

氏 名 石 橋 里 江 子
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)
 学 位 記 番 号 医 博 第 2158 号
 学位授与の日付 平成 11 年 9 月 24 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 Roles of prostaglandin E receptors in mesangial cells under high glucose conditions
 (プロスタグランジン E 受容体のメサンギウム細胞における意義に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 清 野 裕 教 授 北 徹 教 授 中 尾 一 和

論 文 内 容 の 要 旨

最近 8 種類のプロスタノイド受容体の一次構造が cDNA クローニングにより解明された。プロスタノイド受容体はロドプシン型受容体スーパーファミリーに属し、そのシグナルは G 蛋白の活性化により伝達される。このうちプロスタグランジン E (PGE) 受容体である EP には EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ の 4 つのサブタイプが同定されている。各サブタイプは腎臓において、EP₄ が糸球体、EP₃ が尿細管、ヘンレ上行脚および集合管、EP₁ が集合管にそれぞれ局在しているとされてきた。また、これまでに高グルコース濃度下においてメサンギウム細胞のプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生および DNA 合成が亢進することが報告されてきたが、PGE₂ のメサンギウム増殖における役割を含めその詳細な機序は明らかではない。本研究ではメサンギウム細胞における EP の発現と高グルコース濃度下の意義について検討した。

1. 培養ラットメサンギウム細胞における EP の発現と各サブタイプの機能

培養ラットメサンギウム細胞 (MC) を雄性 WKY ラットより Differential sieving にて調製し継代後、7-9 代目で使用した。MC は正常グルコース群 (5.6 mM), 高グルコース群 (25 mM), マニトール群 (グルコース 5.6 mM + マニトール 19.4 mM) の 3 群に分類して 5 日間培養した。ノザンプロット解析の結果、MC には細胞内 Ca²⁺ 上昇を惹起する EP₁ (8 kb, 6 kb) と cAMP を増加させる EP₄ (3.5 kb) の遺伝子発現が認められた。いずれの発現も正常グルコース群、高グルコース群、マニトール群の 3 群間に差は認められなかった。正常グルコース群において sulprostone (EP₁/EP₃ アゴニスト), M&B 28767 (EP₃/EP₁ アゴニスト) および PGE₂ は MC の DNA 合成を有意に亢進させた。これらは EP₁ 特異的阻害剤 (SC-51322, ONO-AE-628) との共存下にはば前値まで抑制された。また PGE₂ 添加により MC の細胞内 Ca²⁺ 濃度は有意な上昇を認めたが、EP₁ 特異的阻害剤の前処置により基礎値まで抑制された。一方、MC の cAMP 産生は 11-deoxy-PGE₁ (EP₄/EP₃/EP₂ アゴニスト) および PGE₂ により有意に増加 (control 0.85, 11-deoxy-PGE₁ 1.5, PGE₂ 2.6 pmol/mg protein) したが、sulprostone, butaprost (EP₂ アゴニスト), M&B 28767 は効果を示さなかった。さらに forskolin, db-cAMP, 11-deoxy-PGE₁ は用量依存性に MC の DNA 合成を抑制した。以上の結果より、MC において EP₁ は増殖促進に、EP₄ は増殖抑制に働くことが示された。

2. 高グルコース下における EP の機能的意義

高グルコース群において培養上清中の PGE₂ 濃度は正常グルコース群の 2 倍 (2.9 nM), DNA 合成は 2.5 倍に亢進し、この DNA 合成亢進は EP₁ 特異的阻害剤により用量依存性に抑制された。11-deoxy-PGE₁ または PGE₂ による cAMP 産生は、高グルコース群において正常グルコース群のそれぞれ 75%, 65% に抑制されていた。ブドウ糖過剰状態のメサンギウム細胞においては protein kinase C (PKC) が活性化されることが知られているが、高グルコース群において EP₄/cAMP 系が抑制される機序を明らかにする目的で PKC の意義を検討した。正常グルコース群において PGE₂ 10⁻⁶ M により 3 倍に亢進した cAMP は、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 1 ~ 100 nM により用量依存性に抑制された。また forskolin

10^{-6} M により刺激された cAMP は PMA 10 nM 添加により 51% に抑制された。以上より、PKC の adenylate cyclase に対する抑制効果が示された。また、高グルコース群と浸透圧を等しくしたマニトール群においては高グルコース群同様に培養上清中の PGE_2 濃度は 2 倍に増加していたが、高グルコース群とは異なり DNA 合成亢進は認められなかった。マニトール群では 11-deoxy- PGE_1 または PGE_2 による cAMP 産生は抑制されなかったことから、 PGE_2 産生増加のみでは増殖促進の EP_1 と増殖抑制の EP_4 が共存するため PGE_2 による MC の DNA 合成亢進には不十分であり、 EP_4/cAMP 系の抑制が必要であることが示された。

以上の検討により、MC には PGE 受容体サブタイプのうち EP_4 のみならず EP_1 が存在することが証明された。また MC において EP_1 は細胞増殖促進作用、 EP_4 は細胞増殖抑制作用をもつことが示された。高グルコース下におけるメサンギウム細胞の DNA 合成亢進には、高浸透圧による PGE_2 産生増加とともに EP_4/cAMP 系の抑制に伴う EP_1 機能亢進が関与していると考えられた。以上より糖尿病性腎症の発症または進展にプロスタノイドが関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究ではメサンギウム細胞のプロスタグランジン E 受容体 (EP) 発現を解析し、高グルコース下における意義について検討した。

4 種類の EP サブタイプのうち培養ラットメサンギウム細胞 (MC) には EP_1 と EP_4 の遺伝子発現を認めた。 EP_1 アゴニストは DNA 合成を亢進させ、 PGE_2 添加による細胞内 Ca^{2+} 上昇は EP_1 阻害剤により抑制された。一方、 EP_4 アゴニストと PGE_2 は cAMP 産生を増加させ、db-cAMP、 EP_4 アゴニストは DNA 合成を抑制した。以上、MC では EP_1 は Ca^{2+} を介して増殖促進に、 EP_4 は cAMP を介して増殖抑制に働くことが示された。

次に MC の EP_1 および EP_4 発現への高グルコース (25 mM) の影響を検討した。高グルコースは培養上清中 PGE_2 濃度および DNA 合成を亢進させ、この DNA 合成亢進は EP_1 阻害剤により抑制された。また高グルコース下では PKC 活性化に伴い EP_4/cAMP 系が抑制された。高グルコース下の DNA 合成亢進には、 PGE_2 産生増加と EP_4/cAMP 系の抑制に伴う EP_1 機能亢進が関与していると考えられた。

以上の研究は糖尿病性腎症におけるメサンギウム細胞の EP の意義の解明に貢献した。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 11 年 7 月 12 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。