

Title	Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances GF- β -dependent responses in human mesangial cells.
Sub Title	メサンギウム細胞の、TGF- β 刺激反応における、ERK MAPkinase及びSmadシグナルの交互作用
Author	林田, 朋子
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.32-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041202-0032

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF- β -dependent responses in human mesangial cells.

(メサンギウム細胞の、TGF- β 刺激反応における、ERK MAPkinase及びSmadシグナルの交互作用)

林 田 朋 子

内容の要旨

腎糸球体硬化症の病態には、細胞外基質（以下ECM）のメサンギウム領域への沈着と尿管領域の狭小化を特徴とする。その病態には transforming growth factor β （以下TGF- β ）等様々なサイトカインの関与が指摘されているが詳細は不明である。私どもは腎糸球体硬化の発症においてTGF- β がいかにECMの産生を促すのか、細胞内シグナル伝達機構の調節を検討してきた。本論文ではTGF- β の作用におけるERK MAP kinaseおよびSmadシグナルの交互作用を検討した。

(対象と方法) ヒトメサンギウム細胞およびマウス乳腺上皮細胞において、TGF- β 1 (1.0ng/ml) の刺激後RIPA bufferで細胞内蛋白を抽出、一部は抗Smad2/3抗体にて免疫沈降し、Smadリン酸化、重合をWestern blot法にて検討した。-0.4 α 2 (I) collagen promoterまたはSmad3-Gal4/Gal-Lux reporterはリポフェクション法にて細胞導入し24時間TGF- β 1刺激による転写活性を測定した。

(結果と考察) ヒトメサンギウム細胞におけるTGF- β 1の刺激において、ERK MAP kinaseの阻害薬はSmad3転写活性、Smad2/3のセリンリン酸化及びSmad4とのヘテロマー形成を有意に抑制したが、マウス乳腺上皮細胞ではその効果が認められずERK MAP kinaseの関与は細胞特異的であることが示された。阻害薬の抑制効果は、免疫沈降したSmad2/3分子内の総リン酸化セリン量において有意であったが、受容体特異的SSXSモチーフのリン酸化には有意差を認めなかった。受容体キナーゼの基質セリンを欠くSmad3AはTGF- β 1刺激により分子内にリン酸化セリンが認められ、ERK MAP kinase阻害薬はこれを抑制した。この結果は、TGF- β 1刺激により活性化されたERK MAP kinaseを介して、R-Smad分子内のSSXSモチーフ以外のセリンリン酸化が誘導されることを示唆した。次にTGF- β 1のコラーゲン転写誘導は、活性化型MAP ERK kinase kinase (caMEK) 発現下で有意に亢進し、またSmad3コンストラクトの導入はコラーゲン転写を亢進した。受容体基質セリンを欠くSmad3Aの導入はTGF- β 1の転写誘導活性を完全に抑制したが、caMEKによる転写亢進は影響を受けなかった。一方ERK MAP kinase基質配列を欠くSmad3EPMコンストラクトを導入した細胞ではcaMEKによる転写亢進は抑制されたが、TGF- β 1の転写誘導には有意な変化を認めなかった。

以上の結果から、ERK MAP kinaseカスケードとの交互作用は、Smadシグナル伝達機構を調節しヒトメサンギウム細胞におけるTGF- β 刺激によるコラーゲン発現に相乗的に作用することが明らかにされた。

論文審査の要旨

腎糸球体硬化症では、細胞外基質のメサンギウム領域への沈着や尿管領域の狭小化が特徴であり、この病態の発症には、transforming growth factor (TGF) β など種々のサイトカインの関与が想定されている。本研究では、培養ヒトメサンギウム細胞を用いて、TGF β の細胞外基質の産生亢進における細胞内シグナル伝達機構を検討した。

ヒトメサンギウム細胞においてTGF β 1は、ERK MAP kinaseを刺激した。ERK MAP kinaseの阻害薬は、Smadと呼ばれる細胞内シグナル伝達因子、すなわちSmad

3転写活性、Smad2/3のセリンリン酸化およびSmad4とのヘテロマー形成を有意に抑制し、ERK MAP kinaseカスケードとSmadシグナル伝達機構とが密接に関係していることを明らかにした。このような作用はマウス乳腺上皮細胞では認められず、ERK MAP kinaseの関与は細胞特異的であるとされた。

次にTGF β 1のコラーゲン転写誘導は、活性化型MAP ERK kinase kinase (caMEK) 発現下で有意に亢進した。受容体基質セリンを欠くSmad3Aの導入は、TGF β 1の転写誘導活性を完全に抑制したが、caMEKによる転写亢進は影響を受けず、一方ERK MAP kinaseの基質配列を欠くSmad3 EPMコンストラクトを導入した細胞では、caMEKによる転写亢進を認めなかったが、TGF β 1の転写誘導には有意な変化はみられなかった。

以上の研究成績から、ERK MAP kinaseカスケードの交互作用がSmadシグナル伝達を調節し、メサンギウム細胞におけるTGF β 刺激によるコラーゲン発現に相乗的に作用していると結論した。

このような研究に関してまず問題となったのが使用されたメサンギウム細胞の安定性である。ヒトのメサンギウム細胞を用いていることからこの程度の継代培養されたものが妥当であるかが問題とされた。本研究では何度かの検討で5-6代目の細胞が安定していたことから、5-6代目の細胞を用いてすべての実験をしたとされた。また対照として用いた上皮細胞がヒトではなくマウス乳腺上皮細胞を用いたことが問題とされたが、このような実験でしばしば用いられる代表的な細胞であるからとされた。

次にメサンギウム細胞におけるTGF β の刺激でERK MAP kinaseカスケードとSmadシグナル伝達機構とが密接に関係してコラーゲン発現に作用することを明らかにしたが、この機構の解明を臨床にどう生かすかが議論された。TGF β の発現さらにその刺激による細胞内シグナル伝達機構が種々の条件によって影響を受けることも解明できたので、細胞内シグナル伝達の局所的な阻止により、腎硬化の阻止に有効な薬剤の開発を進めていきたいとされた。

以上のように本研究はメサンギウム細胞において、TGF β による細胞外基質産生に関する細胞内シグナル伝達機構を明瞭に示され、腎硬化の領域に大きく貢献する論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
泌尿器科学 村井 勝 病理学 岡田 保典
医学 末松 誠
学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成16年 8月24日