

論文内容要旨

High glucose promotes TGF- β 1 production by inducing FOS expression in human peritoneal mesothelial cells.

(ヒト腹膜中皮細胞における高グルコース刺激による TGF- β 1 産生は FOS 発現により誘導される)

Clinical and Experimental Nephrology,

2015, in press.

主指導教員：正木 崇生教授

(病院 腎臓内科学)

副指導教員：河野 修興教授

(応用生命科学部門 分子内科学)

副指導教員：松原 昭郎教授

(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)

心石 敬子

(医歯薬学総合研究科展開医科学専攻)

High glucose promotes TGF- β 1 production by inducing FOS expression in human peritoneal mesothelial cells.

(ヒト腹膜中皮細胞における高グルコース刺激による TGF- β 1 産生は
FOS 発現により誘導される)

(背景・目的)

腹膜透析(PD)液による持続的な腹膜障害は、腹膜中皮細胞の剥離、細胞外基質の過度の累積と血管新生を特徴とする中皮下線維化を引き起こし、限外濾過不全となるだけでなく、被嚢性腹膜硬化症の進展にも関与しており、腹膜中皮細胞は腹膜線維化の治療ターゲットとして期待されている。

また、PD 液の浸透圧物質として使用されているグルコースにより TGF- β 1 が産生され、腹膜線維化の進展に重要な役割を果たしていることが報告されている。グルコースによる TGF- β 1 産生経路は完全には解明されておらず、本研究ではヒト腹膜中皮細胞(HPMC)で高グルコース(HG)誘導性 TGF- β 1 産生に関連する転写因子を明らかにすることを目的としている。

(方法・結果)

HPMC は待機的な胃癌手術を受ける患者の大網から単離培養し、3 人から採取した HPMC をコントロール(グルコース濃度 0.1% : NG)または HG (グルコース濃度 4%)培養液で 3 時間培養して RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。51 遺伝子が NG 群と比較して HG 群で 3 倍以上に発現量が増加した。それらのうち転写機能に関連する遺伝子に着目し、遺伝子オントロジー解析で生物学的プロセスの regulation of transcription and being DNA-dependent に分類される 13 遺伝子について更に検討を行った。

9 遺伝子 (MECOM、EGR1、FOSB、NR4A2、FOS、C5orf41、KLF5、CSRNP1、ATF3) は 3 時間 HG 刺激で mRNA 発現量が 3 倍以上に増加した。SIX4、TLE4、SIX1 および ZBTB1 の増加は 3 倍未満であった。

RNA 干渉は、HPMC に目的遺伝子別の stealth siRNA または Silencer Negative Control #1 siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて導入した。MECOM、FOSB、FOS および ATF3 は、RNA 干渉により HG 誘導性 TGF- β 1 mRNA 増加が 24 時間刺激でそれぞれ 45.2%、42.0%、35.7%、25.8% と有意に抑制された。EGR1、NR4A2、C5orf41、KLF5 および CSRNP1 は RNA 干渉による TGF- β 1 mRNA 発現の抑制は見られなかった。

MECOM、FOSB、FOS および ATF3 の TGF- β 1 蛋白発現への影響は、4 つの遺伝子の RNA 干渉後に NG または HG で 24 から 48 時間刺激し、HPMC 培養液上清中の TGF- β 1 蛋白濃度を Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) で測定して評価した。48 時間刺激後の TGF- β 1 蛋白濃度増加が抑制されたものは FOS のみであった。

HPMC の HG 刺激による FOS mRNA および蛋白量の経時的変化を qPCR およびウエスタンブロットで測定した。FOS mRNA は 3 時間刺激で約 22 倍に増加し、その後減少して 24 時間では刺激前のレベルに戻った。FOS 蛋白は HG 刺激 2 時間で増加し始め、3 時間でピークとなり大幅に減少した。

マウス腹腔内投与モデルはオスの 12 週齢 C57BL/6 マウスを用い、4% グルコース投与群、4% マンニトール群、コントロール群の 3 群で、腹膜中皮細胞における FOS および TGF- β 1 の発現を免疫組織化学染色で検討した。FOS および TGF- β 1 はどちらも中皮細胞の細胞質に認められた。FOS はコントロール群と比較して HG 群は 2 倍、マンニトール群は 1.3 倍、同様に TGF- β 1 は HG 群で 2.4 倍、マンニトール群で 1.4 倍に増加しており、マンニトール群はグルコース群より有意に軽度であった。

(考察)

本研究で、HPMC における HG 誘導性 TGF- β 1 産生増加は FOS 発現を介しており、他の

遺伝子は関連する可能性が低いことが明らかになった。FOS は activator protein-1 (AP-1) 複合体の主要構成要素であり、FOS、JUN、ATF や Maf ファミリーなどに属するタンパク質と二量体を形成し、DNA に結合することで転写を促進する因子である。いくつかの転写因子が TGF- β 1 調整に関与することが報告されているが、HPMC において AP-1 は HG 誘導性 TGF- β 1 産生に関連する転写因子であると推察された。AP-1 は増殖、生存、分化、アポトーシス、細胞遊走や転写など多くの細胞プロセスを制御しており、HG で亢進する FOS 発現阻害は、腹膜線維化の治療目標となりうることが示唆された。