



Title	フィブロネクチンの代謝・排泄動態と腎障害に関する研究
Author(s)	西澤, 美徳
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41121
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名 西澤 美徳

博士の専攻分野の名称 博士(薬学)

学位記番号 第14794号

学位授与年月日 平成11年3月25日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文名 フィブロネクチンの代謝・排泄動態と腎障害に関する研究

論文審査委員 (主査)

教授 真弓 忠範

(副査)

教授 前田 正知 教授 山元 弘 教授 馬場 明道

論文内容の要旨

細胞外マトリックス (ECM) を構成する主要成分のひとつであるフィブロネクチン (FN) は、細胞の ECM への接着を媒介することにより細胞の機能を調節していると考えられている。FN は、ある種のプロテアーゼにより分解を受けるとインタクトな分子では観察されない特異な生物活性を有するフラグメントを放出し、本来ダウンレギュレーターとして作用するはずのプロテアーゼによる分解を受けることによってその機能的多様性を拡大し、インタクト FN とともに様々な生理現象のみならず病態現象にも複雑に関与しているものと考えられる。しかしながら、このようなユニークな機能動態を有する FN の代謝・排泄に関する報告は意外にも少なく、FN 分子の代謝・排泄動態はあまり解明されていないのが現状である。そこで、正常ラットと糸球体腎炎モデルのひとつである受動型ハイマン腎炎 (PHN) ラットにおける FN 関連物質の尿中排泄動態を比較することにより FN の代謝・排泄動態の解明を試み、あわせて FN フラグメントの PHN 誘導による腎障害に及ぼす影響についても究明を試みた。

FN 分解物にはしばしば特異的生物活性が検出されるため、FN 関連物質の尿中への排泄動態究明にあたっては量的な評価にもまして質的な評価が重要と考え Immunoblot 法による検討が試みたが、尿中には免疫グロブリンと反応性を示す蛋白質が多数存在することが判明し、Immunoblot 法のプロッキング条件を改良した。これにより、尿中に排泄された FN フラグメントがどのような機能性ドメインに由来しているのか検出することが可能となった。

この改良した Immunoblot 法および ELISA を用い正常ラットおよび抗 Fx1A 抗体を投与することにより誘導した PHN ラットにおける FN 関連物質の尿中排泄動態を解析したところ、正常ラットの FN 関連物質の尿中排泄量は、定量を実施した 0 ~ 6 週間一定の値 (約 0.2 μg/day) を維持していたが、PHN ラットでは抗 Fx1A 抗体投与後 1 週目より増加し、2 週目に最大 (4.9 ± 3.5 μg/day) となった。その後 3 週目より急激に減少し、尿中への蛋白質の排泄パターンとは異なっていた。これらのことより、PHN の発症により FN 分子に特異的な何らかの変化が生じている可能性が示された。Immunoblot 法によるさらなる検討で、正常ラットの尿中には 55 および 65 K の細胞結合性 (CCB) ドメイン由来の FN フラグメントが排泄されていることが明らかとなった。一方、PHN ラットの尿中には、正常ラット尿中に認められた二種類のフラグメントは認められず、インタクト FN に加え CCB ドメインを含む 150 K のフラグメントをはじめとした高分子 (100 ~ 200 K) フラグメントを多数認めた。また、PHN 発症に伴い尿中へ排泄される FN フラグメントの起源を同定すべく血漿中の FN 関連物質の Immunoblot 解析の結果、PHN ラット血漿中にもインタクト FN および多数の高分子 FN フラグメントが検出されたため、PHN ラット尿中に認められた FN

フラグメントは血漿中のインタクト FN およびフラグメントの一部が、尿中へ漏出してきたものであると考えられた。

次に、正常および PHN ラット間の FN の排泄動態の違いをさらに検討すべくラット腎皮質中における FN 分解活性の違いの有無を検討したところ、正常および PHN ラット腎皮質ホモジネートはともにインタクト FN を分解し、それらの FN 分解能はほぼ同程度であった。この結果と PHN の基本病変が腎糸球体に集中することを考えあわせると、PHN ラット尿中に排泄される FN フラグメントは腎糸球体周辺で産生されたものと考えられた。また、インタクト FN を分解するプロテアーゼはチオール（システイン）プロテアーゼあるいはメタロプロテアーゼである可能性が示された。ECM 成分を特異的に分解するメタロプロテアーゼとしてマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が知られていることから、FN を分解する酵素として MMP に注目し、各種 MMP によりインタクト FN が分解可能であるか否かを検討した。その結果、MMP はインタクト FN を N 末端側フィブリン結合 (Fib 1) ドメイン、CCB ドメインあるいは C 末端側フィブリン結合 (Fib 2) ドメインを含む様々な分子サイズのフラグメントに分解した。また、これらの FN フラグメントには、PHN ラット尿中に検出された 150K の CCB ドメインとその両端のドメインを含むと考えられるフラグメントも存在していた。また、これらの FN フラグメントは、CCB ドメイン、Fib 1 ドメインおよび Fib 2 ドメインに由来するフラグメントに特異的な生物活性をそれぞれ示したことから、MMP は各機能性ドメインに特異的な生物活性を保持した FN フラグメントを遊離することが明らかとなった。特に MMP-2 (ゼラチナーゼ A) は、その作用が強かった。ある種の腎炎においては MMP-2 が、メサンギオリーシス部や糸球体基底膜の断裂部に存在して組織破壊をもたらすという報告があり、PHN の病態進行においても MMP の関与が推測され、MMP により分解されてきた FN フラグメントが腎細胞の機能調節を行っている可能性が考えられた。

そこで最後に PHN の誘導により腎臓で産生されたと考えられる CCB ドメインとその両端のドメインを含む 150K の FN フラグメントが、実際に腎細胞に対しどのような影響を及ぼすのかを正常ラット腎メサンギウム細胞を用いた *in vitro* 培養系により検討したところ、この FN フラグメントはメサンギウム細胞にアポトーシスを引起すことが明らかとなった。この作用は、細胞の FN 基質からの脱着によるものであると考えられ、その機序は FN フラグメントのメサンギウム細胞と FN との競合的接着抑制およびメサンギウム細胞による MMP の産生あるいは活性化の亢進であることが示された。したがって、PHN の誘導に伴って腎糸球体周辺で遊離してきた CCB ドメインを含む FN フラグメントは、腎障害において増悪因子として作用している可能性が考えられた。

以上、本研究により FN の代謝・排泄動態および PHN の誘導による腎障害に対する FN フラグメントの影響について一端が解明できたものと考える。

論文審査の結果の要旨

ヒト膜性腎症の代表的実験モデルのひとつである受動型ハイマン腎炎 (passive Heymann nephritis : PHN) は、ラット近立尿細管刷子縁由来の分画 Fx1A に対する抗体 (抗ラット Fx1A 抗体) を静脈内投与することにより誘導することができ、糸球体上皮細胞から基底膜を場とする局所的な免疫複合体 (immune complex : IC) の形成が、その発現機序と考えられている。この腎炎モデルにおける蛋白尿の発現機序として、Adler らは抗 Fx1A 抗体中に含まれる抗インテグリン $\beta 1$ 抗体による糸球体上皮細胞の糸球体基底膜への接着抑制によるものであろうと推論している。しかしながら、糸球体構成細胞のひとつであり糸球体の支持、収縮の役割を果たしているメサンギウム細胞に及ぼす FN をはじめとする ECM 構成成分の影響については明らかとなっていない。著者は、ECM 領域で起る免疫複合体に端を発する炎症反応の結果、糸球体周辺での組織破壊に伴った炎症性プロテアーゼによる ECM 分子の分解により産生される FN 分解物 (代謝産物) こそがメサンギウム細胞に増悪的に作用するのではないかと考え研究を開始した。その結果、

1. PHN ラット尿中にはインタクト FN のみならず分子量 150kDa などの FN フラグメントが排泄されていることを明らかとした。
2. PHN の誘導に伴う濾過機能等の障害によりインタクト FN が遊離されてくるだけでなく、未知の機構により細胞外に漏出してきた腎臓由来のプロテアーゼにより、インタクト FN は分解され、そのひとつはマトリックスメタロプロ

ロテアーゼを示した。

3. MMPはインタクトFNを分解し、分解により產生してきたFNフラグメントは各機能性ドメイン特有の生物活性を保持した状態のまま遊離されることが明らかとなった。また、MMPによるインタクトFNの分解により、CCBドメインを含む分子量150kDaのFNフラグメントが產生されることが判明した。

4. CCBドメインおよびそれに隣接するドメインを含むこの150kFNフラグメントは培養メサンギウム細胞の細胞外マトリックス基質からの脱着を競合的に促進し、最終的に細胞死（アポトーシス）を惹起する事を明らかにした。

これらのことより、少なくとも細胞結合性ドメインを含む150kDaFNフラグメントは、腎炎発症後の腎障害の進行において増悪因子として作用している事を明らかにした点、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考える。