

# The induction of cell cycle regulatory and DNA repair proteins in cisplatin-induced acute renal failure

著者	周 華
発行年	2004-09-17
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/246">http://hdl.handle.net/10271/246</a>

doi: 10.1016/j.taap.2004.04.003

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 426号	学位授与年月日	平成16年 9月17日
氏名	周 華		
論文題目	The induction of cell cycle regulatory and DNA repair proteins in cisplatin-induced acute renal failure (シスプラチン誘発急性腎不全における細胞周期調節因子と DNA 修復因子の発現)		

博士(医学) 周 華

## 論文題目

The induction of cell cycle regulatory and DNA repair proteins in cisplatin-induced acute renal failure  
(シスプラチン誘発急性腎不全における細胞周期調節因子とDNA修復因子の発現)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

シスプラチン(CDDP)誘発急性腎不全においてcyclin依存性キナーゼ(CDK)-阻害因子の一つであるp21やPCNAなどDNA修復に関連する因子が腎障害に対して保護的な役割を果たすことが示唆されている。しかし、他の細胞周期調節因子であるp27、cyclin B1、cyclinD1やDNA修復因子の、CDDP誘発急性腎不全に対する作用については検討されていない。

本研究では、細胞周期調節とDNA修復因子修飾による急性腎不全の予防や治療法の開発を目的として、CDDP誘発急性腎不全における細胞周期調節因子(p21、p27、cyclinB1、cyclinD1)とDNA修復因子(PCNA、GADD45、GADD153)の発現を検討するとともに、砒素(sodium arsenite(SA))を用いてCDDP誘発急性腎不全を軽減した時のこれらの発現の変化を検討した。

### [材料ならびに方法]

雄性SDラットにCDDP6mg/kgを陰茎静脈より静注し急性腎不全を惹起した。CDDP投与の前日からSA6mg/kgを1回陰茎静脈より投与する群(SA+CDDP群)と同用量の生食を静脈投与する群(CDDP単独群)、及びCDDPの代わりに生食だけを静注した群(生食群)またはSA(6mg/kg)だけを静注する群(SA単独群)の4群に分けて、CDDP静注前0日目、静注後3、5日目に、血液を採取した後屠殺し、腎臓を摘出、左腎の一部を20%ホルマリンで固定し、右腎の髄質外層から蛋白抽出するまで-80℃で凍結保存した。  
腎機能の評価：血清クレアチニン値を酵素法で測定。

腎組織障害の評価：PAS染色標本を用い、腎髄質外層外帯における障害の程度を400倍、25視野にて100尿細管について0~4の5段階評価でスコア化し、組織障害の半定量的評価を行った。

腎尿細管細胞アポトーシスの評価：TUNEL陽性細胞で特徴づけられるアポトーシス細胞を400倍、50視野でカウントし半定量評価した。

細胞周期調節蛋白やDNA修復関連蛋白の評価：p21、p27、cyclinB1、cyclinD1、PCNA、GADD45、GADD153の免疫染色を施行し、腎髄質外層外帯の尿細管における各染色陽性細胞数を400倍、50視野でカウントした。また、3日目の腎髄質外層より蛋白を抽出し、p21、p27、cyclinB1、cyclinD1、PCNA、GADD45、GADD153の発現をウェスタンブロット法で分析した。内部標準としては $\beta$ -actinの発現を検討した。p27とPCNA陽性細胞の関係について、連続切片を用いて免疫染色で評価した。

### [結果]

1. CDDP投与により3日目から血清クレアチニン値の上昇と尿細管障害、尿細管アポトーシス細胞の増加が認められ、これらの変化は5日目にさらに強くなった。
2. 免疫組織学的染色では、p21、p27、cyclinB1、cyclinD1の陽性細胞がCDDP投与3日目に腎髄質外層

尿細管で有意に増加した。同様に、PCNA、GADD45、GADD153陽性細胞も3日目に増加した。

3. 連続切片を用いた検討では、p27とPCNAの発現が同じ細胞核に染色された。
4. SA投与によりCDDP誘発急性腎不全の程度は軽減されるとともに、p27の発現はさらに増強した。一方、cyclinB1とcyclinD1の発現はむしろ減弱した。またPCNAとGADD153の発現もさらに増加した。
5. SAはCDDP投与後に増加したp21とGADD45の発現に影響を与えなかった。SA単独投与は腎機能と腎組織障害の程度に影響を与えなかった。

#### 〔考察〕

CDDP誘発急性腎不全では細胞周期調節因子のp21、p27、cyclinB1、cyclinD1とDNA修復関連因子PCNA、GADD45、GADD153の全ての発現が増強することを確認した。細胞周期をとめる方向で作用するp21、p27とともに、細胞周期を進める方向で作用するcyclinB1、cyclinD1の発現が増強されていたが、SA投与により腎障害を軽減させた時、p27はさらに発現が増強し、cyclinB1とcyclinD1の発現は減弱した。この時、PCNA、GADD153の発現もさらに増加していた。これらのことは、細胞周期をG1/SあるいはG2/M期に停止させる方向の変化とDNA修復関連因子の発現増加がCDDP誘発急性腎不全の軽減とともに起きていることを示している。

#### 〔結論〕

CDDP誘発急性腎不全において細胞周期調節因子やDNA修復関連因子の発現が腎尿細管上皮細胞で誘導される。これらの変化はCDDP誘発急性腎不全の程度を修飾している可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

シスプラチン(CDDP)誘発急性腎不全においてcyclin依存性キナーゼ(CDK)-阻害因子の一つであるp21やPCNAなどDNA修復に関連する因子が腎障害に対して保護的な役割を果たすことが示唆されている。しかし、他の細胞周期調節因子であるp27、cyclinB1、cyclinD1やDNA修復因子の、CDDP誘発急性腎不全に対する作用については検討されていない。本研究では、細胞周期調節とDNA修復因子修飾による急性腎不全の予防や治療法の開発を目的として、CDDP誘発急性腎不全における細胞周期調節因子(p21、p27、cyclinB1、cyclinD1)とDNA修復因子(PCNA、GADD45、GADD153)の発現を検討するとともに、砒素(sodium arsenite(SA))を用いてCDDP誘発急性腎不全を軽減した時のこれらの発現の変化を検討した。

方法は雄性SDラットにCDDP6mg/kgを陰茎静脈より静注し急性腎不全を惹起するモデルである。CDDP投与前日からSA6mg/kgを1回陰茎静脈より投与する群(SA+CDDP群)と同用量の生食を静脈投与する群(CDDP単独群)、及びCDDPの代わりに生食だけを静注した群(生食群)またはSA(6mg/kg)だけを静注する群(SA単独群)の4群に分けて、CDDP静注前0日目、静注後3、5日目に、血液を採取した後屠殺し、腎臓を摘出、左腎の一部を20%ホルマリンで固定し、右腎の髄質外層から蛋白抽出するまで-80℃で凍結保存した。

腎機能の評価は血清クレアチニン値を酵素法で測定し、また腎組織障害の評価についてはPAS染色標本を用い組織障害の半定量的評価を行った。さらに腎尿細管細胞アポトーシスはTUNEL陽性細胞を指標にして半定量評価した。細胞周期調節蛋白やDNA修復関連蛋白p21、p27、cyclinB1、cyclinD1、PCNA、GADD45、GADD153の評価も免疫染色を用いるとともに、3日目の腎髄質外層より蛋白を抽出し、p21、

p27、cyclinB1、cyclinD1、PCNA、GADD45、GADD153の発現をウェスタンブロット法で分析した。内部標準としては $\beta$ -actinを用いた。

p27とPCNA陽性細胞の関係について、連続切片を用いて免疫染色で評価した。この実験の結果、CDDP投与により3日目から血清クレアチニン値の上昇と尿細管障害、尿細管アポトーシス細胞の増加が認められ、これらの変化は5日目にさらに強くなること、免疫組織学的染色では、p21、p27、cyclinB1、cyclinD1の陽性細胞がCDDP投与3日目に腎髄質外層尿細管で有意に増加した、PCNA、GADD45、GADD153陽性細胞も3日目に増加すること、連続切片を用いた検討では、p27とPCNAの発現が同じ細胞核に染色されること、SA投与によりCDDP誘発急性腎不全の程度は軽減されるとともに、p27の発現はさらに増強する、一方、cyclinB1とcyclinD1の発現はむしろ減弱すること、またPCNAとGADD153の発現もさらに増加したこと、さらにSAはCDDP投与後に増加するが、p21とGADD45の発現に影響を与えず、SA単独投与も腎機能と腎組織障害、これら細胞周期やDNA修復に関連する蛋白の発現の程度に影響を与えないことなどがわかった。興味深いことに、細胞周期をとめる方向で作用するp21、p27とともに、細胞周期を進める方向で作用するcyclinB1、cyclinD1の発現も増強されていたが、SA投与により腎障害を軽減させた時、p27はさらに発現が増強し、cyclinB1とcyclinD1の発現は減弱した。この時、PCNA、GADD153の発現もさらに増加していた。つまり、細胞周期をG1/SあるいはG2/M期に停止させる方向の変化とDNA修復関連因子の発現増加がCDDP誘発急性腎不全の軽減とともに起きており、これらがCDDP誘発急性腎不全の程度を修飾していると結論した。

審査委員会の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) ラットの急性腎不全モデルはヒトの急性腎不全とどう違うか
- 2) なぜ近位尿細管がこのモデルのターゲットになるのか
- 3) CDDPによる細胞死の機構は尿細管細胞に特異的なものか
- 4) TUNEL陽性細胞とp21陽性細胞の同一性を二重染色で検討したか
- 5) GADD45の細胞質から核への移行の意味は
- 6) 尿細管細胞で修復がおこっているということの証拠は
- 7) 砒素単独の、これらの修復分子に対する影響はなにか
- 8) p27の変化の機構はどのようなものが考えられるか、またそのための実験方法にはどのようなものがあるか
- 9) 砒素の細胞増殖への影響をKi-67などで確かめているか
- 10) 腎障害保護作用について、ヒートショックたんぱくに注目した理由

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶 村 春 彦  
副査 大 橋 京 一 副査 北 川 雅 敏