

氏名・(本籍) 磯野元秀(滋賀県)
学位の種類 博士(医学)
学位記番号 博士第270号
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日 平成10年3月24日
学位論文題目 ANP inhibits endothelin-1-induced activation of JNK in glomerular mesangial cells
(糸球体メサンギウム細胞において、ANPはエンドセリン-1によるJNK活性化を抑制する)

審査委員 主査 教授 木之下 正彦
副査 教授 戸田 昇
副査 教授 吉川 隆一

論文内容の要旨

【目的】

腎糸球体メサンギウム細胞は、収縮能・増殖能・細胞外基質産生能などを有し、腎糸球体機能調節に重要な役割を担っている。血管作働性物質の一つであるendothelin-1(ET-1)は、メサンギウム細胞の収縮・増殖・細胞外基質産生亢進作用を有しており、生理的及び病的状態において同細胞機能を修飾していると考えられる。一方、血管弛緩物質であるatrial natriuretic peptide(ANP)は、メサンギウム細胞におけるこれらのET-1作用に拮抗することが知られている。しかし、このようなANPのET-1に対する拮抗作用のメカニズムは未だ十分に解明されていない。近年、細胞内情報伝達系において、種々の細胞外刺激により活性化されるmitogen-activated protein kinase(MAPK)ファミリーの重要性が提唱されているが、その1つであるc-Jun NH₂-terminal kinase(JNK)がET-1により活性化されることを共同研究者らが報告した。そこで、本研究は、メサンギウム細胞におけるANPの抗ET-1作用機構を明らかにするため、ET-1のJNK活性化に対するANPの効果に関し検討を行った。

【方法】

1. 腎糸球体メサンギウム細胞の培養法；SD系雄性ラットより単離した腎糸球体を培養し、メサンギウム細胞を得た。0.4% fetal bovine serumを含む培養液にて24時間孵置したsubconfluent(80%)の細胞を、ANPで前処置後ET-1あるいはIL-1 β で刺激し、以下の測定を行った。
2. JNK活性；JNK活性は、JNKがc-Junのアミノ酸末端に結合し、近傍のセリンをリン酸化する特性を利用したsolid phase kinase法を用いた。すなわち、細胞をANPで前処置後、ET-1等にて刺激し、細胞溶解液をグルタチオンセファロースビーズに結合したGST-c-Junと反応させ、ビーズを回収した後、基質であるGST-c-Jun上でリン酸化反応を行い、c-Junへのリン酸化能を測定した。
3. JNKのリン酸化；JNKのリン酸化は、リン酸化されたJNKの183番のスレオニンと185番目のチロシン残基を認識する特異抗体を用いたimmunoblot法で検討した。
4. 細胞内カルシウム濃度；カルシウム感受性蛍光色素fura-2で前処置した細胞の蛍光強度比を測定することにより細胞内カルシウム濃度を算出した。
5. AP-1のDNA結合能；核蛋白を抽出し、ラベルしたAP-1 consensus oligonucleotideと反応させ、gel mobility shift法を用いて、AP-1の結合能を測定した。

【結果】

1. メサンギウム細胞において、ANPはET-1によるJNK活性化を濃度依存性に抑制した。
2. ET-1によるJNK活性化に対するANPの抑制効果は、ANPのbiological receptorの特異的拮抗剤であるHS142-1により阻止された。

3. 細胞内cGMP増加物質である8-Br-cGMPとSNPも、ET-1によるJNK活性化を抑制した。
4. Interleukin-1 β (IL-1 β)は、濃度依存性にJNK活性を増加させたが、このIL-1 β の効果はANPにより抑制されなかった。
5. ET-1、IL-1 β 刺激により、JNKのリン酸化は亢進した。ANPは、ET-1によるJNKのリン酸化亢進は抑制したが、IL-1 β によるJNKのリン酸化亢進は抑制しなかった。
6. ANPは、ET-1の細胞内カルシウム上昇作用を濃度依存性に抑制した。
7. ANPは、ET-1によるAP-1のDNA結合能亢進を抑制したが、IL-1 β によるAP-1のDNA結合能亢進は抑制しなかった。

【考 察】

メサンギウム細胞において、ANPはET-1によるJNK活性化を抑制することを示した。その作用は、ANPがbiological receptorに結合し、細胞内cGMPを増加させることにより発揮されると考えられた。一方、IL-1 β もJNKを活性化するが、その活性化はANPにより抑制されなかった。さらに、ANPはET-1による細胞内カルシウムの上昇を抑制した。これまで、ET-1によるJNK活性化はカルシウム依存性であること、またIL-1 β は細胞内カルシウムに影響を及ぼさないと報告されていることから、ANPは、ET-1による細胞内カルシウムの上昇を抑えることにより、JNKの活性化作用を抑制している可能性が考えられる。また、ANPは、ET-1によるAP-1のDNA結合能亢進も抑制したことから、ANPは、JNKの抑制を介しc-Junの転写活性を抑制することで転写因子であるAP-1のDNA結合能亢進を抑制する可能性が示唆された。以上の結果より、ANPは、ET-1により活性化される細胞内情報伝達経路を抑制することで、ET-1の様々な作用に拮抗している可能性が考えられた。

【結 論】

培養メサンギウム細胞において、ANPは、ET-1によるJNKの活性化及びAP-1のDNA結合能亢進を抑制した。

論文審査の結果の要旨

培養メサンギウム細胞における心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の抗エンドセリン-1 (ET-1) 作用機構を明らかにする目的で、ET-1とANPの細胞内情報伝達経路に及ぼす影響、特にc-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) に対する作用を検討し、以下の結果を得た。

- 1) ANPは、JNK活性化およびリン酸化を抑制した。
- 2) ET-1のJNK活性化作用のANPによる抑制は、ANPのbiological receptor拮抗剤であるHS-142-1で阻害された。
- 3) ANPは、ET-1による細胞内カルシウム上昇を抑制した。
- 4) ANPは、転写因子AP-1のDNA結合能亢進作用を抑制した。

以上の研究は、メサンギウム細胞の増殖・細胞外基質産生に対するANPの抑制作用の機序を考察する上で重要な意味を持つものであり、博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月6日実施の論文内容と、それに関連した試問を受け、合格と認められたものである。