

—Reviews—

虚血性急性腎不全における性差発現に関する研究

高山 淳二^{*,a}, 高岡 昌徳^c, 松村 靖夫^b

Studies on the Sex Difference in Ischemic Renal Failure

Junji TAKAYAMA^a, Masanori TAKAOKA^c, and Yasuo MATSUMURA^b^aTranslational Research, Ltd., 2438, Miyanoura, Kagoshima 891-1394, Japan^{b,c}Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received September 26, 2008; Accepted November 10, 2008)

It is known that female rats are more resistant than male rats to ischemic acute renal failure (ARF). To elucidate the meaning of this sex difference in ischemic ARF, we first searched for proteins, using the proteomic technique, which show sex difference by a change of expression after ischemia/reperfusion in rat kidneys. Ischemic ARF was induced by 45-min ischemia followed by reperfusion. Increased or decreased protein spots were detected in the post-ischemic kidney, by means of two-dimensional gel electrophoresis, 2 h after reperfusion, and at this point there were no significant alterations in the renal function parameters of both sexes. The quantitative change in the detected proteins tended to be much greater in males than in females. Several significant ($P < 0.01$) up- or down-regulated (more than 1.5-fold) proteins, in males only, were identified, respectively, as ezrin, glucose-regulated protein 78, heat shock protein 70 and protein disulfide isomerase A3 precursor, are which are known that the expression or post-translational modification is regulated by intracellular ATP content. In addition, F_1F_o -ATPase β subunit and meprin α subunit were identified in significant up-regulated protein spots in males, but not in females. We next examined whether an F_1F_o -ATPase inhibitor oligomycin and a meprin inhibitor actinonin would overcome the ischemia/reperfusion-induced renal injury in male and female rats. At 24 h after reperfusion, renal function and histology of both males and females showed significant deterioration, although the degree of both renal dysfunction and histological damage was much more severe in males than in females. Pre-ischemic treatment with oligomycin (0.5 mg/kg, i.v.) or actinonin (10, 30 mg/kg, i.v.) attenuated the ischemia/reperfusion-induced renal injury in male rats, but failed to improve the renal injury in female rats. In contrast, female rats, as well as male rats, were protected against ischemia/reperfusion-induced renal injury when verapamil (1 mg/kg, i.v.) was administered. These results indicate that the renoprotective effect of oligomycin and actinonin is male-specific, thereby suggesting that F_1F_o -ATPase and meprin are involved in the sex difference in terms of exacerbation of ischemic renal injury in male rats. The possibility that F_1F_o -ATPase and meprin are key factors in the sex difference in the pathogenesis of ischemic ARF warrants further attention.

Key words—acute renal failure; sex difference; proteomic analysis; meprin; F_1F_o -ATPase

^{*}, ^a トランスレーショナル リサーチ株式会社, 〒 891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438, e-mail: takayama-junji@snbl.co.jp

^b 大阪薬科大学 病態分子薬理学研究室

^c 大阪薬科大学 生体機能解析学研究室

本論考は、高山淳二の博士論文をもとに再構成したものである。

虚血性急性腎不全は、出血や体液の喪失、ショックによる循環不全あるいは腎移植手術時にしばしば認められる。好氣的代謝を営む組織の機能は、間断的な血流が運ぶ酸素と栄養素により支えられているが、虚血状態ではミトコンドリアの酸化的リン酸化による ATP 産生が低下することから、腎臓においては、老廃物の排泄、体液電解質のバランスおよびホルモンの分泌などが機能不全に陥る。¹⁾

最近の疫学調査では、急性腎不全による死亡率は女性より男性で 2 倍以上高いことが示されており、²⁾ 性別は急性腎不全による死亡率の独立した予測因子の一つであることが見い出されている。また、虚血性急性腎不全モデル動物でみられる腎障害は雌より雄で極めて重篤であり、³⁾ 本病態の発症に雌雄差のあることが知られている。しかしながら、本病態における性差発現のメカニズムには未だ不明な点が残されている。

近年飛躍的に進歩したプロテオーム解析技術は、種々の病態で特異的に発現変動するタンパク質を同定し、医薬品開発のターゲットを迅速に発見することを可能にする。すなわち、本解析技術は、多く

の細胞生物学的現象や各種疾患動物モデルにおいて、タンパク質の発現変動を体系的かつ網羅的に解析することができるため、それぞれの疾患とその治療に関連した因子を絞り込み、それらを標的とする医薬品の探索ができるものと期待されている。⁴⁾

本研究では、虚血性急性腎不全で認められる性差発現において、腎臓で発現するタンパク質の雌雄差を網羅的に解析し、さらに、この解析結果に基づいた薬理学的アプローチにより、本病態の性差発現とその原因候補タンパク質との関連性について検討を行った。

1. 虚血性急性腎不全の性差発現に關与するタンパク質の解析

実験動物として、8 週齢の雄性および雌性 Sprague-Dawley 系ラットを用いた。右腎摘除 2 週間後に左腎を 45 分間虚血状態にし、その後再灌流処置を施すことにより、虚血性急性腎不全モデルを作製した。Figure 1 に示すように、血中尿

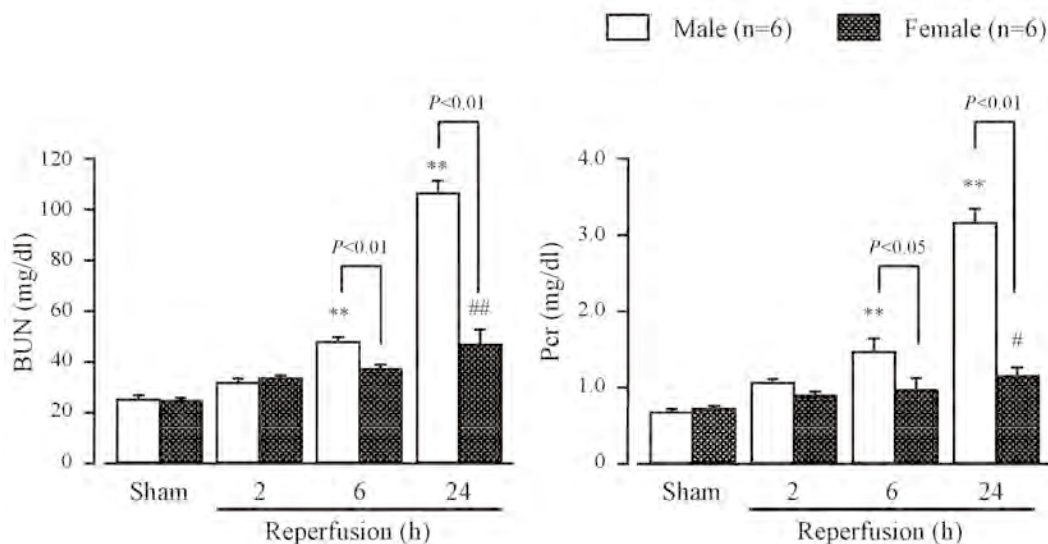


Figure 1. Time course of blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinin (Pcr) in male and female rats subjected to 45-min ischemia. Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$, compared with sham-operated male rats. # $P < 0.05$, *** $P < 0.01$, compared with sham-operated female rats.

素窒素濃度 (BUN) および血漿クレアチニン濃度 (Pcr) は、雌雄ラットともに、再灌流 2 時間後において有意な変化は認められないものの、再灌流の時間経過と共に上昇し、再灌流 24 時間後には有意な上昇を示した。さらに、再灌流 6 および 24 時間後には、これらの腎機能パラメーターが雌性ラットに比し雄性ラットで有意な高値を示し、虚血再灌流処置によって引き起こされる腎機

能低下の程度に雌雄差が認められた。

腎機能低下が認められない虚血再灌流処置 2 時間後の腎臓について、二次元ゲル電気泳動法によりタンパク質を分離し (Figure 2)、雌雄における発現変動の差異を比較した。その結果、Figure 3 に示すように、虚血再灌流処置により、雌雄ラットの腎臓で同程度の増減を示すタンパク質 (破線周囲) も数多くあるが、実線で示されるように著

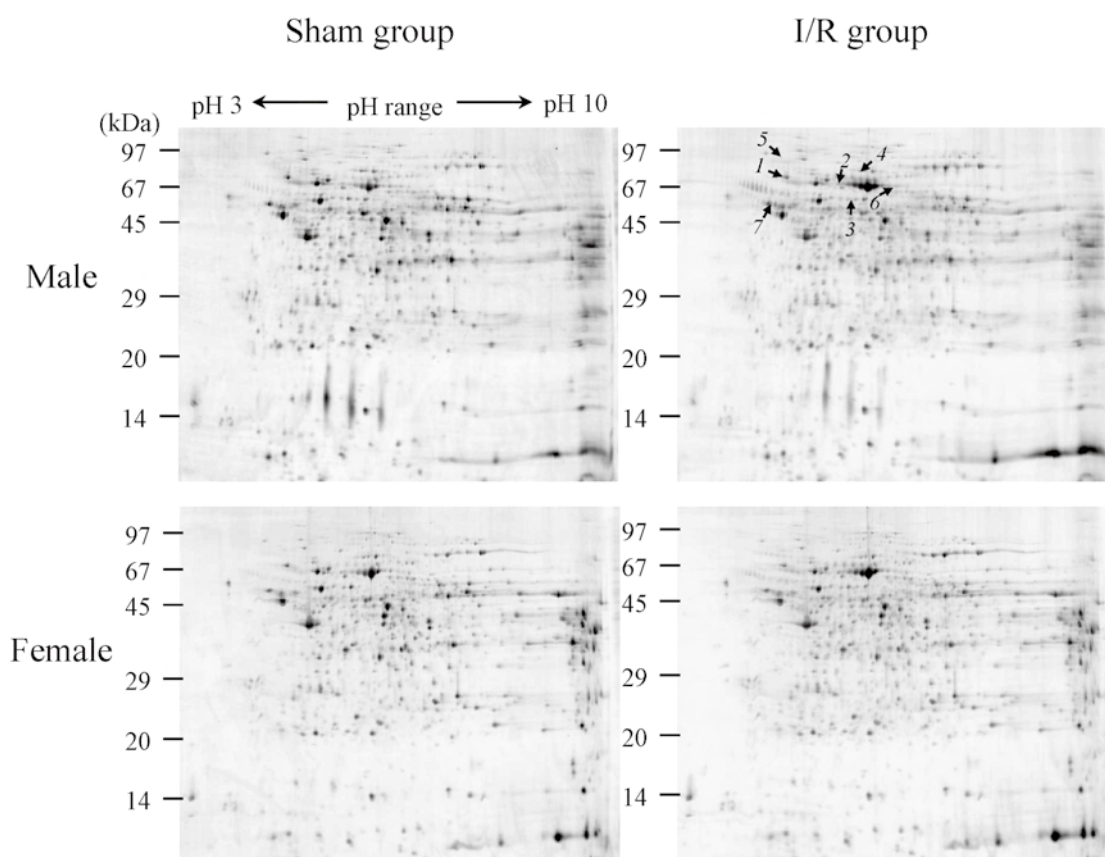


Figure 2. Two-dimensional gel images of renal proteins from sham-operated male and female rats or I/R-treated male and female rats. Proteins labeled with CyDye DIGE Fluor dye were separated by two-dimensional gel electrophoresis on basis of differential isoelectric point (x-axis) and molecular weights (y-axis). The spot numbers correspond to the numbers described in the legend of Figure 3. I/R, ischemia/reperfusion.

明な増減を示すタンパク質の種類が雄性ラットで多い傾向を認めた。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法によりタンパク質の解析を行った結果, glucose regulated protein 78 (Figure 3; No. 1), heat shock protein 70 (Figure 3; No. 2), protein disulfide-isomerase A3 precursor (Figure 3; No. 3) および ezrin (Figure 3; No. 4) など, 細胞内 ATP 濃度の変化によってその発現や翻訳後修飾が制御されることの知られているタンパク質が, 虚血再灌流処置の初期に雄性ラットの腎臓で顕著に増加または減少することが明らかになった。さらに, 雄性ラットで著明な増加を示すタンパク質の中に, ATP の合成と分解に関与する F_1F_0 -ATPase の β サブユニット (Figure 3; No. 6 および 7) やタンパク分解酵素である meprin の α サブユニット (Figure

3; No. 5) が同定された。以上より, 虚血性急性腎不全における性差発現の一因として, F_1F_0 -ATPase および meprin が関与する可能性が示唆された。

2. 腎虚血再灌流障害に及ぼす F_1F_0 -ATPase 阻害薬 oligomycin の影響

第 1 編のプロテオーム解析の結果より, 虚血再灌流初期に腎臓で顕著に増減するタンパク質の種類は, 雌性ラットと比較して, 雄性ラットで多いことが示された。また, 雄性ラットで顕著な増減を示すタンパク質の中に, 細胞内 ATP 濃度の変化によってその発現や翻訳後修飾が制御されるものが認められた。さらに, ミトコンドリア F_1F_0 -ATPase の β サブユニットが腎虚血再灌流処置に

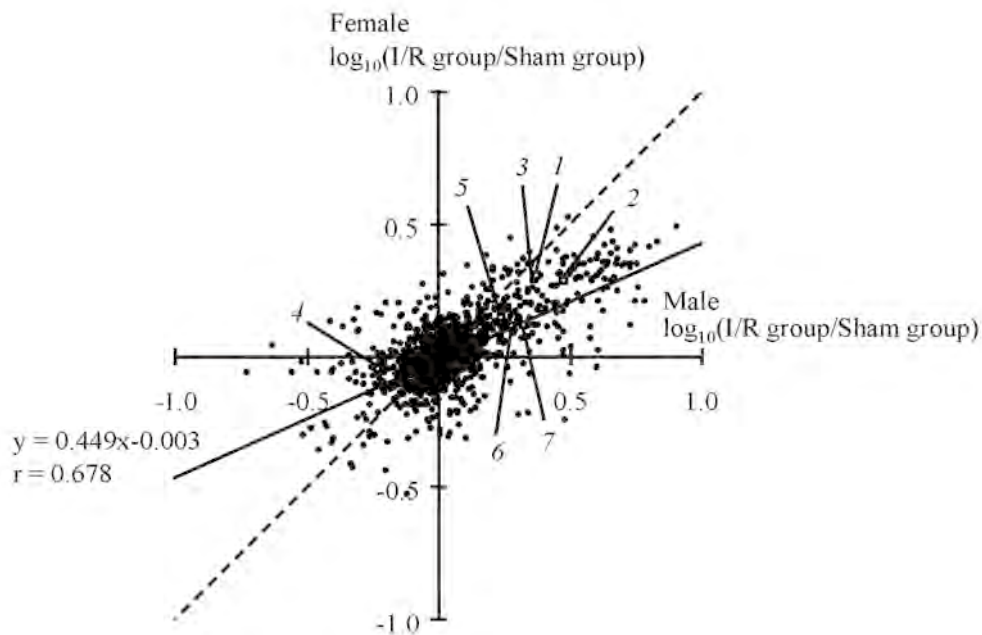


Figure 3. The profile of a change ration in proteins gel spots of male and female rat kidneys after reperfusion. These gel spots were obtained on two-dimensional gel electrophoresis in kidneys of sham-operated rats (Sham group) and I/R-treated rats 2 h after reperfusion (I/R group). Values were expressed as logarithm of the volume ration (I/R group/Sham group). Several proteins were identified as glucose regulated protein 78 (spot No. 1), heat shock protein 70 (spot No. 2), protein disulfide isomerase A3 precursor (spot No. 3), ezrin (spot No. 4), meprin α subunit (spot No. 5) and F_1F_0 -ATPase β subunit, (spot No. 6, 7). The numbers correspond to the spot numbers in Figure 2. I/R, ischemia/reperfusion.

よって雄性特異的に増加するタンパク質の一つとして同定された。F₁F₀-ATPase は、ミトコンドリア内膜に存在し、酸素が十分に供給されている状態では電気化学ポテンシャル勾配を利用してATPを合成している。しかしながら、ミトコンドリアの電位勾配が破綻する酸素欠乏状態では、F₁F₀-ATPase はATPの合成から加水分解へとその役割を切り替える⁵⁾。これまでに、F₁F₀-ATPase 阻害薬である oligomycin の処置により心筋虚血によるATP枯渇が軽減することから、虚血による

ATP枯渇の一部にF₁F₀-ATPaseを介するATP加水分解の関与が示唆されている⁶⁾。そこで本章では、虚血性急性腎不全の性差発現におけるF₁F₀-ATPaseの役割を調べる目的で、腎虚血再灌流障害に及ぼす oligomycin の影響について雌雄両ラットを用いて検討した。

Figure 4 に示すように、虚血再灌流処置 24 時間後の雄性および雌性ラットでは、それぞれの虚血再灌流処置を施していない sham ラットと比較して、BUN および Pcr の有意な上昇が認められ、腎髄質

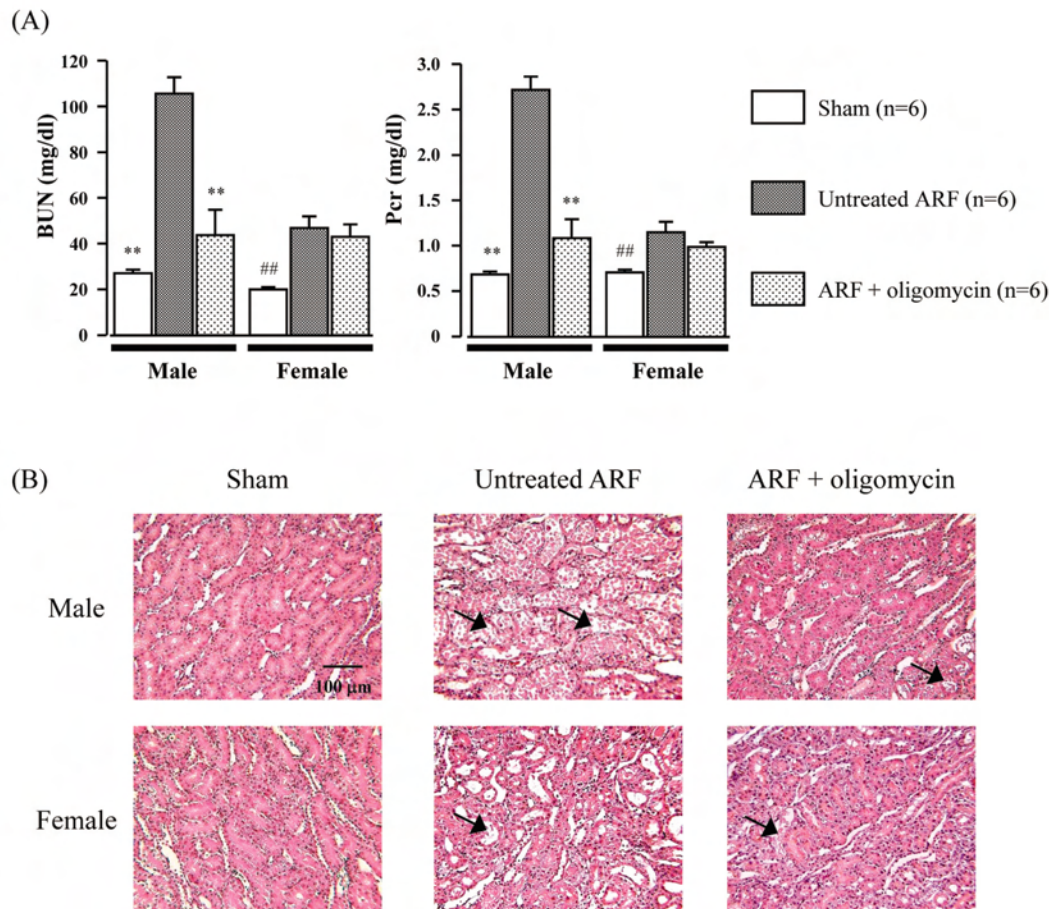


Figure 4. Effects of oligomycin on blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinine (Pcr) at 24 h after reperfusion (A). Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$, compared with untreated ARF male rats. ## $P < 0.01$, compared with untreated ARF female rats. Light microscopy of the outer zone outer stripe of medulla of the kidney of ARF male and female rats untreated and treated with oligomycin at 24 h after reperfusion, and sham-operated male and female rats (B). Arrows indicate tubular necrosis (hematoxylin and eosin staining). Oligomycin (0.5 mg/kg) or vehicle was given intravenously 5 min before ischemia. ARF, acute renal failure.

外層外帯において尿細管壊死も観察された。また、これらの腎機能低下および腎組織障害は雌性ラットと比較して雄性ラットでより重篤であった (BUN, Pcr; $P<0.01$)。oligomycin (0.5 mg/kg, i.v.) の虚血 5 分前投与は、虚血再灌流処置 24 時間後に認められる腎機能低下および腎組織障害に対して、雄性ラットでは有意かつ顕著に改善効果を示したが、雌性ラットには影響を及ぼさなかった。次に、雄性ラットの腎虚血再灌流障害に対する oligomycin の改善効果を調べる目的で、腎虚血による ATP 枯渇に及ぼす oligomycin の影響を検討した。雄性および

雌性ラットともに、腎組織中の ATP 含量は虚血処置後から急速に低下し、再灌流処置後には緩やかな回復を示したが、虚血 10 分後までの ATP 含量は雌より雄で有意な低値を示した (Figure 5A)。また、oligomycin (0.5 mg/kg) の虚血前処置によって、虚血 5 および 10 分後の腎組織中 ATP 含量は、雄性ラットでは有意な上昇を示したが、雌性ラットでは影響されなかった (Figure 5B)。すなわち、虚血による腎障害や腎 ATP 枯渇に対する oligomycin の抑制効果は、雄性ラットに対して特異的であることが判明した。

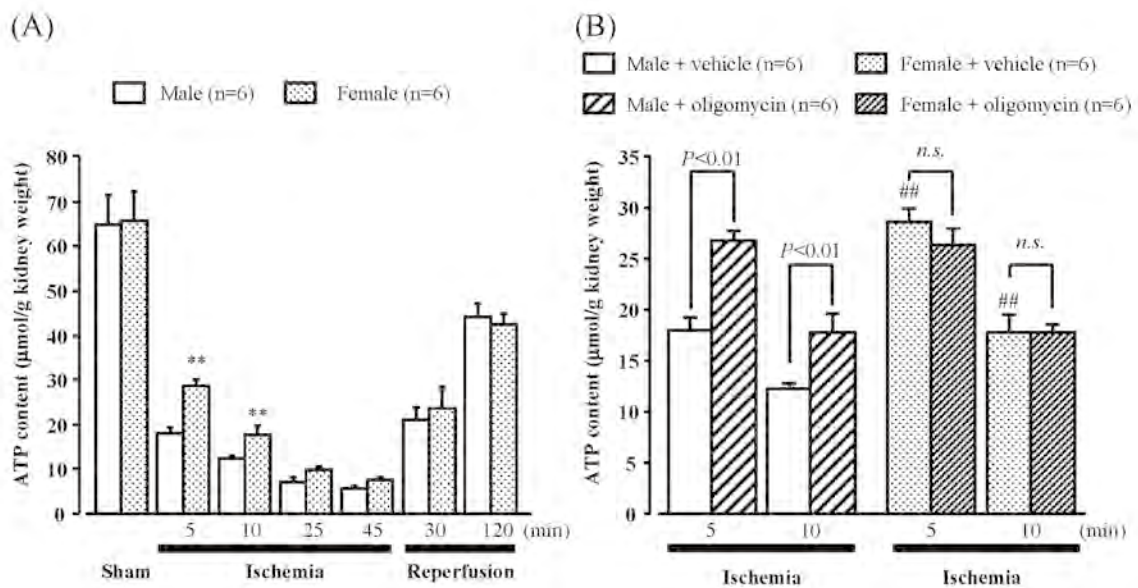


Figure 5. Time course of renal ATP content during ischemia/reperfusion in male and female rats (A), and effect of oligomycin on renal ATP depletion during ischemia (B). Oligomycin (0.5 mg/kg) or vehicle was given intravenously 5 min before ischemia. Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. ** $P<0.01$, compared with male rats at the same point. ## $P<0.01$, compared with vehicle-treated male rats at the same time point.

3. 腎虚血再灌流障害に及ぼす meprin 阻害薬 actinonin の影響

第1編のプロテオーム解析の結果より、腎虚血再灌流初期に meprin の α サブユニットが雄性ラットの腎臓で有意な増加を示すことが明らかになった。meprin は、腎近位尿細管細胞の刷子縁膜に存在するタンパク分解酵素の一種であり、細胞外マトリックスの構成成分である collagen IV、および nidogenなどを基質とする⁷⁾。また、雄性ラットの腎臓に虚血再灌流処置を施すと、尿細管の laminin が分解されることや、laminin の分解に関わる酵素として meprin が同定されている⁸⁾。さらに、meprin の α サブユニットが遺伝的に欠損している系統のマウスでは、 α サブユニットの発現が正常であるマウスに比べ、腎虚血再灌流障害が

軽度であることが示されている⁹⁾。これらの知見は meprin が腎虚血再灌流障害の病態発症に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。そこで本章では、虚血性急性腎不全の性差発現における meprin の役割を調べる目的で、meprin 阻害薬である actinonin の腎虚血再灌流障害に及ぼす影響について雌雄両ラットを用いて比較検討した。さらに、雄性ラットの虚血性腎障害に対して保護効果を有することが知られているカルシウム拮抗薬 verapamil¹⁰⁾の雌雄ラットに対する効果と比較した。

Figure 6 に示すように、腎虚血再灌流処置24時間後の雄性および雌性ラットでは、それぞれの虚血再灌流処置を施していない sham ラットと比較して、BUN および Pcr の有意な上昇が認められた。また、これらの腎機能低下

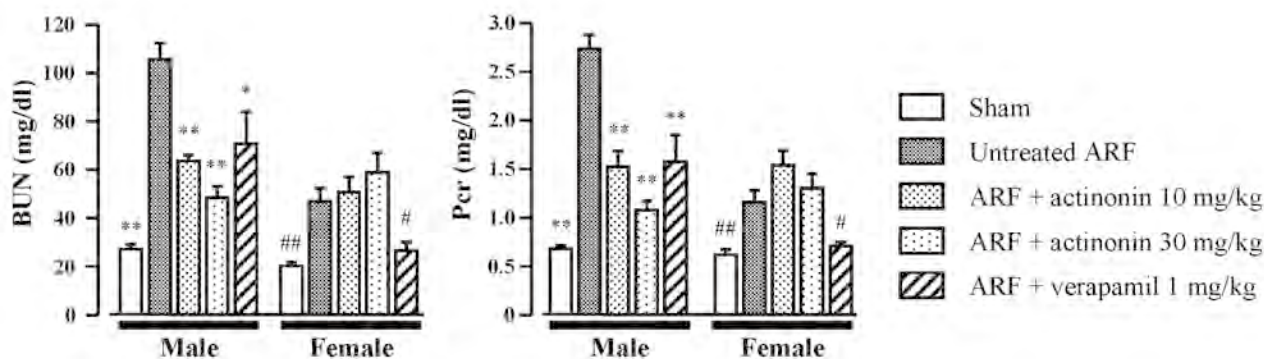


Figure 6. Effects of actinonin or verapamil on blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinine (Pcr) at 24 h after reperfusion. Actinonin or verapamil was given intravenously 5 min before ischemia. Each column and bar represents the mean \pm S.E.M. ($n=6$, except for 10 mg/kg actinonin group; $n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with untreated ARF male rats. # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with untreated ARF female rats. ARF, acute renal failure.

は雌性ラットと比較して雄性ラットでより重篤であった ($P<0.01$). 雄性ラットに actinonin (10, 30 mg/kg, i.v.) を虚血 5 分前に投与した場合, 虚血再灌流処置による腎機能低下に対して用量依存的かつ有意な改善効果を示した. しかし, 雌性ラットでは, 高用量の actinonin (30 mg/kg) を投与しても, 虚血再灌流処置による腎機能の悪化は影響されなかった. 一方, verapamil (1 mg/kg, i.v.) の虚血前投与は, 雄性ラットの虚血再灌流による腎機能の低下を有意に抑制し, さらに, 雌性ラットに対しても保護効果を示した.

虚血再灌流処置 24 時間後の雄性ラットの腎組織を光学顕微鏡により観察したところ, 腎髄質外層外帯における尿細管壊死の障害像が認められた

(Figure 7). 雌性ラットに虚血再灌流処置を施した場合にも腎組織障害は観察されたが, 雄性ラットと比較して部分的なものであった. 雄性ラットに actinonin を 30 mg/kg の用量で虚血前投与すると, 虚血再灌流障処置による腎組織病変の形成は抑制されたが, 雌性ラットに同用量の actinonin を投与しても, 腎組織障害に影響を及ぼさなかった. 一方, verapamil (1 mg/kg) の虚血前投与は, 雄性および雌性ラットの腎組織障害に対して保護効果を示した. これらの結果より, verapamil は雌雄両ラットの虚血再灌流処置による腎障害を保護するが, 一方の actinonin は雄性ラットの腎虚血再灌流障害に対して特異的に改善効果を発揮することが判明した.

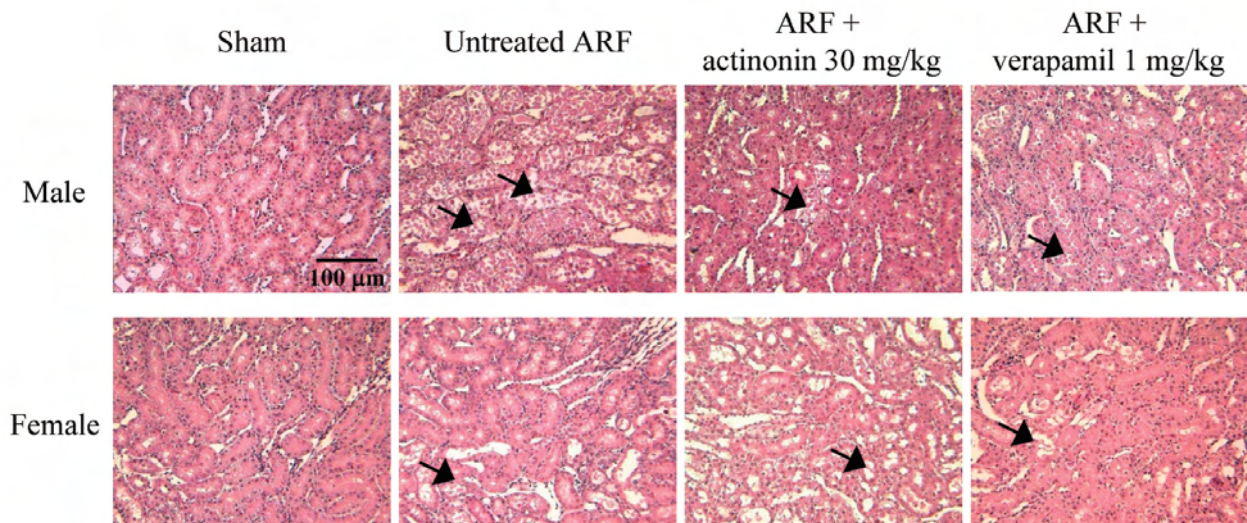


Figure 7. Light microscopy of the outer zone outer strip of medulla of the kidney of ARF male and female rats untreated and treated with actinonin (30 mg/kg) or verapamil (1 mg/kg) at 24 h after reperfusion, and sham-operated male and female rats. Actinonin or verapamil was given intravenously 5 min before ischemia. Arrows indicate tubular necrosis (hematoxylin and eosin staining). ARF, acute renal failure.

結語

腎虚血再灌流初期に F_1F_o -ATPase β サブユニットや meprin α サブユニットのタンパク質発現が雄性ラットでのみ有意に増加すること、また、 F_1F_o -ATPase 阻害薬の oligomycin あるいは meprin 阻害薬の actinonin が雄性ラットの腎虚血再灌流障害を顕著に抑制したことから、腎虚血再灌流障害の発症・進展過程において、 F_1F_o -ATPase β サブユニットや meprin α サブユニットの発現増加とそれに伴う酵素活性の上昇が雌雄で異なり、このことが虚血性急性腎不全における性差発現に関与していることが示唆された。以上、 F_1F_o -ATPase および meprin が本病態の性差発現に関わることを明らかにした。

なお、本研究は大阪薬科大学の実験動物委員会の承認を得て実施されたものである。

REFERENCES

- 1) Hishida A., *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, **44**, 94-101 (2002).
- 2) Mehta R.L., Pascual M.T., Gruta C.G., Zhuang S., Chertow G.M., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 1350-1357 (2002).
- 3) Park K.M., Kim J.I., Ahn Y., Bonventre A.J., Bonventre J.V., *J. Biol. Chem.*, **279**, 52282-52292 (2004).
- 4) Cunningham M.J., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **44**, 291-300 (2000).
- 5) Solaini G., Harris D.A., *Biochem. J.*, **390**, 377-394 (2005).
- 6) Jennings R.B., Reimer K.A., Steenbergen C., *J. Mol. Cell Cardiol.*, **23**, 1383-1395 (1991).
- 7) Bond J.S., Matters G.L., Banerjee S., Duscheck R.E., *FEBS Lett.*, **579**, 3317-3322 (2005).
- 8) Kaushal G.P., Walker P.D., Shah S.V., *J. Cell Biol.*, **126**, 1319-1327, (1994).
- 9) Trachtman H., Valderrama E., Dietrich J.M., Bond J.S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 498-505 (1995).
- 10) Burke T.J., Arnold P.E., Gordon J.A., Bulger R.E., Dobyan D.C., Schrier R.W., *J. Clin. Invest.*, **74**, 1830-1841 (1984).