



## Effect of diabetes on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase on rat aorta

大原, 肇

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1994-11-02

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1881

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001881>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 大原 肇 (兵庫県)  
 博士の専攻 分野の名称 博士(医学)  
 学位記番号 博2第1424号  
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
 学位授与の日付 平成6年11月2日  
 学位論文題目 Effect of Diabetes on Cytosolic Free  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in Rat Aorta  
 (ラット大動脈における細胞内free  $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPaseに及ぼす糖尿病の影響)  
 審査委員 主査教授 春日雅人  
 教授 横山光宏 教授 千原和夫

### 論文内容の要旨

#### 【緒言】

Blausteinらの仮説によると高血圧の成因は血管平滑筋細胞において $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase活性が阻害され、細胞内 $\text{Na}^+$ の蓄積が生じ、その結果Na-Caチャネルを介して細胞内に $\text{Ca}^{2+}$ が流入して細胞内free  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) が増加することによると言われている。一方、糖尿病に高血圧の合併が多い事はよく知られているが、その機構の詳細は未だ明らかではない。そこで我々は糖尿病ラット大動脈の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase活性と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定し、糖尿病における高血圧の進展について検討した。さらに糖尿病ラット大動脈での $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPaseの動態について詳細に検討する目的で、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPaseの活性部位である  $\alpha$  1 及び  $\alpha$  2 subunit, 及びこれと複合体を作り細胞膜へ輸送して完全な酵素活性を持たせるために必要であるといわれている  $\beta$  subunitの各々につき mRNAならびに蛋白の発現を検討した。

#### 【方法】

##### (1) 糖尿病動物の作製

Sprague-Dawley雄性ラットにストレプトゾトシン (STZ) を $65\text{mg}/\text{kg B W}$ 尾静脈より静注して糖尿病を発症させ、2日、7日、14日後に大動脈を摘出し実験に供した。一部の糖尿病ラットは糖尿病発症後3～5単位のインスリンを連日皮下注し、インスリン治療群として7日後に実験に供した。

##### (2) $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase活性の測定

ラット大動脈をホモジネートし、 $8000 \times g$ 、20分間遠沈後、その上清を $10000 \times g$ 、60分間遠沈して細胞膜分画を得た。シモンズらの方法によりウアバイン感受性 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase活性を測定し、単位時間あたりのNADHの変化量として表した。

##### (3) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定

ラット大動脈を細切後、コラゲナーゼを用いて細胞を単離し、fura 2-AM ( $6.24 \mu\text{M}$ ) と $37^\circ\text{C}$ で45分間インキュベートする事により細胞内にfura 2を取り込ませた。洗浄後、蛍光分光度計にて

$[Ca^{2+}]_i$ を測定した。

#### (4) Northern Hybridization

ラット大動脈よりグアニジンチオシアネート法でRNAを抽出し, total RNA 20  $\mu$ gを1.4%アガロースゲルで電気泳動後, ニトロセルロース膜にプロットした。Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  1,  $\alpha$  2,  $\beta$  subunitならびに  $\beta$  actinのcDNAをランダムプライマー法にて<sup>32</sup>Pでラベルし, プローブとして用いた。Northern Hybridizationは42°Cにて18時間行い, 洗浄後オートラジオグラムにかけた。Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaseの各subunitのmRNAの発現量は, そのオートラジオグラムをデンシトメーターで測定し,  $\beta$  actinのmRNAの発現量との比で表した。

#### (5) Western Blotting

ラット大動脈の細胞膜分画10  $\mu$ gを7.5% SDS-PAGEで泳動後, ニトロセルロース膜にプロットし, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  1及び $\alpha$  2 subunitに対するモノクローナル抗体を用いて, アルカリフィオスファターゼ法で検出した。

### 【結果】

(1) ラット大動脈Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase活性はコントロール ( $17.5 \pm 2.1 \mu\text{mol NADH/mgprotein/hr.}$ )と比較すると糖尿病発症2日後にはすでに有意に低下しており ( $9.4 \pm 1.3 \mu\text{mol NADH/mgprotein/hr.}$ ,  $p < 0.05$ ), 7日後, 14日後でも低下したままであった ( $8.2 \pm 1.4$ 及び $9.6 \pm 1.7 \mu\text{mol NADH/mgprotein/hr.}$ )。しかしながらインスリン治療群の糖尿病ラットではNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase活性はほぼ正常に戻っていた ( $14.9 \pm 2.0 \mu\text{mol NADH/mgprotein/hr.}$ )。

(2)  $[Ca^{2+}]_i$ はコントロール ( $153 \pm 7 \text{nM}$ )と比較して糖尿病発症2日後では有意な変化は認められなかつたが ( $133 \pm 12 \text{nM}$ ), 7日後, 14日後には有意に増加した ( $221 \pm 18$ 及び $243 \pm 17 \text{nM}$ ,  $p < 0.001$ )。またインスリン治療群の糖尿病ラットでは  $[Ca^{2+}]_i$ は正常レベルにまで回復した ( $158 \pm 11 \text{nM}$ )。

(3) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  2 subunitのcDNA probeでNorthern Hybridizationを行ったところ, 3.4 kbと5.3 kbの2種類のmRNAのバンドが認められた。コントロールラット大動脈における各mRNAの発現を100%とした場合, 糖尿病発症2日後では5.3 kbのバンドの発現量だけが約38%に減少しており, 糖尿病発症7日後, 14日後では  $\alpha$  2 subunit mRNAの両方のバンドの発現量が有意に減少していた (7日後3.4 kb : 約46%, 5.3 kb : 約25%,  $P < 0.01$ /14日後3.4 kb : 約42%, 5.3 kb : 約24%,  $P < 0.001$ )。またインスリン治療群の糖尿病ラット大動脈では5.3 kb mRNAの発現が約70%にまで回復していた。

(4) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  2 subunitの蛋白質はコントロールと比較して糖尿病発症7日後までは有意な変化は認められなかつたが, 14日後ではmRNAの発現の減少に伴ってNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  2 subunitの蛋白質も有意に減少していた (約69%,  $P < 0.01$ )。

(5) ラット大動脈におけるNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaseの  $\alpha$  1 subunit,  $\beta$  1 subunitのmRNAの発現や,  $\alpha$  1 subunitの蛋白質のレベルは糖尿病の検索したすべての時期において有意な差を認めなかつた。

### 【考察及び結論】

これらの結果によりSTZ糖尿病ラット大動脈においてNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase活性は糖尿病発症直後から低下し, 引き続いてNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaseの合成も低下する事が示された。

以前よりインスリンはNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase活性を刺激する事が知られており, インスリンはカテコラ

ミン等とともに $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPaseをコントロールする重要なメディエーターであると考えられている。

糖尿病や飢餓状態のような低インスリン状態下にある種々の組織において $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性が低下している事が知られているが、今回の我々の結果は糖尿病の大動脈においても $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性が同様に低下する事を示した初めてのものである。

Fleckensteinらは年齢と共に大動脈に $\text{Ca}^{2+}$ が蓄積するだけでなく、コントロールの悪い糖尿病では $\text{Ca}^{2+}$ の蓄積が促進される事を報告している。Herreraらは高血圧ラットの大動脈において $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPaseの $\alpha$  subunitの遺伝子発現に関してisoformに特異的な変化を報告しており、それによると糖尿病における我々の結果と同様、高血圧においても $\alpha$  2 subunitのmRNAの発現が有意に低下している事を認めている。それと同時に、Sadaらは自然発症高血圧ラットから単離した大動脈において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と筋緊張が増加している事を認めている。

Blausteinの仮説が正しく、 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPaseの低下が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の蓄積を促進するなら、STZ誘発糖尿病動物でみられた $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性の低下が糖尿病における高血圧の進展にとって重要な成因の一つであるかもしれない。

### 論文審査の結果の要旨

糖尿病において高血圧が高頻度に合併する事はよく知られているが、その成因の詳細は未だ明らかではない。Blausteinの仮説によると高血圧の成因には血管平滑筋細胞において $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性が低下して細胞内 $\text{Na}^+$ の蓄積が生じる結果、Na-Caチャンネルを介した $\text{Ca}^{2+}$ の流入によって細胞内free  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) が増加することが関与していると言われている。そこで今回、糖尿病ラット大動脈の $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定し、糖尿病における高血圧の進展について検討した。さらに糖尿病ラット大動脈での $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPaseの動態について詳細に検討する目的で $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPaseの活性部位である $\alpha$  1 及び $\alpha$  2 subunit、及びこれと複合体を作り細胞膜へ輸送して完全な酵素活性を持たせるために必要であると言われている $\beta$  subunitの各々につきmRNAならびに蛋白の発現を検討した。

ラットにストレプトゾトシン(STZ)を静注して糖尿病を発症させ、大動脈の $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性を測定したところ、糖尿病発症2日後には既に有意に低下していたが、インスリン治療によりほぼ正常に戻った。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は糖尿病発症2日後では有意な変化は認めなかったが、7日後には有意に増加しており、インスリン治療により回復した。

インスリンは $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性を刺激する事が知られており、糖尿病や飢餓状態などの低インスリン状態では種々の組織において $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性が低下している事が報告されている。今回の結果は糖尿病の大動脈においても $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性が同様に低下している事を示した初めてのものである。

$\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  2 subunitのmRNA及び蛋白の発現は糖尿病の大動脈において有意に低下し、インスリン治療により一部回復した。一方、 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  1 subunit、 $\beta$  subunitのmRNA及び蛋白の発現は糖尿病により影響を受けなかった。 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPaseの各subunitの中でインスリン、カテコールアミン等に感受性があり、regulatory subunitと呼ばれている $\alpha$  2 subunitのみがisoform特異的に糖尿病により影響された事は非常に興味深い。

Blausteinの仮説が正しく、 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性の低下が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の蓄積を促進するなら、糖尿病における大動脈 $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -ATPase活性の低下が高血圧の進展にとって重要な役割を果たしている

可能性が示唆された。

本研究は糖尿病における高血圧の進展について、その大動脈Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaseの関与を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったその酵素の活性ならびに発現に及ぼす糖尿病の影響について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。