

氏名(本籍) 高谷季穂(大阪府)
学位の種類 博士(医学)
学位記番号 博士第442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 Involvement of ERK pathway in albumin-induced MCP-1 expression
in mouse proximal tubular cells
(マウス近位尿細管細胞におけるアルブミン刺激によるMCP-1産生にお
けるERKの関与について)

審査委員 主査 教授 岡田裕作
副査 教授 堀池喜八郎
副査 教授 山路昭

論文内容要旨

【背景と目的】

腎疾患の進展と尿蛋白の程度との間に相関があることが指摘されており、尿蛋白量が多いほど、腎不全に進行するリスクが高いと報告されている。糸球体疾患においても腎機能障害の程度は糸球体障害度とともに、尿細管間質障害の程度と相関関係があることから、尿蛋白は尿細管間質障害を惹起する因子として重要であると考えられている。慢性糸球体腎炎の間質に認められるマクロファージやTリンパ球の遊走を促進するサイトカインであるmonocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)は、尿蛋白中のアルブミンの刺激により近位尿細管細胞から産生されることが明らかになってきた。そこで今回新しく確立したマウス近位尿細管細胞のcell lineを用い、アルブミン刺激によるMCP-1産生の機序について検討した。

【方法】

1) C57BL/6J系マウスより近位尿細管細胞を単離後、cell line化した。この細胞(mProx)は、形態上、機能上から近位尿細管細胞の性質を維持しており、近位尿細管細胞のモデルとして実験に使用した。2) fatty acid free bovine serum albumin(BSA)を用いてmProxを刺激し、MCP-1産生をNorthern blot法にて検討した。3) MCP-1産生の機序を明らかにするため、BSAのMAPK経路(ERK、p38 MAPK、JNK)に及ぼす影響をWestern blot法にて検討し、MAPK経路のMCP-1産生に及ぼす影響をNorthern blot法、ELISA法、Luciferase assay法にて検討した。4) BSAによるNF- κ B活性化に及ぼすMAPK経路の影響をgel mobility shift assay (EMSA)法、Western blot法、Luciferase assay法にて検討した。

【結果】

1) BSA刺激によりmProxから、時間(最大6時間)、濃度(最大30mg/ml)依存性にMCP-1 mRNAの産生が増加した。2) ERKはBSA(30mg/ml)刺激5分後より活性化され、30分後には刺激前のレベルに回復した。p38 MAPKも刺激1分後より活性化され、10分後には回復したが、JNKは活性化されなかった。3) I κ B- α のリン酸化と分解はBSA刺激後1時間より始まり、2.5時間後には回復した。4) MEK阻害剤(U0126)あるいはp38阻害剤(SB203580)前附置後、BSA刺激を加えた。MCP-1 mRNAとproteinの発現はU0126により有意に抑制されたが、SB203580では抑制されなかった。次にMCP-1/JE promoterを接続したLuciferase reporterをmProxに遺伝子導入し、U0126前附置後BSA刺激を加えたところ、MCP-1の転写活性はU0126で抑制された。5)

MCP-1のpromoter領域には1つのAP-1結合領域と、2つのNF- κ B結合領域が存在する。各結合領域をAP-1/GC site、 κ B-1/ κ B-2 siteとし、核蛋白DNA結合能をEMSA法にて検討したところ、BSA刺激によりAP-1とNF- κ BのDNA結合能はともに増強し、U0126で抑制された。6) BSA刺激によるI κ B- α の分解は、U0126で抑制された。さらにNF- κ B Luciferase reporterをmProxに遺伝子導入し、U0126前附置後BSA刺激を加えたところ、転写活性はU0126で抑制された。

【考 察】

mProxにおいて、BSA刺激はMCP-1産生を増加させるとともに、ERK、NF- κ Bを活性化した。MEK阻害剤 (U0126) によりMCP-1産生は抑制されたことから、MCP-1産生にERKの関与が考えられた。MCP-1のpromoter領域には1つのAP-1結合領域と、2つのNF- κ B結合領域が存在するが、AP-1-DNA結合だけでなく、NF- κ B-DNA結合はBSA刺激により増強し、U0126で抑制された。I κ B- α の分解、NF- κ B Luciferase reporterの転写活性もBSA刺激により増強し、U0126で抑制されたことから、BSA刺激によりNF- κ B活性化には、NIK/IKK/I κ B/NF- κ B経路以外に、NIK/MEK/ERK/NF- κ B経路が関与している可能性が示唆された。

【結 語】

ERK経路は、アルブミン刺激によるMCP-1産生に関与する可能性が示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

腎疾患の進展と尿蛋白量との間には相違があり、尿蛋白は尿細管間質障害を惹起する因子として重要である。尿細管間質障害を惹起する原因となるmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は、尿蛋白中のアルブミンによる刺激によって近位尿細管細胞から産生される。

本研究では新しく確立したマウス近位尿細管細胞のcell lineを用い、アルブミン刺激によるMCP-1産生の機序について検討した。その結果、近位尿細管細胞をアルブミンで刺激すると、MCP-1産生が増加することを確認した。その産生増加には、ERK経路とNF- κ B経路によるシグナル伝達に関与し、さらにこのNF- κ Bの活性化にもERKが関与することを明らかにした。

以上のように、ERKがアルブミン刺激によるMCP-1産生に関与することを示し、この成果は進行性腎疾患に対する新しい治療方法を示唆するものであり、博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認められる。

なお、最終試験は平成15年2月4日に実施し、合格と判定した。