

原 著

腎臓における酸化ストレス下の c-maf 発現調節

東京女子医科大学医学部第四内科学（主任：新田孝作教授）

オオishi テツヤ ヨシダ タクミ スギウラ ヒデカズ ツチヤ ケン ニッタ コウサク
大石 哲也・芳田 工・杉浦 秀和・土谷 健・新田 孝作

(受理 平成19年11月12日)

Regulation of Oncogene c-maf Expression in the Kidney under Oxidative Stress

Tetsuya OISHI, Takumi YOSHIDA, Hidekazu SUGIURA,
Ken TSUCHIYA and Kosaku NITTA

Department of Medicine IV, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

Maf is a family of oncogenes that encode a transcription factors containing a typical bZip structure—a motif for protein dimerization and DNA binding—and have been speculated to possess various potentials in mediating development, cellular differentiation and biological activities in several organs. Previously, we reported that c-maf modulates the antioxidative pathway via plasma glutathione peroxidase-3 in the proximal tubules of the mouse kidney. Therefore, we suggested that c-maf might play an important role in the presence of oxidative stress in the kidney. Here, we investigated c-maf expression in a rat model for renal ischemia reperfusion injury and cultured cells derived from human kidney proximal tubular cells (HK-2) treated with several oxidative compounds. The *in vivo* and *in vitro* experiments demonstrated that the expression of c-maf mRNA was relatively low during the early stage of oxidative stress but increased at a later stage. An immunohistochemical study showed a reduction in c-maf protein over a similar time course. Tunel staining in HK-2 cells that were overexpressing c-maf showed a tendency toward a protective effect against H₂O₂, and the expression of the c-maf gene was related to a decrease in p21 and p53. These data indicate that c-maf depletion may trigger apoptotic cell death under stressful conditions, suggesting that the c-maf gene may be related to anti-stress related genes.

Key words: apoptosis, c-maf, oxidative stress, ischemic-reperfusion renal injury

緒 言

Maf 遺伝子は、転写因子の一つで、large maf と small maf に分類される癌関連遺伝子の総称である。Large maf は、塩基性領域ロイシンジッパー型 (bZip 型) 転写因子に属し、眼や脾臓などにおける細胞分化、形態形成や発達に関与していることが報告されている^{1)~3)}。我々は、large maf family の mafB と c-maf が腎臓に発現し⁴⁾⁵⁾、c-maf は腎近位尿細管に特異的に発現していることを報告した⁵⁾。また、c-maf 遺伝子欠損マウスを用いた腎臓の遺伝子発現プロファイルにおいて、抗酸化遺伝子 glutathione peroxidase-3 (GPx3) の発現が低下することを確認した。さらに、*in vitro* の検討で c-maf と GPx3 がシグナル伝達の上流下流の関係にあることを示し、c-

maf が抗酸化経路に関連する可能性を報告した⁶⁾。しかし、酸化ストレス条件下における c-maf 遺伝子発現変化、抗酸化機能や調節との関係については不明な点が多い。そこで、腎臓における c-maf 遺伝子発現調節を、典型的な酸化ストレスの実験モデルである腎虚血再灌流障害 (IRI) を用いて検討した。IRI は、酸化的ストレスによって組織の損傷と機能障害が生じることが指摘されている⁷⁾⁸⁾。これらの病態には、活性酸素や炎症反応が関与しており⁹⁾¹⁰⁾、細胞の壊死やアポトーシスに至るとされている¹¹⁾¹²⁾。そのため、その過程における c-maf 遺伝子の発現変化について検討を行った。また、ヒト由来腎近位尿細管細胞 (human kidney proximal tubular cell : HK-2) を用いて、酸化剤を暴露した条件下における c-maf 遺

伝子発現を検討した。さらに、同細胞株に一過性 c-maf 遺伝子導入を試み、同様に酸化剤を暴露した条件下における酸化ストレス関連遺伝子発現量の変化と細胞障害、特にアポトーシスとの関連を検討した。

対象および方法

1. 対象

200~250g (7~8 週齢) 雄性の Wistar 系ラットを用いた。室温 25°C の条件下に自由摂食、飲水とした。全ての動物実験は東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て (No 03-7), NIH の実験動物の使用ガイドラインに準拠して施行した。全ての動物は pentobarbital を用いて麻酔下に手術を施行した。

2. 方法

1) 動物モデル

ラットは、次の 2 つのグループに無作為に分類した。

(1) 腎虚血再灌流障害 (IRI) 群 (6 時間, 12 時間, 1 日, 3 日, 10 日目; 各々 n=5~6)

腎臓の虚血再灌流モデルは、既報と同様の手順で作製した¹³⁾。麻酔下で、腹部正中切開にて両側腎門部の腎動脈と腎静脈を露出させ、動脈クリップを用いて両側腎動静脈をクランプした。60 分後動脈クリップを開放し再灌流した。

(2) Sham 群 (0 時間, 6 時間, 12 時間, 1 日, 3 日, 10 日目; 各々 n=5~6)

麻酔下で、腹部正中切開にて両側腎門部における腎動脈と腎静脈を露出させた。腎動静脈のクランプを施行せず閉腹した。

手術後 6 時間, 12 時間, 1 日, 3 日, 10 日目に、各群で血液採取、腎臓を摘出した。腎臓を分割し、4% paraformaldehyde で固定した。

2) 細胞培養, 内因性 c-maf と c-maf 過剰発現の方法 (各々 n=4~8)

近位尿細管細胞由来である HK-2 細胞を、10% FCS/F12/DMEM 培地 (Invitrogen) を基礎培地とし、5% CO₂, 37°C の条件で培養した。内因性 c-maf 発現を確認するために、mRNA および蛋白を抽出した。c-maf の cDNA full length (北海道大学, 酒井正春博士より供与) を、pcDNA3.1 vector (Invitrogen) を用いサブクローニングした。この c-maf 遺伝子およびコントロール pcDNA3.1 vector を、50% confluent になった HK-2 細胞に Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入し、過剰発現を確認するために 24 時間後に mRNA および蛋白を抽出した。

3) HK-2 細胞への酸化剤暴露の方法 (各々 n=3~4)

酸化ストレス刺激として、酸化剤である H₂O₂ を用いた。H₂O₂ による細胞傷害度より、暴露濃度の基礎検討を行い、実験に用いる濃度を 100μM とした。HK-2 細胞に 100μM H₂O₂ を暴露し、3 時間, 6 時間, 12 時間および 24 時間後に細胞を回収した。Control 群として、暴露のない HK-2 細胞を同様の時間経過で回収した。

4) maf 過剰発現細胞への酸化剤暴露 (各々 n=4~6)

c-maf 過剰発現時の酸化ストレスへの関与を確認するために、H₂O₂ と同様の酸化剤である S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP, NO donor) と lipopolysaccharide (LPS) を選択した。100μM H₂O₂ 暴露時の HK-2 細胞傷害度と比較し、ほぼ同等と考えられる濃度を検討した上で、SNAP は 300μM, LPS は 30μM とした。HK-2 細胞に c-maf plasmid と control plasmid を導入し 24 時間後に培養液の交換を行い、それぞれに 100μM H₂O₂ 暴露群, 300μM SNAP 暴露群と 30μM LPS 暴露群を作製し、6 時間後に細胞を回収し、mRNA を抽出した。

5) RNA 抽出, real-time PCR

c-maf および酸化ストレス下での細胞障害, アポトーシスに関連する遺伝子として p53, p21 を選択し、mRNA 発現量の評価は real-time PCR を用いた。Total RNA を、TRIZOL (Invitrogen) を用いて腎臓および培養細胞から抽出した。cDNA は 5μg の total RNA と oligo (dT) を使用し SuperScript kit (Invitrogen) によって作製した。Real time PCR は各々の cDNA を鋳型とし、SYBR green PCR 反応液 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems) による one step 法を施行した。各遺伝子に特異的なプライマーの配列を以下に示す。

c-maf : AAGGGTATCTGGCTCATGGA (forward), GTGCAAGTCCAGGGTATGTG (reverse)

p21 : CTTTGAAGTTCGCCACTGAGA (forward), ACACGCTCCCAGACGTAGTT (reverse)

p53 : AGCCAGGGCTCTAAGGAAGT (forward), TTCCAGCTGGTTCTGGATCT (reverse)

また glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Rodent (Applied Biosystems, 東京) を用いて、サンプル間の数値を標準化した。

6) Western blotting

腎組織は, lysis buffer (20mM Tris buffer, pH 7.5, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin from bovine lung, 2 mM DL-dithiothreitol, 1% polyoxyethylene sorbitan mono-laurate, 1 mM ethylenediamine tetraacetate) に浸し, ホモジネート後, 5,000rpm \times 10 分間の遠心を行い, 上清を分離した. 10% polyacrylamide gel を用い, 各サンプルから 1 レーンにつき 30 μ g の蛋白を電気泳動し, ニトロセルロース膜へ転写した. 膜を 4 $^{\circ}$ C, 3% スキムミルクで一晩ブロックし, 一次抗体として c-maf モノクローナル抗体 (Santa Cruz, CA) を, 400 倍に希釈し, 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた. Washing buffer (0.3% Tween20 in PBS) にて 10 分間 2 回洗浄し, 二次抗体として horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-rat immunoglobulins (DAKO) を室温にて 1 時間反応させた. その後, ECL Western blotting system (Amersham Biosciences, NJ) にて反応させ, X 線フィルムに撮影した. 得られたバンドの定量化には, 画像処理解析ソフト Image J を用いた.

7) 免疫組織染色

腎臓は, 4 $^{\circ}$ C で 16 時間, 4% paraformaldehyde にて固定し, パラフィンに包埋した. 3 μ m のパラフィン切片を脱パラフィンし, 0.3% H₂O₂ メチルアルコールに 30 分間反応させた. 免疫組織染色に Vectastain ABC Kit Rat IgG (Vector Laboratories, CA) を用い, 20 分間 rabbit serum (20mM Tris, 225 mM NaCl, 0.15% rabbit serum) でブロックし, ついで 15 分間 anti-rat IgG (H+L) にてブロックした. c-maf を 30 分間反応させ, 洗浄後, 30 分間ビオチン化二次抗体にて反応させ, Vectastain ABC Reagent で 30 分間反応した. その後 peroxidase substrate solution DAB substrate kit (Vector Laboratories) にて発色させた. 組織障害の判定には, Hematoxylin-eosin (HE) 染色を行った.

8) アポトーシス細胞の検出

Terminal deoxyribonucleotide transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を施行した. 対照の染色として, 4',6-diamidino-2'-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) dye (Kirkegaard Perry Laboratories, MD) を用いた. 4% paraformaldehyde で固定した凍結切片にて, In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche, Penzberg, Germany) を用いて染色した.

HK-2 細胞は, 氷上で 2 分間, 0.1% TritonX-100 in 0.1% sodium citrate にて反応させ, 洗浄後に TUNEL reaction mixture に, 暗所 37 $^{\circ}$ C, 60 分間反応させた. 洗浄後, DAPI を暗所で 4 分間反応させ, VectaShield を用いてマウントした.

9) 生化学のパラメータの測定

血液サンプルは, 遠心し (5,000rpm \times 10 分間), 血漿を採取した. 血漿 creatinine (PCr) 濃度は, 自動分析器 (SRL) にて測定した.

10) 統計

数値はすべて平均値 \pm 標準誤差で示した. 統計的分析は, 群間の変化に unpaired t-test を用いた. p 値 $<$ 0.05 を統計学的に有意とした.

結 果

1. ラット腎虚血再灌流障害 (IRI) における c-maf の影響

PCr は 1 日目に IRI 群において上昇した (IRI 群; 2.19 ± 1.03 mg/dl vs sham 群; 0.21 ± 0.025 mg/dl, $p < 0.001$). IRI 群の PCr は, 時間の経過とともに低下したが, 10 日目においても sham 群と有意差がみられた (IRI 群; 0.27 ± 0.017 mg/dl vs sham 群; 0.20 ± 0.045 mg/dl, $p < 0.01$) (図 1).

c-maf mRNA 発現量は, IRI 群において 1 日目から著しく減少した (IRI 群; 0.48 ± 0.12 vs sham 群; 1.10 ± 0.44 , $p < 0.05$). 経時的に改善したが, 3 日目から mRNA の発現量は sham 群に比べ増加する傾向がみられ, 10 日目でも同様の傾向がみられた (10 日目: IRI 群; 1.08 ± 0.44 vs sham 群; 0.82 ± 0.21 , $p = 0.32$) (図 2). c-maf の発現蛋白量の変化について, Western blotting の Band を数値化したものをグラフで示した (図 3). 図 2 の mRNA の発現量の変化と同様に, IRI 群 0.25~1 日目までは, c-maf 蛋白の発現量は sham 群に比べ有意に低下し (1 日目: IRI 群; 0.77 ± 0.07 vs sham 群; 1.00 ± 0.46 , $p < 0.001$), 3 日目以降は増加する傾向を示した (10 日目: IRI 群; 1.28 ± 0.36 vs sham 群; 1.00 ± 0.36 , $p = 0.28$).

c-maf の腎臓組織内での局在は, sham 群のパラフィン免疫組織染色 (図 4a) で, 皮質近位尿細管に陽性であり, 糸球体や遠位尿細管などの他部位には染色されなかった. IRI 群における組織学のおよび c-maf 染色量の変化を図 4b, c に示した. 糸球体障害は IRI 群と sham 群で認められなかったが, IRI 群では腎皮質尿細管の brush border の消失, 基底膜からの上皮細胞の脱落, 尿細管閉塞, 尿細管拡張が

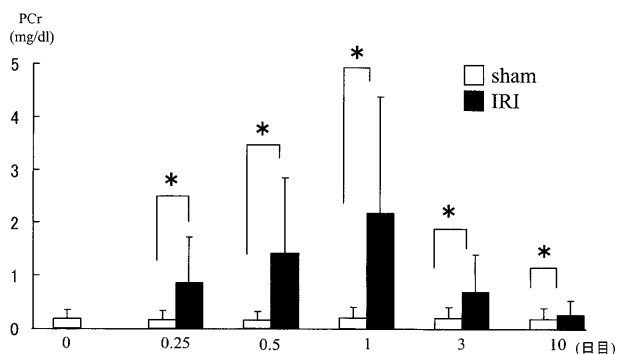


図1 血漿 Creatinine 濃度の変化

PCrはIRI群において有意に上昇した。PCr:plasma creatinine, 数値は平均 ± 標準偏差, n = 6 ~ 7, *: p < 0.01.

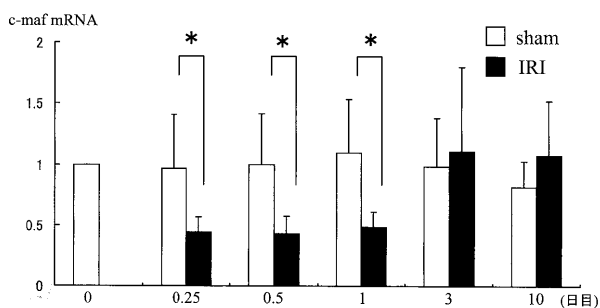


図2 腎臓 c-maf mRNA 発現量の相対的变化

腎臓の c-maf mRNA 発現は, IRI 群で早期に減少した。Sham 群の 0 日目を 1 とした相対値で表示した。数値は平均 ± 標準偏差, n = 4 ~ 6, *: p < 0.05 vs sham.

HE 染色で認められた。c-maf の組織染色量は, sham 群に比べ IRI 群 0.5 日目で皮質近位尿細管細胞質における染色量が低下し, IRI 群の 10 日目では, ほぼ改善から増加する傾向がみられた。

2. ヒト由来腎近位尿細管細胞の酸化ストレス環境での c-maf の影響

HK-2 細胞の内因性の c-maf と, c-maf overexpression plasmid 導入後の c-maf の発現を mRNA と Western blotting で確認したところ, mRNA および蛋白質いずれにおいても内因性 c-maf の発現が確認された。また c-maf 遺伝子導入 HK2 細胞において c-maf が過剰発現によって増加していることが確認された (図 5)。

c-maf mRNA の発現量は, H₂O₂ 暴露群において 12 時間目から減少し (IRI 群; 0.62 ± 0.17 vs sham 群; 1.09 ± 0.14, p < 0.01), 24 時間後には改善傾向がみられた (IRI 群; 1.09 ± 0.37 vs sham 群; 1.14 ± 0.27, p = 0.87) (図 6)。

次に酸化ストレスによるアポトーシスとの関連を

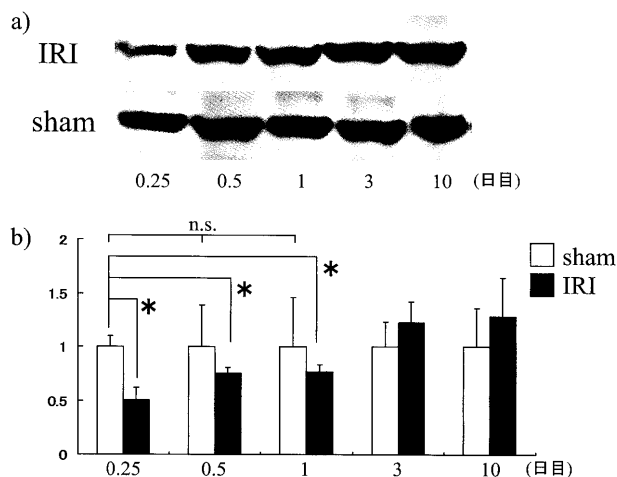


図3 腎臓 c-maf 蛋白発現量の相対的变化

a: Western blotting, b: c-maf 蛋白発現の半定量。c-maf 蛋白質発現は, IRI 群で早期に減少した。Sham 群を 1 とした相対値で表示した。数値は平均 ± 標準偏差, n = 5 ~ 6, *: p < 0.01.

みるために, アポトーシス関連遺伝子である p53 と p21 の mRNA の発現を確認した。HK-2 細胞へ一過性に control plasmid と c-maf overexpression plasmid の導入を行い, 事前の検討で 100 μM H₂O₂ と細胞傷害度がほぼ同等と考えられた 300 μM SNAP と 30 μM LPS をそれぞれ暴露した。どの酸化剤においても control plasmid 群に比べ c-maf plasmid 群では, p53 と p21 の mRNA 発現の誘導は抑制された (図 7)。

また, H₂O₂ を暴露した HK-2 細胞の TUNEL 陽性細胞は, c-maf plasmid 群において減少する傾向がみられた (図 8)。

考 察

Maf family は, トリレトロウイルスから癌遺伝子 *v-maf* が発見された後に, その細胞性因子 *c-maf* が同定された¹⁴⁾¹⁵⁾。その関連因子として, アミノ末端側に転写活性化領域をもつ large maf family に属する c-Maf, MafB, NRL, および L-Maf の 4 種類と, 転写活性化領域をもたない small Maf family に属する MafG, MafK および MafF の 3 種類が同定されている¹⁴⁾¹⁵⁾。Maf family は, 最近のデータベースの情報によれば, 魚類からヒトにいたる脊椎動物で非常によく保存されていることがわかっており, 生命存続に重要な遺伝子群であるといえる。

腎臓における Maf family に注目すると, large maf family の mafB が糸球体の基底膜を構成する podocyte の分化に関与していることが報告され, 糸球体

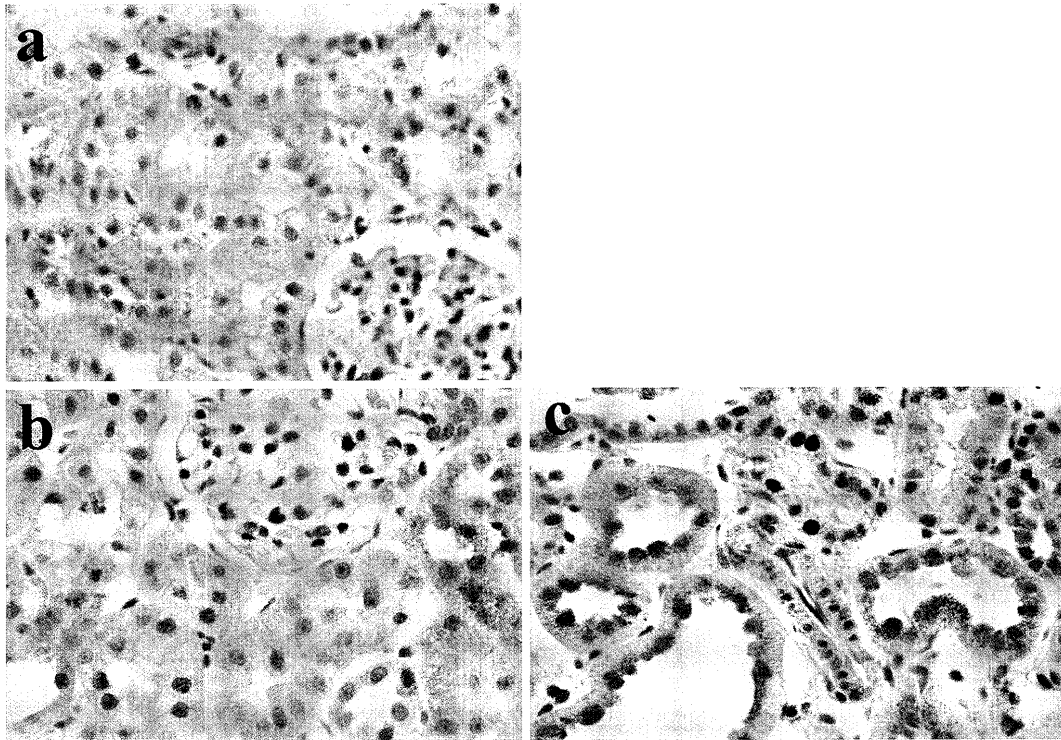


図4 腎皮質 c-maf 免疫染色

a: sham 群, b: IRI 群 0.5 日目, c: IRI 群 10 日目, $\times 400$. (a) sham 群で尿細管細胞の細胞質および核に染色がみられる。糸球体は染色されなかった。(b) IRI 後 0.5 日目では、ネフロン全体で c-maf 染色性の低下がみられるが、(c) 10 日目では、細胞質および核における染色性が増加している。

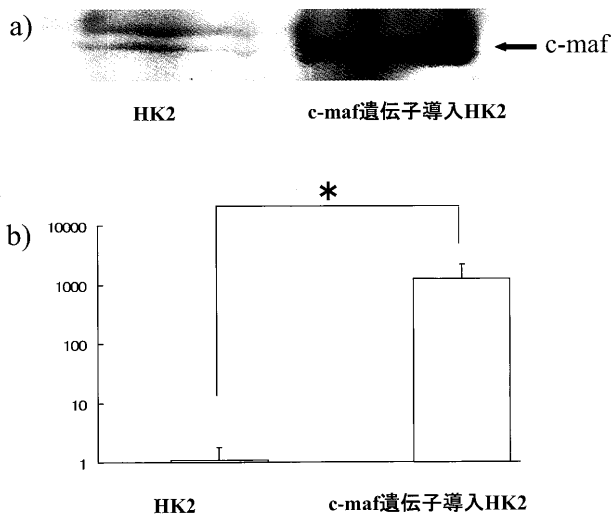


図5 HK-2 細胞の c-maf 遺伝子導入

a: Western blotting, b: c-maf mRNA 発現量. HK-2 細胞の c-maf mRNA 発現は、内因性に確認された。c-maf 遺伝子導入により c-maf mRNA と蛋白は著明に誘導されていることが確認された。mean \pm SD, n = 4, * : p < 0.01.

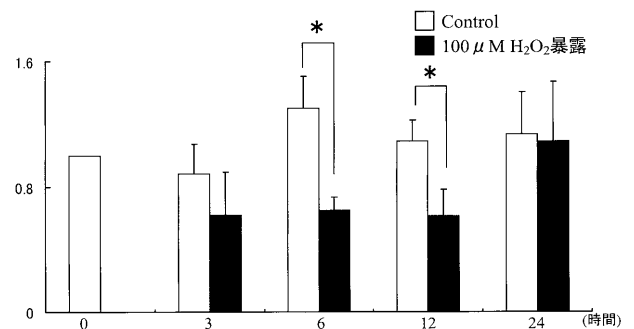


図6 H_2O_2 100 μ M を暴露した HK-2 細胞の c-maf mRNA 発現量の相対的变化

HK-2 細胞の c-maf mRNA 発現量は、暴露群で早期に減少した。Control 群の 0 時間を 1 とした相対値で表示した。数値は平均 \pm 標準偏差, n = 3~4, * : p < 0.01.

腎炎の原因遺伝子の一つであることも示唆されている⁴⁾¹⁶⁾。我々は、large maf family の中で c-maf が特異的に腎尿細管、特に近位尿細管に発現していることを確認している⁵⁾。c-maf は、すでに眼形成¹⁷⁾、骨髄腫細胞¹⁸⁾、膵臓の分泌細胞¹⁹⁾、軟骨細胞の分化²⁰⁾²¹⁾ にも関与していることが報告されている遺伝子である。さらに、我々は c-maf 遺伝子欠損マウスを用いて、近位

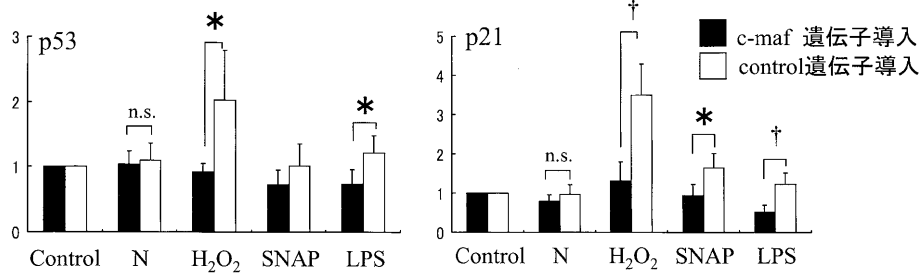


図7 一過性 c-maf 遺伝子導入をした HK-2 細胞へ各種酸化剤を暴露後の p53, p21 mRNA 発現量の相対的变化

p53, p21 mRNA 発現量は, 一過性 c-maf 遺伝子導入した群で有意に減少した. Control を 1 とした相対値で表示した. 数値は平均 ± 標準偏差, n = 4 ~ 6, * : p < 0.05, † : p < 0.01 vs 遺伝子導入群, N : 酸化処理のない群.

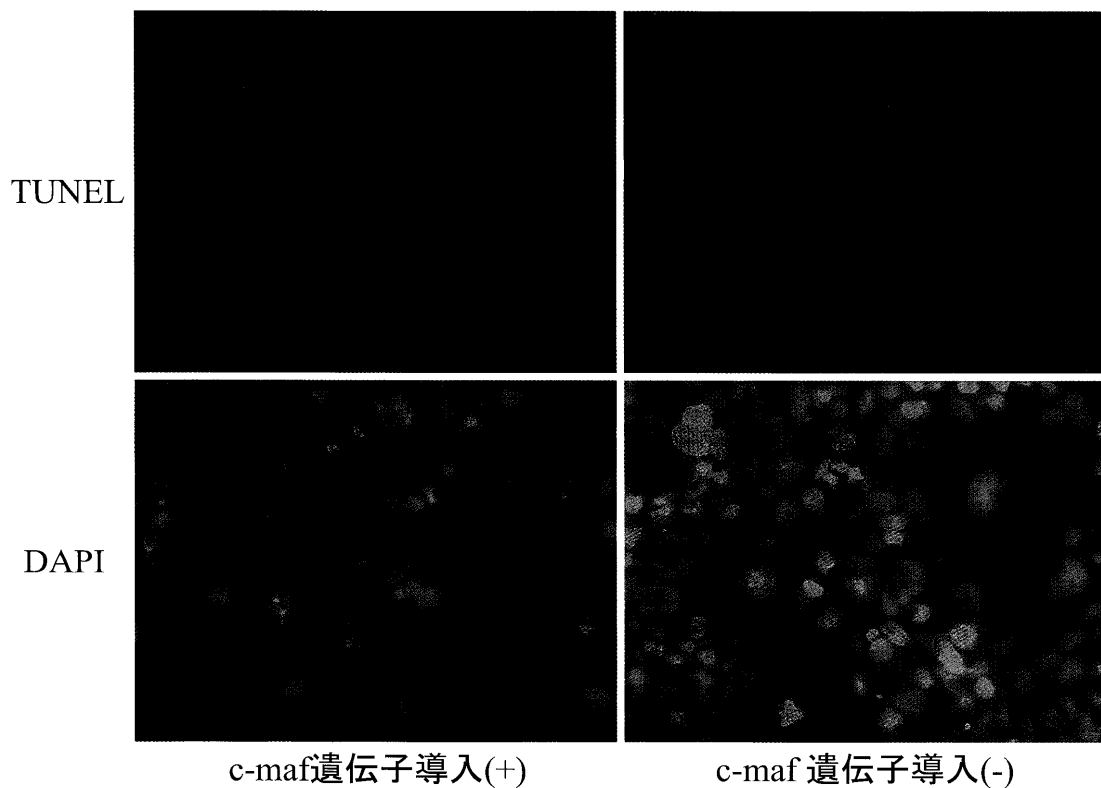


図8 一過性 c-maf 遺伝子導入をした HK-2 細胞における H₂O₂ 暴露後のアポトーシス細胞 TUNEL 陽性細胞は, c-maf 遺伝子導入群で減少している傾向がみられた.

尿管の細胞質が非欠損マウスに比べ小さいことも報告した⁵⁾. このため c-maf が尿管において特異的に発現し, さらに重要な働きに関与していることが考えられた. そして, c-maf 遺伝子欠損マウスの尿管の遺伝子発現プロファイルを用い, 抗酸化遺伝子 glutathione peroxidase-3 (GPx3) の発現が低下することを確認し, *in vitro* の検討で c-maf と GPx3 がシグナル伝達の同カスケードにあることを示し, c-maf が酸化に関連する可能性を報告した⁶⁾. これらの結

果から, c-maf 遺伝子の尿管での働きとしては, 酸化ストレスに関与している可能性が示唆された. そこで, 今回我々は, 典型的な酸化ストレスの実験モデルである尿管 IRI モデルを用いてその発現の変化を観察し, *in vitro* においてもその発現の変化と細胞障害における検討を行った.

In vivo における c-maf 遺伝子の mRNA と蛋白の発現は, IRI において早期より抑制を受け, その後改善することが確認された. さらに, 免疫染色法にお

いても近位尿細管細胞の細胞質内の染色量が同様に変化していることが確認された。腎 IRI モデルでは、主に近位尿細管細胞に障害が生じることはよく知られている²²⁾。そして、inflammatory process、接着分子の発現²³⁾²⁴⁾、reactive oxygen species や nitric oxide の産生などの酸化ストレスが腎障害の進行を促進させると考えられている^{22)25)~32)}。近位尿細管に c-maf 遺伝子が特異的に発現していることから、今回の c-maf 遺伝子の発現量の変化は、IRI に伴うストレスが直接 c-maf 遺伝子の発現量に関与していると考えられる。

IRI は、典型的な酸化ストレスの実験モデルであるが、酸化ストレスが直接 c-maf 遺伝子の発現量の変化に関わっていることを確認するために、*in vitro* での検討を行った。酸化ストレス (H_2O_2) を HK-2 細胞に暴露し、c-maf 遺伝子の発現量を検討した。*In vivo* における結果と同様に、c-maf mRNA の発現量は、早期に抑制を受けた後に改善することが確認され、c-maf 遺伝子の作用が、以前の報告⁶⁾と同様に抗酸化に関与している可能性が示唆された。さらに、HK-2 細胞に一過性 c-maf 遺伝子導入を試み、3 種類の酸化剤 (H_2O_2 , SNAP, LPS) を暴露した条件下で酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現量を検討した。遺伝子導入群では、control 群に比べ、p53 と p21 の mRNA 発現の誘導が抑制される傾向がみられた。酸化ストレス関連遺伝子は、細胞が酸化ストレスに暴露されると、まず p53 が誘導され、さらにその下流遺伝子として p21 や Bax が誘導されることが知られている³³⁾³⁴⁾。今回の検討から、c-maf 遺伝子を過剰発現させた細胞株でこれらの誘導が抑制されたことは、c-maf 遺伝子が抗酸化に関与している可能性がある。また、p21 は、細胞の酸化ストレス下において、細胞増殖停止やアポトーシスの機能を担う分子であることが知られている³³⁾³⁴⁾。このため、HK-2 細胞のアポトーシス細胞の発現数の違いについても検討を行った。c-maf 遺伝子を過剰発現させた HK-2 細胞では、アポトーシス細胞の発現が抑制される傾向がみられ、c-maf 遺伝子が抗アポトーシス作用を有する可能性が考えられた。

以上の *in vitro* の結果を *in vivo* の機序にあてはめると、c-maf 遺伝子はマウスの近位尿細管細胞で抗アポトーシス作用を発揮し、細胞傷害の進展を抑制することにより、腎機能の回復を担った可能性が考えられる。その結果は、腎機能 (PCr 濃度) の改善にも反映されていると考えられる。しかし、早期に

c-maf 遺伝子の mRNA や蛋白が低下したことは、抗アポトーシス作用だけでは説明が困難であり、そして細胞の integrity の低下による変化ともいえる。しかし、c-maf 遺伝子は anti-oxidant response element (ARE) と結合し ARE-mediate gene expression を調節しているとの報告³⁵⁾があり、ARE を介して酸化調節に関わることも考えられている。即ち酸化ストレスの早期には、c-maf 遺伝子は発現を抑えて酸化に関与する経路の調節を行っている可能性も推測される。

本検討の結果を踏まえ c-maf 遺伝子が抗酸化作用や抗アポトーシス作用を有する可能性は、今後さらなる検討により確認される必要がある。濃度や時間依存性の検討を含めた多面的な検証が必要であり、今後さらに研究を深める必要がある。

結 論

酸化ストレス下において、腎皮質尿細管の c-maf mRNA および蛋白発現は、早期に減少し、以後上昇する傾向がみられた。c-maf 遺伝子は腎虚血再灌流障害の病態生理機能に関与することが示唆され、抗酸化作用や抗アポトーシス作用を有している可能性が考えられた。

謝 辞

本研究にご協力をいただいた坪井真由子研究員、寺岡敦子研究員、宗川 愛研究員に深く感謝いたします。本研究の費用の一部は、科学研究費基盤研究(C) 15590862 (土谷 健) による。

文 献

- 1) Cordes SP, Barsh GS: The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* **79**: 1025-1034, 1994
- 2) Fujiwara KT, Kataoka K, Nishizawa M: Two new members of the *maf* oncogene family, *mafK* and *mafF*, encode nuclear b-Zip proteins lacking putative trans-activator domain. *Oncogene* **8**: 2371-2380, 1993
- 3) Kataoka K, Nishizawa M, Kawai S: Structure-function analysis of the *maf* oncogene product, a member of the b-Zip protein family. *J Virol* **67**: 2133-2141, 1993
- 4) Imaki J, Onodera H, Tsuchiya K et al: Developmental expression of *maf-1* messenger ribonucleic acids in rat kidney by *in situ* hybridization histochemistry. *Biochem Biophys Res Commun* **272**: 772-782, 2000
- 5) Imaki J, Tsuchiya K, Mishima H et al: Developmental contribution of c-maf in the kidney: distribution and developmental study of c-maf mRNA in normal mice kidney and histological study of c-maf

- knockout mice kidney and liver. *Biochem Biophys Res Commun* **320**: 1323–1327, 2004
- 6) **Shirota S, Yoshida T, Sakai M et al**: Correlation between the expression level of c-maf and glutathione peroxidase-3 in c-maf $-/-$ mice kidney and c-maf overexpressed renal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 501–506, 2006
 - 7) **Noiri E, Nakao A, Uchida K et al**: Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: F948–F957, 2001
 - 8) **Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Thiernemann C**: Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat proximal tubular cells against oxidant stress. *Kidney Int* **56**: 973–984, 1999
 - 9) **Lloberas N, Torras J, Herrero-Fresneda I et al**: Postischemic renal oxidative stress induces inflammatory response through PAF and oxidized phospholipids. Prevention by antioxidant treatment. *FASEB J* **16**: 908–910, 2002
 - 10) **Okusa MD**: The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure. *Nephron* **90**: 133–138, 2002
 - 11) **Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS et al**: Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* **140**: 831–838, 1992
 - 12) **Padanilam BJ**: Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**: F608–F627, 2003
 - 13) **Yoshida T, Kurella M, Beato F et al**: Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int* **61**: 1646–1654, 2002
 - 14) **Kawai S, Goto N, Kataoka K et al**: Isolation of the avian transforming retrovirus, AS42, carrying the v-maf oncogene and initial characterization of its gene product. *Virology* **188**: 778–784, 1992
 - 15) **Nishizawa M, Kataoka K, Goto N et al**: v-maf, a viral oncogene that encodes a “leucine zipper” motif. *Proc Nat Acad Sci USA* **86**: 7711–7715, 1989
 - 16) **Sadl V, Jin F, Yu J et al**: The mouse Kreisler (Krm11/MafB) segmentation gene is required for differentiation of glomerular visceral epithelial cells. *Dev Biol* **249**: 16–29, 2002
 - 17) **Sakai M, Imaki J, Yoshida K et al**: Rat maf related genes: specific expression in chondrocytes, lens and spinal cord. *Oncogene* **14**: 745–750, 1997
 - 18) **Chesi M, Bergsagel P, Shonukan OO et al**: Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* **91**: 4457–4463, 1998
 - 19) **Mastuoka T, Zhao L, Artner I et al**: Members of the large maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet β cells. *Mol Cell Biol* **23**: 6049–6062, 2003
 - 20) **Maclean EH, Kim JI, Glimcher MJ et al**: Absence of transcription factor c-maf causes abnormal terminal differentiation of hypertrophic chondrocytes during endochondral bone development. *Dev Biol* **262**: 51–63, 2003
 - 21) **Omoteyama K, Ikeda H, Imaki J et al**: Activation of connective tissue growth factor gene by the c-Maf and Lc-Maf transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 1089–1097, 2006
 - 22) **Chien CT, Lee PH, Chen CF et al**: De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* **12**: 973–982, 2001
 - 23) **Rabb H, O’Meara YM, Maderna P et al**: Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int* **51**: 1463–1468, 1997
 - 24) **Bonventre JV**: Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **14**: S55–S61, 2003
 - 25) **Yu BP**: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* **74**: 139–162, 1994
 - 26) **Nath KA, Norby SM**: Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* **109**: 665–678, 2000
 - 27) **Yu L, Gengaro PE, Niederberger M et al**: Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1691–1695, 1994
 - 28) **Peresleni T, Noiri E, Bahou WF et al**: Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. *Am J Physiol* **270**: F971–F977, 1996
 - 29) **Ling H, Edelstein C, Gengaro P et al**: Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* **277**: F383–F390, 1999
 - 30) **Saikumar P, Venkatachalam MA**: Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol* **23**: 511–521, 2003
 - 31) **Bonegio R, Lieberthal W**: Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **11**: 301–308, 2002
 - 32) **di Mari JF, Davis R, Safirstein RL**: Activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury. *Am J Physiol* **277**: 195–203, 1999
 - 33) **Nakamura Y**: Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Sci* **95**: 7–11, 2004
 - 34) **Vogelstein B, Lane D, Levine AJ**: Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307–310, 2000
 - 35) **Dhakshinamoorthy S, Jaiswal AK**: c-Maf negatively regulates ARE-mediated detoxifying enzyme genes expression and anti-oxidant induction. *Oncogene* **21**: 5301–5312, 2002
 - 36) The NCBI is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>