

氏名(本籍)	金 崎 啓 造 (広島県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士第433号		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位授与年月日	平成15年3月27日		
学位論文題目	N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline Inhibits TGF-β-Mediated Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression via Inhibition of Smad Pathway in Human Mesangial Cells (N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Prolineはヒトメサンギウム細胞においてTGF- β 刺激によるPlasminogen Activator Inhibitor-1の発現を阻害する)		
	審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
		副査 教授	松 末 吉 隆
		副査 教授	小笠原 一 誠

論文内容要旨

【背景と目的】

近年の大規模臨床試験において、進行性腎疾患に対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACE-I)の腎保護作用が報告されている。ACE-Iは、アンジオテンシン受容拮抗薬(ARB)と同様、糸球体高血圧を是正することにより腎保護作用を発揮すると考えられているが、ACE-IとARBの併用療法がより強力な腎保護作用を発揮するとの報告から、ACE-IはARBにはない薬理作用を有する事が推測される。そこでACE-I服用時に血中濃度が増加する幹細胞増殖抑制因子N-Acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline(Ac-SDKP)に注目し、進行性腎疾患を含めて繊維性増殖疾患の発症進展に重要な役割を演じているサイトカイン、TGF- β の作用に対するAc-SDKPの効果を検討することにより、Ac-SDKPの腎保護作用における可能性を検討した。

【方法】

全実験において正常ヒト培養メサンギウム細胞の細胞株であるCryo NHMCを用いた。

1) Ac-SDKP有無の条件で下記の実験を行った。

a) TGF- β 1刺激後、標的遺伝子発現(plasminogen activator inhibitor-1, alpha2(I)collagen)をNorthern blot法で検討した。

b) TGF- β 1刺激後、extracellular-signal regulated kinase(ERK)、Smad2のリン酸化をWestern blot法にて検討した。

c) TGF- β 1刺激後、細胞質から核内に移行した転写因子(Smad)をWestern blot法、蛍光抗体法にて検討した。

d) TGF- β 1刺激後、転写活性をLuciferase assayにて検討した。

2) Smad7に関しては、さらに詳細に下記の実験を行った。

a) Smad7 mRNA発現を、Ac-SDKPの有無にて検討した。

b) 過剰発現させたSmad7の細胞内局在をAc-SDKP孵置、TGF- β 1刺激の有無にて蛍光抗体法を用い検討した。

c) 過剰発現させたSmad7のAc-SDKPによる細胞内局在変化は、Western blot法でも検討した。

【結果】

ヒト培養メサンギウム細胞において、1) TGF- β 1刺激後のplasminogen activator inhibitor-1(PAI-1), alpha2(I)collagen2(COL1A2)の遺伝子発現はAc-SDKPの孵置で有意に抑制された。

2) Ac-SDKPはTGF- β 1刺激によるSmad2のリン酸化、Smad2,3の核内移行、及びSmad結合領域を含むレポーター活性を抑制した。また、Smad2リン酸化抑制効果にはAc-SDKPの前孵置1時間以上が必要であった。3) Ac-SDKPはTGF- β 1によるERKのリン酸化を抑制しなかった。また、Ac-SDKP単独でERKのリン酸化が認められた。4) Ac-SDKPは抑制型Smad、Smad7の遺伝子発現を増強しなかった。5) 過剰発現させたSmad7はAc-SDKP孵置により核から細胞質に局在変化した。また、この局在変化はAc-SDKP孵置1時間後から認められた。

【考 察】

ACE-I投与時に生体内で血中濃度が増加するペプチドAc-SDKPが、メサングウム細胞において、TGF- β のPAI-1及びCOL1A2遺伝子増強作用を抑制する事が明らかとなった。TGF- β の細胞内情報伝達系の解析から、Ac-SDKPはTGF- β による受容体調節型Smadのリン酸化、核内移行を抑制することが明らかとなった。さらにAc-SDKP孵置により抑制型Smad、Smad7の核から細胞質への局在変化が認められた。Smad7局在変化の詳細な分子機構は現時点では不明であるが、TGF- β レセプターでの受容体調節型Smad活性化との競合阻害に重要と考えられているSmad7の細胞質への局在変化がAc-SDKPの抗TGF- β 作用に重要であると考えられた。これらの結果、ACE-Iにはレニン-アンジオテンシン系非依存的に、Ac-SDKPの血中濃度増加を介した抗繊維化作用、腎保護作用を発揮する薬理作用が存在する可能性が示唆された。

【結 語】

本研究の結果により、ACE-I有効性の新たな側面が明らかとなったとともに、Ac-SDKPが進行性腎疾患に対する新たな治療戦略となり、また腎疾患に対する創薬を考えていく上で今後重要な位置づけを占めると確信している。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は、アンジオテンシン変換酵素阻害薬（ACE-I）投与時に血中濃度が増加するペプチドN-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline（Ac-SDKP）が、腎疾患の進展において中心的役割を演じるサイトカインtransforming growth factor- β （TGF- β ）の作用を抑制し得るかを、ヒトメサングウム細胞を用い検討したものである。その結果、Ac-SDKPはTGF- β によるSmad2リン酸化、受容体調節型Smad核内移行、およびSmad経路を介した転写活性を抑制することが明らかとなり、このAc-SDKPの抗TGF- β 作用には、抑制型Smad、Smad7の核内から細胞質への局在変化が重要であると考えられた。

本研究は、ACE-I有用性の新たな一面を実証し、Ac-SDKPが進行性腎疾患に対する新たな治療戦略となる可能性を示したものである。従って、博士（医学）授与に適するものと判定した。

なお、最終試験は平成15年2月5日に実施し、合格と判定した。