

審査の結果の要旨

氏名 花房 規男

本研究では、活性化された血小板から放出されるスフィンゴシン 1 リン酸に注目し、その培養メサンギウム細胞に対する影響およびその機序に対して *in vitro* において検討した。また、同時に他のスフィンゴ脂質の影響も検討し、下記の結果を得た。

1. スフィンゴシン 1 リン酸は、 $0.1\sim 3\mu\text{M}$ の濃度で培養ラットメサンギウム細胞において、その DNA 合成および細胞数の増加をともに促進させることが明らかになった。一方、他のスフィンゴ脂質のメサンギウム細胞数に対する影響を見たところ、 $10\mu\text{M}$ の濃度ではセラミド・スフィンゴシンで細胞数は有意な減少を認めたが、ジメチルスフィンゴシンでは MTS assay 上、生細胞の痕跡はほとんどみとめられなかった。
2. ジメチルスフィンゴシンによる細胞数の減少について、アポトーシスによるものが考えられたため、メサンギウム細胞でアポトーシスを検出した。Hoechst 33258 で核を染色し、蛍光顕微鏡で観察したところ、ジメチルスフィンゴシンを加えた群で核の fragmentation, condensation を伴う典型的なアポトーシスに陥った細胞を多数認めた。定量を行うため、FITC ラベルした annexin V でメサンギウム細胞を染色しフローサイトメトリーを行ったところ、ジメチルスフィンゴシンを加えた群ではコントロールに比較して有意にアポトーシスに陥った細胞は多かった。
3. こうした作用を持つスフィンゴシン 1 リン酸が血小板に由来する、つまり細胞の外から作用するかについて以下検討を行った。まず細胞膜受容体の mRNA レベルでの発現を RT-PCR で検出したところ、ラットでクローニン

グされている受容体 *edg-1*, *edg-2*, *edg-5* (*agr16/h218*) の発現を認めた.

4. 一方, メサンギウム細胞内でスフィンゴシン 1 リン酸が合成されるかについて, 前駆体であるスフィンゴシンをトリチウムでラベルしたものを加えその代謝を検討した. その結果, 今回使用したメサンギウム細胞では, 5 分, 20 分, 60 分ではいずれにおいてもスフィンゴシン 1 リン酸はほとんど合成されなかった. このことは PDGF を加えたものにおいても同様の結果であった. このことからスフィンゴシン 1 リン酸はメサンギウム細胞において, autocrine 作用あるいは線維芽細胞で示されたような PDGF のセカンドメッセンジャーとしての作用は持たないことが推測された.

以上、本論文は、*in vitro* においてスフィンゴシン 1 リン酸が糸球体メサンギウム細胞を増殖させることを示し、このような作用をもつスフィンゴシン 1 リン酸はメサンギウム細胞自身には由来せず、細胞外から膜受容体を介して作用する可能性があることを示した。メサンギウム細胞の増殖が、腎炎において非可逆性病変である糸球体硬化につながるとされている。*edg* の阻害あるいは血小板からのスフィンゴシン 1 リン酸の放出を抑制、さらにはアポトーシスを誘導するスフィンゴ脂質を利用することにより、メサンギウム細胞の増殖およびそれに引き続く糸球体硬化が抑制される可能性が考えられた。このため、スフィンゴシン 1 リン酸のメサンギウム細胞への影響を示した本研究は、腎炎の進展に新たな治療戦略を呈示する重要な研究と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。