



Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes in the Pathogenesis of Murine Daunomycin (DM)-induced Nephropathy

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大竹, 剛靖 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1012

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 159号	学位授与年月日	平成 6年 3月25日
氏 名	大 竹 剛 靖		
論文題目	Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes in the Pathogenesis of Murine Daunomycin (DM) – induced Nephropathy (マウス・ダウノマイシン腎症の発生における活性酸素と抗酸化酵素の役割)		

医学博士 大竹 剛 靖

論文題目

Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes in the Pathogenesis of Murine Daunomycin (DM) -induced Nephropathy

(マウス・ダウノマイシン腎症の発症における活性酸素と抗酸化酵素の役割)

論文の内容の要旨

進行性腎障害の病態を調べるため用いられている動物モデルの1つとして、マウスに抗癌剤であるダウノマイシン (DM) を投与して惹起される腎症がある。これは、早期には糸球体上皮細胞障害を特徴とし人の微小変化型ネフローゼ症候群に似たモデルと考えられている。我々は、マウスの系統により DM 腎症の発症感受性に明らかな差があることを見いだしたが、その原因は未だ明らかではない。本研究は、このモデルでの腎症の発症原因と系統間発症感受性の差の原因を明らかにする目的で、DM 感受性系統 A/J、DM 抵抗性系統 C57BL/6 J (B6) を用い、活性酸素および抗酸化酵素の役割について検討した。

方法：

A/J、B6 両系統の12週齢雄マウス (20-25 g) に、DM20mg/kgを尾静脈より静注しモデルを作成。経時的に尿中アルブミン排泄量を測定し、血清アルブミン、クレアチンを比較した。次に、生理食塩水で灌流した腎皮質組織を用い、DM 投与前投与後の腎組織中 DM 濃度、組織過酸化脂質、内因性抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンパーオキシダーゼ (GSH-Px)、抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) を経時的に検討した。また、腎症発症系 A/J での活性酸素の関与を確かめるため A/J を1群：DM コントロール群 (N=16)、2群：SOD 併用群 (SOD 5 mg/kgを1日2回14日間連日皮下注射、N=10)、3群：ジメチルサイオウレア (DMTU) 併用群 (DMTU50mg/kgを1日2回14日間連日腹腔内投与、N=10)、4群：カタラーゼ併用群 (カタラーゼ10万単位/kgを1日2回14日間連日腹腔内投与、N=12) に分け経時的に尿中アルブミン排泄を検討した。

結果：

A/J では DM 投与後7日より有意のアルブミン尿が認められ14日では更に増加したが B6 では経過中アルブミン尿は認められなかった (14日：A/J vs B6 ; 7.07 ± 1.56 vs 0.18 ± 0.03 mg/day, $p < 0.01$)。腎組織中 DM 濃度は DM 投与後30分 (A/J vs B6 ; 14.08 ± 1.15 vs 15.61 ± 0.52 μ g/g)、6時間 (5.04 ± 0.46 vs 5.20 ± 0.73 μ g/g) と差は認めなかった。腎皮質組織中過酸化脂質は DM 投与前では差はなかったが A/J では投与後4日、7日で前値に比し有意の増加を認めた (前 ; 0.57 ± 0.04 , 4日 ; 0.75 ± 0.05 , 7日 ; 0.69 ± 0.06 nmolMDA/mg protein)。B6 では有意の変動はなかった。内因性抗酸化酵素活性は DM 投与前または投与後4日の早期に SOD および GSH-Px が B6 で有意に高値であった (A/J vs B6 ; 4日 SOD ; 132.84 ± 6.56 vs $177.67 \pm 10.39 \times 10^2$ N.U./mg protein, $p < 0.05$, 前 GSH-Px ; 2.96 ± 0.22 vs 4.52 ± 0.11 , $p < 0.01$, 4日 GSH-Px ; 3.13 ± 0.19 vs $5.11 \pm 0.21 \times 10^2$ nmol/mg protein, $p < 0.01$)。スカベンジャー併用実験では SOD 併用群、DMTU 併用群においてコントロール群と比較し7日、14日とも有意のアルブミン尿の改善が認められたが、カタラーゼ併用群では7日での改善を認めたが14日での改善は認めなかった (14日 ; DM コントロール群 8.09 ± 1.53 , SOD 併用群 $2.87 \pm 0.83^{**}$, DMTU 併用群 $3.58 \pm 0.99^{*}$, カタラーゼ併用群 6.33 ± 1.95 mg/day, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$)。

結論：

1. 腎症発症系 A/J では蛋白尿出現前に一過性の組織過酸化脂質の増加を認め SOD、DMTU の併用により蛋白尿の有意の改善を認めたことからこのモデルでの腎症発症における活性酸素の関与が示された。
2. 腎症非発症系 B6 では内因性抗酸化酵素、特に SOD、GSH-Px が DM 投与前または投与後早期で高値であることが酸化的組織障害を抑制し、その後の蛋白尿の出現を抑制している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

マウスに抗癌剤であるダウノマイシン (DM) を投与して生じる腎症は微小変化型ネフローゼ症候群に似た動物モデルと考えられている。著者らの研究グループは DM 腎症の発症感受性はマウスの系統間で差があることを見いだしているが、その機序はまだ明らかにされていない。ダウノマイシンやアドリアマイシンなどのキノン系抗癌剤は種々の活性酸素種を生じる作用を持つことが知られている。申請者はこの点に着目して、本研究でこの DM 腎症の発症原因と系統間の発症感受性の差の原因を明らかにする目的で、DM 感受性系統である A/J と DM 抵抗性系統 C57BL/6J (B6) を用いて活性酸素および抗酸化酵素の役割について検討したものである。

方法：

A/J、B6 両系統の12週齢の雄マウスに DM を静注することにより作成した実験モデルで尿中アルブミン排泄量と血清アルブミン、クレアチニン量を経時的に測定して、これを腎障害のパラメーターとした。活性酸素および抗酸化酵素の役割を調べる為に、生理食塩水で灌流した腎皮質組織での、DM 投与前投与後の DM 濃度、過酸化脂質、内因性抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンパーオキシダーゼ (GSH-Px)、そして還元型グルタチオン (GSH) を経時的に測定した。更に、腎症発症系 A/J での活性酸素の関与を調べる目的で、種々の抗酸化酵素と抗酸化剤を投与する実験を行った。1. DM コントロール群、2. SOD 併用群、3. ジメチルサイオウレア (DMTU) 併用群、4. カタラーゼ併用群 での尿中アルブミン量の経時的測定を行ってその抑制効果を調べた。

結果：

A/J 系では DM 投与後 7 日から有意のアルブミン尿が生じて、14 日では更に増加したが、B6 系では経過中のアルブミン尿は認められなかった。腎皮質組織中の DM 濃度は、30 分、6 時間とも両系で差はなかった。過酸化脂質量は A/J 系で投与後、4 日、と 7 日で投与前に比較し、有意の増加を認めたが、B6 系では不変であった。SOD と GSH-Px は DM 投与前と 4 日後に B6 系で A/J 系に比較し、有意に高かった。抗酸化酵素と抗酸化剤の投与による実験では SOD 併用群、DMTU 併用群において、7 日後14日後ともアルブミン尿の改善が有意に認められた。カタラーゼ併用群では7 日後での改善を認めたが、14 日後での改善は認められなかった。

結論：

1. 腎症発症系 A/J では蛋白尿出現前に腎皮質において一過性の過酸化脂質の増加を認め、更に SOD、または DMTU の併用投与に蛋白尿の有意の改善を認めたことから、この実験モデルでの腎症発症の機序に活性酸素が関与していることが考えられた。
2. 腎症非発症系 B6 では内因性抗酸化酵素の SOD、GSH-Px が DM 投与前と投与後の早期で高値

であることが組織の過酸化反応を抑制し、その後の蛋白尿の出現を抑制しているという機序が考えられた。

この研究は腎症のモデルで活性酸素種がその発症機序に関与していることを示したもので、この分野の研究に寄与するものと評価された。

なお、本論文の審査過程で次のような質疑が申請者になされた。

1. DM 投与による両系統のマウス (A/J と B6) の尿細管の病理組織像に違いがあるか
2. DM の肝臓障害または代謝産物による二次的腎臓障害は考えなくてよいのか
3. DM による腎臓障害発症までの time lag が長い理由
4. 両種のメラニンの含有量の違いは実験結果に影響を与えたか
5. 用いた両種のラットの週齢は適切であったか
6. 両種の腎臓組織の膜組成 (脂肪酸) の組成の比較はされているか
7. 発症 4 日以前の過酸化脂質は測定してあるか
8. A/J と B6 での DM の影響の差にはラジカル以外の要因は考えられないか
9. 抗酸化酵素の腎臓での局在について
10. 尿蛋白の増加とともに心筋障害はみられたか
11. DM の心筋障害ではフリーラジカルが生じるか

以上の討論における申請者の応答は概ね適切と認められ、本論文は博士 (医学) の学位授与に値すると全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 平 光 忠 久

副査 教授 金 子 榮 藏 副査 教授 白 澤 春 之

副査 助教授 植 松 俊 彦 副査 助教授 小 林 明