

氏名	中川清
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人博第88号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科文化・地域環境学専攻
学位論文題目	脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット由来細胞を用いた高血圧発症及び合併症の研究

論文調査委員 (主査) 教授 家森幸男 教授 津田謹輔 助教授 森谷敏夫

### 論文内容の要旨

本論文では、高血圧症および高血圧性合併症の二つの視点で、生体内における細胞の役割について、培養細胞を用いた検討結果が報告されている。

本態性高血圧症の成因については、遺伝的素因が関与していることは明らかであり、一般的には複数の遺伝因子が複合した多因子遺伝によると考えられている。高血圧症の問題となる点は、長期持続した場合、脳、心臓、腎臓などに重篤な合併症を誘発し、そのために急死するか、もしくは慢性に経過し社会活動に多大なる影響を与えることにある。従って高血圧症及び高血圧合併症を防止することは極めて重要な課題となる。

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) は、高血圧自然発症ラット (SHR) より重篤な高血圧を若年期より発症し、また全例が脳卒中を自然発症する唯一のモデル動物であり、ヒトと同じように脳血管障害を起こし、脳出血、脳梗塞のような高血圧性血管合併症で死亡する。近年、SHRSP/Izm または SHR/Izm から得られた細胞は WKY/Izm に比較して、増殖能やイオンチャネル等の様々な機能異常が報告され、これが高血圧症発症や高血圧症合併症に関与していると考えられている。

本研究では、第一に、本態性高血圧症の成因という視点から SHRSP 由来メサンギウム細胞の増殖能の異常を見出し (第2章)、次に細胞内  $Ga$  濃度変化に対するイオンチャネルの異常をパッチクランプ法を用い、電気生理学的に解析した (第3章)。これら二つの異常が高血圧発症の分子機構に関与している可能性を示した。第二に、高血圧性合併症の中でも最も大きな医療社会的問題になる脳卒中の成因と予防の視点から、SHRSP 由来培養神経細胞を用いて虚血・再灌流の影響を培養条件下で観察する実験系を設定し、SHRSP 由来神経細胞の脆弱性とそれに対する抗酸化剤の有用性を見出し、脳卒中、脳血管性痴呆の予防に関する意義を考察した (第4章)。

本態性高血圧症の成因という視点からは、本研究により SHRSP 由来メサンギウム細胞は、WKY 由来メサンギウム細胞に比し、著しい増殖能の亢進を示した。特に増殖因子 PDGF の刺激時には、SHRSP 由来細胞は、WKY 由来細胞に比し著しい増殖能の亢進を示した。また、このような PDGF に対する反応性は高濃度に対してだけでなく、低濃度においても亢進していることを明らかにした。さらに、本態性高血圧症ではメサンギウム細胞が関与する尿細管系球体フィードバック調節機構で  $Cl^-$  イオンに対する反応性の低下が報告されていることに着目し、本研究では、細胞の増殖時には細胞内  $Ca^{2+}$  が上昇することから、薬物により細胞膜の  $Ca^{2+}$  透過性を高めることで細胞内  $Ca^{2+}$  を上昇させ、膜電位と膜イオン電導度に対する影響を検討した。その結果、WKY 由来細胞において細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇時に  $Cl^-$  イオンチャネルが開き、 $Cl^-$  イオンの細胞外への流出が見られたが、SHRSP 由来細胞では、細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇時における  $Cl^-$  イオンチャネルの開放は見られなかった。一方、SHRSP 由来細胞において、細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇時に  $K^+$  イオンチャネルが開き、 $K^+$  イオンの細胞外への流出が見られたが、WKY 由来細胞では示されなかった。とりわけ、SHRSP の  $Cl^-$  イオンチャネルの異常は尿細管系球体フィードバックの調節の主体が  $Cl^-$  イオンであることから、尿細管内の  $Cl^-$  イオン (すなわち  $Na^+$  イオン) の排泄が低下し

たとき、 $\text{Cl}^-$  の糸球体からの排泄が充分おこらず、体内で  $\text{Na}^+$  が貯留し、血圧が上昇すると結論した。

ヒト高血圧症と同様の進展機序を示す SHRSP において、高血圧症の進展には、生理的にも存在する糸球体制御機構異常による可能性を指摘した。

また高血圧性合併症の一つである脳卒中の成因や予防の視点からは、SHRSP 由来神経細胞は、WKY 由来神経細胞に比し、虚血・再灌流条件に際してより脆弱であることを電子顕微鏡的観察により明らかにした。この結果により、虚血後の再灌流は神経細胞に重度の障害を与えると結論づけた。さらに神経保護作用を示す薬剤の影響を検討し、抗酸化剤である Idebenone および IGF-I による細胞死の改善効果が濃度依存的にあることを示した。特に Idebenone は、神経細胞障害を有意に抑制することを明らかにした。これらの結果により、Idebenone は酸素ラジカルを消去して、神経細胞死を抑制すると結論づけ、さらに酸素再灌流で生じる神経細胞死の抑制効果は、IGF-I よりも抗酸化剤の方が効果があると結論づけた。

脳卒中素因がある患者の神経細胞は、SHRSP 由来神経細胞と同様に虚血・再灌流時に非常に脆弱である可能性が高く、降圧治療に際し、神経細胞への悪影響を最小限にするため、抗酸化剤の併用が脳卒中における神経細胞死の予防に重要であることを示した。

### 論文審査の結果の要旨

本学位申請論文は、高血圧症および高血圧性合併症の二つの病態における腎メサンギウムと脳神経細胞の役割について、培養細胞を用いた研究結果を報告している。第1章ではこの研究題目に関わるこれまでの諸研究の成果と問題点に触れ、当該研究の動機付けと目的が述べられている。

第2章では、高血圧症における腎細胞の機能異常の視点から腎糸球体メサンギウム細胞の増殖性を検討し、SHRSP 由来メサンギウム細胞は、WKY 由来メサンギウム細胞に比し、著しく増殖能が亢進していることを証明した実験結果が述べられている。

第3章では、SHRSP 由来メサンギウム細胞の WKY 由来メサンギウム細胞では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に際し、異なるチャネルが活性化させることを実験的に確認した。一連の実験から、高血圧症の成因として報告されている尿細管フィードバック機構の異常に関与すると結論した。さらに、ヒト高血圧と同様の進展機序を示す SHRSP において、高血圧の進展が、糸球体制御機構における異常による可能性を指摘した。

第4章では、高血圧性合併症の一つである脳卒中の成因と予防の視点からは、本研究により、SHRSP 由来神経細胞は、WKY 由来神経細胞に比し、虚血・再灌流条件に非常に脆弱性があることを電子顕微鏡試験により明らかにし、さらに神経保護作用を示す薬剤の影響を検討した実験結果を述べている。一連の実験から、虚血後の再灌流は神経細胞に重度の障害を与えると結論し、抗酸化剤が神経細胞障害の抑制効果に有用であると結論した。さらに、降圧治療に際し、神経細胞への悪影響を最小限にするため、抗酸化剤の併用の重要性を指摘した。

第5章で全体の総括と結論を述べ、最後に、今後の研究の進むべき方向に言及している。

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) は、高血圧自然発症ラット (SHR) より重篤な高血圧を若年期より自然発症するユニークなモデル動物であり、本態性高血圧症の病態解明と予防の為に広く利用されてきた。本研究以前にも、SHRSP 由来の血管平滑筋細胞やグリア細胞では、イオンチャネル等の様々な機能異常の存在が報告されており、これが高血圧症発症や高血圧症合併症に関与していると考えられていた。しかし血圧調節機構に重要なメサンギウム細胞においては、組織生理学的知見はほとんど得られていない。しかもパッチクランプ法のような電気生理学的手法を用いた実験は全く報告されていない。第3章で得られた実験結果は、高血圧症の病態でメサンギウム細胞のイオンチャネルに異常のあることを実証した世界で最初の細胞生理学的知見として高く評価できる。

また、虚血・再灌流の分子機構については、まだ世界的にも緒についたばかりであり、本研究以前にも SHRSP を用いた虚血・再灌流の実験が行われていたが、*in vivo* の実験に限られていた。第4章で述べられている研究成果は、培養系で虚血・再灌流の実験を行い、神経細胞単独での脆弱性、さらには薬剤の影響を示した先駆的な仕事として、方法論の開発と得られた所見は共に高く評価でき、国際誌 *Hypertension Research* に報告されている。

高血圧症および高血圧合併症の分子機構は殆ど未知であるが、腎臓が病態に重要な役割を担っていることが指摘されている。また、高血圧合併症である脳卒中の分子機構においても虚血の影響が指摘されてきている。しかし、本研究のような腎

細胞を用いた細胞生理学的アプローチや脳神経細胞を用いた虚血・再灌流の病態細胞生理学的アプローチはこれまで殆ど行われていなかった。申請者が進めてきた培養レベルでの研究は、高血圧症および高血圧合併症の病態生理学的機序を解明していく上で、今後の研究の発展に大きく貢献すると期待できる。本研究は細胞レベルで体内環境と細胞との本質的關係の一端を明らかにしたもので、人間の身体と環境との關係の究明を目指す文化地域・環境学専攻、環境保全発展論講座、身体環境解析論の目的に沿ったものである。

よって本論文は、博士（人間・環境学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。また、平成12年1月11日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。