

(1)

氏名(生年月日) 田 中 正 巳
 籍 本
 学位の種類 博士(医学)
 学位授与の番号 甲第262号
 学位授与の日付 平成7年5月19日
 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当(医学研究科専攻, 博士課程修了者)
 学位論文題目 **Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells**
 (培養ラット卵巣顆粒膜細胞の分化とアポトーシスの過程におけるアンジオテンシンII2型受容体の検討)
 論文審査委員 (主査) 教授 出村 博
 (副査) 教授 高桑 雄一, 武田 佳彦

主論文の要旨

〔目的〕

アンジオテンシンII (Ang II) の受容体にはタイプ1受容体(AT₁), タイプ2受容体(AT₂)の2種のサブタイプが存在する。AT₁受容体はAng IIの代表的な作用, 即ち, 血圧, 体液量, 電解質バランスなどの調節作用の発現に関与することが明らかにされているのに対して, AT₂受容体の生理作用は明らかではない。今回AT₂受容体の生物学的意義を解明するため, ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系におけるAT₂受容体の特性を検討した。

〔対象および方法〕

未成熟3週齢雌性ラットに5日間エストロゲンを皮下投与した後, 卵巣を摘出し, 顆粒膜細胞を無血清培地で培養した。AT₂受容体結合量は, AT₁結合能を選択的に阻害するdithiothreitolによる前処理後, ¹²⁵I-[Sar¹, Ile⁸]Ang IIとAng IIをリガンドとする結合実験にて評価した。さらに, AT₂受容体結合量の調節因子を明らかにするため, Ang II, LH, FSHおよび各種の成長因子(bFGF, EGF, TGFβ)の影響を検討した。

〔結果〕

顆粒膜細胞の細胞当たりのAT₂受容体結合量は経時的に増加し, 培養開始後48時間におけるK_d, B_{max}は各々7.5×10⁻¹⁰M, 11300 sites/cellであった。AT₂受容体結合量はAng IIの添加により用量依存性に著明な増加を示したが, その作用はAT₁受容体を選択的な

アンタゴニストDup753では阻害されず, AT₂受容体を選択的なアンタゴニストPD123319で阻害された。これに対して, FSHの添加はAT₂受容体結合量を著明に減少させたが, 各種成長因子は影響を与えなかった。さらに, AT₂受容体結合量の増加は, アポトーシスの指標とされるDNA断片化と並行して認められた。

〔考察〕

今回の検討から, 卵巣顆粒膜細胞にはAT₂受容体が存在し, その細胞当たりの受容体量は, 時間依存性かつAng IIの用量依存性に増加することが示された。さらに, Ang IIのこの作用はAT₂受容体自身を介して起ることが明らかとなった。Ang IIは副腎のAT₁受容体をup-regulateすることが報告されているが, AT₂受容体に関する報告はこれが初めてである。Ang IIは卵巣ホルモンの合成に関与するとの報告があり, AT₂受容体のup-regulationは, その際Ang IIの作用を増強する役割を担っていると考えられる。

従来よりFSHは, 卵巣顆粒膜細胞のFSH, LH, プロラクチン, EGF, ソマトメジンC, ゴナドトロピン遊離刺激ホルモンなどの種々のホルモンの受容体を増加させることが報告されているが, 今回我々は, FSHがAT₂受容体の発現を著明に抑制することを明らかにした。即ち, AT₂受容体は顆粒膜細胞においてFSHにその発現が抑制されることが示された初めての受容体である。

卵巣顆粒膜細胞における AT₂受容体の生理的意義の詳細は明らかではない。しかしながら、既に AT₂受容体は主に閉鎖細胞に存在することが報告されていることに加えて、今回その経時的変化が細胞内 DNA の断片化に並行し、また卵胞の成熟を促進する FSH にて減少することを明らかにしたことから、AT₂受容体は顆粒膜細胞のアポトーシスや卵胞の分化に関与することが示唆された。

〔結論〕

1. ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系において、細

胞当たりの AT₂受容体結合量は時間依存性に増加した。

2. Ang II はその受容体である AT₂受容体の結合量を増加させたのに対して、卵胞の成熟を促進する FSH は AT₂受容体結合量を減少させた。

3. AT₂受容体結合量の経時的変化は細胞内 DNA の断片化と並行していた。

以上のことから、AT₂受容体は顆粒膜細胞のアポトーシスや卵胞の分化に関与することが示唆された。

論文審査の要旨

本論文は、未解明であったアンジオテンシン II (Ang II) の 2 種の受容体のうち、従来その生理作用が不明であった II 型 (AT₂) 受容体の生物学的意義を解明するため、ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養系を用いて検討し主に以下の 3 点を明らかにしたものである。

第 1 にこの培養系において、細胞あたりの AT₂受容媒体結合量は時間依存性に増加した。

第 2 に Ang II は AT₂受容体の結合量を増加させたが FSH は AT₂受容結合量を減少させた。

第 3 に AT₂受容体結合量の経時的変化は細胞内 DNA の結合量を減少させた。

本論文は、AT₂受容体の up-regulation が Ang II の作用の増強する役割を担っていること、AT₂受容体が顆粒膜細胞のアポトーシスや卵胞の分化に関与することを世界に先がけて明らかにしたもので、学術上価値の高い論文である。

主論文公表誌

Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells (培養ラット卵巣顆粒膜細胞の分化とアポトーシスの過程におけるアンジオテンシン II 2 型受容体の検討) *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol 207 No2 592-598頁 (1995年 1月15日発行)

Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, Sugimoto M, Usuki S, Naruse M, Murakami K, Miyazaki H

副論文公表誌

- 1) アンジオテンシン変換酵素阻害薬とアンジオテンシン受容体拮抗薬。ホルモンと臨 42(12): 59-65 (1993) 田中正巳, 成瀬光栄, 吉本貴宣, 成瀬清子, 出村 博
- 2) Effect of dithiothreitol on angiotensin II receptor type II in rat ovarian cultured granulosa cells (ジチオスレイトールが培養ラット卵巣顆粒膜細胞のアンジオテンシン II 2 型受容体におよぼす影響). *Biochem Biophys Acta* 1192: 286-288 (1994) Ohnishi J, Tanaka M, Naruse M, Usuki S, Murakami K, Miyazaki H

- 3) ヒト血中免疫活性ウワバインの病態生理学的意義. *Ther Res* 15(1): 208-212 (1993) 成瀬光栄, 成瀬清子, 田辺晶代, 吉本貴宣, 渡辺康子, 栗本文彦, 堀場伸郎, 田中正巳, 田村正明, 稻上 正, 出村 博
- 4) 高コレステロール血症における HMG-CoA 還元酵素阻害剤プラバスタチン投与時のエスケープ現象とシンバスタチンの効果. *動脈硬化* 22: 301-306 (1993) 成瀬光栄, 吉本貴宣, 成瀬清子, 田中正巳, 関 敏郎, 長谷充康, 出村 博
- 5) エストロゲン誘発性高血圧. *日臨 (内分泌症候群一関連内分泌病を含めて下巻)*: 624-627 (1994) 成瀬光栄, 成瀬清子, 吉原 泉, 長谷素子, 田辺晶代, 吉本貴宣, 田中正巳, 出村 博
- 6) エンドセリン拮抗薬. *循環器科* 34(脈管作動性物質およびその拮抗薬の臨床応用): 34-39 (1993) 成瀬光栄, 成瀬清子, 吉村貴宣, 田辺晶代, 田中正巳, 出村 博
- 7) 総説: 高血圧における一酸化窒素 (Nitric oxide, NO) の臨床的意義. *日内分泌会誌* 70(5): 489-502 (1994) 成瀬光栄, 成瀬清子, 吉本貴宣, 田中正巳, 田辺晶代, 出村 博