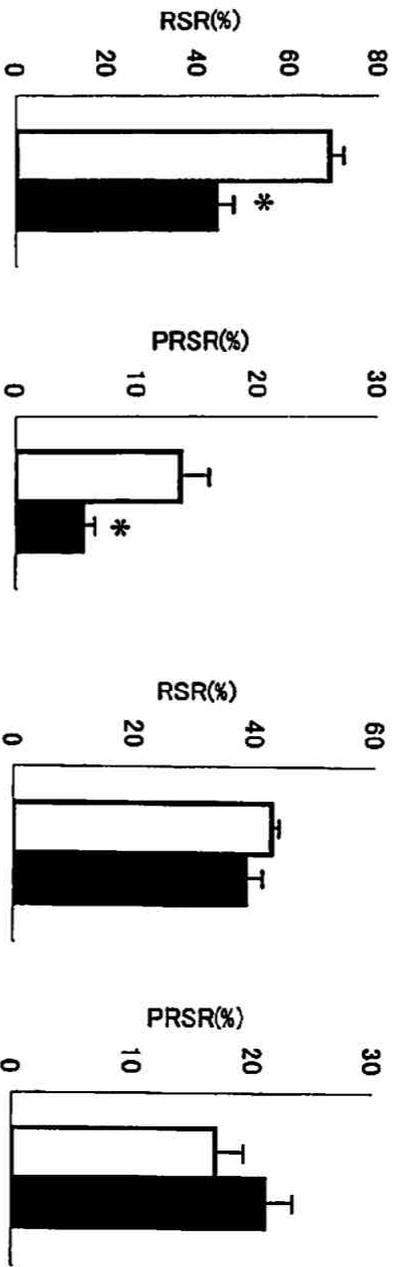
(Hirota N et al: Hypertension Res 26: 493-501, 2003 の Fig. 6. の一部を許可を得て改変, 転載)

NCDC で処置しなかった正常ラット JG 細胞におけるものと同様であった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、NCDC 前処置 JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

第9図は、慢性期糖尿病モデルラットより採取した JG 細胞を NCDC (200 μ mol/L) で前処置し12時間の圧を負荷した際の RSR, PRSR, ARC, PRC の変化を示したものである。NCDC 前処置した慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、12 時間圧負荷前後の RSR はそれぞれ $40.2 \pm 2.4\%$ と $40.2 \pm 3.2\%$ であり、12 時間圧負荷前後の PRSR はそれぞれ 19.8 ± 0.8 と $17.9 \pm 2.3\%$ であった。これらから、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞においても、NCDC 処置による PLC 阻害は慢性圧負荷による RSR, PRSR 減少反応を抑制することが示された。NCDC 前処置した慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、40 mmHg の慢性圧負荷は、ARC を 38.8 ± 5.5 から 13.4 ± 2.0 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に減少させ、PRC を 68.3 ± 6.4 から 85.0 ± 2.8 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ へと有意に増加させ、TRC には影響をおよぼさなかった。これら ARC、PRC の変化の傾向は、NCDC で処置しなかった慢性期糖尿病ラット JG 細胞におけるものや NCDC 前処置した正常ラット JG 細胞におけるものと同様であった。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、NCDC で前処置された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

5. 正常および慢性期糖尿病モデルから分離した JG 細胞への慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節における PLD 依存性経路の検討。

第10図は、PLD 阻害薬である 100 μ mol/L の AEBSF で前処置した正常ラット由来 JG 細胞に12時間の圧を負荷した際の RSR, PRSR, ARC, PRC を示したものである。AEBSF 前処置 JG 細胞において、40 mmHg の慢性圧負荷により、RSR は 68.8 ± 3.4 から $43.9 \pm 3.5\%$ へ有意に減少し、PRSR も $13.6 \pm 2.3\%$ から $5.4 \pm 1.0\%$ へ有意に減少した。また、ARC は 40 mmHg の慢性圧負荷によって影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ 66.4 ± 13.2 と 59.4 ± 14.4 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ であった。PRC も 40 mmHg の慢性圧負荷によって影響を受けず、圧負荷前後でそれぞれ 48.6 ± 9.8 と 45.9 ± 7.2 ng of Ang I \cdot h⁻¹ \cdot million cells⁻¹ であった。TRC は AEBSF 処置による影響を受けず、40 mmHg の慢性圧負荷前後でそれぞれ 115.2 ± 8.4 と



第10図 正常ラットより採取したJG細胞において、PLD阻害薬であるAEBSFの存在下で、12時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate: RSR), プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: PRSR), 細胞内活性レニン濃度 (active renin content: ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content: PRC) におよぼす影響。
□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。*p<0.05 vs. 大気圧.

(Hirota N et al: Hypertension 39[part 2]: 363-367, 2002 の Fig. 3. の一部を許可を得て改変, 転載)

第11図 慢性期糖尿病モデルラットより採取したJG細胞において、PLD阻害薬であるAEBSFの存在下で、12時間の圧負荷がレニン分泌率 (renin secretion rate: RSR), プロレニン分泌率 (prorenin secretion rate: PRSR), 細胞内活性レニン濃度 (active renin content: ARC), 細胞内プロレニン濃度 (prorenin content: PRC) におよぼす影響。
□大気圧 ■大気圧+40 mmHg. 平均±標準誤差で表した。

(Hirota N et al: Hypertens Res 26: 493-501, 2003 の Fig. 7. の一部を許可を得て改変, 転載)

105.6±5.1 ng of Ang I · h⁻¹ · million cells⁻¹であった。これらの結果より、正常ラット JG細胞において、AEBSFによるPLD阻害は、慢性圧負荷によるARC減少反応やPRC増加反応を抑制することが示された。トリパンブルー染色による生存細胞数の検討では、AEBSFで前処置された正常ラット JG細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

第11図は、慢性期糖尿病モデルラットより採取したJG細胞をAEBSF (100 μmol/L) で前処置し12時間の圧を負荷した際のRSR, PRSR, ARC, PRCの変化を示したものである。AEBSF前処置した慢性期糖尿病モデルラット JG細胞において、慢性圧負荷はRSRや

PRSRに影響を与えず、圧負荷前後のRSRはそれぞれ42.7±1.4%と38.5±2.8%であり、圧負荷前後のPRSRはそれぞれ16.9±2.3%と21.0±2.3%であった。また、慢性圧負荷はARCやPRCにも影響せず、圧負荷前後のARCはそれぞれ39.7±2.1と40.4±3.4 ng of Ang I · h⁻¹ · million cells⁻¹であり、圧負荷前後のPRCはそれぞれ57.1±4.0と60.2±8.5 ng of Ang I · h⁻¹ · million cells⁻¹であった。AEBSF前処置した慢性期糖尿病モデルラット JG細胞において、慢性圧負荷はTRCにも影響しなかった。これらの結果より、慢性期糖尿病モデル JG細胞において、AEBSFによるPLD阻害は、慢性圧負荷によるRSR減少反応、PRSR減少反応、

ARC 減少反応、PRC 増加反応を抑制することが示された。トリバンプルー染色による生存細胞数の検討では、AEBSF で前処置された慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において圧負荷前後の生存細胞数に差を認めなかった。

考 察

正常対照ラット JG 細胞において、12 時間の圧負荷は TRC に影響をおよぼすことなく RSR、PRSR、ARC を減少させ、PRC を増加させた。細胞内で既に活性化したレニンの再不活性化が起こらないならば、JG 細胞において慢性圧負荷はレニン分泌、プロレニン分泌、プロレニンからレニンへのプロセッシングを抑制すると考えられた。一方、早期および慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞において、12 時間の圧負荷は、RSR、PRSR、TRC に影響をおよぼすことなく ARC を減少させ、PRC を増加させた。この PRC 増加反応は、正常対照ラット JG 細胞と比べ、早期糖尿病モデルラット JG 細胞で差を認めなかったが、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞では、有意に増強していた。さらに、インスリンによる糖尿病治療で血糖を正常化させた場合には、慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞における、慢性圧負荷によるレニン・プロレニン調節の障害を改善した。これら結果より、糖尿病の進行に連れて、慢性圧負荷による JG 細胞からのレニン分泌抑制やプロレニン分泌抑制は減弱し、慢性圧負荷による JG 細胞内のプロレニンからレニンへのプロセッシング抑制は増強することが示された。また、本研究の予備実験において、0.1 μg/ml のストレプトゾトシンの JG 細胞への 12 時間暴露は、TRC を有意に減少させた (ストレプトゾトシン存在下・非存在下各々 50.2 ± 7.0 , 98.2 ± 2.1 ng of Ang I · h⁻¹ · million cells⁻¹, n=4) が、早期または慢性期糖尿病モデルラット JG 細胞における大気圧下 TRC は、各々の正常対照と同様であったため、本研究の実験結果にストレプトゾトシンの急性毒性効果は関連が無いと考えられた。

従来の研究²⁾より、慢性圧負荷による RSR の抑制は、細胞外カルシウム濃度とカルシウムチャンネルに依存し、細胞内カルシウム貯蔵の枯渇は慢性圧負荷による RSR、ARC 減少反応を抑制することが明らかにされている。これらの実験結果より、慢性圧負荷は、JG 細胞においてカルシウムの細胞内流入を刺激するだけでなく細胞内カルシウム貯蔵に依存した機構で、レニン分泌・プロレニン活性化調節に関与することが示唆されていた。PLC は、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate を加水分解

し、イノシトール 3 リン酸と 1,2-diacylglycerol を産生することが知られており、これらは細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出を促し、protein kinase C を活性化する²⁵⁾。また、PLD は、phosphatidylcholine を choline と phosphatidic acid に加水分解し、phosphatidic acid はイノシトール 3 リン酸産生を刺激し、細胞内カルシウムを動員する²⁶⁾²⁷⁾。したがって、JG 細胞への慢性圧負荷によるレニン産生・分泌調節機序において、PLC または PLD 依存性経路が関与する可能性が考えられ、本研究ではこれら機序についても検討を加えた。正常ラット JG 細胞において、PLC 阻害薬である NCDC、U73122 の存在下で、12 時間の圧負荷は ARC 減少反応や PRC 増加反応に影響を与えることなく RSR 減少反応や PRSR 減少反応を抑制した。したがって、慢性圧負荷による JG 細胞からのレニン・プロレニン分泌調節に、PLC 依存性のカルシウムチャンネルが関与することが示唆された。一方、糖尿病モデル JG 細胞において、慢性圧負荷によるレニン・プロレニン分泌調節は障害されており、NCDC による PLC 障害は既に障害されたレニン・プロレニン分泌調節に影響を与えなかった。また、輸入細動脈平滑筋細胞が発生過程で変異したものが JG 細胞であるから²⁸⁾²⁹⁾、その圧負荷による細胞内カルシウム動員のメカニズムは JG 細胞においても維持されていると考えられるが、以前の研究で³⁰⁾³¹⁾、ストレプトゾトシン誘発糖尿病において認められる圧負荷による輸入細動脈収縮障害は、電位依存性カルシウムチャンネルの機能異常が原因であることが報告されていた。さらにこの機能異常の原因の一つとして protein kinase C が関与するチャンネル活性の低下が考えられ³²⁾、糖尿病ラット JG 細胞では、PLC 依存性カルシウムシグナルが障害されることが示唆された。また、慢性圧負荷によるプロレニン分泌調節障害が、既に糖尿病早期から認められ慢性期まで維持されていたことより、高血糖そのものが PLC 依存性のカルシウムシグナルを障害し、それにより JG 細胞の慢性圧負荷による細胞外分泌調節を障害している可能性が考えられた。この推測は、細胞を高糖濃度環境下に置くと、細胞縮小によって伸展受容体が活性化し細胞内カルシウム濃度基礎値が上昇することによって各種刺激による細胞内カルシウム動員が障害されるという従来の報告³³⁾により支持される。

PLD 阻害薬である AEBSF の存在下では、12 時間の圧負荷は RSR 減少反応や PRSR 減少反応に影響を与えることなく ARC 減少反応や PRC 増加反応を抑制した。この慢性圧負荷による細胞内プロレニンの蓄積は、正常対照・糖尿病モデルラット JG 細胞と同様に認められた

ことより、慢性圧負荷は PLD に依存する機序でプロレニンからレニンへの変換を抑制し、細胞内プロレニンを蓄積させたと考えられた。その機序としては、細胞内プロレニン顆粒の輸送が関与する可能性が示唆される。PLD およびその脂質産生物である phosphatidic acid は、endoplasmic reticulum からゴルジ装置への小胞体輸送に必須であることが知られている³⁴⁾。ゴルジ装置はプロレニン活性化の場であるので³⁵⁾、慢性圧負荷によるプロレニン活性化抑制機序に、プロレニンを含む小胞体の PLD 依存性輸送が関与している可能性がある。その他の機序として、phosphatidic acid は DNA 合成調節作用を有することから^{36) 37)}、慢性圧負荷によって刺激された PLD 由来の phosphatidic acid が、プロレニン活性化酵素の酵素活性に関連した遺伝子の発現調節を行っている可能性も考えられた。

慢性圧負荷による細胞内プロレニンの蓄積は、早期糖尿病モデルラット JG 細胞に比べ、慢性期糖尿病ラットモデル JG 細胞で有意に増強していた。したがって、この増強反応は細胞が慢性的に高濃度の糖質にさらされた結果、二次的に生じた変化であることが推測された。従来の研究では、高血糖は細胞内ミトコンドリアにおける reactive oxygen species (ROS) の産生過多を引き起こすことが報告されている³⁸⁾。Transmural pressure は、血管平滑筋細胞において ROS 生成を刺激し³⁹⁾、PLD 依存性経路もまた血管平滑筋細胞において NADPH oxidase 依存性に ROS を産生するので^{19) 40)}、JG 細胞が慢性的に高血糖に暴露されると、産生された ROS によるネガティブフィードバックを介して圧依存性 PLD 経路の抑制が起こる可能性も考えられる。また ROS は、レニンとレニン結合蛋白の複合体である不活性高分子量レニンの形成を刺激することが報告されており³⁵⁾、慢性圧負荷および糖尿病による高血糖は、ROS 活性を増加させることによって JG 細胞における活性レニンから不活性レニンへの変換を引き起こす可能性も考えられた。さらに ROS は、血管平滑筋細胞において cyclic GMP 形成を阻害する⁴¹⁾、cyclic GMP は活性レニンの形成を刺激するため²¹⁾、JG 細胞における圧依存性 PLD 経路は、ROS 産生を介して細胞内 cyclic GMP レベルを抑制することにより活性レニン形成を抑制することも考えられる。

総 括

正常対照ラットの腎臓およびストレプトゾトシン腹腔内注射により作成した糖尿病の早期・慢性期における腎

臓より採取した JG 細胞の初代培養において、12 時間の圧負荷がレニン・プロレニンの分泌と細胞内におけるプロレニンからレニンへのプロセッシングに及ぼす影響とその機序を検討し、以下の結果を得た。

1. 12 時間の圧負荷は正常対照ラット JG 細胞において、レニン分泌・プロレニン分泌・プロレニンからレニンへのプロセッシングをいずれも抑制した⁴²⁾。
2. 早期糖尿病ラット JG 細胞では、12 時間の圧負荷はレニン分泌・プロレニン分泌を抑制せず、プロレニンからレニンへのプロセッシングのみ正常対照ラット JG 細胞と同程度に抑制した⁴²⁾。
3. 慢性期糖尿病ラット JG 細胞では、12 時間の圧負荷はレニン分泌・プロレニン分泌を抑制せず、プロレニンからレニンへのプロセッシングのみ抑制したが、その抑制度は、正常対照ラット JG 細胞や早期糖尿病ラット JG 細胞のそれよりも有意に大きかった⁴²⁾。
4. インスリン治療により血糖を正常域にコントロールした慢性期糖尿病ラットより採取した JG 細胞では、12 時間の圧負荷がレニン・プロレニンの分泌とプロセッシングに与える影響は、正常対照ラット JG 細胞におけるそれと同様であった⁴²⁾。
5. PLC 阻害薬である NCDC, U73122 は、正常対照ラット JG 細胞において、12 時間の圧負荷によるレニン分泌・プロレニン分泌の減少反応を抑制した。しかしながら、12 時間の圧負荷によるレニン分泌・プロレニン分泌が既に抑制されている糖尿病ラット JG 細胞において、NCDC は影響を及ぼさなかった^{42) 43)}。
6. PLD 阻害薬である AEBSF は、正常対照ラット JG 細胞・糖尿病ラット JG 細胞いずれにおいても、12 時間の圧負荷によるプロレニンからレニンへのプロセッシング抑制反応を抑制した^{42) 43)}。

以上の結果より、JG 細胞において慢性圧負荷は、PLC 依存性経路でレニン分泌・プロレニン分泌を抑制し、PLD 依存性経路でプロレニンからレニンへのプロセッシングを抑制することが示された。この PLD 依存性経路によるプロレニンからレニンへのプロセッシング抑制は、糖尿病の進行とともに増強し、さらに糖尿病ラットの JG 細胞では圧によって分泌が抑制されないため、糖尿病における血中プロレニン濃度増加の原因の一つである可能性が考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導、御高閲いただきました慶應義塾大学医学部内科学教室市原淳弘博士に深謝い

たします。さらに、本研究に御協力いただきました内科
学教室腎臓研究室の諸先生方に感謝いたします。

本研究の要旨の一部は、第74回日本内分泌学会
(2001年横浜)、第24・25回日本高血圧学会総会
(2001年大阪、2002年東京)、33rd Annual Meeting
and Scientific Exposition of American Society of
Nephrology (Toronto, 2000)、55th Annual Fall
Conference and Scientific Sessions of the Council for
High Blood Pressure Research of American Heart
Association (Chicago, 2001)、The 2001 ASN/ISN
World Congress of Nephrology (San Francisco,
2001)において発表した。

また本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(奨励
研究(A), No12770590)の援助を受けた。

文 献

- 1) Tobian L, Tomboulian A, Janeczek J : The effect of high perfusion pressures on the granulation of juxtaglomerular cells in an isolated kidney. *J Clin Invest* 38 : 605-610, 1959
- 2) Ichihara A, Suzuki H, Miyashita Y, Naitoh M, Hayashi M, Saruta T : Transmural pressure inhibits prorenin processing in juxtaglomerular cell. *Am J Physiol* 277 : R220-R228, 1999
- 3) DUBYAK GR, El-Moatassim C : Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265 : C577-C606, 1993
- 4) Deinum J, Ronn B, Mathiesen E, Derkx FHM, Hop WCJ, Schalekamp MADH : Increase in serum prorenin precedes onset of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 42 : 1006-1010, 1999
- 5) Franken AAM, Derkx FHM, Man-in't-Veld AJ, et al : High plasma prorenin in diabetes mellitus and its correlation with some complications. *J Clin Endocrinol Metab* 71 : 1008-1015, 1990
- 6) Davies L, Fulcher GR, Atkins A, et al : The relationship of prorenin values to microvascular complications in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabet Complications* 13 : 45-51, 1999
- 7) UK prospective diabetes study group : Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *UKPDS 38. BMJ* 317 : 703-713, 1998
- 8) UK prospective diabetes study group : Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *UKPDS 39. BMJ* 317 : 713-720, 1998
- 9) Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A : Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 76 : 536-543, 1995
- 10) Ranjan V, Xiao Z, Diamond SL : Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress. *Am J Physiol* 269 : H550-555, 1995
- 11) Buga GM, Gold ME, Fukuto JM, Ignarro LJ : Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17 : 187-193, 1991
- 12) Cooke JP, Rossitch E, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ : Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 88 : 1663-1671, 1991
- 13) Schrickler K, Kurtz A : Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 265 : F180-186, 1993
- 14) Knoblich PR, Freeman RH, Villarreal D : Pressure-dependent renin release during chronic blockade of nitric oxide synthase. *Hypertension* 28 : 738-742, 1996
- 15) Scholz H, Kurtz A : Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfusion kidney. *J Clin Invest* 91 : 1088-1094, 1993
- 16) Hishikawa K, Nakai T, Suzuki H, Saruta T, Kato R : Transmural pressure inhibits nitric oxide release from human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 215 : 329-331, 1992
- 17) Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ : Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100 : 1566-1574, 1997
- 18) Freeman EJ : The Ang II-induced growth of vascular smooth muscle cells involves a phospholipase D-mediated signaling mechanism. *Arch Biochem Biophys* 374 : 363-370, 2000
- 19) Touyz RM, Schiffrin EL : Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34 : 976-982, 1999
- 20) Ichihara A, Suzuki H, Murakami M, Naitoh M, Matsumoto A, Saruta T : Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *Eur J Endocrinol* 133 : 569-577, 1995
- 21) Ichihara A, Kobori H, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T : Differential effects of thyroid hormone on renin secretion, content, and mRNA in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 274 : E224-E237, 1998
- 22) Inscho EW, Cook AK, Mui V, Imig JD : Calcium mobilization contributes to pressure-mediated afferent arteriolar vasoconstriction. *Hypertension* 31 : 421-428, 1998
- 23) Takenaka T, Suzuki H, Fujiwara K, Kanno Y, Ohno

- Y, Hayashi K, Nagahama T, Saruta T : Cellular mechanisms mediating rat renal microvascular constriction by angiotensin II. *J Clin Invest* 100 : 2107-2114, 1997
- 24) Andrews B, Bond K, Lehman JA, Horn JM, Dugan A, Gomez-Cambronero J : Direct inhibition of *in vitro* PLD activity by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride. *Biochem Biophys Res Commun* 273 : 302-311, 2000
- 25) Narayanan J, Imig M, Roman RJ, Harder DR : Pressurization of isolated renal arteries increases inositol triphosphate and diacylglycerol. *Am J Physiol* 266 : H1840-H1845, 1994
- 26) Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD : Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 273 : 16586-16590, 1996
- 27) Kurz T, Wolf RA, Corr PB : Phosphatidic acid stimulates inositol 1,4,5-triphosphate production in adult cardiac myocytes. *Circ Res* 72 : 701-706, 1993
- 28) Barajas L : Anatomy of juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 237 : F333-F343, 1979
- 29) Taugner R, Bührle CP, Hackenthal E, Mannek E, Nobiling R : Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. *Contrib Nephrol* 43 : 76-101, 1984
- 30) Takenaka T, Suzuki H, Okada H, Hayashi K, Kanno Y, Saruta T : Mechanosensitive cation channel mediate afferent arteriolar myogenic constriction in the isolated rat kidney. *J Physiol* 511 : 245-253, 1998
- 31) Carmines PK, Ohishi K, Ikenaga H : Functional impairment of renal afferent arteriolar voltage-gated calcium channels in rats with diabetes mellitus. *J Clin Invest* 98 : 2564-2571, 1996
- 32) Schuhmann K, Groschner K : Protein kinase-C mediates dual modulation of L-type Ca^{2+} channels in human vascular smooth muscle. *FEBS Lett* 341 : 208-212, 1994
- 33) Symonian M, Smogorzewski M, Marcinkowski W, Krol E, Massry SG : Mechanisms through which high glucose concentration raises $[Ca^{2+}]_i$ renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 54 : 1206-1213, 1998
- 34) Bi K, Roth MG, Ktistakis NT : Phosphatidic acid formation by phospholipase D is required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Curr Biol* 7 : 301-307, 1997
- 35) King JA, Lush DJ, Fray JCS : Regulation of renin processing and secretion : chemiosmotic control and novel secretory pathway. *Am J Physiol* 265 : C305-320, 1993
- 36) Moolenaar WH, Kruijer W, Tilly BC, Verlaan I, Bierman AJ, deLaat SW : Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* 323 : 171-173, 1986
- 37) Knauss TC, Jaffer FE, Abboud HE : Phosphatidic acid modulates DNA synthesis, phospholipase C, and platelet-derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells. *J Biol Chem* 265 : 14457-14463, 1990
- 38) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al : Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature* 404 : 787-790, 2000
- 39) Nowicki PT, Flavahan S, Hassanain H, et al : Redox signaling of the arteriolar myogenic response. *Circ Res* 89 : 114-116, 2001
- 40) Bellavite P, Corso F, Dusi S, Grzeskowiak M, Della Bianca V, Rossi F : Activation of NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane extracts of pig neutrophils by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 263 : 8210-8214, 1988
- 41) Wu L, de Champlain J : Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats. *Hypertension* 34 : 1247-1253, 1999
- 42) Hirota N, Ichihara A, Koura U, Tada Y, Hayashi M, Saruta T : Transmural Pressure Control of Prorenin Processing and Secretion in Diabetic Rat Juxtaglomerular Cells. *Hypertens Res* 26 : 493-501, 2003
- 43) Hirota N, Ichihara A, Koura U, Hayashi M, Saruta T : Phospholipase D Contributes to Transmural Pressure Control of Prorenin Processing in Juxtaglomerular Cell. *Hypertension* 39[part2] : 363-367, 2002