The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腎解糖系酵素群におよぼす腎虚血・再灌流の影響
Author(s)	山本, 茂生
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38704
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 65 】

氏　　名	山　本　茂　生（やま　もと　しげ　お）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学 位 記 番 号	第　1 0 9 2 6　号
学位授与年月日	平成 5 年 9 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	**腎解糖系酵素群におよぼす腎虚血・再灌流の影響**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　鎌田　武信 （副査） 教 授　谷口　直之　　教 授　松沢　佑治

論 文 内 容 の 要 旨

［目　的］

培養細胞系において，低酸素状態では解糖系酵素群の活性が亢進し，嫌気的解糖を介してのエネルギー産生の亢進が起こることが知られている。腎臓での嫌気的状況下での解糖系の役割については，その詳細は不明である。本研究は，腎虚血・再灌流後の腎血流量減少状態での腎解糖系律速酵素の活性や遺伝子発現の変化を検討した。また細胞増殖の盛んな系では解糖系酵素活性が上昇するとの報告もあり，虚血・再灌流障害を受けた尿細管細胞の修復・再生との関連についても考察を加えた。また解糖系酵素のうちピルビン酸キナーゼ（PK）は腎臓に 2 種類のアイソザイムが存在し，L 型は近位尿細管に，M2型は遠位尿細管・集合管に局在している。虚血障害に対する抵抗性はネフロン部位別に異なっているため，PK についてはアイソザイム別に検討を加えた。

［方　法］

1. モデル動物の作製：SD 系雄性ラット（BW150-200g）を塩酸ケタミン（100mg/kgBW）腹腔内注射で麻酔し，左背部傍正中切開にて左腎臓を露出し血管鉗子で腎門部をクランプした。45分間血行遮断後血流を再開させ，再灌流不全のないことを確認して閉腹した。経時的にラットを屠殺し，左右の腎臓を検体とした。健側腎（右腎）をコントロールとして用いた。
2. 解糖系酵素群の酵素活性測定：PK は，2, 4-Dinitrophenylhydrazone 法を，ホスホフルクトキナーゼ（PFK）は，NADH-Aldolase/TIM/GDH 共役法は，ヘキソキナーゼ（HK）は，NADP-G6PDH 共役法を用いて測定した。PK アイソザイム活性の測定は，検体をウサギ抗ラット L-PK 抗体もしくは抗 M-PK 抗体と反応させた後，Protein A で処理し，その上清を検体として用いた。
3. mRNA レベルの測定：Guanidinium LiCl 法もしくは AGPC（Acid-Guanidinium-Thiocyanate-Phenol-Chloroform）法により総 RNA を抽出し，Northern analysis, dot-blot hybridization をおこなった。cDNA のプローベとして L-PK, M2-PK, HK, PEPCK(Phosphoenolpyruvate carboxykinase), β-アクチン, Type IV コラーゲンを用いた。mRNA レベルの定量は，autoradiography 後のフィルムを Densitometer で計測した。

4. PK アイソザイムの分布の検討：一次抗体としてウサギ抗ラット L-PK 抗体もしくは抗 M-PK 抗体を用い，免疫組織化学的手法で行った。

［結　果］

1. M2-PK 活性は虚血直後は低下するが，その後活性が上昇し 2 - 3 日でピークとなり 1 週間でもとのレベルに回復した。一方 L-PK 活性は M2-PK と鏡像の関係を示し，再灌流後 2 - 3 日に最も活性が低下した。PFK および HK 活性は，再灌流直後，2 日後，7 日後の検体につき測定したが，虚血側腎と健側腎での有意の差を認めなかった。
2. mRNA レベルの検討では，M2-PK は再灌流後 1 日目をピークとし約 2 倍に増加し，L-PK は 1／2 倍に減少した。再灌流後約 3 日で PK mRNA レベルは前値および健側腎のレベルに復した。HK mRNA レベルは全経過を通じて変動しなかった。糖新生系の律速酵素 PEPCK の mRNA レベルは再灌流後 1 日目に最も低値をとり，L-PK と同様の近位尿細管障害を示唆するパターンを呈した。
3. 皮質，髄質内層，髄質外層別の M2-PK の mRNA レベルの測定では，虚血・再灌流障害を強く受ける皮質・髄質外層で mRNA レベルの上昇を認めたが，虚血障害に強い髄質内層では mRNA レベルは虚血後低下する傾向があった。組織化学的には再灌流後の PK アイソザイムの分布の変化は明らかにはならなかった。
4. 細胞骨格構成蛋白の一つ β-アクチンの mRNA レベルは虚血後 1，2 日をピークとし約 2 倍となり，M2-PK の mRNA レベルと類似した変動パターンを示した。細胞外基質蛋白である TypeIV コラーゲンの mRNA レベルは，β-アクチンより 1 - 2 日遅れ約50％の増加を示した。

［総　括］

45分間虚血・再灌流ラット腎での解糖系酵素活性の変動を検討した。律速酵素のうち M2-PK のみに再灌流後の一過性の活性上昇を認めた。虚血・再灌流障害を受けやすい皮質部や髄質外層部で再灌流後に M2-PK mRNA レベルが上昇したこと，皮質部に局在する L-PK や PEPCK の mRNA レベルが低下したこと，細胞増殖時に細胞増殖を反映すると言われる β-アクチンの mRNA レベルが M2-PK の mRNA レベルの変動と一致していたことなどより，M2-PK が虚血・再灌流障害を受けた腎尿細管細胞の増殖・再生に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，腎臓における虚血再灌流時の糖代謝（主に解糖系）の変化を明らかとすべく，腎虚血再灌流モデルラットを用いて腎解糖系酵素の活性とその mRNA レベルの変動を検討した。その結果，腎解糖系律速酵素のうち M2-PK のみに再灌流後の一過性の活性および mRNA レベル上昇を認めた。この M2-PK 変動の生理的意義は未だ不詳であるが，今回の検討では再灌流後の尿細管の再生や増殖と関連が強いことが明らかとなった。以上の研究は，解糖系酵素と細胞増殖との関連を研究する上で重要な知見を加えた点で学位に値すると考えられる。