

# 進行性腎障害進展過程におけるミトコンドリア酸化ストレスの意義

堀家 英之

糖尿病を筆頭として多彩な原因で慢性腎不全が招来されるが、その進展過程には、共通機序が存在すると考えられている。さらに腎内で産生される活性酸素による酸化ストレスの亢進が共通機序の一部を構成していることが示唆されている。進行性腎障害におけるミトコンドリア DNA (mtDNA) の酸化的障害、およびミトコンドリア機能異常の存在とその意義について検討した。

従来、腎内での活性酸素産生を直接検出する事は不可能であったが、活性酸素反応性色素である dichlorofluorescein-diacetate と共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより、腎組織において産生された活性酸素を可視化することに成功した。5/6腎摘 (Nx) ラットでは、コントロール群と比較し、糸球体内での活性酸素生成の有意な増加を認めた。次に、核酸の酸化的障害を 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) を指標として検討した。8-OHdG の尿中排泄量は Nx 作成直後には、減少するが組織障害の進展に一致し増加を認めた。腎組織における 8-OHdG の局在を免疫組織化学により検討したところ、8-OHdG の蓄積は主に糸球体上皮および内皮細胞に認められた。細胞内では主として細胞質に局在しており、mtDNA への酸化的障害の蓄積が推測された。mtDNA 遺伝子の発現変化を検討すると、呼吸鎖 complex I, II 構成分子である NADH dehydrogenase 2 及び cytochrome b の遺伝子発現が Nx 群において低下していた。

次に、培養糸球体上皮細胞を用いて、mtDNA の酸化的障害が細胞機能に与える影響について検討した。ミトコンドリア呼吸鎖酵素群 complex I 及び III の特異的阻害薬を用いたところ、細胞内に活性酸素生成の亢進を認めた ( $p < 0.05$ )。また、糸球体上皮細胞を活性酸素により処理することにより、ミトコンドリア膜電位の低下と apoptosis の誘導を認めた。

以上の結果より、進行性腎障害において、糸球体内での活性酸素生成の亢進と、その結果生じるミトコンドリア及び mtDNA の酸化的障害が、組織障害の進展に関与していることが明らかとなった。

(平成15年10月14日受理)

## Role of Mitochondria and Mitochondrial DNA Damage Due to Oxidative Stress in Progressive Renal Disease

Hideyuki HORIKE

Reactive oxygen species (ROS) have been demonstrated to play a crucial role in the pathophysiology of various renal diseases. We studied the possible implication of mitochondrial

injury induced by oxidative stress in progressive forms of renal diseases. We examined mitochondrial oxidative damage and deterioration of mitochondrial function in a 5/6 nephrectomized remnant kidney model (Nx), and found generation of significant amount of ROS in the Nx glomeruli. Urinary excretion of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG), which is a product and biomarker of oxidative DNA damage, significantly increased 20 weeks after nephrectomy. Immunohistochemical studies using a monoclonal antibody against 8-OHdG revealed accumulations of 8-OHdG mainly in the cytosol of glomerular epithelial and endothelial cells. We examined the expression of the NADH dehydrogenase 2 and cytochrome b genes, which encode proteins consisting of complex I and III, respectively, and found that they were suppressed in the Nx rats. We examined the effects of mitochondrial respiratory chain inhibitors on ROS production in rat glomerular epithelial cells (GECs). Rotenone and antimycin A, which inhibit complexes I and III, respectively, increased ROS production. The direct influence of ROS on the mitochondria was also examined. On exposure to hydrogen peroxide, the GECs showed a loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). Chromatin condensation and nuclear fragmentation, which are features of apoptotic cell death, were demonstrated in the GECs.

These results indicated that oxidative injuries to the mitochondria and mtDNA play an important role in the development of progressive renal diseases. (Accepted on October 14, 2003) *Kawasaki Igakkaishi 29(3): 189-202, 2003*

**Key Words** ① **Progressive renal disease** ② **Oxidative Stress**  
③ **Mitochondria** ④ **Mitochondrial DNA**

## 緒 言

生体内では酸素の利用過程において常時活性酸素が生成されている。生体内にはこの活性酸素を消去する防御機構が具備されており、活性酸素による細胞障害を抑制している。この活性酸素産生と防御機構の破綻が生じた場合、活性酸素による様々な障害が発生する。

活性酸素は脂質、タンパク質、糖質、核酸など種々の生体構成成分を酸化的に障害し、多くの病態・疾患と関連している事が示されている<sup>1)~3)</sup>。特に核酸の活性酸素種による損傷は、DNA鎖の切断、核酸塩基の修飾、デオキシリボースの酸化などの障害を生じ、発癌、老化と関係していることが早くから示されてきた。近年、変性性神経疾患<sup>4),5)</sup>や心・血管疾患<sup>6)</sup>の病態形成にも核酸の酸化的障害が関係していることが報告されている。

核酸は活性酸素により様々な酸化的修飾を受

けるが、中でもグアニン塩基8位の炭素が水酸化されて生じた8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)の生成が核酸の酸化的障害のマーカーとして注目されている<sup>7)</sup>。癌や糖尿病において、その発症や病期の進行に8-OHdGの蓄積が報告されている<sup>1)~3),7),8)</sup>。また、老化に伴いミトコンドリアDNA (mtDNA)に8-OHdGが蓄積することも報告され、細胞老化との関連も推測されている<sup>9)</sup>。

進行性腎障害の進展は、ある時期より原因疾患の如何に関わらず共通のメカニズムで進行し、末期腎不全へ至ると考えられている。そのメカニズムの一つとして活性酸素の関与が注目されつつある<sup>10)</sup>。酸化ストレスによるミトコンドリア及びmtDNA障害が糖尿病性腎症の組織障害進行に関与することが報告されている<sup>11)</sup>。

本研究は、進行性腎障害における共通メカニズムとして活性酸素によるミトコンドリア及びmtDNAの酸化的修飾が関与することを解明することを目的とした。

## 材料と方法

### 1. 5/6腎摘ラットの作成

10週齢の雄性 Sprague-Dawley (S-D) ラット (日本クレア社, 大阪) を使用し, 進行性腎障害モデルとして5/6腎摘 (Nx) ラットを作成した. S-D ラットをネンブータル0.05 ml/100 g 腹腔内投与にて麻酔を行った. 左背側より約1 cmの縦切開を加え左腎を体外へ露出し, 腎の上極および下極をそれぞれ1/3ずつ切除し2/3腎摘を行った. さらに1週間後右腎を全摘出し5/6腎摘ラットを作成した. コントロールとして sham 手術を行った同一週齢のラットを用いた. 本実験は, 川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 99-076), 川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された.

### 2. 培養糸球体上皮細胞

ラット腎糸球体より分離 cell-line 確立した糸球体上皮細胞を山辺英彰博士 (弘前大学医学部第二内科) より供与いただき, 実験に供した. 細胞は敷石状の形態を示し, Fx1A 抗原およびサイトケラチン陽性であり糸球体上皮細胞であることを確認した. 以後の継代培養は10% FCS, カナマイシン50 mg/l 含有 RPMI-1640 (pH 7.2) を用いて, 37°C, CO<sub>2</sub> 5% の条件にて行った.

### 3. 糸球体における活性酸素発生の検出

5/6腎摘作成後2週のラットを用い糸球体内の活性酸素産生を検討した. ネンブータルによる腹腔内麻酔下で, 迅速に腎臓を摘出後, sieving 法<sup>12)</sup>にて糸球体を単離した. 得られた糸球体のうち1/3を活性酸素産生の検討に供し, 残り2/3を後述の遺伝子発現検討のため-80°Cにて凍結保存した. 活性酸素発生の検討は細胞内に取り込まれ活性酸素により酸化され緑色蛍光を発する dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA, Molecular Probes 社, Eugene, OR) を用い行った<sup>13)~15)</sup>. 単離した糸球体を終濃度1 mM の DCFH-DA 添加 RPMI-1640 培地に浮遊し37°C, 40分間反応を行った. Phosphate-

buffered saline (PBS, pH7.2) にて洗浄後, 共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-NT, Leica 社) にて観察を行い, 各糸球体の蛍光強度を測定した. コントロール群と Nx 群との比較は各群4匹のラットを用いそれぞれより単離糸球体20個あたりの平均蛍光強度にて行った.

### 4. 尿中8-OHdG 排泄量の定量

蓄尿は代謝ゲージを使用し, 5/6腎摘後2, 4, 8, 16, 20, 24週まで行った. 採尿後遠心し上清を-20°Cで保存した. 50 $\mu$ l の尿検体を用いて8-OHdG 固相化プレートを用いた競合的 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (日本老化制御研究所) により1日尿中8-OHdG 排泄量を定量した.

### 5. 免疫組織化学的検討

5/6腎摘後, 2, 4, 8週に屠殺を行った. 腹部正中切開後, 迅速に腎臓を摘出し腎皮質部を4~5 mm角に細切し, 4%パラホルムアルデヒド (4% PFA) にて浸透固定, アルコールにて脱水後パラフィン包埋を行った. 約2 $\mu$ m の切片を作成し, 脱パラフィン後, マウス抗8-OHdG モノクローナル抗体 (日本老化制御研究所) を一次抗体として用いて以下の如く酵素抗体法を行った. まず, 内因性 peroxidase を3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加 methanol で30分間非特異反応をブロックした後, 一次抗体を室温にて2時間反応させた. 次いで avidin-biotin complex 法 (Vector 社, Burlingame, USA) で反応させた後, 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えた0.02% 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride にて発色させた.

免疫染色の結果を以下の方法で定量的に評価した. 各切片の糸球体20個を対象とし, 糸球体当り陽性細胞の占める割合を0から4に点数化 (0, 0%; 1+,  $\leq$ 25%; 2+,  $\leq$ 50%; 3+,  $\leq$ 75%; 4+,  $\leq$ 100%) しコントロール群と比較した. 間質尿管における定量的評価は, 無作為に抽出した腎皮質部10視野において糸球体を除いた全面積に対する陽性面積の占める割合を画像解析ソフト (NIH image Ver. 1.62) を用い検討した.

### 6. 糸球体における酸化的 mtDNA 修飾の検討



-80℃にて凍結保存しておいた単離糸球体に STE 溶液 (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH7.4), 0.5% sodium dodecyl sulfate, 10 mg/ml Proteinase K (最終0.5 mg/ml) を加え, 37℃で12時間インキュベートした. フェノール/クロロフォルム法にて除蛋白した溶液にエタノールを加え, DNA を抽出した. さらに70%エタノールで洗浄後, TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) に溶解し, 1  $\mu$ l を分光光度計による DNA 量の測定に使用した.

8-OHdG 化以外の mtDNA への障害, すなわち点変異や欠失などを Ballinger らによる quantitative PCR (QPCR) 法にて総括的に評価した<sup>16)~17)</sup>. これは, 鋳型 DNA 上に修飾塩基や塩基欠落部位などが存在すると耐熱性 DNA polymerase による増幅活性が抑制されることを利用している. 今回我々は, ミトコンドリア DNA に BamHI site が一ヶ所だけ存在することを利用し, 核 DNA を含めた抽出全 DNA 溶液を BamHI 処理後, 0.6%アガロースゲルにて電気泳動を行った. etidium bromide による染色を行った後, densitometer を用い mtDNA 量を定量化した. この結果にもとづき PCR の鋳型となる mtDNA 量を一定量に調節し, 下記の方法で PCR を行った.

whole mtDNA を増幅するために以下の配列のプライマーを設計した<sup>18)</sup>. Forward primer: 5'-CCT CCC ATT CAT TAT CGC CGC CCT TGC -3', Reverse primer: 5'-GAT GGG GCC GGT AGG TCG ATA AAG GAG-3'. wax (AmpliWax™ PCR Gem 100, Perkin Elmer 社) を用い Hot start 法にて mtDNA の全塩基配列の増幅を行った. PCR tube の下層に各プライマー-0.2  $\mu$ M, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 各 dNTP 400  $\mu$ M を加え総量20  $\mu$ l とし, wax で下層を封入後, 上層に25 ng の鋳型 mtDNA, 2.5単位の Taq DNA polymerase (LA Taq™, TaKaRa 社), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, を加え, 総量30  $\mu$ l に調整し PCR を行った. 94℃ 1分間の

initial denaturation 後に, denaturation (94℃ 30秒間), annealing および extension (68℃ 20分間) の反応を30サイクル (PTC-100, MJ Research 社) 行い, 最終 extension (72℃ 10分間) にて反応を終了した. PCR の最終産物は0.6%アガロースゲル上で電気泳動後, etidium bromide で染色し可視化した. 得られた PCR 産物は Luminous Imager Ver. 2.0 デジタルイメージ解析ソフト (アイシンコスモス社) を用いて比較検討した.

#### 7. 糸球体における mtDNA の mRNA 発現の検討

Nx 糸球体において mtDNA がコードする mRNA の発現の変化を検討した.

-80℃にて凍結保存しておいた単離糸球体から, Acid Guanidinium Phenol Chloroform (AGPC) 法で total RNA の抽出を行った. RNA はエタノールで沈殿した後, diethylpyro carbonate (DEPC) 処理蒸留水で溶解した.

reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) 法により, mtDNA 遺伝子上に存在する2つの遺伝子, NADH dehydrogenase 2 (ND2) 及び cytochrome b (cyt b) の発現を以下のプライマーを用い検討した. ND2: Forward primer; 5'-GCC GCC TAA TCA CGA CAC TT-3', Reverse primer; 5'-GCG AGT GAG AGT GTG TTG AT-3', cyt b: Forward primer; 5'-ACT CCT TTA TCG ACC TAC CG-3', Reverse primer; 5'-TAC GAC CCC TCC TAG TTT GT-3'. cDNA の合成は, 2  $\mu$ g の total RNA を鋳型として, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, random hexamer 2.5  $\mu$ M, 各 dNTP 1mM, 7.5単位の MuLV (Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase (Perkin Elmer 社) を加え, 総量60  $\mu$ l に調整し行った. 42℃ 30分間処理後, 99℃ 5分間の加熱にて酵素の非活性化を行った. PCR 反応は0.12  $\mu$ g の cDNA, 各プライマー-0.2  $\mu$ M, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 0.5単位の Taq DNA polymerase (Ampli-Taq, Perkin Elmer 社) を加え, 総量20  $\mu$ l に調整し PCR を行った. 95℃ 2分間の initial de-



naturalization 後に, denaturation (95°C 1 分間), annealing (56°C 1 分間), extension (72°C 1 分間) の反応を33 (ND2) ないし28 (cyt b) サイクル (PTC-100, MJ Research 社) 行い, 最終 extension (72°C 7 分間) で反応を終了した. RT-PCR の最終産物は1.6%アガロースゲルにて電気泳動後, etidium bromide にて染色し, Luminous Imager Ver. 2.0 デジタルイメージ解析ソフトを用いて比較検討した.

#### 8. ミトコンドリアの活性酸素産生におよぼす呼吸鎖酵素阻害剤の影響

糸球体上皮細胞を25 cm<sup>2</sup> フラスコに1x10<sup>4</sup> cell/ml の濃度で培養し, 前述の growth medium を使用し subconfluent になるまで培養後, 細胞周期同調を行うため1% FCS 含有 RPMI-1640 培地へ変更し, 細胞周期の同調後実験に供した. ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤である rotenone 5 μM (complex I 阻害剤), thenoyltrifluoroacetone 50 μM (complex II 阻害剤, TTFA), antimycin A 10 μM (complex III 阻害剤), (以上 Sigma 社, St. Louis, Mo) をそれぞれ添加し, 3 時間培養した<sup>19)</sup>. PBS にて洗浄後, DCFH-DA 10 μM 含有 RPMI-1640 に置換し37°C, CO<sub>2</sub> 5% の条件で40分間反応を行った. PBS にて洗浄後, トリプシン2.7 ml, EDTA0.3 ml を加え細胞を剥離し, flow cytometry (Becton Dickinson 社) にて呼吸鎖酵素の阻害による活性酸素産生量の変化を検討した.

#### 9. 活性酸素によるミトコンドリア膜電位変化

糸球体上皮細胞1x10<sup>4</sup> cell/ml を8 chamber-slide で培養し, subconfluent を確認後1% FCS 含有 RPMI-1640 培地にて細胞周期同調を行った. 24 時間後, 過酸化水素200 μM を添加し, 1, 2, 3, 4 時間後のミトコンドリア膜電位変化を membrane potential-sensitive dye である JC-1 (Molecular Probes 社) を用いて検討した. 膜電位の評価は蛍光顕微鏡

(LEITZ-DMRD, Leica 社) を使用し10視野の観察を行い, 細胞質に十分な赤色の蛍光を発する細胞を膜電位維持細胞数としカウントを行い, 視野内の全細胞数に対する割合を算出した.

#### 10. 活性酸素による apoptosis の誘導

糸球体上皮細胞を上記と同様の条件で培養し, 過酸化水素200 μM を添加し, 1, 2, 3, 4 時間後の核形態変化を Hoechst 33342 (Molecular Probes 社, Eugene, OR) を用いて検討した. 蛍光顕微鏡 (LEITZ-DMRD, Leica 社) を使用し10視野の観察を行い, 核 chromatin 凝集細胞数のカウントを行い視野内の全細胞数に対する割合を算出した.

各群間の比較は Mann-Whitney U test で行った. p 値は0.05以下を有意とした.

## 結 果

### 1. Nx 糸球体における活性酸素の生成

活性酸素により緑色蛍光を発する色素 DCFH-DA と共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより, 疾患糸球体において活性酸素産生を直接可視することに初めて成功した. コントロール (Fig. 1a) に比べ, Nx 作成後2週の単離糸球体においてびまん性に増強した蛍光が観察された (Fig. 1b). 糸球体当りの平均蛍光強度の比較

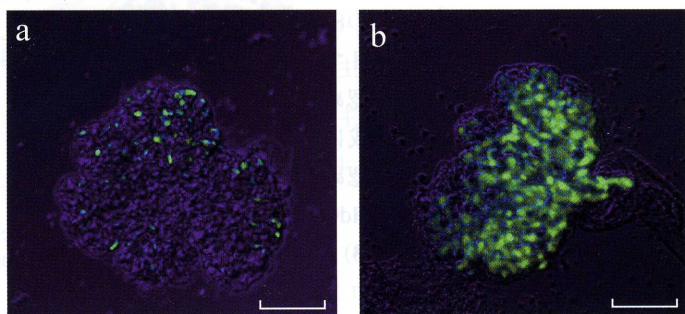
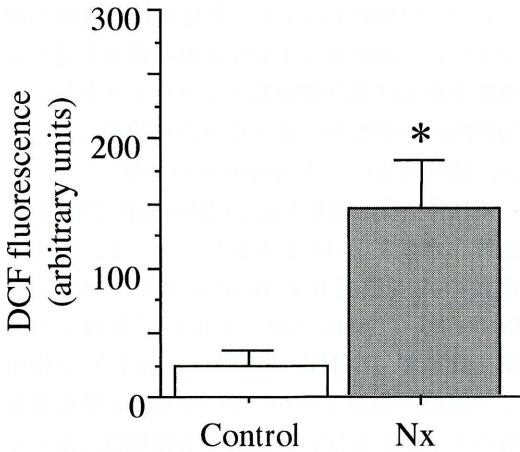


Fig. 1. ROS production in isolated glomeruli obtained from a control rat and a Nx rat at two weeks. Isolated glomeruli were cultured in RPMI-1640 medium, and DCFH-DA was added to the medium. After 40-min incubation, the glomeruli were examined at a 485nm wavelength by confocal microscopy. DCF fluorescence was observed in isolated glomeruli from the Nx rat. In control glomeruli, there were few positive cells (a), but many more DCF positive cells were seen in the glomeruli from the Nx rat (b). (bar = 25 μm).



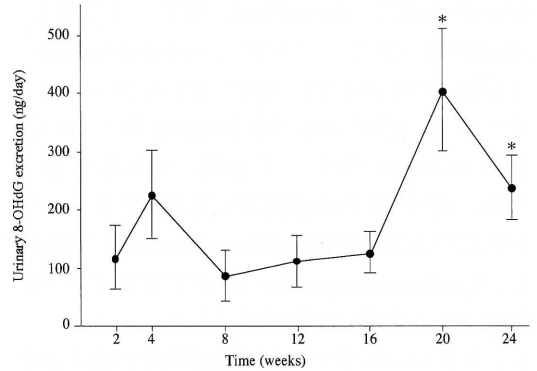
**Fig. 2.** The DCF fluorescence intensity of isolated glomeruli. The fluorescent intensity of isolated glomeruli from the Nx rat was significantly higher than that from the control rat. Values are means  $\pm$  SD (n = 10). Significance values (\* $p < 0.0005$ ) were determined vs. the control.

においてもコントロール群に比べNx群では有意に増加を認めた (Fig. 2). Nxモデルでは4週頃より組織障害が出現し始めることが知られているが, Nx作成後2週の糸球体においてすでに活性酸素の産生亢進が認められ, 組織障害に先行して活性酸素産生が亢進することが確認された.

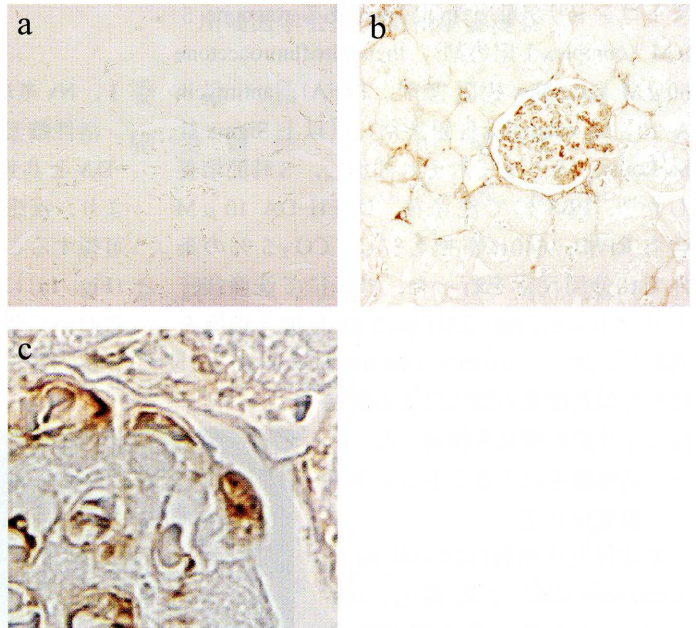
## 2. 尿中8-OHdG排泄量の測定

コントロール群2週目の8-OHdG排泄量は $325 \pm 34$  ng/日であり24週目まで有意な変化を認めなかった. Nx群は5/6腎摘作成により8-OHdG排泄量の減少を認めたが, 20週以降より尿中8-OHdG排泄量の増加を認めた (Fig. 3). これは, 5/6腎摘によるネフロン数減少により尿中8-OHdG排泄量が減少し, 腎障害の進行に伴い排泄量の増加を認めたものと考えられた.

## 3. 腎組織における8-OHdG蓄積の免疫組織化学的検討



**Fig. 3.** Urinary 8-OHdG excretion in the Nx rats. Urinary excretion of 8-OHdG was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Urinary excretion of 8-OHdG was significantly increased at 20 weeks after nephrectomy. Significance values (\* $p < 0.05$ ) were determined vs. two weeks.



**Fig. 4.** Immunohistochemical detection of 8-OHdG in the control and Nx renal tissues at eight weeks after nephrectomy. 8-OHdG positive cells were not seen in the control rat (a). In the Nx rat, 8-OHdG positive cells were observed mainly in the cytosol of glomerular epithelial and endothelial cells (c), tubular cells and the peritubular capillary (b). Original magnification  $\times 200$  (a, b),  $\times 400$  (c).

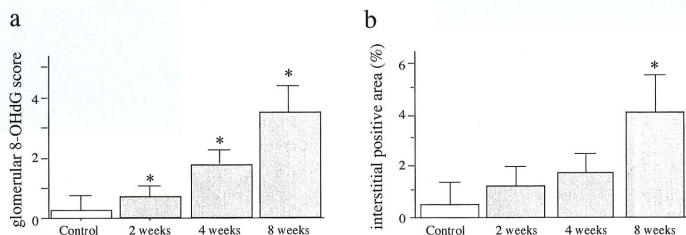
コントロール群では陽性細胞を認めなかった (Fig. 4a). Nxモデルでは糸球体内では主に上皮細胞, 内皮細胞に, 尿管間質では尿管上



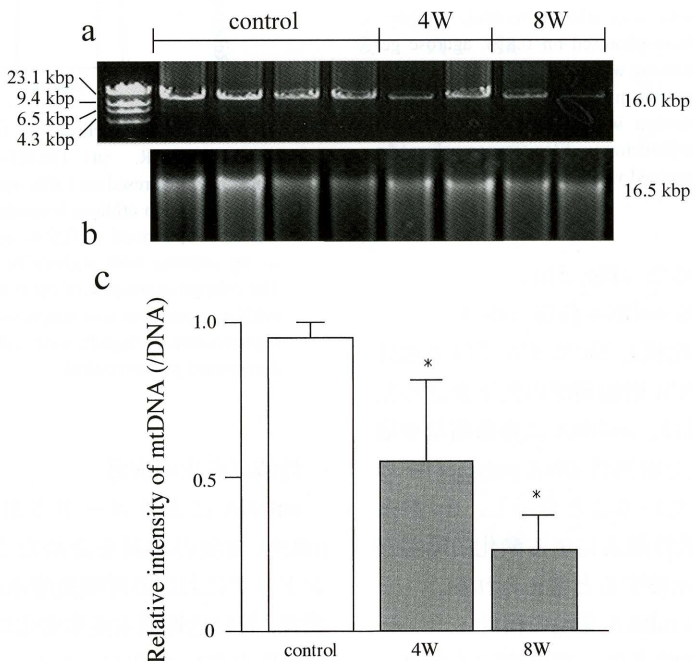
皮細胞，尿細管周囲毛細血管内皮細胞に陽性所見を認めた (Fig. 4b)。強拡大で観察すると，核の染色のみならず細胞質内により強い陽性所見を認めた (Fig. 4c)。この8-OHdGの局在から核酸の酸化障害は核DNAよりむしろミト

コンドリアDNAに多く生じると考えられる。

8-OHdGの糸球体内陽性細胞数および尿細管間質の染色面積を経時的に比較したところ，糸球体内陽性細胞数はコントロール群と比較し2週目より (Fig. 5a)，尿細管間質では8週目よ

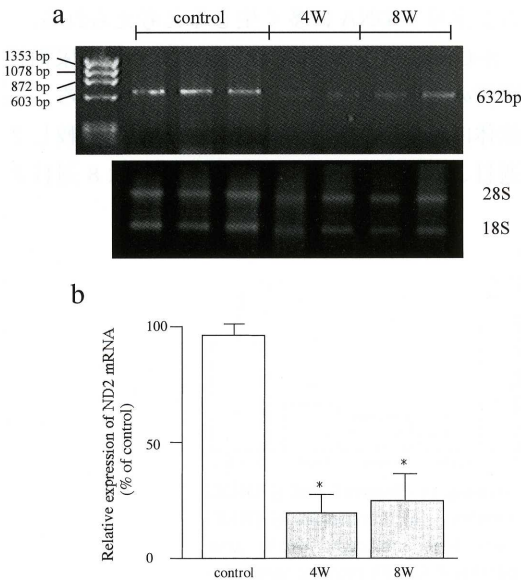


**Fig. 5.** Quantitative analysis of 8-OHdG staining in glomeruli and 8-OHdG positive areas in the interstitium and tubulus. (a) Glomerular 8-OHdG staining scores were increased at two, four and eight weeks after nephrectomy. (b) Interstitium and tubulus 8-OHdG positive areas also increased at eight weeks after nephrectomy. Significance values (\* $p < 0.05$ ) were determined vs. the control. Values are means  $\pm$  SD (n = 5).



**Fig. 6.** Oxidative mtDNA damage. (a) The PCR products of mtDNA (16.0 kb fragment) were electrophoresed on 0.6% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide. (b) To ensure quantitative conditions, DNA (including nuclear DNA and mtDNA) was electrophoresed on 0.6% agarose gel after being digested by the BamH1 restriction enzyme. The digested DNA was visualized by staining with etidium bromide. (c) Relative intensity analysis of the PCR products of mtDNA is shown. The amounts of PCR products from mtDNA declined at four and eight weeks after nephrectomy.





**Fig. 7.** Analysis of NADH dehydrogenase 2 (ND2) mRNA expression by RT-PCR. (a) RT-PCR products of ND2 were electrophoresed on 1.6% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide (upper). Total RNA was electrophoresed on 0.8% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide (lower). (b) The relative expression of ND2 mRNA is shown. ND2 mRNA expression was suppressed at four and eight weeks after nephrectomy. Significance values (\* $p < 0.05$ ) were determined vs. the control.

り有意な増加を認めた (Fig. 5b).

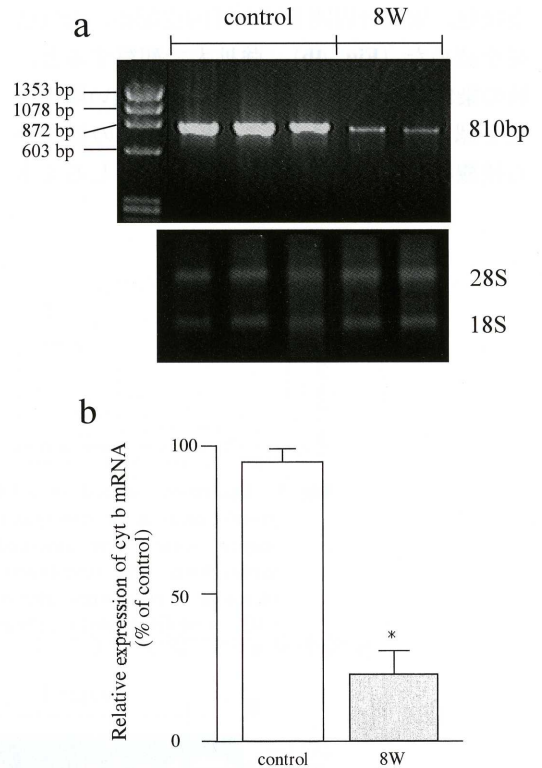
#### 4. QPCR 法による mtDNA 修飾の検討

コントロールと比較し Nx モデルでは 4 週目より, mtDNA の PCR 増幅効率の低下を認めた (Fig. 6). この結果は, mtDNA に修飾塩基や塩基欠落部位が存在し耐熱性 DNA polymerase の増幅活性を抑制していることを示し, Nx 群糸球体に mtDNA に活性酸素による酸化的障害が生じていることを示唆すると考えられる.

#### 5. mtDNA 由来の mRNA 発現の検討

mtDNA は呼吸鎖酵素の一部の遺伝子をコードしている. Nx モデル 8 週の糸球体において, mtDNA によりコードされる呼吸鎖 complex I 構成分子である ND2 (Fig. 7a,b) および complex III 構成分子である cyt b (Fig. 8a,b) の遺伝子発現が低下していた.

#### 6. ミトコンドリア呼吸鎖酵素阻害剤による活



**Fig. 8.** Analysis of cytochrome b (cyt b) mRNA expression by RT-PCR. (a) The RT-PCR products of cyt b were electrophoresed on 1.6% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide (upper). Total RNA was electrophoresed on 0.8% agarose gel and visualized by staining with etidium bromide (lower). (b) The relative expression of cyt b mRNA is shown. Cyt b mRNA expression was suppressed at eight weeks after nephrectomy. Significance values (\* $p < 0.05$ ) were determined vs. the control.

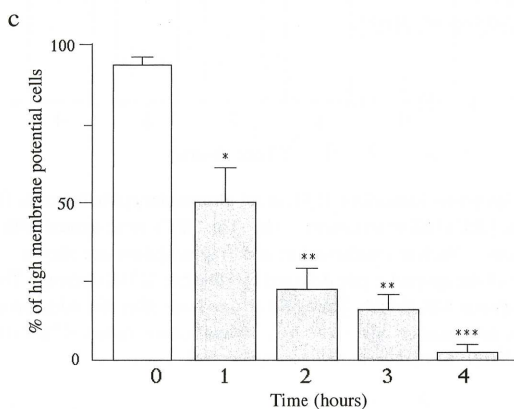
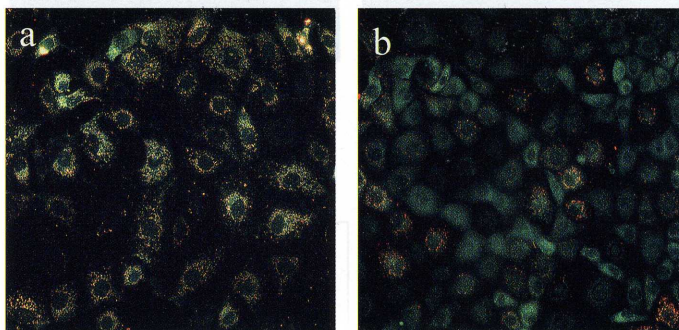
#### 性酸素産生の検討

mtDNA によりコードされる呼吸鎖酵素の mRNA 発現の抑制を認めたことから, ミトコンドリアにおける呼吸鎖酵素の機能抑制による変化, 特に活性酸素産生変化について検討した. DCFH を用いた flow cytometry による解析により, rotenone, antimycin A 添加細胞で, コントロールと比較し平均蛍光強度の有意な増加を認め, 活性酸素の産生亢進が示された (Table 1). これはミトコンドリア呼吸鎖の異常により活性酸素のさらなる増加が生じることを示していると考えられる.

Table 1

	DCF fluorescence (% of control)
Control	100 ± 6.2
Rotenone (5μM)	145 ± 41.3*
TTFA (50μM)	118 ± 26.8
Antimycin A (10μM)	197 ± 57.4*

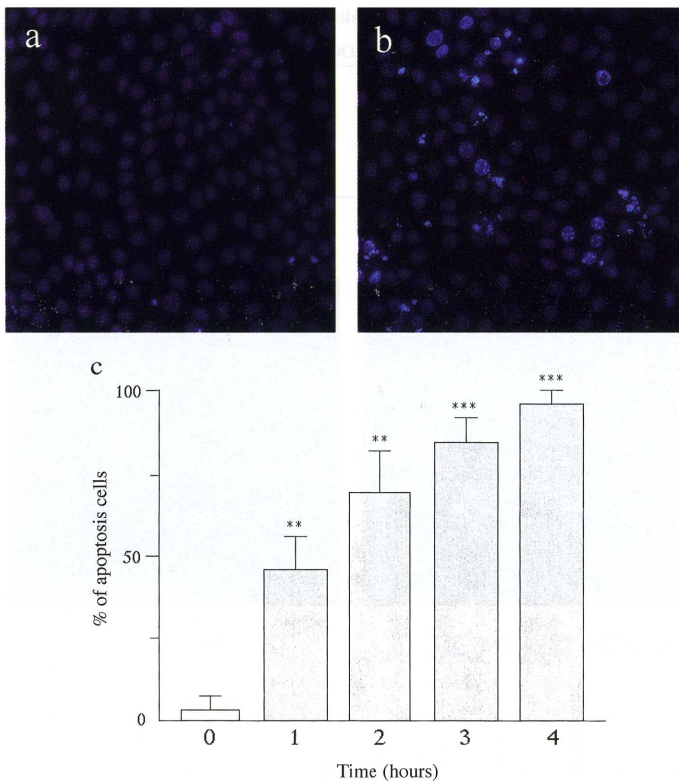
(\* p < 0.05)



**Fig. 9.** Changes in mitochondrial membrane potential induced by  $H_2O_2$  in rat glomerular epithelial cells (GECs). At high membrane potential, JC-1 accumulates sufficiently to aggregate, resulting in large red (590-nm) shifts. At lower potentials, the dye exists as a green fluorescent (530-nm) monomer. (a) GECs before treatment were presented. (b) GECs were treated with  $H_2O_2$  for one hour. Note the loss of yellow-orange mitochondrial staining. Original magnification  $\times 200$  (a, b). (c) Time course of alteration of mitochondrial membrane potential in GECs. The mitochondrial membrane potential had already significantly decreased at one hour after the addition of  $H_2O_2$ . Values are means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Significance values (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.0005$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ) were determined vs. the control.

7. 活性酸素によるミトコンドリア膜電位変化 apoptosis の誘導過程にミトコンドリア膜電位の低下が関与する。正常糸球体上皮細胞においては膜電位指示薬である JC-1 がミトコンド

リアに取り込まれ、赤橙色の蛍光を発しているのが観察され、膜電位が維持されていることが示された (Fig. 9a)。一方、過酸化水素  $200 \mu M$  添加した糸球体上皮細胞では蛍光色素のミトコ



**Fig. 10.** Apoptosis induced by  $H_2O_2$  in rat glomerular epithelial cells (GECs). (a) The GECs before treatment. (b) The GECs were treated with  $H_2O_2$  for one hour. Nuclear condensation and fragmentation are shown. (c) The course of the apoptotic rate detected by Hoechst 33342 staining. The amount of apoptosis had already increased at one hour after the addition of  $H_2O_2$ . Values are means  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Significance values (\* $p < 0.0005$ , \*\* $p < 0.0001$ ) were determined vs. the control.

ンドリアへの取り込みが低下し、細胞質内に diffuse な緑色蛍光を発し、活性酸素による膜電位の低下が示された (Fig. 9b). また、膜電位が維持されていた細胞数は、過酸化水素添加により経時的な減少が認められた (Fig. 9c). このことから活性酸素はミトコンドリアに作用し膜電位の低下を誘導することが示された。

#### 8. 活性酸素による apoptosis の誘導

過酸化水素  $200 \mu M$  を添加し、核の形態変化を観察した. コントロール (Fig. 10a) と比較し過酸化水素を添加した細胞は、核 chromatin の凝集、細胞質の縮小した apoptosis 像が多く観察された (Fig. 10b). この apoptosis 細胞数は、過酸化水素添加後、経時的に増加が認めら

れ、酸化ストレスが糸球体上皮細胞にアポトーシスを誘導することが示された (Fig. 10c).

#### 考 察

活性酸素はシグナル伝達の mediator として、あるいは転写因子の機能制御などを通して細胞の生理機能の遂行に重要な役割を果たしている。しかしながら、防御機能を凌駕する過剰な活性酸素産生は組織障害因子として病態形成に関与する。進行性腎障害において活性酸素が病態形成に関与することが従来より示唆されていたが、腎組織内での活性酸素産生を直接可視化することは不可能であった。今回、進行性腎障害モデ



ルである Nx ラットの糸球体内において活性酸素産生が亢進していることを直接検出することに初めて成功した。

活性酸素の産生経路としては NAD (P) H oxidase, ミトコンドリア呼吸鎖, xanthine/xanthine oxidase の系が知られている。近年, 心血管領域では血管平滑筋細胞や内皮細胞などで NAD (P) H oxidase の活性化による活性酸素産生が確認され, 血管内皮機能の低下や心血管イベントの発症・進展に関与することが明らかとなっている<sup>20), 21)</sup>。また, eNOS が活性酸素産生に関与することも報告されている<sup>22)</sup>。糖尿病性腎症や高血圧モデルにおいては, NAD (P) H oxidase の構成 component の発現増強が示され, その機序としてレニン-アンジオテンシン系の亢進が関与することが推測されている<sup>23)~25)</sup>。

ミトコンドリアは細胞の呼吸やエネルギー産生を行う細胞内小器官であり, 生理的状态では内膜に存在する 5 つの complex からなる呼吸鎖によって ATP 産生が行われている。ミトコンドリアには約 16.5 Kb の環状 DNA が存在し, ミトコンドリア呼吸鎖酵素の一部とその翻訳にあずかる rRNA をコードしている。

mtDNA は核 DNA よりも酸化的障害を受けやすいことが知られている。ミトコンドリアでは呼吸鎖での電子伝達による酸化的リン酸化の過程で, 絶えず数%のスーパーオキシド( $O_2^-$ )が生成されており, それ自身が活性酸素の産生源となっていることや<sup>26)~28)</sup>, mtDNA がイントロンを持たないこと, ヒストン等の保護蛋白を欠くこと, DNA 修復酵素が核に比べ不十分であることなどから, 核 DNA に比べ酸化的修飾を受けやすい<sup>29)</sup>。

酸化的核酸障害を修復する酵素群が存在するが, 8-OHdG に対してもこれを除去修復する酵素である human 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 (hOGG-1) が知られている<sup>30), 31)</sup>。我々はこの hOGG-1 がミトコンドリア移行シグナルを持ち, 酵素活性の異なる遺伝子多型が存在することに着目し, IgA 腎症の腎予後と hOGG-1 遺伝子型との関連について報告している<sup>32)</sup>。酵素活

性の低い遺伝子型で腎機能低下速度が早く尿蛋白量も多く認め, 核酸の酸化的障害に対する修復能の違いが腎予後に関係することを見いだした。この結果からも腎症進展に活性酸素による核酸障害特に mtDNA の障害が関与すると考えている。

酸化ストレスによる mtDNA 障害は, mtDNA がコードする遺伝子発現に異常を惹起し, さらに mRNA 発現変化をもたらすことが推測される。Ballinger により開発された mtDNA を鋳型とした quantitative PCR を利用することにより, Nx ラット糸球体において mtDNA の障害が存在する事が示された。また, mtDNA がコードしている呼吸鎖 complex I, III の構成分子である, ND2 および cyt b の mRNA 発現は, Nx ラット糸球体においてその発現が低下していた。

mtDNA の発現異常は呼吸鎖機能の異常を惹起することが推測される。呼吸鎖を阻害することにより, ミトコンドリアでの活性酸素生成が亢進することを確認した。以上の結果から, 活性酸素により生じる mtDNA の酸化的障害と mtDNA 遺伝子発現異常に基づき, 呼吸鎖機能が低下し, ミトコンドリアにおける活性酸素生成がさらに増加するという, vicious cycle が形成されることが予測される。

ミトコンドリアの膜間腔にはプロトンイオンの汲み上げにより形成される膜電位が存在する。近年, apoptosis の誘導過程において, ミトコンドリア膜電位が低下することが示されている<sup>33), 34)</sup>。ミトコンドリア膜電位が低下すると膜に存在する permeability transition (PT) pore が開大し, ミトコンドリア膜間腔からチトクローム C が細胞質に放出され, caspase の系を介した apoptosis の経路が活性化し細胞死が実行される<sup>35)~38)</sup>。培養糸球体上皮細胞では過酸化水素によりミトコンドリア膜電位の低下と apoptosis が誘導されることを認めた。このことは糸球体内での酸化ストレスの亢進により, 糸球体上皮細胞のミトコンドリア膜電位低下を介して apoptosis による細胞死が惹起されることを示している。我々は, 糸球体硬化の進展過程に糸

球体構成細胞の apoptosis による持続的な細胞死が関与していることを明らかにしており<sup>39)~44)</sup> ミトコンドリアの酸化的障害による apoptosis 誘導が、腎障害進展メカニズムの一翼を担っている可能性が示唆された。

本研究は、進行性腎障害の進展に活性酸素産生亢進と mtDNA の酸化的障害の関与を推測するものであり、腎症進展の共通メカニズムに新たな洞察を与え、今後の治療戦略を構築する上でも示唆に富むものであると考える。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、直接の御指導、御検閲を賜りました川崎医科大学内科学(腎)教室 柏原直樹教授に深甚なる謝意を表わすとともに、実験について御助言、御協力いただいた同 佐々木環助教授ならびに同教室員の皆様方に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第33回アメリカ腎臓学会(2000年, トロント)において発表した。

本研究の一部は文部省科学研究費(No. 11671062)の援助で行った。

## 文 献

- 1) Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T : Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1 : its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 76 : 365-374, 1997
- 2) Fung H, Kow YW, Van Houten B, Mossman BT : Patterns of 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* 18 : 825-832, 1997
- 3) Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T : Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347 : 444-445, 1996
- 4) Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C : Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 : 2642-2647, 1997
- 5) Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC : Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 : 7531-7536, 1997
- 6) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW : Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 74 : 1141-1148, 1994
- 7) Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Alho H : New biomarker Evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 417 : 150-152, 1997
- 8) Hinokio Y, Suzuki S, Hirai M, Chiba M, Hirai A, Toyota T : Oxidative DNA damage in diabetes mellitus : its association with diabetic complications. *Diabetologia* 42 : 995-998, 1999
- 9) Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T : Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 189 : 979-985, 1992
- 10) Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z : Reactive oxygen species induce apoptosis in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 7 : 2357-2363, 1996
- 11) 八田秀一 : 糖尿病性腎症進展過程におけるミトコンドリア酸化ストレス関与の意義. *川崎医学会誌* 27 : 67-82, 2000
- 12) Kreisberg JJ, Hoover RL, Karnovsky MJ : Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vivo.

Kidney Int 14 : 21–30, 1978

- 13) Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ : Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75 : 241–251, 1993
- 14) Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G : Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272 : 21388–21395, 1997
- 15) Aoyagi K, Akiyama K, Tomida C, Gotoh M, Hirayama A, Takemura K, Ueda A, Nagase S, Koyama A, Narita M : Imaging of hydroperoxides in a rat glomerulus stimulated by puromycin aminonucleoside. *Kidney Int Suppl* 71 : S153–155, 1999
- 16) Ballinger SW, Van Houten B, Jin GF, Conklin CA, Godley BF : Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells. *Exp Eye Res* 68 : 765–772, 1999
- 17) Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS : Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 86 : 960–966, 2000
- 18) Konstantinov AA, Peskin AV, Popova EYu, Khomutov GB, Ruuge EK : Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 894 : 1–10, 1987
- 19) Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G : Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272 : 21388–21395, 1997
- 20) Cai H, Harrison DG : Endothelial dysfunction in cardiovascular disease : the role of oxidant stress. *Circ Res* : 840–844, 2000
- 21) Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Diez J : Vascular oxidant stress : molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 56 : 57–64, 2000
- 22) Katusic ZS : Vascular endothelial dysfunction : does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 : H981–986, 2001
- 23) Onozato L, Toji A, Goto A, Fujita T, Christopher S Wilcox : Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy : Effect of ACEI and ARB. *Kidney International* 61 : 186–194, 2002
- 24) Zalba G, San Jose G, Beaumont J, Fortuno A, Diez J : Polymorphisms and promoter overactivity of the p22phox gene in vascular smooth muscle cells from SHR. *Circ Res* 88 : 217–222, 2001
- 25) Tinatin C, Tojo A, Onozato L, Chagria Kitiyakara, Christopher S Wilcox : Expression and Cellular Localization of Classic NADPH Oxidase Subunits in the Spontaneously Hypertensive Rat Kidney. *Hypertension* 39 : 269–274, 2002
- 26) Turrens JF, Boveris A : Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191 : 421–427, 1980
- 27) Wei Y, Scholes CP, King TE : Ubisemiquinone radicals from the cytochrome bcl complex of the mitochondrial electron transport chain—demonstration of QP-Sradical formation. *Biochem Biophys Res Commun* 99 : 1411–1419, 1981
- 28) Konstantinov AA, Peskin AV, Popova EYu, Khomutov GB, Ruuge EK : Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 894 : 1–10, 1987
- 29) Beckman KB, Ames BN : Detection and quantification of oxidative adducts of mitochondrial DNA. *Methods in Enzymology* 264 : 442–453, 1996
- 30) Aburatani H, et al : Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase. a functional mutM homologue. *Cancer Res* 57 : 2151–2156, 1997
- 31) Arai K, et al : Cloning of human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 14 : 2857–2861, 1997
- 32) 堀家英之, 福島達夫, 佐々木環, 藤本壮八, 八田秀一, 佐藤 稔, 浪越為八, 進藤彰久, 荒川さやか, 横野博史, 柏原直樹 : hOGG1遺伝子多型 Cys (C) 326 Ser (S) と IgA 腎症進展との関連. *腎とフリーラジカル* 6 : 182–187, 2002



- 33) Ehlers RA, Hernandez A, Bloemendal LS, Ethridge RT, Farrow B, Evers BM : Mitochondrial DNA damage and altered membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) in pancreatic acinar cells induced by reactive oxygen species. *Surgery* 126 : 148-155, 1999
- 34) Narita M, Shimizu S, Ito T : Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 14681-14686, 1998
- 35) 柏原直樹 : アポトーシス - 進行性腎障害における意義 - 医学のあゆみ 193 : 26-31, 2000
- 36) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N : Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397 : 441-446, 1999
- 37) Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G : Cell Death Differ 6 : Apoptosis inducing factor (AIF) : a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* : 516-524, 1999
- 38) Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y : Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399 : 483-487, 1999
- 39) Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z : Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49 : 103-111, 1996
- 40) Kashihara N, Sugiyama H, Makino H : Mechanisms for induction of apoptosis and glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* 14 : 52-54, 1999
- 41) Kashihara N, Sugiyama H, Makino H : Apoptosis and Scarring. *Clin Exp Nephrol* 2 : 302-306, 1998
- 42) Sugiyama H, Kashihara N, Maeshima Y, Okamoto K, Kanao K, Sekikawa T, Makino H : Regulation of survival and death of mesangial cells by extracellular matrix. *Kidney Int* 54 : 1188-1196, 1998
- 43) 柏原直樹, 杉山 齊, 槇野博史 : 間質線維化機序 - Apoptosis. 腎と透析45 : 1107-1110, 1998
- 44) 柏原直樹 : メサンギウム病変は糸球体硬化に至るか? Apoptosis. 腎と透析47 : 263-268, 1999