

## 急性腎不全の発症における シグナル伝達分子および疾患関連タンパク質の解析

幸田 祐佳

### Signal Transmission Molecules and ARF-related Protein in the Development of Acute Renal Failure (ARF)

Yuka KOHDA

*Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan*

(Received November 24, 2006)

Zinc, a trace element in the body, has been reported to cause neuronal cell death. Some zinc compounds are used as supplementary food but the molecular mechanism of zinc toxicity on renal tissue remains unknown. So, I investigated to determine whether free radicals and ERK1/2 activation were involved in renal cell injury induced by zinc. Zinc at the concentration of 30  $\mu\text{M}$  significantly increased LDH leakage, as an index of cell injury, from the cells 24 hr after its exposure. An antioxidant DPPD caused recovery from such an injury, suggesting the development of free radical-induced injury by zinc. Zinc exposure induced translocation of a p67<sup>phox</sup> subunit of NADPH oxidase from the cytosol to the microsomes. DPI, a NADPH oxidase inhibitor, blocked zinc-induced cell injury. The treatment of the cells with U0126, an ERK inhibitor, remarkably ameliorated the cell injury and ERK1/2 activation by zinc. Such an ERK1/2 activation was inhibited by DPPD. These results suggest that zinc generates free radicals via NADPH oxidase to cause ERK1/2 activation which results in an injury of LLC-PK<sub>1</sub> cells.

**Key words**—zinc injury; nephrotoxicity; oxidative stress; NADPH oxidase; ERK activation

## 1. はじめに

本稿では、大阪薬科大学同窓会研究助成による課題「急性腎不全の発症におけるシグナル伝達分子および疾患関連タンパク質の解析」の基盤となる論文<sup>1,2)</sup>の内容を中心に研究課題の方向性を紹介します。

## 2. 目的

腎臓は金属による影響を受けやすく、水銀やカドミウムによる腎毒性にはフリーラジカルが関与

すると考えられている。<sup>3,4)</sup> 亜鉛は重要な生体微量元素の一つであり、多くの細胞機能に必要とされている。しかし、一方で、脳神経において過剰な亜鉛が細胞障害を引き起こすことが報告されている。<sup>5)</sup> 最近、亜鉛はマグネシウムおよび銅と共に、栄養機能食品に追加され、サプリメントとして使用されるようになったが、亜鉛の腎障害についてはよく知られていない。

そこで、亜鉛の腎細胞に対する障害性を調べ、その障害へのフリーラジカルの関与について検討した。亜鉛によるフリーラジカル性の脳神経細胞障害

において、NADPH オキシダーゼが関与することが報告されている。<sup>6)</sup> そこで、腎上皮細胞にも存在すると考えられている NADPH オキシダーゼの亜鉛によるフリーラジカル産生機構への関与についても検討を行った。私はこれまでにセファロリジンによるフリーラジカル性腎細胞障害において、細胞内シグナル伝達経路の一つである extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) が関与することを報告している。<sup>7)</sup> さらに脳神経細胞において、亜鉛によるフリーラジカル産生を介した ERK1/2 の活性化が細胞障害に関与することが報告されていることから、<sup>8)</sup> 亜鉛による腎細胞障害への ERK1/2 の関与についても検討した。

### 3. 方法

ブタ腎由来培養腎上皮細胞株 LLC-PK<sub>1</sub> は、5% fetal bovine serum (FBS) を含む D-MEM/F-12 を用いて、37°C、95% Air - 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 4 日間培養した。LLC-PK<sub>1</sub> がコンフルエンスに達した後、無血清培地に交換し、その 2 時間後に塩化亜鉛 (30 μM) を添加し、抗酸化剤 N, N'-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD)、NADPH オキシダーゼ阻害薬 DPI および ERK 阻害薬 U0126 は培地交換時に添加した。塩化亜鉛存在下において一定時間

培養後、細胞障害の指標として、細胞から培地中への乳酸脱水素酵素 (LDH) 遊離率を測定した。塩化亜鉛を曝露後、細胞内画分を調製し、サイトゾル画分およびミクロソーム画分における NADPH オキシダーゼの p67<sup>phox</sup> サブユニットの発現、および核画分におけるリン酸化 ERK1/2 量をウエスタンブロット法により測定した。

### 4. 結果

LLC-PK<sub>1</sub> において、亜鉛 (30 μM) は曝露 24 時間で有意な細胞障害を引き起こした。この亜鉛による細胞障害は、抗酸化剤 DPPD により顕著に抑制された (表 1)。亜鉛による細胞障害は、NADPH オキシダーゼ阻害薬である DPI と ERK 阻害薬である U0126 によっても有意に抑制された (表 2)。

LLC-PK<sub>1</sub> において、亜鉛を添加 3 時間後のサイトゾル画分において、p67<sup>phox</sup> の減少が引き起こされ、ミクロソーム画分において、顕著に p67<sup>phox</sup> の増大がみられた (図 1)。亜鉛は曝露 24 時間で、核画分におけるリン酸化 ERK1/2 量を増大させ、DPPD はこの増大を抑制した (図 2)。

表 1 亜鉛添加 24 時間後における乳酸脱水素酵素 (LDH) 遊離率の増大と抗酸化剤 DPPD の影響

	乳酸脱水素酵素 (LDH) 遊離率 (%)
対照群	2.51 ± 0.06
塩化亜鉛 (30 μM)	12.52 ± 0.48*
塩化亜鉛 + 抗酸化剤	3.01 ± 0.10 <sup>#</sup>
抗酸化剤 DPPD (1 μM)	2.48 ± 0.10

\* p<0.01 vs. 対照群

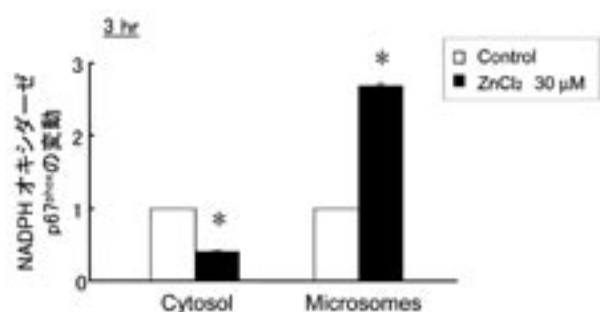
<sup>#</sup> p<0.01 vs. 塩化亜鉛 (30 μM)

表 2 亜鉛添加 24 時間後における乳酸脱水素酵素遊離率の上昇に対する NADPH オキシダーゼ阻害薬および ERK 阻害薬の効果

	乳酸脱水素酵素遊離率 (%)
対照群	1.32 ± 0.11
塩化亜鉛 (30 μM)	11.13 ± 0.97*
塩化亜鉛 + NADPH オキシダーゼ阻害薬	3.86 ± 0.25 <sup>#</sup>
塩化亜鉛 + ERK 阻害薬	2.13 ± 0.08 <sup>#</sup>
NADPH オキシダーゼ阻害薬 DPI (1 μM)	2.57 ± 0.14
ERK 阻害薬 U0126 (10 μM)	1.48 ± 0.67

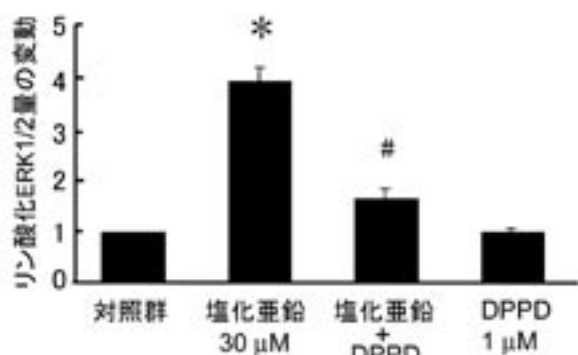
\* p<0.01 vs. 対照群

<sup>#</sup> p<0.01 vs. 塩化亜鉛 (30 μM)



\*p<0.01 vs. respective control

図1 亜鉛添加3時間後のサイトゾル画分およびミクロソーム画分におけるNADPHオキシダーゼ p67<sup>phox</sup>の変動



\*p<0.01 vs. 対照群

#p<0.01 vs. 塩化亜鉛 (30 μM)

図2 亜鉛添加24時間後の核画分におけるリン酸化ERK1/2量の増大と抗酸化剤DPPDの影響

## 5. 考察

亜鉛は生体内で核酸やタンパクの代謝に関与し、生体に必要な働きを有することはよく知られており、亜鉛欠乏による細胞機能障害については多くの報告がある。<sup>9)</sup> 脳神経細胞において、過剰な亜鉛による細胞障害にフリーラジカルの産生増大が関与すると考えられている。<sup>10)</sup> 今回、腎上皮細胞において亜鉛は、正常な血漿中亜鉛濃度の約2倍の濃度である30 μMにおいて、細胞障害を引

き起こした。亜鉛による細胞障害に先立って極めて早期に、NADPHオキシダーゼの構成成分としてサイトゾルに存在するp67<sup>phox</sup>が細胞膜へ移行して、NADPHオキシダーゼが活性化されていることが示唆されることから、NADPHオキシダーゼを介したフリーラジカルの産生が亜鉛による細胞障害に関与することが考えられる。また、亜鉛によるERKの活性化が抗酸化剤により抑制されたことから、亜鉛によるフリーラジカル産生がERKを活性化する可能性が示唆される。MAPキナーゼであるERKの活性化は、細胞における生存シグナルに関わるとの報告もあるが、ERK阻害薬が亜鉛による細胞障害を軽減したことから、亜鉛によるERK活性化は細胞障害に重要な役割を果たしていると考えられる。亜鉛によるERK活性化と細胞障害との関連、特に転写因子(DNA結合分子)およびそれにより誘導される炎症性タンパク質の解析、については現在、大阪薬科大学同窓会研究助成金の支援により、詳細に検討中である。<sup>11,12)</sup>

**謝辞** このたびは、大阪薬科大学同窓会研究助成金のご援助をいただき、心よりお礼申し上げます。稿を終えるにあたり、種々の実験にご協力いただいた松永佳子修士および玉井佐知子修士に感謝致します。

## REFERENCES

- 1) Matsunaga Y., Kawai Y., Kohda Y., Gemba M., *J. Toxicol. Sci.*, **30**(2), 135-144 (2005).
- 2) Matsunaga Y., Kohda Y., Gemba M., *Jin to Furirajikaru*, Vol. 7, 41-44 (2004).
- 3) Goering P.L., Morgan D.L., Ali S.F., *J Appl Toxicol.*, **22**(3), 167-172 (2002).
- 4) Thevenod F., *Nephron Physiol.* **93**(4), 87-93 (2003).
- 5) Ryu J.R., Shin C.Y., Choi J.W., Min H.W., Ryu J.H., Choi C.R., Ko K.H., *Exp. Brain Res.*, **143**, 257-263 (2002).

- 6) Noh K.M., Kim Y.H., Koh J.Y., *J. Neurochem.* **72**, 1609-1616 (1999).
- 7) Kohda Y, Hiramatsu J, Gemba M., *Toxicology Letters*, **143**, 185-194 (2003).
- 8) Seo S.R., Chong S.A., Lee S.I., Sung J.Y., Ahn Y.S., Chung K.C., Seo J.T., *J. Neurochem.* **78**, 600-610 (2001).
- 9) Nodera M., Yanagisawa H., Wada O., *Life Science*, **69**, 1639-1649 (2001).
- 10) Derkinderen P., Enslin H., Girault J.A., *Neuroreport*, **10(5)**, R24-34 (1999).
- 11) Kohda Y., Tamai S., Kawai Y., Gemba M., *Jin to Furirajikaru*, Vol. 8, 70-72 (2006).
- 12) Kohda Y, Matsunaga Y, Shiota R, Satoh T, Kishi Y, Kawai Y, Gemba M., *J. Toxicol. Sci.* **31(3)**, 207-217 (2006).