

氏 名 (本 籍) 北 田 宗 弘 (滋賀県)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 7 4 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C- $\beta$   
activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy  
(糖尿病性腎症における酸化ストレスにはプロテインキナーゼC- $\beta$ による糸  
球体 p47phox, p67phox の移行が必要である)

審 査 委 員 主 査 教 授 大 久 保 岩 男  
副 査 教 授 岡 田 裕 作  
副 査 教 授 谷 徹

## 論文内容要旨

*整理番号	477	(ふりがな) 氏名	きただ むねひろ 北田 宗弘
学位論文題目	Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C- $\beta$ activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. (糖尿病性腎症における酸化ストレスにはプロテインキナーゼ C- $\beta$ による糸球体 p47phox、p67phox の移行が必要である。)		
<p>【研究の目的】</p> <p>糖尿病モデル動物において、種々の抗酸化剤投与による腎病変の改善が報告されている。しかし、酸化ストレスの増強が糖尿病腎糸球体で一次的に生じているのか、また活性酸素種がいかにかに産生されるのかについては明らかにされていない。活性酸素種の産生源として着目されている NADPH oxidase は、細胞質 subunit p47phox、p67phox と NOX homologues (NOX 1、NOX 4、gp91phox)・p22phox からなる膜結合 subunit が複合体を形成することによって活性化される。そこで、本研究では糖尿病腎糸球体での酸化ストレスの増強を証明するとともに、NADPH oxidase の subunit 発現、活性化、更にはその活性化機構に関して検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>実験1：S-D ラット6週齢(雄)に STZ 50 mg/kg を静脈内投与し、糖尿病ラットを作成した。一方 citrate buffer を投与したラットを control とした。1) control (C群)、2) 糖尿病 (D群)、3) 糖尿病+insulin (I群) (insulin pellet 皮下埋め込み)、4) 糖尿病+ruboxistaurin (RBX、PKC <math>\beta</math> 特異的阻害剤) (R群) (10 mg/kg/日、経口) の4群に分別し、4週後、以下の実験を行った；一日尿中 8-OHdG 排泄量：ELISA 法、腎糸球体酸化ストレス：8-OHdG 免疫組織化学染色、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生 (単離糸球体・糸球体懸濁液)：lucigenin 法、NADPH oxidase subunit の mRNA 発現 (p47phox、p67phox、NOX 4、gp91phox、p22phox、NOX 1)：northern blot 法、蛋白発現・糸球体での膜移行 (p47phox、p67phox)：western blot 法。</p> <p>実験2：adenovirus(Ad-) GFP、PKC <math>\beta_2</math> を感染させた培養ラットメサンギウム細胞における、p47phox・p67phox (膜・細胞質・全細胞) 発現を western blot 法、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生を dihydroethidium 染色法にて検討した。</p> <p>【結果】</p> <p>実験1：1) 尿中 8-OHdG 排泄量は C群に比し D群において有意に増加し、I・R群では抑制された。2) 腎糸球体 8-OHdG 免疫組織染色は C群に比し D群において著明に増加し、I・R群では抑制された。3) 単離腎糸球体における O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生は C群に比し D群で有意に増強し、I・R群で抑制された。更に diphenylen iodonium (DPI) (NADPH oxidase 阻害剤)・tiron (O<sub>2</sub><sup>-</sup> スカベンジャー) の添加にてこの O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生は完全に抑制された。4) 糸球体懸濁液における NADPH を基質とした O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生は C群に比し D群において有意に増強し、I・R群では抑制された。また、DPI、tiron の添加にてこの O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生は抑制された。5) 糸球体 p47phox・</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、  
2 千字程度でタイプ等で印字すること。  
2. ※印の欄には記入しないこと。

p67phox の mRNA・蛋白発現は C 群に比し D 群において有意に増加し、I 群では抑制されたが、R 群では変化を認めなかった。6) 糸球体 NOX 4 mRNA 発現は、C 群に比し D 群において有意に減少し、I 群では抑制されたが R 群では変化を認めなかった。7) 糸球体 p22phox、gp91phox、NOX 1 mRNA 発現は C・D 群間で変化はなかった。8) 糸球体での p47phox・p67phox の膜移行は C 群に比し D 群で有意に増加し、R 群で抑制を認めた。

実験 2: Ad-PKC  $\beta_2$  過剰発現メサンギウム細胞において、p47phox・p67phox の膜移行は発現量に変化なく有意に増加するとともに、dihydroethidium 染色も有意な増加を認めた。

#### 【考 察】

STZ 誘発糖尿病ラット腎糸球体では酸化ストレスが糖尿病の早期から既に増強しており、NADPH oxidase の活性化が主な産生源として役割を果たしていることが明らかとなった。その oxidase の活性化には、p47phox・p67phox の発現増加及び膜移行が関与し、PKC  $\beta$  阻害剤はそれら膜移行を抑制することによって、酸化ストレスを改善した可能性が示唆された。また、PKC  $\beta_2$  過剰発現メサンギウム細胞においても p47phox・p67phox 膜移行の増強及び  $O_2^-$  産生増加を認め、PKC  $\beta$  の p47phox・p67phox 膜移行を介した NADPH oxidase 活性化による活性酸素種産生への関与が示された。

#### 【結 論】

糖尿病腎糸球体における酸化ストレスの増強には、p47phox・p67phox 発現増強とともに、PKC  $\beta$  活性化によるそれら膜移行を介する NADPH oxidase の活性化が重要である。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	477	氏名	北田宗弘
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>酸化ストレスの亢進は、糖尿病性腎症の発症・進展機序の一つと考えられている。</p> <p>本研究は、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットの腎糸球体及び PKC <math>\beta_2</math> を過剰発現させたメサンギウム細胞を用い、1) 酸化ストレス亢進の証明、2) 活性酸素種の産生機構、3) 酸化ストレスと PKC <math>\beta</math> 活性化との関連について検討したものである。</p> <p>その結果、STZ 誘発糖尿病ラット腎糸球体において酸化ストレスは亢進しており、その分子機構に PKC <math>\beta</math> の活性化による p47phox、p67phox の膜移行増加を介した NADPH オキシダーゼの活性化が関与していることが明らかになった。</p> <p>本論文は、糖尿病性腎症の発症・進展における酸化ストレス亢進の関与ならびにその分子機構を解明したものであり、博士(医学)の学位論文に値する。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成16年2月4日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成16年2月13日)			