



Acquired resistance to rechallenge injury with uranyl acetate in LLC-PK1 cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 古谷, 隆一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1580

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	医博論第 303号	学位授与年月日	平成11年 3月 9日
氏 名	古 谷 隆 一		
論文題目	<p>Acquired resistance to rechallenge injury with uranyl acetate in LLC-PK₁ cells (酢酸ウラニウム誘発急性腎不全の抵抗性獲得に関する LLC-PK₁ cell での検討)</p>		

博士(医学) 古 谷 隆 一

論文題目

Acquired resistance to rechallenge injury with uranyl acetate in LLC-PK₁ cells

(酢酸ウラニウム誘発急性腎不全の抵抗性獲得に関するLLC-PK₁ cellでの検討)

論文内容の要旨

[はじめに]

急性腎不全からの回復期には、新たな侵襲による急性腎不全が発症しにくい事が動物の急性腎不全モデルで報告され、急性腎不全に対する抵抗性獲得現象として知られている。我々はこれまで酢酸ウラニウム誘発急性腎不全モデルを用いた *in vivo* での検討で、2回目の侵襲時には尿細管壊死の程度が著しく軽減される事を示し、急性腎不全の抵抗性獲得の機序は腎血行動態を介する機序よりも腎尿細管障害の軽減を介する機序が重要であると推論した。そこで、抵抗性獲得の機序に関して培養尿細管細胞を用い *in vitro* の系で検討する。

[材料ならびに方法]

近位尿細管由来の樹立細胞である LLC-PK₁細胞を用いた。培養液中に各種濃度の酢酸ウラニウムを投与し、酢酸ウラニウム投与24、48時間後に細胞より放出される LDH を細胞タンパク量で補正した値 [LDH/Protein (LDH/P)] を指標として細胞障害の程度を比較検討した。

(1) 実験系の確立

培養液中の酢酸ウラニウム濃度を、 0.3×10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} M としたときの LDH/P はそれぞれ、24時間 (2.7 ± 0.2 、 3.7 ± 0.3 、 $6.8 \pm 0.5^{**}$ 、 $14.1 \pm 1.0^{**}$: $p < 0.01$)、48時間 (5.5 ± 0.6 、 6.8 ± 0.5 、 $10.2 \pm 0.4^{*}$ 、 $31.5 \pm 3.6^{**}$: $^{*}, p < 0.05$, $^{**}, p < 0.01$) であり、この結果は酢酸ウラニウム 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} M の24時間後には軽度の細胞障害を、 1×10^{-3} M の48時間後には強い細胞障害を惹起する事を示す。

(2) 抵抗性の獲得

LLC-PK₁細胞を各種濃度 (0.3×10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} M) の酢酸ウラニウムを含む培養液で24時間培養する。その後細胞を分離し酢酸ウラニウムを含まない培養液を用いて培養し、十分増殖した時点で再び酢酸ウラニウム 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} M を培養液中に投与し48時間培養した後、LDH/Pを測定する。

(3) Heat stress protein (HSP) の関与

① Heat stressの影響

LLC-PK₁細胞に42°C、30分の heat stress をかけた後、細胞を分離、培養し増殖した時点で酢酸ウラニウム 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} M を培養液中に投与し48時間培養した後、LDH/Pを測定する。さらに、HSPの合成阻害を行うケルセチン100 μ M、スタウロスポリン0.1 μ g/ml を培養液中に投与し同様の実験を行った。

② 抵抗性獲得へのHSPの影響

ケルセチン100 μ M、スタウロスポリン0.1 μ g/ml を培養液中に投与し、(2)と同様に実験を行った。

〔結果〕

(1) 抵抗性の獲得

0.3×10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} M の酢酸ウラニウムに24時間暴露した細胞で、2回目の酢酸ウラニウム 1×10^{-3} M 48時間暴露後の LDH/P はそれぞれ、 31.5 ± 3.6 、 38.6 ± 7.0 、 $15.2 \pm 1.4^{**}$ 、 $15.1 \pm 0.7^{**}$ (** , $p < 0.01$) であり、1回目に軽度の細胞障害を来す 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} M で培養した群では2回目の酢酸ウラニウム投与後の LDH/P の上昇が有意に抑制された。この事は、あらかじめ軽度の細胞障害をおこす酢酸ウラニウムに暴露された群では2回目の強い侵襲に抵抗性が獲得されていることを示す。

(2) Heat stress proteinの関与

1回目が無処置、heat stress、heat stress + ケルセチン、heat stress + スタウロスポリンに24時間暴露された細胞での2回目の酢酸ウラニウム 1×10^{-3} M 48時間暴露後の LDH/P はそれぞれ、 31.5 ± 3.6 、 $7.6 \pm 0.6^{**}$ 、 33.7 ± 1.5 、 28.0 ± 1.5 (** , $p < 0.01$) であり、heat stress protein が抵抗性獲得に関与することが示唆された。さらに、1回目が無処置、酢酸ウラニウム、酢酸ウラニウム + ケルセチン、酢酸ウラニウム + スタウロスポリンの2回目の酢酸ウラニウム 1×10^{-3} M 48時間暴露後の LDH/P はそれぞれ 31.5 ± 3.6 、 $15.1 \pm 0.7^{**}$ 、 42.5 ± 1.1 、 38.9 ± 1.8 (** , $p < 0.01$) であり、酢酸ウラニウム誘発細胞障害に対する抵抗性獲得に関しても heat stress protein が関与することが示唆された。

〔考察〕

今回の検討で、酢酸ウラニウムにより一度細胞障害が惹起された LLC-PK₁細胞では、2回目の酢酸ウラニウム投与によっても細胞障害は惹起されにくい事を示した。今回の実験で用いた LLC-PK₁細胞は近位尿細管由来の樹立細胞であり、この結果は酢酸ウラニウム誘発急性腎不全で認められる抵抗性獲得の機序の少なくとも一部が尿細管細胞レベルでの変化に起因する事を示している。

酢酸ウラニウム誘発細胞障害に対する抵抗性獲得は、heat stress で前処置をした場合にも酢酸ウラニウムで前処置をした場合と同様に認められた。さらに、heat stress protein の合成阻害を行うケルセチン、スタウロスポリンを用いるとこの抵抗性は消失した。したがって、酢酸ウラニウム誘発細胞障害の抵抗性獲得に、“heat stress によって誘導され、かつケルセチン、スタウロスポリンにより抑制されるもの”の関与が示唆される。すなわち heat stress protein がもっとも考えられるが、ケルセチン、スタウロスポリンには共通して protein kinase C 抑制作用があることも知られており、他の機序の関与も否定はできない。

〔結論〕

酢酸ウラニウム誘発急性腎不全で認められるものと同様の抵抗性獲得が LLC-PK₁細胞でも認められ、この機序に heat stress protein が関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

急性腎不全の回復期にある腎に対して、もういちど急性腎不全を生ずるような侵襲を加えても、通常の腎と比較して抵抗性を有することが知られている。この抵抗性がどのような機序によるものか、興味ある現象である。

本申請者は酢酸ウラニウム投与による急性腎不全モデルを用いて種々な研究を行ってきた。急性腎

不全の研究においては生体の循環系が重視される傾向があったが、これまでの一連の研究から、酢酸ウラニウムによる抵抗性の獲得に関しては血行動態や糸球体の変化が関与する可能性は低く、本物質が近位尿細管細胞を障害し、抵抗性も直接に細胞レベルで成立するのではないかと考えられた。

そこで、すでに確立している近位尿細管細胞由来の細胞株である LLC-PK₁細胞を用い、細胞障害の指標としては培養液中に放出されるLDH酵素活性を測定し、放出LDH量/細胞蛋白量 (Wroblewski unit / $\mu\text{g protein}$) として定量的に表現した。その結果、以下のような結果が得られた。

- 1) 障害を与えるには48時間酢酸ウラニウムと接触させるのがよい。
- 2) $1 \sim 5 \times 10^{-4}\text{M}$ では障害は軽度であるが、 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ では明らかな障害作用が認められる。
- 3) ほとんど障害を与えない $1 \times 10^{-4}\text{M}$ で処理した細胞では抵抗性が獲得されなかったが、 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ で処理した細胞は抵抗性を獲得していた。
- 4) この抵抗性を獲得した細胞に対して、heat shock protein (hsp) 合成を阻害するという quercetin や staurosporineを加えると、通常の細胞と同様の障害が生じた。
- 5) 前処理を42℃30分のheat stressに置き換えても、結果は同様であった。

以上のように、本申請者が酢酸ウラニウム投与による急性腎不全の耐性獲得現象を *in vitro* で再現することに成功したことは大いに評価するとができる。このモデル系を用いた実験により、耐性獲得が酢酸ウラニウム濃度依存性ではなく、酢酸ウラニウムによる細胞障害により二次的に生じる非特異的なものであることが示唆された。これは、heat stress処理によっても酢酸ウラニウムによる前処理と同様の効果を示し、heat stressによって酢酸ウラニウム障害に対する抵抗性を獲得すること、しかもhsp合成阻害物質が、どちらの前処理に関しても、その耐性獲得効果を失わせることから、両者は共通の機序としてhspを介して耐性現象を示している可能性が示された。これは非常に興味ある所見であり、今後この方面の研究の発展が期待される。

このような申請者の発表に対して、審査委員から次のような質問が行われた。

- 1) LLC-PK₁はどのような細胞か、近位尿細管細胞と考えてよいか
- 2) 培養液に血清を加えないと、それだけで細胞にstressにならないか
- 3) 酢酸ウラニウムの添加で、どのくらいの細胞が死ぬのか
- 4) 接触培養後、十分増殖したところで2回目の侵襲を加えるというが、時間としては何時間くらいか
- 5) それは*in vivo*の実験における14日目の再投与に相当していると考えてよいか
- 6) 抵抗性はどのようなかたちで分裂する細胞に伝えられるのか。この性質はいつ頃まで維持されるのか
- 7) 形態的にはどのような所見か
- 8) hsp産生増加の直接的な証明はなされなかったのか
- 9) 阻害薬の投与は1回目の侵襲で投与するのと、2回目の侵襲で投与するのと、どちらの方が抵抗性を阻害する効果が強いのか
- 10) hsp産生が抵抗性獲得に関与するとして、どのような機序で耐性を示すのか
- 11) hspにもいろいろあるが、どのhspが関与するのか
- 12) 細胞周期とは関係ないか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点をよく理解しており、本論文は博士（医学）の学位授与に値すると審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 公 生

副査 教授 橋 本 久 邦 副査 助教授 内 藤 恭 久