

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590918

研究課題名（和文）NADPH オキシダーゼ新規制御因子 Poldip2 の腎病態生理における役割の解明

研究課題名（英文）Roles of novel NADPH oxidase regulator, Poldip2, in renal pathophysiology

研究代表者

谷山佳弘（TANIYAMA YOSHIHIRO）

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：70441079

研究成果の概要（和文）：NADPH オキシダーゼの新規制御因子である Poldip2 は、腎内では糸球体（メサンジウム細胞および上皮細胞）や皮質および髄質集合管において発現していることが確認された。さらに、糖尿病モデルマウスでは週齢が進むにつれてその腎内での発現が低下していた。一方、高血圧モデルラットの腎においては、週齢とともに増加していた。培養細胞を用いた実験において、トランスフォーミング増殖因子（TGF- $\beta$ ）により Poldip2 蛋白発現が亢進することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Podip2, a regulator for NADPH oxidase, is localized to glomerular cells, and epithelium of cortical and modularly collecting ducts. Its expression is upregulated in a diabetic animal model according to age. Contrary, it is downregulated in a hypertensive animal model. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates its expression in a cell culture system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：腎臓学

キーワード：NADPH オキシダーゼ、TGF- $\beta$ 、糖尿病性腎症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、糖尿病性腎症や高血圧性腎症と

いった腎疾患の発症および進展において、酸化ストレスが深く関与していることが明らか

かとされている。酸化ストレスは、活性酸素や過酸化水素などの活性酸素種（ROS）の産生が亢進し、その消去系の能力を凌駕する際に生じる。NADPH オキシダーゼは活性酸素を生成する主要な酵素であり、腎疾患のみならず心血管疾患、免疫系疾患といった様々な疾患において活性化され、酸化ストレスを惹起していることが示されている。NADPH オキシダーゼは、Nox や p22phox をはじめとする数種類の構成蛋白によりなる酵素である。Nox アイソフォームのうち、Nox4 は腎臓の cDNA ライブラリーから単離され、その蛋白発現は特に腎臓において高いことが報告されている。Nox4 由来の ROS は多岐にわたる生理学的機構に関与していることが示されているが、その中には細胞老化、アポトーシス/細胞生存、細胞分化、細胞外マトリックス産生、細胞遊走といったものが含まれる。このように、細胞レベルにおいて Nox4 由来の ROS の役割が解明されつつあるものの、腎疾患の病態生理における Nox4 の役割については十分な理解がなされていないのが現状である。

(2) 我々は、p22phox と結合する蛋白として Poldip2 (polymerase delta-interacting protein) を同定し、これが Nox4 の新規制御因子として機能することをみいだした。Poldip2 は、細胞内において Nox4 と共存しており、Nox4 由来の活性酸素産生を増加させる因子であることを明らかとした。興味深いことに、Poldip2 は Nox4 と同様に mRNA レベルおよび蛋白レベルで他臓器に比較して腎臓において高発現していた。

以上のように、NADPH オキシダーゼのうち、Nox4 は腎臓において高発現していることが示されているものの、その病態生理における役割は十分には理解されていない。さらに、Poldip2 は我々が最近同定した新規 Nox4 制御因子であり、その機能については全く不明で

ある。これまでに報告されている文献的検討からは、Nox4 および Poldip2 は細胞増殖、虚血による障害や間質線維化といった腎組織障害の過程に深く関していることが予想される。Poldip2 については Nox4 の腎疾患病態生理における役割が解明されれば、これらの分子をターゲットとした新規治療法の開発が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、NAD(P)H オキシダーゼの新規制御因子である Poldip2 が糖尿病性腎症や高血圧性腎症などの腎疾患の病態生理において果たしている役割を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) Poldip2 に対する特異抗体を用い、糖尿病モデル動物である db/db マウス、あるいは高血圧モデル動物である脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) の腎臓における Poldip2 発現部位を同定する。

(2) 上記各モデルにおける週齢ごとの Poldip2 発現量をウェスタンブロット法にて評価する。

(3) 培養細胞を用い、Poldip2 発現調節に関わる因子を見出す。

## 4. 研究成果

(1) Poldip2 の腎内発現局在について特異抗体を用いた免疫組織化学法にて検討した。その結果、Poldip2 免疫活性は糸球体 (メサンジウム細胞および上皮細胞)あるいは尿細

管上皮細胞に存在していることが明らかとなった。尿細管での発現局在を明らかとするため、尿細管セグメントごとにマーカーとなる蛋白との共在を確認したところ、アクアポリン2陽性細胞に豊富な Poldip2 発現が確認された。このことにより皮質および髄質集合管上皮細胞において Poldip2 が強く発現していることが確認された。

(2) ウェスタンブロット法を用い、Poldip2 発現量を定量的に解析したところ、糖尿病モデルである db/db マウスでは週齢が進むにつれてその腎内での発現が低下していた。一方、高血圧モデルである SHR-SP の腎においては、Poldip2 発現は週齢とともに増加していた。

(3) マウス皮質集合管上皮細胞から樹立された M-1 細胞を培養し、各種刺激に対する Poldip2 発現の変化をウェスタンブロット法にて検討した。その結果、M-1 細胞をトランスフォーミング増殖因子 (TGF- $\beta$ ) で刺激すると、その濃度および時間依存性に Poldip2 蛋白発現を上昇させることが明らかとなった。

(4) 培養メサンジウム細胞においても M-1 細胞と同様の検討をおこなった。その結果、やはり TGF- $\beta$  刺激により、Poldip2 発現は亢進した。TGF- $\beta$  はメサンジウム細胞でのコラーゲン産生を増加させることが知られているため、そのメカニズムに Poldip2 が関与しているかどうかについて検討した。siRNA を用いてメサンジウム細胞での Poldip2 発現を抑制すると、TGF- $\beta$  によるコラーゲン I 発現が低下した。

以上の結果により、これまで不明であった Poldip2 の腎内発現局在が明らかとなり、ま

たこれが糖尿病性腎症や高血圧性腎障害の病態に関与している可能性が示唆された。また、疾患モデルで認められた生体内での発現調節機構の一部に TGF- $\beta$  が関与し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)

[学会発表] (計3件)

①中谷嘉寿、谷山佳弘ほか、NADPH oxidase 調節蛋白 Poldip2 のメサンジウム細胞における役割についての検討、第 55 回日本腎臓学会学術総会、2012 年 6 月 1 日、横浜

②中谷嘉寿、谷山佳弘ほか、NOX4 を制御する NADPH oxidase 調節蛋白質 Poldip2 の糖尿病性腎症に対する検討、第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会、2011 年 5 月 20 日、札幌

③中谷嘉寿、谷山佳弘ほか、Poldip2 の糖尿病性腎症における病態生理学的意義に関する検討、第 53 回日本腎臓学会学術総会、2010 年 6 月 17 日、神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷山 佳弘 (TANIYAMA YOSHIHIRO)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：70441079

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

