

氏 名	たなかみさ佐 田 中 美 佐
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2855 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Role of coagulation factor Xa and protease-activated receptor 2 in human mesangial cell proliferation (ヒトメサンギウム細胞における活性型凝固第 X 因子 (Xa) とプロテアーゼ活性化受容体 2 (PAR2) の役割)
論文調査委員	(主 査) 教 授 小 川 修 教 授 横 出 正 之 教 授 福 田 和 彦

論 文 内 容 の 要 旨

メサンギウム領域のフィブリン沈着およびメサンギウム細胞増殖は、IgA 腎症や Henoch-Schönlein 紫斑性腎炎のような活動型メサンギウム増殖性糸球体腎炎において認められる特徴的な所見である。*In vitro* では、培養メサンギウム細胞 (MC) 上に凝固第 V 因子が発現し、活性型第 X 因子 (FXa) とともにプロトロンビンがトロンビンへと変換され、フィブリンが産生されることが報告されており、MC 上での凝固過程の進行が明らかにされている。また FXa 自身が、メサンギウム細胞に対して増殖刺激作用を有していることも知られている。活動型メサンギウム増殖性糸球体腎炎における糸球体障害の進行過程には、糸球体内凝固が重要な役割を果たすと考えられる。それゆえ重要な凝固因子の 1 つである FXa の糸球体腎炎への影響を検討するためには FXa によるメサンギウム細胞増殖に関わる分子メカニズムを明らかにし、治療への応用を検討することが重要である。一方、トロンビンや内因性凝固因子の上流に位置するいくつかのセリンプロテアーゼにより活性化される受容体として、7 回膜貫通型のプロテアーゼ活性化受容体 (PARs) が存在し、炎症や組織障害に対する修復過程に関する様々な細胞に対し、影響を及ぼすことが明らかにされている。FXa に関して、細胞の種類により PAR1 あるいは PAR2 を活性化することが報告されているが、メサンギウム細胞については不明である。従って FXa 刺激による MC 増殖と凝固に関する効果およびそのメカニズムを解析し、FXa に対するプロテアーゼ活性化受容体 2 (PAR2) の役割について検討した。

まず FXa 刺激により ^3H -thymidine 取込みと WST-1 アッセイによる細胞数がともに濃度依存性に増加し、FXa に対する特異的な競合的拮抗阻害剤 DX-9065a により、FXa 刺激による増殖効果がそれぞれコントロールの 62.5% および 88.6% に抑制された。MC 上に形成された安定化フィブリン (XFb) も DX-9065a により減少することが免疫染色法で確認できた。細胞内伝達系に関しては、MAP キナーゼ (ERK) のリン酸化が、FXa 刺激により活性化され、その活性化は DX-9065a 前処置により抑制された。また ERK のリン酸化及び細胞増殖が、ERK 上流に位置する MEK の阻害薬 PD98059 により抑制された。次に RT-PCR にて MC に PAR1, 2, 3 の mRNA の存在を確認し、抗 PAR2 抗体による免疫染色法で PAR2 の発現を確認した。MC を PAR2 アゴニストペプチド (SLIGKV) で刺激したところ、 ^3H -thymidine 取込みと WST-1 アッセイによる細胞数がともに増加した。また PAR1 拮抗薬である FR171113 は、トロンビンと PAR1 アゴニストペプチド (SFLLRN) 刺激による ERK 活性化に対し抑制効果を認めたが、FXa と SLIGKV 刺激に対して抑制効果を示さなかった。

以上の結果より、FXa はメサンギウム細胞上の PAR2 を介し ERK を活性化し、メサンギウム細胞増殖を引き起こすことが明らかとなった。また、DX-9065a は FXa 刺激による ERK の活性化とメサンギウム細胞増殖を抑制し、かつメサンギウム細胞上の凝固過程を阻止する作用があり、それゆえ、DX-9065a 等の選択的 FXa 阻害剤は糸球体腎炎を含む様々な炎症や凝固障害に対して治療薬剤になりうる可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

メサンギウム領域のフィブリン沈着を含め凝固系の亢進およびメサンギウム細胞（MC）増殖は、活動型メサンギウム増殖性糸球体腎炎の特徴的な所見である。従って凝固因子の1つであるXaの糸球体腎炎への影響と治療への応用を検討することが重要である。一方、プロテアーゼ活性化受容体（PARs）は炎症や組織障害に対する修復過程に関する様々な細胞に発現し、Xaの受容体であることも知られている。従ってXa刺激によりMC増殖とフィブリン沈着に影響があるか否か、その作用におけるPAR1、PAR2の役割及び情報伝達機構につき検討した。

Xaは濃度依存性にMCの細胞増殖を引き起こしたが、この効果はPAR2アゴニストペプチドにても同様であった。さらにXaはMAPキナーゼであるERKを活性化することも明らかとなり、ERK活性を阻害するとXaによるMC増殖が抑制されることから、XaはPAR2を介しERKを活性化し、MC増殖を引き起こすことが明らかとなった。しかしながら、PAR1アンタゴニストを用いた検討からXaによる作用にPAR1は関与しないことが明らかになった。また、Xaの阻害剤DX-9065aはXa刺激によるERKの活性化とMC増殖を抑制し、かつMC上のフィブリン沈着を阻害する作用が明らかとなった。以上の結果よりXaとPAR2がMCの増殖やフィブリン沈着に関与し、選択的Xa阻害剤は糸球体腎炎を含む様々な炎症や凝固障害に対して治療薬剤になる可能性があると考えられた。本研究は糸球体腎炎の解明に貢献しその治療薬の開発に寄与するところが多い。

従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年2月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。