

Title	Induction of Glia maturation factor-B in proximal tubular cells leads to vulnerability to oxidative injury through p38 pathway and changes in antioxidant enzyme activities.
Author(s)	貝森, 淳哉
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/45347
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	かい もり じゅん や 貝 森 淳 哉
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 18100 号
学位授与年月日	平成 15 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Induction of Glia maturation factor-B in proximal tubular cells leads to vulnerability to oxidative injury through p38 pathway and changes in antioxidant enzyme activities. (腎臓近位尿細管における Glia maturation factor-B の発現誘導が p38 と抗酸化酵素活性の変化を通して細胞の酸化障害を促進する。)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 長田 重一 教授 辻本 賀英

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

近年、高血圧とならんで、蛋白尿が腎疾患進行に対する予後不良因子であることがほぼ定着しつつある。そこで我々は、腎疾患進行の mechanism を理解するため、蛋白負荷蛋白尿モデルマウスを作成し、近位尿細管で蛋白尿により発現変化する約 2000 種類よりなる遺伝子群の data base を構築した (Nakajima et al. *Kidney Int*, 2002)。この遺伝子群の中には、近位尿細管細胞の蛋白尿に対する適応に関係する遺伝子の他、免疫、神経、growth factor、actin modulator に関係する遺伝子が認められた。本研究では、神経特異的遺伝子である glia maturation factor-beta (GMF-B) が蛋白尿により近位尿細管で発現増加することから、GMF-B の近位尿細管細胞における機能を主に *in vitro* の系を用いて解析し、GMF-B 発現の腎疾患進行に対する影響について検討した。

【方法】

近位尿細管で蛋白尿により発現変化する遺伝子 data base の中から今回特に p38 に関連するとされる GMF-B を見だし、近位尿細管での GMF-B の発現誘導をより詳細に検討するため、northern blotting 解析、*in situ hybridization*、*laser microdissection-real time PCR* 解析を行った。また、神経特異的遺伝子 GMF-B の近位尿細管での機能を解析するため、mouse 近位尿細管由来培養細胞 mProx24 に GMF-B を強制発現させた細胞を樹立し、GMF-B が p38 に関連することから、酸化ストレスにおける F-actin reorganization、apoptosis との関係解析し、蛋白尿による GMF-B 発現誘導の腎疾患進行に対する影響について検討した。

【成績】

- 1) 病態モデルマウスの腎臓を用いた northern blotting 解析では GMF-B は第一週後も time dependent な遺伝子発現変化を示し、*in situ hybridization* では GMF-B の遺伝子発現部位は主に近位尿細管であった。*laser microdissection-real time PCR* を用いて近位尿細管特異的な GMF-B の遺伝子発現を定量したところ蛋白負荷第三週において control の約 16 倍の発現増強を認めた。
- 2) GMF-B を強制発現させた細胞は、WT に比べ、細胞死の刺激 (TNF- α 、angiotensin II) に対して細胞死が、促

進された。

- 3) TNF- α 、angiotensin II が酸化ストレスを及ぼすことが知られていることから、GMF-B 強制発現細胞に BSO、H₂O₂ の刺激を加えたところ、細胞障害が WT に比べ、促進した。
- 5) GMF-B の発現によって、細胞質の F-actin が disrupt し、核周辺に沈着する F-actin reorganization が認められ、この変化は、p38 特異的阻害剤である SB203580 で阻害された。
- 6) GMF-B の発現によって、H₂O₂ 刺激による apoptosis が増強され、この作用は p38 特異的阻害剤である SB203580 で阻害された。
- 7) 細胞内の H₂O₂ 量を DCFH-DA にて測定したところ、H₂O₂、TNF- α 、angiotensin II の刺激に対して GMF-B 強制発現細胞では、WT に比べ H₂O₂ 量の増加が遷延していた。この H₂O₂ 量の増加の遷延は p38 特異的阻害剤である SB203580 で阻害された。
- 8) 細胞内の antioxidant enzyme の活性を測定したところ、GMF-B 強制発現細胞では、WT に比べ CuZnSOD の活性が増加していたが、catalase、glutathione peroxidase の活性が低下しており、glutathione の量も低下していた。

【総括】

脳特異的発現を示す遺伝子 GMF-B が近位尿細管において、蛋白尿で発現誘導することが示された。GMF-B の発現が尿細管細胞において F-actin reorganization 及び apoptosis などの酸化ストレス障害を増強することによって、腎疾患進行に関係する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、高血圧とならんで、蛋白尿が腎疾患進行に対する増悪因子であることが定着しつつあるが、その成因については明らかにされていない。そこで申請者は、腎疾患進行のメカニズムを解明するため、蛋白負荷による蛋白尿モデルマウスを作成し、近位尿細管で蛋白尿により発現変化する約 2000 種類の遺伝子群のデータベースを構築した。本研究では、神経特異的遺伝子である glia maturation factor-beta (GMF-B) に注目して解析を行い、GMF-B 発現の腎疾患進行に対する影響について検討した。これまで、発現が脳特異的だと考えられてきた遺伝子 GMF-B が、腎近位尿細管において蛋白尿で発現誘導されることを始めて見出した。GMF-B を強制発現させた細胞は、野生型 (WT) に比べ、酸化ストレス障害である F-actin 構築変化及びアポトーシスが促進された。この変化は、p38 特異的阻害剤である SB203580 で阻害された。細胞内の H₂O₂ 量を測定したところ、H₂O₂、TNF- α 、angiotensin II の刺激に対して GMF-B 強制発現細胞では、WT に比べ H₂O₂ 量の増加が遷延していた。この H₂O₂ 量の増加の遷延は p38 特異的阻害剤である SB203580 で阻害された。細胞内の antioxidant enzyme の活性を測定したところ、GMF-B 強制発現細胞では、WT に比べ CuZnSOD の活性が増加していたが、catalase、glutathione peroxidase の活性が低下しており、glutathione の量も低下していた。これらの結果から、今まで神経保護的と考えられてきた GMF-B の発現が尿細管細胞では、酸化ストレス障害を増強すること、また、この変化が抗酸化酵素の活性変化によるものであることを初めて見出した。この研究成果は、これまで不明であった蛋白尿の腎疾患進行に対するメカニズムを解明するものとして意義が大きく、博士 (医学) の学位授与に値すると考える。