

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 鈴 木 快 文

本研究は腎虚血再灌流障害での 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、腎機能障害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 Western blot 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、マウス腎皮質に対する過酸化水素および PAF 刺激による 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多核白血球を用いて、PAF 刺激による p38 MAPK の活性化を検討した。また、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と GFP ラット腹腔多核白血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。これらは PAF と p38 MAPK の関連性、p38 MAPK の活性化の時間的経過、PAF の標的組織と活性化される p38 MAPK の局在に関する解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 野生型マウスでの腎虚血再灌流モデルでは、再灌流後 24 時間の血清クレアチニンおよび尿素窒素値が著しく上昇するのに対して、p38 MAPK 阻害剤の投与によってその上昇が有意に抑えられた。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は抑えられた。またリン酸化 p38 MAPK 抗体を用いて、Western blot 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 p38 MAPK 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ず、対照と同程度となった。そして、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。再灌流後 5 分での免疫組織染色を行ったところ、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。
2. ヒト尿細管細胞の不死化細胞である、HKC8 細胞に対する過酸化水素刺激では、Western blot 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。

[別紙 2]

3. マウス腎皮質を薄切し、PAF 刺激を与えた結果、p38 MAPK のリン酸化を認め、PAF 受容体拮抗剤にてリン酸化の減弱を認めた。また、PAF 受容体欠損マウスの腎皮質では、PAF 刺激による p38 MAPK のリン酸化は減弱していた。
4. casein 刺激にて得られたマウス腹腔多核白血球に PAF 刺激を与えたところ、野生型マウス由来多核白血球では、Western blot 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るという、一連の実験と同様の動きを示した。そして、PAF 受容体拮抗剤を作用させた多核白血球では、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多核白血球では、リン酸化型 p38 MAPK の発現は消失していた。
5. 単層培養したラット腎葉間動脈内皮細胞由来の RIAEC 細胞上に GFP ラットから採取した腹腔多核白血球を接触させ、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。これに対して PAF 受容体阻害剤にて RIAEC 細胞と多核白血球を培養すると残存する細胞数が減少することから、PAF と PAF 受容体との相互作用が、細胞間接着に関係していることを示唆する結果と考えた。

以上、本論文は腎虚血再灌流モデルによる腎機能障害が、PAF 受容体欠損マウスにおいて、そして p38 MAPK 阻害剤の投与によって、改善することを示した。ここで、p38 MAPK のリン酸化には虚血再灌流後 5 分という早い段階で腎皮質において認められ、このリン酸化はその後急速に消失することを明らかにした。また今回、尿細管および好中球の両者において、PAF 刺激が p38 MAPK をリン酸化することが明らかになった。すなわち、先行研究により虚血再灌流障害において PAF と p38 MAPK はそれぞれ重要な役割を担っていることは示されてきたが、本研究では、腎虚血再灌流の極めて早期に 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。これらより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、腎虚血再灌流障害のメカニズムの解明に重要な貢献を成すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。