

氏 名	リー 李 文 華
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3217 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	α -Tocopherol induces calnexin in renal tubular cells: Another protective mechanism against free radical-induced cellular damage (α -トコフェロールは腎尿細管で calnexin を誘導する：抗酸化作用の新たな機序について)
論文調査委員	(主 査) 教 授 稲 垣 暢 也 教 授 淀 井 淳 司 教 授 小 川 修

論 文 内 容 の 要 旨

鉄キレート剤である鉄ニトリロ三酢酸(Fe-NTA)を齧歯類に腹腔内投与すると、腎近位尿細管においてフェントン反応を介した酸化ストレスを惹起する。その急性期には尿細管の酸化的傷害が認められるが、Fe-NTA の反復投与を行うと 1～2 年ののちに高率に腎癌が誘発されることが知られている。これまでに、抗酸化剤として知られる α -tocopherol (ビタミン E の主成分) を Fe-NTA 投与前より食餌に混じて持続的に投与すると、急性傷害を予防するのみならず腎発がん率も低下させることが示された。本研究においては、上記動物モデルを使用して、発現マイクロアレイ解析により α -tocopherol の腎臓に及ぼす作用を遺伝子レベルで網羅的に検討した。4 週齢の雄ウィスターラットを高 α -tocopherol 食 (500 mg/kg) あるいはコントロール食 (20 mg/kg) で 4 週間に渡り飼育した。Fe-NTA 投与前の動物群の腎臓の α -tocopherol 含有量を測定した。Fe-NTA 投与群においては Fe-NTA 2.5 あるいは 5mg 鉄/kg 体重を腹腔内投与後 3 時間で腎のサンプルを収集した。高 α -tocopherol 食群ラットの Fe-NTA 投与前腎臓では α -tocopherol の含量がコントロール食群の約 2 倍であった。Fe-NTA 投与後腎の組織学的検討を行うと、高 α -tocopherol 食群では酸化的傷害が軽減されていた。総 RNA を抽出し常法により上記 6 匹の腎の発現マイクロアレイ解析を行った。すると、酸化ストレスに伴いシャペロン蛋白である calnexin や cyclophilin A などの mRNA 発現が上昇したが、これらの遺伝子発現は高 α -tocopherol 食の動物では Fe-NTA 投与前に予め発現誘導が起こっていることが判明した。これらの結果は定量的 PCR で確認され、calnexin 蛋白が腎尿細管細胞で増加したことを特異抗体で示した。腎尿細管由来株化細胞である LLC-PK1 の培養液に α -tocopherol を添加すると calnexin が誘導され、過酸化水素の細胞毒性に対する抵抗性が増加した。その際、calnexin 蛋白を siRNA で減少させると過酸化水素の毒性が増強した。次に、COS7 細胞に calnexin を遺伝子導入すると過酸化水素の毒性に対する抵抗性が増加した。本研究においては、糖蛋白特異的なシャペロン分子である calnexin が α -tocopherol により腎尿細管に誘導されることが見出された。 α -tocopherol は糖転移酵素である N-acetylglucosaminyltransferase 3 の発現も腎尿細管で増加させることを合わせ考察すると、 α -tocopherol は単に活性酸素消去剤として働くだけでなく、細胞内で軽度の小胞体ストレスを発生させることにより、糖タンパクの代謝を修飾するという新たな役割を有することが示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ビタミン E の主成分である α -tocopherol (α T) には抗酸化作用が知られるが、その生体内における作用機構の解明は十分ではない。鉄ニトリロ三酢酸(Fe-NTA)投与はラット腎近位尿細管に酸化的傷害を来し、その反復投与により高率に腎癌が発生する。 α T 強化食には同腎癌の予防効果が知られている。本研究においては、発現アレイ解析を使用し、 α T の新たな作用機構を検討した。ラットを α T 強化食で 4 週間飼育すると、腎の α T 含量は普通食料の約 2 倍となり、Fe-NTA 投与による急性腎尿細管傷害が軽減された。高 α T 食の腎では GRP78/BiP を指標とする小胞体ストレスが軽度増加すると同時に、糖蛋白シャペロンである calnexin や糖転移酵素である N-acetylglucosaminyltransferase 3 の発現が増加した。次に、

尿細管由来 LLC-PK1 細胞に α T を添加すると calnexin の発現と過酸化水素への耐性が増加した。一方、同細胞で calnexin をノックダウンすると α T による防御効果が抑制された。逆に COS-7 細胞に calnexin を遺伝子導入すると過酸化水素への耐性が増加した。これらの結果は、 α T 強化食が腎に小胞体ストレスを惹起することおよび糖蛋白関連遺伝子を誘導することを示すものである。

以上の研究は α T の作用機構解明に貢献し、酸化ストレス発がんの予防法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。