

氏名（本籍）	神谷 哲朗（愛知県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位授与番号	甲第 8 号
学位授与日付	平成 23 年 3 月 25 日
専攻	医療情報学専攻
学位論文題目	低酸素状態下における細胞外抗酸化酵素の発現調節機構に関する研究 (Regulation of extracellular-superoxide dismutase during hypoxia)
学位論文審査委員	(主査) 教授 丹羽 雅之 (副査) 教授 田中 稔幸 (副査) 教授 深尾 敏幸 (副査) 教授 稲垣 直樹

論文内容の要旨

慢性腎疾患の進展ならびに脂肪細胞の肥大化過程において誘導される慢性的な低酸素ストレスは、組織における活性酸素種（ROS）の産生亢進をきたし、それにより動脈硬化をはじめとする種々の病態を増悪する可能性が報告されている。Extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD) は、細胞外に局在する唯一の抗酸化酵素であり、分泌後、細胞表面や間質の細胞外マトリックスに結合し、組織を酸化ストレスから防御していると考えられている。EC-SOD は他の臓器と比べ、腎および脂肪組織に比較的高濃度に分布し ROS の消去を担っているため、低酸素状態下における本組織での EC-SOD 発現調節機構を解明することは、上記疾患の発症・進展抑制に向けて重要な課題である。そこで本研究では、アフリカミドリザル腎尿細管上皮細胞（COS7 細胞）およびマウス前駆脂肪細胞（3T3-L1 細胞）を用いて、低酸素状態下の培養細胞における EC-SOD 発現変動とそのメカニズムについて、細胞内 ROS および tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの炎症性サイトカインとの関係に着目して検討した。

1. 低酸素状態下の培養腎尿細管上皮細胞における抗酸化酵素の発現変動

抗酸化酵素の発現に及ぼす低酸素ストレスの影響を、低酸素誘導剤である塩化コバルト（CoCl₂）添加法ならびに低酸素分圧（1% O₂）曝露法を用いて検討した。COS7 細胞を CoCl₂ により処理したところ、細胞内 ROS 産生の亢進が認められた。一方、CoCl₂ の濃度および処理時間依存的に EC-SOD 発現量の減少が認められた。しかし、他の SOD アイソザイム（Cu,Zn-SOD および Mn-SOD）の発現量に変化は認められなかった。また、低酸素分圧下の COS7 細胞においても、細胞内 ROS 産生の亢進ならびに EC-SOD 発現量の減少が認められた。次に、EC-SOD 発現減少に対する ROS の関与を検討した。抗酸化剤である trolox で細胞を前処理することにより、CoCl₂ 処理による細胞内 ROS 産生の亢進ならびに EC-SOD 発現量の減少は有意に抑制された。一方、ROS の産生を伴わない低酸素誘導剤であるデフェロキサミンで細胞を処理した場合には、EC-SOD 発現量の減少は認められなかった。これまでに、EC-SOD は mitogen-activated protein kinase (MAPK) によりその発現量が制御されていることが報告されている。そこで、EC-SOD 発現減少への MAPK の関与について、そのリン酸化および MAPK 阻害剤の影響の観点から検討した。COS7 細胞を CoCl₂ により処理したところ、p38-MAPK のリン酸化が増大し、p38-MAPK の阻害剤である SB203580 で細胞を前処理することにより、CoCl₂ 処理による EC-SOD 発現量の減少は有意に抑制された。しかし、他の MAPK 阻害剤の前処理による影響は認められなかった。これらの結果から、低酸素状態下の腎尿細管上皮細胞において、EC-SOD 発現調節に細胞

内 ROS ならびに p38-MAPK によるシグナル経路の関与が示唆された。

2. 低酸素状態下の培養脂肪細胞における抗酸化酵素の発現変動

3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化は定法に従って行った。COS7 細胞と同様に、3T3-L1 細胞に低酸素ストレスを負荷したところ、EC-SOD のみ発現量は減少した。また、炎症性アディポサイトカインであるアディポネクチン発現量も EC-SOD 発現量と同様に減少した。しかし、3T3-L1 細胞における EC-SOD 発現調節に細胞内 ROS および p38-MAPK の関与は認められず、その代わりに TNF- α および c-Jun N-terminal kinase (JNK) の関与が認められた。これらの結果より、COS7 細胞と比較しそのシグナル経路は異なるものの、低酸素状態下の脂肪細胞においても、EC-SOD 発現量が減少することが明らかとなった。

以上、低酸素状態下の COS7 細胞および 3T3-L1 細胞において、SOD アイソザイムの内で EC-SOD のみ発現量の調節を受けることが明らかとなった。また、その発現調節に、COS7 細胞では細胞内 ROS ならびに p38-MAPK によるシグナル経路が関与すること、3T3-L1 細胞では TNF- α および JNK によるシグナル経路が関与することを明らかにした。低酸素状態下の組織において、EC-SOD 発現量が減少することにより酸化ストレスに対する防御能が低下し、それが慢性腎疾患やメタボリックシンドロームの増悪を促進する可能性が示唆された。本研究成果は、低酸素状態下における酸化ストレス由来の細胞障害メカニズムの解明に繋がるものであり、心血管系疾患の発症・進展抑制に向けての有益な情報を提供できるものと考ええる。

論文審査結果の要旨

本論文は細胞外抗酸化酵素 (EC-SOD) の発現調節機構を、アフリカミドリザル腎尿細管上皮細胞 (COS7) およびマウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1) を用いて検討した成績をまとめたものである。

EC-SOD は細胞外に局在する唯一の抗酸化酵素であり、腎および脂肪組織に比較的高濃度に分布し、酸化ストレスからの組織の防御に役割を演じると考えられる。一方、慢性的な低酸素ストレスは活性酸素種の産生亢進をきたし、種々の病態の形成に関わると推定される。そこで、低酸素状態下での EC-SOD の発現を、COS7 細胞および 3T3-L1 細胞を用いて検討した。

COS7 細胞を用いた検討においては、低酸素ストレスにより、細胞内活性酸素種の増加に伴って EC-SOD の発現が低下すること、他の SOD アイソザイムには発現変動は認められないこと、抗酸化剤の添加によってこれらの変化が抑制されることを明らかにした。また、低酸素ストレスによって p38-MAPK のリン酸化が亢進し、p38-MAPK 阻害薬処置によって EC-SOD 発現の低下が抑制されることを示した。一方、3T3-L1 細胞を用いた検討では、低酸素ストレスは EC-SOD と共にアディポネクチンの発現を低下させること、EC-SOD 発現の低下には活性酸素種や p38-MAPK ではなく、TNF- α および JNK が関与することを明らかにした。

これらの成績から、低酸素状態下の腎組織、脂肪組織等においては EC-SOD 発現が低下し、酸化ストレスに対する防御能が低下して慢性腎疾患、メタボリックシンドローム等の病態を進展させる可能性を示唆した。また、腎組織と脂肪組織とでは EC-SOD 発現低下を誘発する機構が異なることを示した。これらの知見は、酸化ストレスによって形成される病態の理解、治療戦略の構築に有用な示唆を与えるものであり、博士論文として価値あるものと判断した。

最終試験結果の要旨

神谷氏の学位論文の主要部分は審査付き学術雑誌に公表済みの 2 編の論文に基づくものであり、本論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

また、公聴会において、学位論文の内容に関する事項、すなわち、細胞外抗酸化酵素の生理的役割、低酸素状態下での発現変化、発現調節に関わる細胞内シグナル、酸化ストレスによって形成される病態に対する予防および治療への応用などに関して試問を行った。申請者から十分な内容の回答が得られたので、最終試験に合格したと判定した。

論文リスト

1. Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Harutaka Yamada, Hirokazu Imai, Naoki Inagaki and Tetsuo Adachi. Cobalt chloride decreases EC-SOD expression through intracellular ROS generation and p38-MAPK pathways in COS7 cells. *Free Radical Research* 42: 949-956, 2008. [IF: 2.215]
2. Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Naoki Inagaki and Tetsuo Adachi. The effect of hypoxia mimetic cobalt chloride on the expression of EC-SOD in 3T3-L1 adipocytes. *Redox Report* 15: 131-137, 2010. [IF: 1.506]