



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)	謹, 霞
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39830
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	ちん 謙	しゃ 霞
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	第12391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), アンギオテンシンII(AngII), 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NIH3T3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'-GGAACCTCAGTGGAACCTCAGG-3')。対照として、センスODN (S-1, 5'-ATGGTGATGGA GGTGGGC-3'), mutated ODN (M-1, 5'-GCTCACCACCCCTCAC GAT-3'), mutated ODN (M-2, 5'-AGGTCCCTGAAAGCGAAGTCG-3')を作製した。subconfluent MCを用いAS-1 (10μM)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をした後、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 (1μM)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。