

ラット単離糸球体における活性酸素産生に及ぼすアデノシン及びそのアナログの効果

遠藤 仁*, 宮ノ下昭彦

要約：正常ラット腎よりメッシュ法で糸球体のみを単離し，phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)を添加すると活性酸素(ROM)が産生される。このROM産生はアデノシンとそのアナログで用量依存性に抑制され，この効果はアデノシン2 (A₂) 受容体の親和性の順序に従った。又，この作用は細胞内cAMPの上昇により代替された。従ってアデノシンの効果はA₂受容体を介した作用であることが明らかにされた。

見出し語：単離糸球体，フォルボールエステル，アデノシン2受容体，活性酸素。

緒言

腎疾患の発症機序は未だ十分に解明されていないので，実験動物にヒトの腎疾患に類似の障害を作成してその原因を明らかにすることにより，臨床上の問題点を解決せんとする試みがなされている。腎疾患モデルの作成には大きく二つの手法が提唱されている。即ち一つは何らかの免疫機序を介したものであり，もう一つは非免疫的な手法である。何れの病態モデルにおいても，腎障害を引き起す直接的なメディエーターは共通のものであるという考え方もある。その一つにフリーラジカルの関与も含まれており，その中でも酸素ラジカル，別の呼び方としては活性酸素群 (reactive oxygen metabolites; ROM) が近年注目をあびている。他方，腎疾患の中でも糸球体腎炎は臨床上，最も重要視されている。しかるに，本研究においてはin vitroの系で糸球体にROMを産生させ，その産生抑制効果を示すアデノシン及びそのアナログについて検討を行った。

何故アデノシンを取り上げたかという点，上述の非免疫腎疾患 (ネフローゼ) モデルとして30年以上前から用いられているPAN (puromycin aminonucleoside)が化学構造上，

アデノシン類似の物質だからである。

研究方法

(1) 動物及び糸球体の単離

SD系雄性ラットの腎をHanksの緩衝液で灌流し，皮質のみを細切した。金属メッシュを用いて既報¹⁾に準じて組織中の糸球体のみを採取した。即ち細切皮質を金属メッシュに軽く押し乍ら破碎し，徐々に通過メッシュのサイズを小さくし，最終的には74ミクロンメッシュ上に残存する組織を800回転/分で5分の遠心を2～3回繰り返して糸球体のみを得た。

(2) ROM及びcAMPの測定

単離糸球体の一部を組織タンパク量の測定に使用した後，糸球体懸濁液200 μ lをluminol (最終濃度 1.1×10^{-4} M)を含むペロナール緩衝液760 μ lに加え，luminometer (LKB1251)にセットした。37 $^{\circ}$ C一定時間の安定性を記録した後，20 μ lのPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 通常使用最終濃度 1.6×10^{-5} M)を自動注入装置で加え，発光量が最大に達した時点での30秒間の積算量で定量化した¹⁾。糸球体にアデノシンアナログを添加して産生されるcAMP量をRIA法で定量化した。

*東京大学医学部薬理学教室

Hitoshi Endou

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

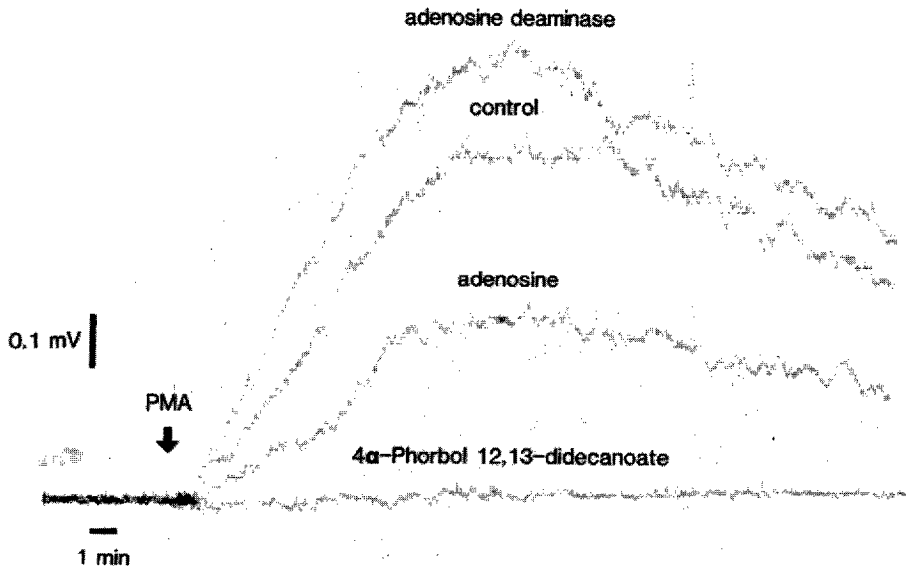


図1. ラット単離糸球体におけるPMA刺激後の活性酸素の産生とアデノシンによる抑制とアデノシンデアミナーゼによる促進効果。

結 果

(1) 活性酸素の測定とアデノシンによる抑制効果

図1に示すように、PMAの添加約1分後からluminol発光量は徐々に上昇し、約10分後に最大となり以後漸減する。Cキナーゼの活性作用を示さない4 α -phorbol 12, 13-didecanoateの添加ではROMの産生を認めない。即ちCキナーゼの活性上昇を介した機序によりROMが産生されることを示している。アデノシン $10^{-4}M$ の存在によりROM産生は明らかに減少し、アデノシンの分解酵素であるadenosime deaminaseの添加により、ROM産生は上昇する。後者の所見は内因性のアデノシンもROMの産生抑制に関与していることを示唆する。

(2) アデノシンアナログの効果

非水解性のアナログによってもPMAによるROM産生は用量依存性の減弱を示した(図2)。その抑制効果の強さは5'-N-ethyl

carboxamido adenosine (NECA) > 2-chloroadenosine (2CADO) > N⁶-R-phenylisopropyladenosine (R-PIA) > cyclohexyladenosine (CHA)の順であり、これはアデノシン受容体に2種類あるうちの一つであるA₂受容体刺激強度の順序と同じであった。

(3) アデノシンアナログのcAMP上昇作用

A₂受容体刺激によりROM産生が抑制されるか否かを確認するために、四種のアナログによるcAMPの上昇効果を検討した結果を図3に示す。図2のROM抑制効果の場合とは丁度逆に、cAMPの上昇作用が用量依存性に認められた。即ちA₂受容体への親和性の強い順(NECA > 2CADO > R-PIA > CHA)にcAMPの産生は亢進しており、ROM産生の抑制にA₂受容体に関与している事が明らかとなった。

考 察

アデノシンの腎内受容体の局在をcAMPの

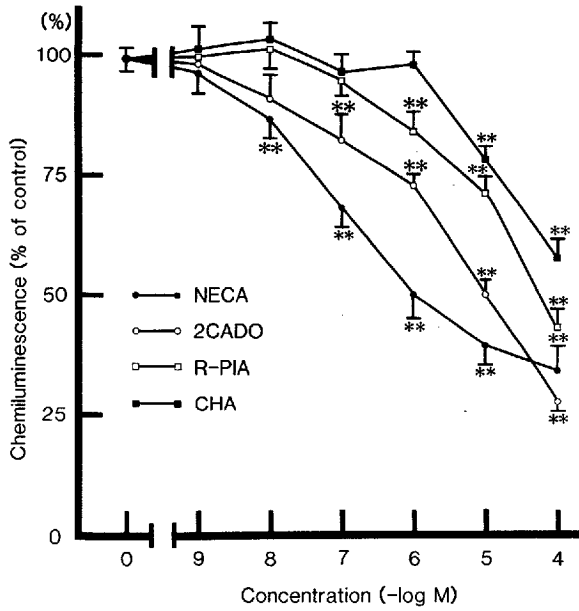


図2. ラット単離糸球体におけるPMA誘導活性酸素産生に及ぼすアデノシンアナログの刺激。用量-反応曲線。

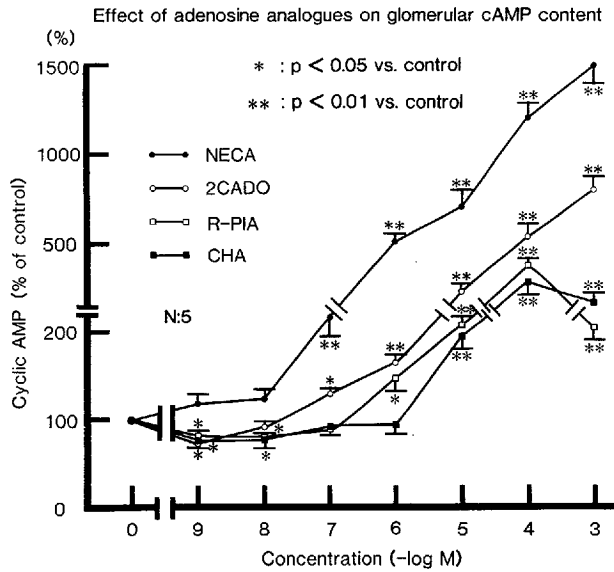


図3. ラット単離糸球体でのアデノシンアナログによるcAMPの上昇効果を示す用量-反応曲線。

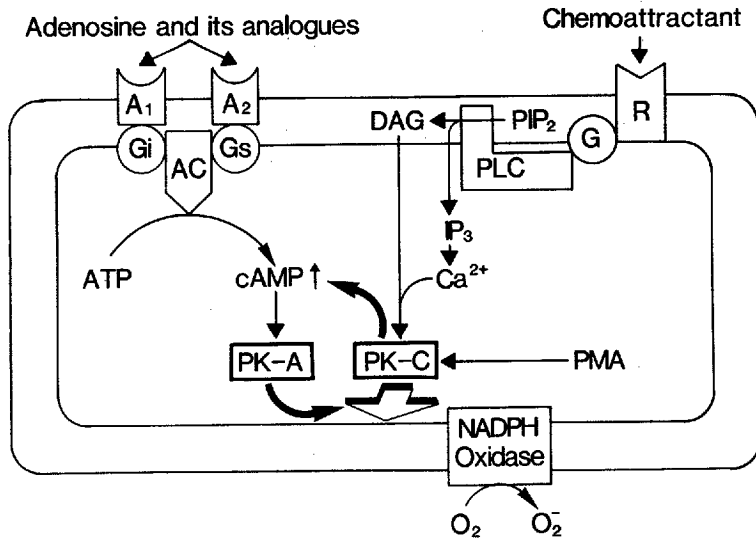


図4. ラット糸球体での活性酸素産生におけるCキナーゼ系とその抑制を示すAキナーゼ系の相互関連性の存在を示す模式図。

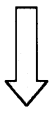
上昇作用を示すA₂受容体について検索した結果、圧倒的に糸球体に高いことを見出した²⁾。その上、アデノシンの代謝における最初のステップであるadenosine deaminase, それに続く二番目のpurine nucleoside phosphorylaseは共にネフロン内では糸球体に最も高い活性が認められた³⁾。これらの結果はアデノシンが糸球体で作用を発現し、細胞内に輸送されると直ちに分解を受けることを示すものであり、アデノシンの代謝回転が糸球体で高いことを意味する。

図2や図3の結果はCキナーゼの活性化によるROM産生という系にA₂受容体刺激によるAキナーゼによるROM産生抑制の系との相互関連の存在を示唆するもので、これらを図4に要約した。結果には示していないが、cAMPの産生を直接刺激するforskolinによってもROM産生は確かに抑制された⁴⁾。同様の結果はcAMPを反応液に添加しても認められた⁴⁾。このCとAキナーゼ系の相互関連はROM産生系へのアデノシンによる抑制の生化学的機序を解明する突破口となるものであり、より詳細な追求が望まれる。

細胞内情報伝達に際してのCキナーゼの活性化はinositolリン酸, IP₃を介して細胞内Ca⁺⁺の上昇を起す。最近我々が示したangiotensin IIによる近位尿細管細胞内Ca⁺⁺上昇作用⁵⁾へのcAMP系による修飾と同様の機構が糸球体にも存在するか否かは今後の課題である。

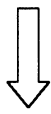
文 献

- 1) Miyanoshita, A., Takahashi, T. and Endou, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 519-525 (1989)
- 2) Endou, H., Takahashi, T. and Miyanoshita, A., In: *Frontiers of Nephrology* (Berliner, R. et al. eds.) Elsevier, pp.163-171 (1990)
- 3) Takahashi, T., Kakuno, K., Yamada, H. and Endou, H., *Renal Physiol. Biochem.*, 12:287-294 (1989)
- 4) Miyanoshita, A., Takahashi, T. and Endou, H., (submitted)
- 5) Jung, K.-Y. and Endou, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:1221-1228 (1989)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約: 正常ラット腎よりメッシュ法で糸球体のみを単離し, Phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)を添加すると活性酸素(ROM)が産生される。この ROM 産生はアデノシンとそのアナログで用量依存性に抑制され, この効果はアデノシン 2(A₂)受容体の親和性の順序に従った。又, この作用は細胞内 cAMP の上昇により代替された。従ってアデノシンの効果は A₂ 受容体を介した作用であることが明らかにされた。