



Important role for fibronectin-EⅢA in renal tubular repair and cellular recovery in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤本, 大貴 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1213">http://hdl.handle.net/10271/1213</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 360号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏 名	藤 本 大 貴		
論文題目	<p>Important role for fibronectin-EHIIA in renal tubular repair and cellular recovery in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats  (酢酸ウラニウム誘発急性腎不全ラットの尿細管修復と細胞回復における細胞性フィブロネクチン EHIIA の役割)</p>		

博士(医学) 藤 本 大 貴

## 論文題目

Important role for fibronectin-EIHA in renal tubular repair and cellular recovery in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats

(酢酸ウラニウム誘発急性腎不全ラットの尿細管修復と細胞回復における細胞性フィブロネクチン EIHA の役割)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

細胞外基質(extracellular matrix; ECM)であるフィブロネクチン(Fn)は細胞移動、細胞増殖や他の ECM の産生などを介し創傷治癒に重要な役割を果たす。これら Fn の機能は、その受容体である  $\beta 1$  integrin を介して生ずるため、創傷治癒過程では Fn 産生と  $\beta 1$  integrin 発現が密接に関与すると考えられる。

Fn は血漿 Fn(pFn)と組織 ECM としての細胞性 Fn(cFn)の二形態がある。cFn のうち創傷治癒に関与するとされている cFn-EIHA は、正常組織ではほとんど発現せず、皮膚、肝、肺が障害を受けた際の上皮再生の場で発現を認める。腎では胎生期や腎疾患で cFn-EIHA と  $\alpha$ 平滑筋アクチン陽性細胞(筋線維芽細胞形質)が時間的及び空間的に共発現することが報告され組織修復や再構築への関与が示唆されている。急性腎不全における組織修復は、創傷治癒の特殊型と考えられ、ラット虚血性急性腎不全ではその修復過程に cFn-EIHA が発現することが報告されているが、その産生細胞は明らかではない。腎毒性急性腎不全では、尿細管修復過程に  $\alpha$ 平滑筋アクチン陽性細胞が関与する可能性を我々は報告しているが、cFn の発現の有無や産生細胞については全く検討されていない。

本研究では、酢酸ウラニウム誘発ラット急性腎不全の発症・修復過程における cFn-EIHA の出現とその産生細胞及びその受容体  $\beta 1$  integrin 発現を検討することにより cFn と  $\beta 1$  integrin の役割を明らかにしようとした。

### [材料ならびに方法]

雄 SD ラット(200-250g)に酢酸ウラニウム(UA) 5 mg/kg を静注し急性腎不全(ARF)を惹起した。ARF 誘発後、第 2、3、4、5、7、9、15、21 日に屠殺し、腎組織より光顕標本、凍結標本、免疫電顕標本の作成と、RNA の抽出を行った。ARF の経過は血清クレアチニン値と尿細管上皮細胞数の経時的変化にて評価した。免疫及び組織化学的検討にて、ECM ではラミニン、タイプ III コラーゲン、タイプ IV コラーゲン、硫化プロテオグリカン、cFn を、また  $\alpha$ 平滑筋アクチン(筋線維芽細胞マーカー)、ED1(単核球/マクロファージのマーカー)、 $\beta 1$  integrin(Fn 受容体)、TGF- $\beta 1$ (ECM 産生刺激サイトカイン)の発現を検討した。cFn-EIHA、 $\beta 1$  integrin の超微局在は包埋前免疫電顕法にて確認した。cFn-EIHA、 $\beta 1$  integrin 及び TGF- $\beta 1$  は RT-PCR 法を用いて腎皮質・髄質外層でのメッセージ発現も検討した。

### [結果]

- (1) 腎機能障害のマーカーである血清クレアチニン値は UA 投与後 3 日目より有意に上昇し、7 日目にピークとなり、15 日目にベースラインに回復した。
- (2) 近位尿細管傷害及び回復のマーカーとしての近位尿細管細胞数は 2 日目より減少を認め、5 日目に最小となり以降回復に向かった。7 日目の時点で露出尿細管基底膜はほぼ再生上皮細胞で覆われた。

- (3) 正常コントロールラットでは発現の認めない cFn は、2 日目より傷害を受けた尿細管周囲を含めた髄質外層外帯の傍尿細管領域に出現し以降持続して発現した。4 日目からは再生尿細管基底膜にも染色を認めた。ラミニン、タイプ III、IV コラーゲンは、観察期間中、正常コントロールとはほぼ同程度の沈着であった。硫酸プロテオグリカンは 7 日目から 21 日まで一部の傍尿細管領域に染色が増強した。一方、Fn 受容体である  $\beta 1$  integrin は正常では尿細管の基底膜と軽度間質に認め、2 日目より傍尿細管領域の傷害部間質に強く認め、7 日目以後徐々に正常パターンへと戻った。
- (4) 浸潤 ED1-陽性マクロファージ及び  $\alpha$  平滑筋アクチン陽性筋線維芽細胞は 2 日目より尿細管間質に有意に増加し、それぞれ 5 日目と 7 日目にピークとなり、その後減少した。TGF- $\beta 1$  は、2 日目には傷害尿細管細胞に、5 日目には傷害尿細管周囲の間質細胞に、7 日目には明らかに再生尿細管細胞に新たな染色を認めた。
- (5) 免疫電顕上 cFn は 2 日目に主に傍尿細管毛細血管内皮に認め、その後露出尿細管基底膜近傍の線維芽細胞とごくわずかに浸潤白血球周囲にも認めた。cFn は露出尿細管基底膜部位に局在した。5 ~ 7 日以後は再生尿細管細胞の基底側細胞膜と尿細管基底膜に cFn が陽性であった。 $\beta 1$  integrin は正常では尿細管基底膜に認め、ARF 発症後傍尿細管毛細血管内皮、線維芽細胞に認め、5 日目には再生尿細管細胞の全周に弱く認め、7 ~ 9 日目に再生細胞の成熟に伴い基底膜側のみに認められるようになった。
- (6) cFn mRNA の発現は、免疫染色同様 2 日目より著明な増加を認め、徐々に増加し 9 日目にピークとなり維持された。 $\beta 1$  integrin mRNA の発現は、2 日目より増加を認め、4 ~ 7 日目をピークとし、その後、減少傾向を認めた。TGF- $\beta 1$  mRNA は、3 日目より有意に増加し、15 日目までピークは維持され 21 日目に減少傾向を認めた。TGF- $\beta 1$  は cFn の発現より遅れて出現することから、cFn の初期発現に関与している可能性は少ないと考えられた。

#### 〔考察〕

cFn が酢酸ウラニウム誘発急性腎不全での主たる組織傷害部位である髄質外層外帯の再生尿細管上皮近傍毛細血管内皮細胞と線維芽細胞に、 $\beta 1$  integrin の発現を伴って、尿細管の修復過程に一致して発現を認めたこと、他の ECM の発現を伴わず特異的な発現であったこと、などから尿細管の修復に関与している可能性がある。

cFn と  $\beta 1$  integrin の産生細胞は尿細管細胞傷害早期では主として髄質外層外帯の傍尿細管毛細血管内皮細胞と線維芽細胞であり、後には再生尿細管細胞上皮も産生に関与することが証明された。

#### 〔結論〕

髄質外層外帯の傍尿細管毛細血管内皮細胞や線維芽細胞、再生尿細管細胞で産生された cFn は paracrine や autocrine 的に再生尿細管細胞へシグナル伝達し尿細管の修復に関与していることが示唆される。

### 論文審査の結果の要旨

本申請者の教室では、ラットに対して酢酸ウラニウム投与を行い、発生する腎障害を急性腎不全のモデルとして、長年に亘って研究を行っている、今回は、この修復過程において筋線維芽細胞と思われる

$\alpha$ 平滑筋アクチン陽性細胞が出現し、これと期を一にして細胞外基質(extracellular matrix: ECM)内に、正常では発現していない胎児性フィブロネクチンである細胞性フィブロネクチン EHIA(以下 cFn)が出現することに興味をもち、本物質の動態、および腎障害修復過程におけるその役割について検討した。

実験動物としては雄 SD ラット(200-250g)を用い、酢酸ウラニウム(UA) 5 mg/kg を静注し、腎障害誘発後 2～21日に屠殺し、腎の組織学的検討を行った。また、一部の物質については RT-PCR 法を用いて腎皮質～髄質外層での mRNA 発現量を検討した。

腎機能障害を血清クレアチニン値でみると、投与後 3 日目より上昇、7 日目にピークとなり、15 日目に正常値に回復した。

組織学的には、近位尿細管細胞は 2 日目には脱落し、このために上皮を失い露出された尿細管基底膜が広範に拡がった、

マクロファージ(ED1陽性細胞)は、正常ではごく少ないが、酢酸ウラニウム障害が発生すると増加し、5 日をピークとして消失していった。

$\alpha$ -SMA(平滑筋アクチン)陽性細胞は正常では血管壁にしか認められない、それが 2 日目には増強されるとともに、他方では  $\alpha$ -SMA 陽性な筋線維芽細胞が尿細管基底膜に沿って散在性に現れ、7 日目には傷害尿細管の全周をほぼ取り囲むようになる。そして 7 日目をピークとしてこの  $\alpha$ -SMA 陽性細胞は消失していった。

cFn は免疫電顕では 2 日目に主に傍尿細管毛細血管内皮に認められるのみであった。それが、露出尿細管基底膜周囲を取り囲む平滑筋線維芽様細胞に強く出現するようになった。他にはごくわずかに浸潤白血球周囲にも認められた。4 日目からは光顕でも露出尿細管基底膜に認められるようになった。

上皮細胞は 5 日目からは回復に向かい、上述の cFn 陽性の露出基底膜の上を次第に覆うようになった。再生した尿細管細胞と基底膜の間には引き続き cFn がしばらくの間、認められていた。7 日目には尿細管内腔は再生上皮細胞でほぼ覆われるようになった。

cFn 受容体である  $\beta$ 1 インテグリンは正常では尿細管の基底膜および間質に軽度認められ、2 日目より傍尿細管領域の傷害部間質に強く認め、7 日目以後徐々に正常パターンへと戻った。ラミニン、タイプ III、IV コラーゲンは、観察期間中、正常コントロールとはほぼ同程度の沈着であった、硫化プロテオグリカン は 7 日から 21 日目まで一部の傍尿細管領域に染色が増強したのみであった。TGF- $\beta$ 1 は cFn の発現より遅れて出現することから、cFn の初期発現に関与している可能性は少ないと考えられた。

以上を要約すると、上皮細胞脱落とともに尿細管基底膜の外側を  $\alpha$ -平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞網が取り囲み、ここに cFn が強く出現するようになり、4 日目からはこの cFn が露出尿細管基底膜に拡がるのが光顕でも認められるようになった、上皮細胞は 5 日目から回復に向かい、この cFn 陽性の露出基底膜の上を次第に覆うようになったということであり、筋線維芽細胞網の発達と、基底膜上に拡げられた cFn が、分裂増殖した上皮細胞の尿細管再形成に重要な役割を果たすと考えられる、なお、申請者は再生した上皮細胞から cFn が産生されていると主張し、最初は再生尿細管由来細胞性フィブロネクチンと謳っていたが、上述のような経過を考えると尿細管基底膜を取り囲む平滑筋線維芽細胞から分泌されたと考えた方が妥当と思われた。

本論文内容の説明に引き続き以下のような、論文内容と関連した質問がなされた。

また、英語の表現など、論文内容について、数箇所修正を求めた。

