

氏名(本籍)	西尾利樹(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与の要件	博士第410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14年3月25日
学位論文題目	Cyclic AMP inhibits stretch-induced overexpression of fibronectin in glomerular mesangial cells (メサンギウム細胞において、機械的伸展刺激によるフィブロネクチンの過剰発現はサイクリックAMPにより抑制される)

審査委員	主査 教授	松浦 博
	副査 教授	安藤 喬志
	副査 教授	木村 博

論文内容の要旨

【目的】

進行性糸球体疾患の発症・進展因子の一つとして糸球体高血圧が注目されている。糸球体高血圧は糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞に伸展刺激を与え、細胞外基質産生を増加させ、糸球体硬化を惹起すると提唱されている。我々は、糸球体高血圧のin vitroモデルと考えられている機械的伸展刺激が細胞外基質産生亢進を引き起こす機序として、mitogen-activated protein kinases (MAPKs) の活性化によるactivator protein-1 (AP-1) のDNA結合能の増強が重要である可能性を報告してきた。また、種々のアゴニストによるMAPKsの活性化を、cAMPが抑制することも報告してきた。そこで本研究は、機械的伸展刺激の細胞外基質(フィブロネクチン)産生増加作用をcAMPが抑制するか否かを明らかにすることを目的とした。

【方法】

腎糸球体メサンギウム細胞を20%FCSを含むRPMI1640培地にて培養し、第4～9継代の細胞を実験に使用した。細胞をフレクサーセル上で培養し、subconfluentの状態にて24時間0.2%BSAを含むRPMI1640培地にてstarvationした後、機械的伸展刺激(20%elongation、60cycles/min)を加えた。cAMPの効果は、dibutyryl cAMPあるいはberaprost sodium存在下に、機械的伸展刺激を加えて検討した。さらに、protein kinase A (PKA) 阻害剤(KT5720)を用い、PKAの関与を検討した。

1. MAPK superfamilyを構成している、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) およびp38 MAPKの活性は、機械的伸展刺激を15分間加えた後、Western blot法にて検討した。
2. AP-1のDNA結合能は、機械的伸展刺激を1時間加えた後、gel shift法にて検討した。ラットフィブロネクチンプロモーター領域にはconsensus AP-1 siteは存在せず、-463から-437に存在するAP-1 like siteが、フィブロネクチンmRNAの発現に関与していることが報告されていることから、consensus AP-1 およびAP-1 like oligonucleotidesを使って検討し、さらにc-fosおよびc-jun抗体を用いたsupershift assayを行った。
3. フィブロネクチンmRNA発現は、機械的伸展刺激を6時間加えた後、Northern blot法にて検討した。

【結果】

1. 機械的伸展刺激によりMAPKs (ERK、JNK、p38 MAPK) は有意に活性化され、この活性化は、dibutyryl cAMPおよびberaprost sodiumにより濃度依存性に有意に抑制された。また、KT5720によってこの抑制効果は消失した。
2. Consensus AP-1 siteおよびAP-1 like siteに対するAP-1結合能は、beraprost sodium

によって有意に低下し、KT5720を加える事により、その効果は消失した。c-fosおよびc-jun抗体にて、機械的伸展刺激で認められたAP-1/DNA複合体のsupershiftが確認された。

3. フィブロネクチンmRNAの発現を検討したところ、機械的伸展刺激によりその発現は有意に増加し、beraprost sodiumを付加することによって有意に抑制された。そして、KT5720によりこの抑制効果は解除された。

【考 察】

機械的伸展刺激をメサンギウム細胞に加えることで増加したMAPKs (ERK、JNK、p38、MAPK) 活性は、cAMPにより抑制され、KT5720により抑制効果は解除された。このことより、cAMPがPKAを活性化してMAPKs活性を抑制すると考えられた。そして、機械的伸展刺激によるAP-1のDNA結合能亢進は、c-fosおよびc-jun抗体にてAP-1/DNA複合体がsupershiftされることから、ERKを介するc-FosとJNKを介するc-Junより構成されているAP-1によるものと考えられた。また、フィブロネクチンmRNAの発現には転写因子であるAP-1の活性が必要と考えられており、cAMPはERKおよびJNK活性の抑制により、AP-1のDNA結合能を低下させ、フィブロネクチンmRNAの発現を抑制したと考えられた。このことより、機械的伸展刺激によるフィブロネクチンmRNAの過剰発現は、cAMPによって抑制される可能性が示唆された。以上の成績から、cAMPはMAPKsカスケードを介する細胞外基質(フィブロネクチン)産生増加を抑制し、糸球体硬化を予防する可能性が示唆される。

【結 論】

機械的伸展刺激によるフィブロネクチンmRNA発現の増強は、cAMP/PKA axisを介するMAPKs-AP-1活性の抑制により減弱した。

論文審査の結果の要旨

進行性糸球体疾患の発症・進展因子の一つである糸球体高血圧は、糸球体メサンギウム細胞に伸展刺激を与え、フィブロネクチンなどの細胞外基質産生を増加させ糸球体硬化を惹起すると考えられている。この伸展刺激によるフィブロネクチン産生亢進の機序として、mitogen-activated protein kinases (MAPKs)の活性化を介するactivator protein-1 (AP-1)のDNA結合能の増強が重要であると報告されている。

本研究は培養ラットメサンギウム細胞を用いて、機械的伸展刺激によるフィブロネクチンの過剰産生におよぼすサイクリックAMP (cAMP)ープロテインキナーゼA (PKA)系の効果を検討したものである。細胞内cAMP濃度を増大させるberaprost sodiumは、機械的伸展刺激により増強したERK (extracellular signal-regulated kinase)、JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) およびp38 MAPKの活性、AP-1のDNA結合能およびフィブロネクチンmRNAの発現を用量依存性に抑制した。Beraprost sodiumによるこれらの抑制効果はいずれもPKAの選択的阻害剤であるKT5720 (1 μM)により完全に消失した。

以上の結果より、細胞内cAMPはPKAを活性化してMAPKs活性を低下させ、フィブロネクチンの産生を抑制していると考えられた。

このように本論文は腎糸球体疾患の発症機序ならびにその制御機構について重要な知見を与えたものであり、博士(医学)の学位論文に値するものである。

なお、本学位授与申請者は平成14年2月12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。