

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間： 2008～2009 年度
課題番号：20790591
研究課題名 (和文) 腎病変進行における腫瘍壊死因子活性の多様性に関するシグナル伝達制御機構の検討
研究課題名 (英文) Mechanism of Tumor Necrosis Factor α signaling in renal injury
研究代表者
三崎 太郎 (MISAKI TARO)
浜松医科大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：20464125

研究成果の概要 (和文)：

[背景] Tumor necrosis factor α (TNF α) の細胞内信号伝達は、TNF receptor (TNFR)1 と TNFR2 という 2 種の受容体を介するが、腎病変の進行においてそれらの伝達系がいかなる制御を受けているかは明らかではない。

[方法] 腎線維化モデルである片側尿管結紮(unilateral ureteral obstruction; UUO) ラットの腎障害の経時的变化に関して、TNF α 、TNFR1、TNFR2、TNFR1 のシグナル伝達因子 TRADD、アポトーシス、細胞増殖 (Ki67) を定量的 RT-PCR 法、Western 法、TUNEL 法、免疫染色法などで比較検討した。また、TNF α 中和抗体であるエタネルセプトを投与し、障害軽減作用機序に関して検討した。さらに、TRADD のユビキチン依存性蛋白分解制御について、degradation assay、ubiquitin assay、免疫沈降法などで検討した。

[結果]

1. UUO 腎では TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の mRNA は、経時的に増加した。しかし、それらの蛋白レベルでは、TNFR2 蛋白は増加するが、TNFR1 蛋白は軽度減少し、TRADD 蛋白は mRNA 増加にもかかわらず UUO1 日後より有意に減少した。
2. UUO 腎では TRADD の分解亢進 (degradation assay) とユビキチン化の亢進 (ubiquitin assay) が認められ、この TRADD 分解はプロテアソーム阻害剤により抑制された。
3. HEK293 細胞において TRADD がユビキチン化されることが *in vitro* でも確認された。
4. TNF α 阻害剤エタネルセプトの投与は、UUO 腎障害を軽減し、TRADD の分解を抑制した。

[考察] UUO 腎の尿細管間質障害進行に関与する TNF α の細胞内信号伝達では、TNFR1 を介する TNF α の信号伝達因子 TRADD がユビキチン依存性プロテアソーム蛋白分解制御を受けることで UUO 1 日後より減少していることが明らかになった。この UUO 腎における TRADD の減少は、その腎障害進行において TNF α の信号を TNFR2 を介した信号伝達系優位に働かせている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Increased expression of tumor necrosis factor- α (TNF α) is involved in tubulointerstitial cell proliferation and apoptosis in obstructive renal injury. Two TNF α receptors (TNFR), TNFR1 and TNFR2, exist. On TNF α binding, TNFR1 recruits TNFR-associated death domain (TRADD), an assembly platform to diverge TNFR1 signaling. The precise mechanism of TNFR2-mediated signaling is not fully elucidated. We investigated post-receptor TRADD regulation in rat kidneys with unilateral ureteral

obstruction (UUO). Whereas UUO was associated with increased expression of TNF α , TNFR1, TNFR2, and TRADD mRNAs, TRADD protein decreased markedly at day 1 and remained to be low thereafter, which was associated with a slight decrease in TNFR1 protein levels at days 7 and 14. Ubiquitination and degradation of TRADD were increased in UUO kidneys, degradation of TRADD was stimulated by TNF α in HK-2 cells, and its degradation was suppressed by proteasome inhibitor. Inhibition of TNF α by soluble TNFR2, etanercept, reduced significantly, although transiently, tubular and interstitial cell proliferation, fibronectin expression, and apoptosis in UUO kidneys, and also suppressed TRADD degradation. These data suggest that the decrease in TRADD resulting from enhanced ubiquitin-dependent degradation is involved in obstructive renal injury. Since TRADD is not incorporated in TNFR2-mediated TNF α signaling, the sustained decrease in TRADD may function, at least in part, to divert TNF α signals toward a TNFR2-mediated pathway in UUO kidneys.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学 基礎医学

科研費の分科・細目：医科学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

Tumor necrosis factor (TNF) α の信号伝達のカスケードは、TNF receptor (TNFR)1、TNFR2 を介し信号伝達が行われることが知られている。TNFR1 の信号伝達は、1) TNFR associated death domain (TRADD) から TNF receptor associated factor 2 (TRAF2)、Receptor interacting protein (RIP) を介して Nuclear Factor kappa B (NFkB) を活性化させ、cell survival、細胞増殖や線維化をきたす経路と、2) TRADD から Fas-associated death domain (FADD)、カスパーゼ8、カスパーゼ3 を介してアポトーシスを惹起するという2つの経路が主に知られているが、これらは相反する作用であり、それらのバランスがどのように制御されているかは明らかではない。また、TNFR2 の信号伝達に関しては、TRAF2 を介する NFkB 活性化の報告以外には、

その伝達経路と作用発現の詳細はほとんど解明されていない。TNF α の信号伝達因子については、従来 TRAF2 や RIP のユビキチン化を介した細胞内信号伝達制御系の関与が報告されているが、TRADD を介する信号伝達がどのような細胞内伝達制御を受けているかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、腎線維化のモデルである片側尿管結紮 (unilateral ureteral obstruction; UUO) ラット腎において、UUO による閉塞性腎障害早期の尿細管、間質の細胞増殖と、後期の腎線維化とアポトーシスの進行過程において、TNFR1、TNFR2、TRADD の蛋白と mRNA 発現レベルの経時的変化と、TRADD 蛋白のユビキチン依存性プロテアソーム分解制御の関与を検討した。

3. 研究の方法

1) UUO モデルの作成

生後7週令(約200g)の雄性ラットを用い、エーテル麻酔下にて背部より切開を加え、腎臓を描出し、尿管を3-0絹糸で結紮した。コントロール群においては sham operation を施行した。Day0、1、3、7、14 にラットを屠殺して腎臓を摘出し、経時的な腎臓の組織変化を検討した。腎臓は一部組織切片用に4%パラホルムアルデヒドで固定し、残りを液体窒素にて凍結後-80°Cで保存し、mRNAの発現定量や、蛋白発現定量(Western blot)、TRADDのユビキチン依存性蛋白分解の検討に使用した。

2) 尿細管間質病変の進行とTNF α 信号伝達因子の発現の検討

腎病理所見、免疫組織化学と Western blot による TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の蛋白量と、定量的 RT-PCR による mRNA 発現量を検討した。さらに、それらと Ki67 を用いた細胞増殖、TUNEL によるアポトーシス、マッソントリクローム染色による間質線維化のレベルとを経時的に比較検討して、UUO 腎病変の進行に伴う細胞増殖期からアポトーシス、線維化の進行期に至る経過での TNF α の生理活性の変化とその信号伝達系の変化の関連を検討した。

3) TNF α 阻害薬による検討

UUO において TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の発現の変化を確認後、次に TNF α の阻害薬である etanercept (可溶性 TNFtype2 レセプター) の投与を行い、TNF α を抑制することで細胞増殖、アポトーシス、線維化が改善するかどうかを検討した。

4) 尿細管間質病変の進行における TRADD のユビキチン化とプロテアソーム蛋白分解制御の検討

Degradation assay やプロテアソーム阻害薬を用いた分解阻害実験を行った。

5) In vivo でのユビキチン化の証明

HEK293 細胞に Flag-TRADD、HA-ユビキチンをトランスフェクションし、免疫沈降することで TRADD のユビキチン化を検討した。

6) TNF α 投与による TRADD の分解活性の亢進の検討

HK-2 細胞を TNF α で細胞を刺激することで、TRADD の減少がおきているかどうかを検討した。

4. 研究成果

UUO においては、尿細管間質の線維化の進行とともに、細胞増殖 (Ki67) は day3 をピークに起こり、アポトーシス (TUNEL) は day14 にピークを認めた。TNF α 、TNFR1、TNFR2、TRADD の mRNA は、経時的に増加するが、蛋白に関しては、TNFR2 は増加するが、TNFR1 は軽度減少、TRADD は day1 より有意に減少した。そこで TRADD は mRNA が増加するにもかかわらず、蛋白は減少することに注目し、TRADD のユビキチン依存性プロテアソーム分解を検討した。Degradation assay にて、UUO 腎において TRADD 蛋白の分解が亢進しており、その分解はプロテアソーム阻害薬により抑制されることが確認された。また、Flag-TRADD を用いたユビキチン化アッセイにて、UUO 腎における TRADD のユビキチン化の亢進が確認された。HEK293 細胞に Flag-TRADD と HA-ユビキチンをトランスフェクションし、Flag で2回免疫沈降を行い、Western blot を行うことで、in vivo でも TRADD がユビキチン化されていることが示された。HK2 細胞を TNF α で刺激すると TRADD は経時的に減少した。また、UUO ラットに TNF α 阻害薬である etanercept を投与すると腎障害は軽減(線維化の抑制、Ki67 の減少、アポトーシスの減少)し、TRADD の分解も有意に抑制された。

UUO 腎における尿細管間質障害の進行には TNF α が関与し、その信号伝達因子 TRADD は UUO1 日後からユビキチン依存性プロテアソーム分解を受けて減少していること、また、この TRADD のユビキチン依存性分解は TNF α 刺激により惹起されることが確認された。TRADD は TNFR2 を介する信号伝達系には関与しないので、UUO 腎での TRADD の減少は、その腎病変の進行過程において TNFR1 を介する信号伝達を抑制して TNFR2 を介する信号系を優位に働かせている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Misaki T, Yamamoto T, Suzuki S, Fukasawa H, Togawa A, Ohashi N, Suzuki H, Fujigaki Y, Oda T, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Kitagawa M, Hishida A: Decrease in TRADD

resulted from ubiquitin-dependent degradation in the obstructive renal injury in rats. Am J Pathol : 175(1) : 2009, 74-83 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① UUO 腎における TNF α シグナルの伝達機構、三崎太郎、日本腎臓学会総会、 2009 年 6 月 5 日 横浜
- ② Tumor Necrosis Factor- α Receptor Associated Death Domain is decreased by ubiquitin-dependent degradation in the obstructive renal injury in rats, Taro Misaki, American society of Nephrology 2009.10.31 San Diego

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三崎太郎 (MISAKI TARO)

浜松医科大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 20464125