

氏名	やまもと さとる 山本 了
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第550号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Effects of endothelin-1 and angiotensin-II on extracellular matrix metabolism in a rat mesangial cell line, CRL-2573 (ラットメサンギウム細胞、CRL-2573におけるエンドセリン1とアンジオテンシンIIの細胞外マトリックス代謝に及ぼす影響)
学位論文審査委員	(主査) 宮川 征男 (副査) 長谷川純一 村脇義和

学位論文の内容の要旨

腎線維化及び腎硬化症は、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、高血圧性腎症などさまざまな腎障害に共通した病態であり、腎線維化の進行は腎機能の更なる悪化を来す。腎線維化には種々のサイトカインや血管作動性因子が関与している。血管作動性因子のうち、エンドセリン1(ET-1)とアンジオテンシンII(AT-II)は、強い腎線維化促進作用と共に、細胞増殖作用や蛋白合成促進作用を有している。ただ、腎線維化促進メカニズムについて詳細は不明な点が多い。今回、我々は腎臓での主要な細胞外マトリックス産生細胞であるメサンギウム細胞(CRL-2573)を用いて、ET-1、AT-IIの細胞増殖やマトリックス代謝への影響を検討した。

方法

CRL-2573におけるAT-II 1a型受容体とET-1の2つの受容体、endothelin A receptor:ETAR、endothelin B receptor:ETBRの遺伝子発現を確認するため、各受容体のmRNAをRT-PCRを行なった。ET-1とAT-IIがCRL-2573の増殖、DNA合成に与える影響を調べるために、ET-1あるいはAT-IIを添加した後、DNA合成能はBrdU、細胞増殖はMTT assayにて評価した。またET-1添加後に、ET-1受容体拮抗薬であるETAR拮抗薬BQ123とETBR拮抗薬BQ788を添加し、その影響も検討した。細胞外マトリックス関連物質として、procollagen $\alpha 1(I)$ 、transforming growth factor beta 1(TGF- β_1)、connective tissue growth factor(CTGF)、tissue inhibitor of metalloproteinases-1(TIMP-1)、matrix metalloproteinase-13(MMP-13)及びET-1、endothelin-converting enzyme(ECE)mRNAをreal-time PCRを用いて測定した。

結 果

CRL-2573 細胞で、AT-II 1a 型受容体と ET-1 受容体(ETAR、ETBR)の遺伝子発現を確認した。CRL-2573 では、ET-1 添加により DNA 合成と細胞増殖が用量依存性に促進され、これらの増加は、ETAR 拮抗薬 BQ123 および ETBR 拮抗薬 BQ788 の添加によって抑制された。ET-1 添加により procollagen $\alpha 1(I)$ 、TGF- β_1 、CTGF、TIMP-1、MMP-13 の mRNA の発現はいずれも有意な増加を認めた。なお、これらの発現増加は BQ123 あるいは BQ788 の添加により抑制された。また ET-1 の添加により、ET-1 自体及び ECE の発現増加を認めた。一方、AT-II の添加では DNA 合成、細胞増殖は不変で、AT-II で増加した細胞外マトリックス関連物質の遺伝子発現も変化しなかった。

考 察

今回、ラットメサンギウム細胞由来の CRL-2573 細胞に ETAR および ETBR の発現を確認し、ET-1 添加により細胞の DNA 合成および細胞増殖が促進されること、更に ETAR および ETBR の拮抗薬の添加により、ET-1 で誘導された細胞増殖が抑制されることを明らかにした。ET-1 の作用は、ET-1 自体も誘導されたことよりオートクライン的にも行なわれていることが示唆された。

ET-1 は、procollagen $\alpha 1(I)$ の発現促進と共に線維化促進性サイトカインである TGF- β_1 、その下流に存在する CTGF の発現も促進し、腎線維化に促進的に作用していることが明らかになった。一方 ET-1 添加でコラーゲン分解酵素 MMP-13 の発現も増加したが、同時にその阻害因子である TIMP-1 の発現も増加しており、分解系の亢進は少ないと考えられる。

近年、ET 受容体拮抗薬が、各種の腎病変を改善することが報告されている。今回の我々の成績でも、ETAR および ETBR 拮抗薬により ET-1 によるコラーゲン合成亢進が抑制されると共に、線維化促進性サイトカインの発現亢進が抑制され、ET 拮抗薬の腎線維化の治療薬としての可能性が示唆された。一方、CRL-2573 には AT-II 受容体の遺伝子発現は存在するものの、細胞増殖やマトリックス関連物質の遺伝子発現には影響がみられず、本細胞系では AT-II の検討はできないものと思われる。

結 論

ET-1 は、ラットメサンギウム細胞(CRL-2573)に対して、細胞増殖促進、細胞外マトリックス代謝の亢進を介して、腎線維化の進展に重要な働きをしている可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、血管作動性因子エンドセリン 1 とアンジオテンシン II の腎線維化促進のメカニズムを解明するためにラットメサンギウム細胞 (CRL-2573) を用いて、これらに因子による細胞増殖および細胞外マトリックス代謝への影響を観察したものである。その結果、エンドセリン 1

が用量依存性に細胞増殖を促進すると共に、線維促進性サイトカイン TGF- β ₁、CTGF の発現増加、コラーゲンの合成促進を来すこと、さらに、この増加はエンドセリン受容体拮抗薬により阻害されることが明らかにされた。本論文の内容は、エンドセリン 1 の腎線維化での作用機序を明らかにしたもので、エンドセリン拮抗薬による腎硬化治療の面で、明らかに学術の水準を高めたものと認める。