

論文の内容の要旨

論文題目 マウス腎虚血再灌流モデルにおける血小板活性化因子および p38 MAPK の役割について
の検討

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 鈴木 快文

血小板活性化因子(PAF)は、催炎症作用、平滑筋の収縮、血圧降下作用など様々な生理活性や、気管支喘息、エンドトキシンショックやアナフィラキシーショックなどの病態生理に重要な役割を持つリン脂質メディエーターであり、白血球や血管内皮細胞、好酸球、好塩基球、マクロファージ、血小板など種々の細胞から刺激に応じて産生、分泌される。

腎臓においては、micro-dissection 法によってネフロンセグメント毎に RT-PCR を行った検討から糸球体、近位尿細管曲部および直部、集合管、遠位尿細管曲部、ヘンレ係蹄太い上行脚などに PAF 受容体が存在することが証明された(BBRC 225:352,1996)。また、PAF は虚血再灌流などの酸化ストレス後の組織障害において重要な役割を担っていると考えられ、そうした条件下で、好中球や単球などから分泌され、また内皮細胞表面に発現してくることが明らかになっている。そして、PAF 受容体との相互作用によって、好中球などの活性化、走化性、血管透過性や血小板機能などが亢進し、組織障害を惹起すると考えられている。

ERK, JNK とともに MAPK ファミリーを構成する、p38 MAPK は、ヒト好中球に低濃度の LPS と血清による刺激から tyrosine がリン酸化されるという ERK には認められない働きを持つ、38 kDa の蛋白として発見され、細胞外の浸透圧変化など生理的ストレスによって活性化することが明らかにな

っている。虚血再灌流障害においては、ストレス関連 MAPK である JNK や ERK1/2 の活性化やラットおよびイヌ心やラット腎で p38 MAPK の活性化が観察されるなど、その細胞内シグナル伝達に関する MAPK の知見が集まっている。

【方法】PAF 活性とそのシグナル伝達における p38 MAPK の関連を検討するために、PAF 受容体欠損マウスと p38 MAPK 阻害剤を使用し、腎虚血灌流モデルでの腎機能に対する影響を観察するとともに、リン酸化 p38 MAPK 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行い、シグナル伝達における p38 MAPK の活性化を検証した。続いて、*in vitro* で、過酸化水素刺激による尿細管細胞での p38 MAPK の活性化を観察し、PAF 受容体拮抗剤の作用を検証した。さらに、虚血再灌流モデルでは、遊走細胞による組織障害が重要と考えられており、casein 刺激にて採取したマウス腹腔好中球を用いて、同様に PAF 刺激と p38 MAPK の活性化を検討した。これらの結果から、遊走細胞と標的細胞との相互作用を検討するため、ラット腎葉間動脈内皮細胞 (RIAEC) と GFP ラット腹腔好中球との接着実験を行い、PAF 受容体拮抗剤および p38 MAPK 阻害剤による影響をみた。

【結果】腎虚血再灌流後、野生型マウスでは、再灌流後 24 時間の血清クレアチニン (Cr) および尿素窒素値 (BUN) が著しく上昇した (Cr: 1.60 \pm 0.32 mg/dL, BUN: 205.1 \pm 45.7 mg/dL)。これに対して、p38 MAPK 阻害剤投与群では腎機能の低下が抑えられた (Cr: 0.48 \pm 0.14 mg/dL, BUN: 70.7 \pm 24.0 mg/dL)。また、同様に PAF 受容体欠損マウスでも、血清クレアチニンおよび尿素窒素値の上昇 (Cr: 0.43 \pm 0.05 mg/dL, BUN: 50.7 \pm 16.4 mg/dL) は抑えられた。リン酸化 p38 MAPK 抗体を用いて、ウエスタンブロット解析を行ったところ、正常腎および再灌流直後では、リン酸化型 p38 MAPK の発現を認めることはできなかったが、再灌流後 5 分に強く発現を認めた。この発現は、15 分、30 分後と時間を追う毎に弱くなり、60 分後にはほとんど認められなかった。p38 MAPK 阻害剤の投与にて、虚血再灌流 5 分後のリン酸化 p38 MAPK の発現は減弱した。また、PAF 受容体欠損マウスでもリン酸化 p38 MAPK の発現は減弱していた。免疫組織染色では、尿細管を中心に、抗リン酸化型 p38 MAPK 抗体にて強く染色された。尿細管においての PAF と p38 MAPK との関連を検討するため、ヒト尿細管細胞由来である、HKC8 細胞に対して過酸化水素 200 μ M での刺激を行った。ウエスタンブロット解析にて、リン酸化 p38 MAPK の発現は、0、5 分後では認められなかったが、20、60 分後と時間を追って強く認められた。HKC8 細胞に対する PAF 刺激では、ウエスタンブロット解析にて、リン酸化型 p38 MAPK の発現は認められず、PAF 刺激による細胞内カルシウムの上昇を調べたが、著明な上昇を示す ATP 刺激と比較して、わずかな細胞内カルシウムの上昇を認めるだけであった。しかし薄切したマウス腎皮質に対する PAF 刺激では、ウエスタンブロット解析にて、リン酸化型 p38 MAPK の発現が認め、これは PAF 受容体拮抗剤にて減弱した。次に、PAF 刺激による白血球系細胞への影響を調べるために、casein 刺激にて得られたマウス腹腔好中球に PAF 刺激を与えた。野生型マウス由来好中球では、ウエスタンブロット解析で、

リン酸化型 p38 MAPK は、刺激後 2 分にて強く発現を認め、このリン酸化型 p38 MAPK も時間を追う毎に認めなくなった。そして、PAF 受容体拮抗剤を作用させた好中球では、刺激後 2 分での発現は減弱し、同様に PAF 受容体欠損マウス由来好中球では、リン酸化型 p38 MAPK の発現は減弱していた。

腎虚血再灌流障害では、遊走細胞による組織障害が重要であることが明らかになっており、今回の結果から、白血球の遊走性に PAF が関与していると考え、血管内皮細胞と白血球との相互作用、細胞間接着を検討した。単層培養した RIAEC 細胞上に GFP ラットから採取した腹腔好中球を接触させ、30 分間放置したところ、穏やかな洗浄後も RIAEC 細胞の表面に残存している GFP 細胞が観察された。そして、PAF 受容体阻害剤にて残存する細胞数が減少した。

【考察】p38 MAPK は、細胞外ストレスによる細胞応答に関するシグナル伝達を担う、ストレス関連 MAPK の 1 つと考えられている。腎虚血再灌流障害モデルにおけるシグナル伝達については、ウェスタンブロット解析で p38 MAPK の活性化が認められること、p38 MAPK 阻害剤にて腎虚血再灌流障害が抑えられること、短時間 (15 分間) の腎虚血後 8 日に虚血再灌流を行うと JNK と p38 MAPK の活性化が抑えられ腎機能低下は軽度であること、24 時間の尿管閉塞後 8 日での腎虚血再灌流でも同様に JNK と p38 MAPK の活性化が抑えられ腎機能低下が軽度であることなど、p38 MAPK がこのモデルにおいて、重要な働きを担っていることが報告されている。また、腎虚血再灌流障害において、PAF 受容体拮抗剤が腎機能低下を抑えることが報告されている。今回、腎虚血再灌流障害によって、p38 MAPK がリン酸化されることが明らかになった。PAF 刺激による p38 MAPK のリン酸化は培養細胞では認められなかったが、薄切したマウス腎皮質ではリン酸化が認められ、一方で、casein 刺激による採取したマウス腹腔好中球では PAF 刺激によって p38 MAPK のリン酸化を認めた。

これらの結果から、PAF-PAF 受容体から誘導される p38 MAPK 系のシグナル伝達は、尿細管細胞だけではなく、白血球系細胞内でのシグナル伝達にも関与していることが示唆された。

HL-60 細胞は、PAF 刺激によって superoxide を産生することが明らかになっている。好中球においては、PAF 受容体からのシグナルで MKK3 が活性化し、MKK3 が p38 MAPK をリン酸化することも示されている。虚血再灌流モデルでは、PAF が好中球と内皮細胞との細胞間相互作用に強く関与していることが考えられ、PAF は細胞の走化性因子として、炎症反応時に細胞の遊走に関与していると考えられている。好中球と内皮細胞との接着、tethering には P-selectin が細胞間接着分子として働くと考えられているが、この接着に対して、内皮細胞表面に発現した PAF と好中球表面に発現した PAF 受容体とが、補完的に働いているとする報告もある。

腎虚血再灌流モデルにおいては、PAF 刺激による尿細管障害及び好中球の活性化のステップの中で p38 MAPK 系がそのシグナル伝達を担っていることが示唆された。活性化した好中球は、そ

の細胞表面に発現するP-selectinとPAFによって血管内皮細胞に接着し、局所での炎症を惹起し、好中球によって細胞障害を来すことが示唆された。この時、さらに尿細管細胞などが酸化ストレスを受け、細胞内シグナル伝達機構として p38 MAPK が活性化し、細胞障害を生じると考えられた。

【結語】 腎虚血再灌流障害モデルにおいて腎機能障害は、PAF 受容体欠損マウスおよび p38 MAPK によって、改善することが明らかになった。そして p38 MAPK のリン酸化が PAF 刺激により誘導されることを近位尿細管に富む腎皮質および好中球で示すことに成功した。虚血再灌流での組織障害を惹起する一つのメカニズムとして尿細管細胞と好中球に対する PAF 刺激が p38 MAPK を介するシグナル伝達の活性化に関わっている可能性を示唆した。