

Title	糸球体メサンギウム細胞におけるMAPキナーゼ脱リン酸化酵素MKP-1 (MAP kinase phosphatase-1) の遺伝子発現とその意義
Author(s)	諶, 霞
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39830
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	ちん 謙 しやう 霞
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 2 3 9 1 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	糸球体メサンギウム細胞における MAP キナーゼ脱リン酸化酵素 MKP-1 (MAP kinase phosphatase-1) の遺伝子発現とその意義
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 安東 明夫 教授 高井 義美

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

糸球体メサンギウム細胞 (MC) 増殖は糸球体腎炎の進展過程において重要な役割を果たしている。MC 増殖過程には血小板由来増殖因子 (PDGF), 上皮成長因子 (EGF), アンジオテンシン II (Ang II), アルギニンバゾプレッシン (AVP), エンドセリン-1 (ET-1) などの種々の因子が関与することが知られており, これら因子の刺激伝達系の下流に MAP キナーゼが存在する。MAP キナーゼは MAP キナーゼキナーゼによって Thr (183) と Tyr (185) のリン酸化を受けることで活性化される。その不活性化は MKP-1 (MAP kinase phosphatase-1) と呼ばれるスレオニン/チロシン両残基に特異的な蛋白質脱リン酸化酵素によって行われる。MKP-1 は NIH 3T3 細胞において 1985 年に同定された immediately early gene の一種である。本研究は MKP-1 の糸球体メサンギウム細胞増殖における関与を明らかにする目的で, 培養 MC および実験腎炎モデルラット糸球体における MKP-1 の発現動態を検討した。さらに, 誘導された MKP-1 の機能を明らかにするために, MKP-1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN) を用い, 培養 MC における MAP キナーゼ活性調節および細胞増殖過程における MKP-1 の役割を検討した。

[方法ならびに成績]

1. ラット MC の培養と同定

Sprague-Dawley 系雄性ラット (4 週令, 約 100g) より腎皮質から sieving 法によって糸球体を単離した。単離糸球体を培養後 3 週間頃優勢となる細胞を 4-6 継代し, 実験に供した。MC は, (1) 星状あるいは紡錘型の細胞であること, (2) hill and valley と呼ばれる特徴的な増殖形態を呈すること, (3) 細胞の内部に豊富な actin 線維を有すること, 及び (4) desmin, vimentin, α -smooth muscle actin 染色で陽性であることから同定した。

2. 培養 MC における MKP-1 遺伝子発現誘導

1) 血清による MKP-1 mRNA の発現

培養 MC を 48 時間無血清培養後, 10% FCS により刺激し, total RNA を経時的に単離し, Northern blotting を施行した。FCS 刺激前には MKP-1 mRNA 発現はほとんど認められなかったが, 刺激後 15 分間で MKP-1 mRNA が認められ, 60 分間で最大 (対照の 7 倍) となった。

2) 増殖因子及び血管作動性ペプチドによる MKP-1 mRNA 発現

MCをEGF (100ng/ml), PDGF (20ng/ml), TPA (100ng/ml), AVP (100nM), Ang II (100nM), ET-1 (100nM)で刺激したところ、刺激後30-60分をピークにMKP-1 mRNA発現が誘導された。しかし、血管作動性ペプチド (Ang II, AVP, ET-1)によりMKP-1発現は有意な増強を認めるものの、その程度はFCS, 増殖因子に比し弱かった。

3. 抗Thy-1腎炎モデルラット糸球体におけるMKP-1遺伝子発現

メサンギウム増殖性腎炎のモデルである抗Tyr-1腎炎ラットを抗Thy-1モノクローナル抗体(OX-7)一回静注法により作成した。このモデルにおいてはメサンギウム細胞増殖は3日目より始まり、5-7日でピークを迎える。腎炎惹起後1, 3, 5, 7日での糸球体におけるMKP-1遺伝子発現をNorthern blottingによって分析したところ、3日後に正常対照の4.3倍のピークを示すmRNAレベルの増加が認められた。

4. MKP-1アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS-ODN)によるMKP-1 mRNA発現抑制

MKP-1遺伝子発現を抑制する目的でMKP-1に対する2種類のAS-ODNを作製した(AS-1, 5'-GCCACCTCCATCACCAT-3')(AS-2, 5'-GGAAGTCTCAGTGGAACTCAGG-3')。対照として、センスODN(S-1, 5'-ATGGTGATGGA GGTGGG-3'), mutated ODN(M-1, 5'-GCTCACCACCCTCAGAT-3'), mutated ODN(M-2, 5'-AGGTCCTGAAAGCGAAGTCG-3')を作製した。subconfluent MCを用いAS-1 (10 μ M)をLipofectinを用いてトランスフェクションし、5%FCS存在下に72時間培養後RNAをNorthern blottingで分析したところ、AS-ODN処理した細胞においてMKP-1 mRNA発現はコントロールと比較して約30%の減少を認めた。

5. MKP-1のMAPキナーゼ活性制御における関与

静止期MCに4時間ODNのトランスフェクションをした後、5%FCSによって刺激し、MAPキナーゼ活性を測定した。FCS刺激後5分には、対照とAS-ODN処理細胞両群ともMAPキナーゼ活性がピークになり、その後経時的に低下した。240分の時点でAS-ODN処理群のMAPキナーゼ活性の低下は対照に比し遅延しており、対照群の約2倍であった。また、用いたAS-ODNの抑制効果の特異性を示すために、MKP-1 mRNAの異なる部位に対する2種類のAS-ODNを用いた実験を行い同様の結果を得た。

6. MKP-1の培養MC増殖における役割

静止期MCに4時間ODNのトランスフェクションした後、5%FCS或いはPDGF (10ng/ml)刺激を行って、³H-thymidine取り込みおよび細胞数計測により細胞増殖を検討した。AS-ODN (1 μ M)処理された細胞では対照であるセンス群に比べ、³H-thymidine取り込みが80%抑制された。次に、トランスフェクション後1週間経時的に細胞数を測定したところ、2種類のAS-ODN処理細胞群とも、対照群に比べ約50%の細胞数低下が認められた。

[総括]

本研究ではMKP-1がMCにおいて各種増殖刺激によって速やかに一過性に誘導されることが明らかとなりまた、メサンギウム増殖性腎炎モデルラット糸球体におけるMKP-1発現も細胞増殖の開始とともに増強を認めた。一方アンチセンスODNを用いたMKP-1の特異的阻害によりMAPキナーゼの不活性化が遅延し、また細胞増殖が抑制された。以上の結果はMKP-1のメサンギウム増殖性病変形成過程における積極的な関与を示唆するものである。従来、増殖過程においてはMAPキナーゼの活性化のみが注目されていたが、本研究は活性化されたMAPキナーゼが不活性化されることの重要性を提起するものである。

論文審査の結果の要旨

MAPキナーゼは細胞の増殖と分化という極めて重要な細胞機能のシグナルを伝達している。本研究は、このMAPキナーゼ活性を調節しているMAPキナーゼ脱リン酸化酵素(MKP-1)の糸球体腎炎の発症進展に果たす役割を解明しようとしたものである。まず、腎炎発症の中心的役割を果たすメサンギウム細胞の培養系において、MKP-1が種々の増殖刺激によって発現誘導されることを明らかにした。また、増殖因子の刺激により誘導された内因性M

KP-1が、メサンギウム細胞の増殖刺激の伝達に必要であることをMKP-1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた実験で見出した。アンチセンスオリゴ処理の結果、増殖因子刺激により活性化されたMAPキナーゼが不活性化されず、MAPキナーゼ活性が持続した。さらに、メサンギウム増殖性腎炎モデルラットの糸球体でMKP-1の遺伝子発現が亢進していることも明らかとした。以上の知見は、メサンギウム細胞増殖過程において、MAPキナーゼの活性化とともにその不活性化が重要な役割を果たすことを提唱するものである。本研究は、メサンギウム細胞増殖機構およびメサンギウム増殖性腎炎の病態の理解に新たな視点を与えるものとして高く評価されるものであり、学位に値するものと考えられる。