



Plasma protein extravasation and vascular endothelial growth factor expression with endothelial nitric oxide synthase induction in gentamicin-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: 後藤, 哲男 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1266

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 4 1 3 号	学位授与年月日	平成 1 6 年 3 月 2 3 日
氏 名	後 藤 哲 男		
論文題目	Plasma protein extravasation and vascular endothelial growth factor expression with endothelial nitric oxide synthase induction in gentamicin-induced acute renal failure in rats (ゲンタマイシン誘発ラット急性腎不全における血漿蛋白漏出と血管内皮型一酸化窒素合成酵素誘導を伴う血管内皮増殖因子発現)		

論文題目

Plasma protein extravasation and vascular endothelial growth factor expression with endothelial nitric oxide synthase induction in gentamicin-induced acute renal failure in rats

(ゲンタマイシン誘発ラット急性腎不全における血漿蛋白漏出と血管内皮型一酸化窒素合成酵素誘導を伴う血管内皮増殖因子発現)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Vascular endothelial growth factor (VEGF, 血管内皮増殖因子) は血管透過性亢進を誘導するが、その作用発現には endothelial nitric oxide synthase (eNOS, 血管内皮型一酸化窒素合成酵素) の関与が報告されている。創傷の場合は VEGF と eNOS の発現による微小血管の透過性亢進が生じ、漏出したフィブロンectinやフィブリノゲン等の血漿蛋白は細胞外基質再構成を介して創傷治癒に関与することが知られている。急性腎不全も尿細管上皮細胞傷害後に再上皮化がみられることより創傷治癒の一形態と考えられるが、急性腎不全の過程における微小血管の透過性亢進についての報告はない。本研究ではゲンタマイシン誘発ラット急性腎不全モデルを用いて、その経過における腎内の微小血管の透過性亢進の有無、VEGF と eNOS の発現を検討した。さらに N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 投与により一酸化窒素 (NO) の合成を抑制し、NO と微小血管の透過性及び尿細管細胞回復との関連を検討した。

[材料ならびに方法]

44 匹の雄性 Wistar ラットにゲンタマイシン 400 mg/kg/day を 8 時間毎に 2 日間皮下注射し急性腎不全を惹起した。ゲンタマイシン投与開始後 2 日目より数えて 0, 2, 6, 10 日目に血清クレアチニン値測定のため血清を採取し、その後屠殺し腎臓を摘出した。腎組織は免疫染色用に 4% パラホルムアルデヒド、メタカルン溶液、10% ホルマリンで各々固定し、一部は蛍光抗体法用に凍結切片を作成、残りの腎組織はウェスタンブロット用に凍結保存した。

微小血管の透過性は、30 匹の Wistar ラットを用い、正常コントロール群及びゲンタマイシン群に分子量 250 kDa あるいは 70 kDa の fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識デキストラン 100 μ g/g をトレーサーとして頸静脈より注入し 1 分後に屠殺した。腎組織をホルマリン固定後パラフィン切片を作成し蛍光顕微鏡で観察した。また、電子顕微鏡用に組織を 2% グルタルアルデヒドで固定した。

NO 合成阻害実験として、8 匹の Wistar ラットに NO 合成阻害剤である L-NAME をゲンタマイシン投与開始後 2 日目から数え 3 から 6 日までの尿細管細胞回復期に 100 mg/kg/day 皮下注射した。L-NAME 群と同数の vehicle 群を作成し、6 日目に血清クレアチニン値、注入デキストラン (250 kDa) の漏出、増殖尿細管細胞数について検討した。

腎組織障害度は Periodic acid Schiff 染色切片にて近位尿細管 cross section 上の尿細管上皮細胞の核数を 400 倍で 40 視野計測し半定量化した。

免疫染色はパラフィン切片上で施行し、VEGF, VEGF 受容体 1, 2, eNOS 及び増殖細胞は Ki67、浸潤マクロファージは ED1 にて染色した。皮質での Ki67 及び ED1 陽性細胞数

を400倍で40視野計測し半定量化した。また、血管内皮はRECA1にて染色し、Ki67との二重染色も施行した。蛍光抗体法は、凍結切片上にてフィブロネクチンとフィブリノゲンを染色した。

ウェスタンブロットは0,2,6,10日目の腎皮質でのVEGFとeNOSの発現を検討した。

[結果]

ゲンタマイシン投与群はコントロール群に比べ、2日目で血清クレアチニン値は有意に増加し6日目に最高となった。尿細管障害は0日目から認め6日目に最も強くなったが、6日目には再生尿細管上皮の出現も認められた。VEGFはコントロール群で近位尿細管上に淡い染色を認め、ゲンタマイシン群では0日目から近位尿細管細胞質内に顆粒状に染色され、6日目には再生尿細管上皮にも染色を認めた。VEGF受容体1,2はともにコントロール群では傍尿細管毛細血管内皮に染まり、ゲンタマイシン群においても観察期間中染色部位や染色強度の変化を認めなかった。eNOSはコントロール群で糸球体内皮に強く、傍尿細管毛細血管には弱い染色を認めるのみであったが、ゲンタマイシン群では観察期間を通して傍尿細管毛細血管内皮での染色性の増強を認めた。一方、内皮細胞マーカーRECA1染色は傍尿細管毛細血管で6日目に一過性に染色性が低下した。Ki67陽性増殖尿細管細胞は2日目から有意に増加し6日目に最多となった。また、RECA1とKi67の二重染色ではKi67陽性の内皮細胞数の増加を認めず、内皮細胞の明らかな増殖は認めなかった。ED1陽性浸潤マクロファージは2日目より増加し6日目に最多となった。フィブリノゲン、血漿型フィブロネクチン染色は、コントロール群では傍尿細管毛細血管内に僅かに認めるのみだったが、0日目には傍尿細管毛細血管外の傍尿細管領域に出現し、2日目には尿細管基底膜に沿い、一部は尿細管管腔内にも認め6日目に最も顕著になった。注入FITC標識デキストランも同様な分布の変化を認めた。透過電子顕微鏡観察ではコントロール群ではデキストラン粒子が傍尿細管毛細血管内に留まっているのに対し、ゲンタマイシン群では傍尿細管毛細血管内皮細胞内、尿細管基底膜内、尿細管管腔内にも認めたが、内皮細胞の剥離、血管の断裂は認めなかった。ウェスタンブロットではVEGF, eNOS共にゲンタマイシン群で蛋白の増加が確認された。

回復期のL-NAME投与によるNO抑制実験では、vehicle群に比しL-NAME群で6日目の血清クレアチニン値の高値、FITC標識デキストラン漏出の減少、Ki67陽性細胞数の減少が確認された。

[考察]

ゲンタマイシン誘発急性腎不全ラットの尿細管細胞傷害から修復において、血漿蛋白漏出と注入FITC標識デキストランの漏出を認め、傍尿細管毛細血管の透過性亢進が確認された。傍尿細管毛細血管内皮細胞の超微形態観察結果より、透過性亢進は機能的に生じていると考えられ、内皮細胞内経路による漏出も示唆された。同過程においてVEGF, eNOSの発現増加を認め、透過性亢進にVEGF/VEGFレセプター系及びeNOSの関与が示唆された。また、L-NAME投与により傍尿細管毛細血管の透過性亢進の抑制、腎機能の増悪、尿細管細胞再生の遅延を認めたことから傍尿細管毛細血管の透過性亢進が尿細管修復に関与する可能性が示唆された。

[結論]

ゲンタマイシン誘発急性腎不全ラットにおいて認めた傍尿細管毛細血管透過性亢進によ

る血漿蛋白の漏出は、VEGF/VEGF レセプター系及び eNOS の関与が示唆された。この血漿蛋白漏出は創傷治癒においてと同様に細胞外基質再構築を介し尿細管修復に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

フィブリノーゲン (fbg) やフィブロネクチン (FN) は血管外組織で創傷治癒を促進するとされる。申請者はゲンタマイシン惹起腎尿細管障害モデルを用い、尿細管障害及び修復過程における血管外への fbg 及び血漿 FN (pFN) の漏出と、これに関わる vascular endothelial growth factor (VEGF) 及び endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の発現量及び局在の変化を検討するとともに、NO 産生阻害の影響を解析して、組織修復における血管透過性調節因子の影響を検討した。

ゲンタマイシンを 2 日間 (8 時間毎) 皮下注 (400mg/kg 体重/日) して作成した腎尿細管障害ラット (雄性 Wistar rats) を、ゲンタマイシン投与前及び投与終了後 8 時間 (0 日)、2、6、10 日に屠殺し検体 (血液及び腎組織) を得た。組織中の fbg、pFN、VEGF 受容体、VEGF 及び eNOS の発現局在及び発現量を免疫染色及び western blotting 法で検討した。微小血管透過性は蛍光標識デキストラン (250kDa、70kDa) を用いて評価した。また増殖細胞、浸潤マクロファージ、血管内皮細胞をそれぞれ、Ki67、ED1、rat endothelial cell antigen (RECA)-1 の染色性で評価した。

ゲンタマイシン投与 2 日目より血清クレアチニンが増加し、6 日目に極値を示した後漸減した。これは組織切片で評価した尿細管障害の進行程度と良く一致した。Ki67 染色で評価した増殖尿細管細胞は 2 日目より有意に増加し 6 日目に最多となり腎機能回復過程と一致した。しかし内皮細胞増殖の有意な増加は認められなかった。fbg 及び pFN はコントロール群では傍尿細管毛細血管内に認めるのみであったが、0 日目に血管外への漏出を認め、2 日目には尿細管基底膜周囲また尿細管腔内にも増加し 6 日目に最も顕著となった。ED1 陽性浸潤マクロファージは 2 日目より有意に増加し 6 日目に最多となった。これらより、尿細管細胞の増殖による尿細管再生に fbg 及び pFN の血管外への漏出及びマクロファージの浸潤が関与しているとしている。注入蛍光標識デキストランは傍尿細管毛細血管内皮細胞内、尿細管基底膜内、尿細管管腔内に認められ、fbg 及び pFN の分布と一致した。透過電子顕微鏡観察により、内皮細胞傷害は軽微で形態は保たれ、intercellular junction の拡大も認めないことから fbg 及び pFN は内皮細胞の透過性の機能的な亢進により漏出したと考えられ、内皮細胞内経路による漏出の可能性も考えられた。VEGF はコントロール群で近位尿細管上には淡く染まるのみであったが、0 日目から近位尿細管細胞質内に顆粒状に染色され、6 日目には再生尿細管上皮にも染色を認めた。一方傍尿細管毛細血管内皮に染色された VEGF 受容体は 1、2 型共に経過を通じて変化しなかった。eNOS はコントロールでは糸球体内皮に強く、傍尿細管毛細血管内皮は弱く染色されるのみであったが、ゲンタマイシン投与に伴い後者での染色性の増強を認めた。回復期 (ゲンタマイシン投与終了 3-6 日後) に N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) により一酸化窒素 (NO) の合成を抑制すると、蛍光標識デキストラン漏出が抑えられると共に Ki67 陽性細胞数が減少し、血清クレアチニン値の更なる上昇が認められた。

以上より、ゲンタマイシン誘発尿細管障害における尿細管修復過程において、障害尿細管細胞での VEGF の産生が高まる事が重要であり、血管内皮上の VEGF 受容体を介して eNOS による NO 産生を高め、血管内皮の透過性の亢進により漏出する血漿中の fbg や FN

が、尿細管細胞の増殖及び尿細管の修復を促進するとした。

本学位論文はゲンタマイシン誘発尿細管障害モデルを用いて、組織修復における血管透過性亢進及びそれに伴う血漿蛋白漏出の重要性を、VEGF 及び eNOS の発現量及び局在の変化という新規な観点から詳細に検討し、また NO 合成阻害剤を用いて機能的にもその重要性を実証した点が、審査委員会で高く評価された。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

- 1) ゲンタマイシンの腎障害の特徴とゲンタマイシン投与量の妥当性
- 2) ゲンタマイシンによる尿細管障害における阻血の関与の可能性
- 3) 尿細管障害の判定方法の妥当性
- 4) 蛍光標識デキストラン投与実験における屠殺時間の妥当性
- 5) 電頭用組織標本作製方法の妥当性
- 6) 血管内皮透過性亢進の機序
- 7) 血管内皮透過性亢進における caveolae の役割
- 8) VEGF 発現亢進の機序
- 9) eNOS 発現亢進の機序
- 10) 障害尿細管部位での膠質浸透圧
- 11) 治療への応用の可能性

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	浦 野 哲 盟	
	副査	瀧 川 雅 浩	副査 鈴 木 和 雄