



Distinct population of tubular cells in the distal S3 segment contribute to regeneration of S3 after 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: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 榎間, 昌哲 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/780">http://hdl.handle.net/10271/780</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 5 1 8 号	学位授与年月日	平成 2 0 年 1 1 月 2 1 日
氏 名	榊 間 昌 哲		
論文題目	Distinct population of tubular cells in the distal S3 segment contribute to regeneration of S3 after uranyl acetate-induced acute renal failure in rats (S3 セグメント遠位端の特異な尿細管細胞集団は酢酸ウラニウム誘発ラット急性腎不全における S3 セグメントの再生に寄与する)		

博士(医学) 榊 間 昌 哲

## 論文題目

Distinct population of tubular cells in the distal S3 segment contribute to regeneration of S3 after uranyl acetate-induced acute renal failure in rats

(S3 セグメント遠位端の特異な尿細管細胞集団は酢酸ウラニウム誘発ラット急性腎不全における S3 セグメントの再生に寄与する)

## 論文内容の要旨

[はじめに]

臓器特異的な前駆細胞が種々の組織再生に関与することが報告されているが、腎尿細管の再生細胞の起源や再生時の動態は明らかとは言えない。我々は広範な近位尿細管 S3 セグメントの障害を惹起する酢酸ウラニウム (uranyl acetate, UA) 誘発ラット急性腎不全モデルにおいて、UA 投与 2～3 日後に S3 セグメント遠位端より初期増殖細胞 (以後、標的細胞) が出現することを見出した。この標的細胞が同モデルにおける S3 セグメントの再生を担う特異な細胞群との仮説を立て、その特性を前駆細胞の特性との比較で検討した。

[材料ならびに方法]

Sprague-Dawley ラットに UA 4 mg/kg 静注し高度尿細管障害を伴う急性腎不全モデルを作成した。また、UA 0.25 mg/kg 静注し軽度尿細管障害を作成した。急性腎不全モデルにおいて UA 投与 2～3 日後に出現する標的細胞を  $^3\text{H}$ -thymidine (100  $\mu\text{Ci}/100\text{g}$ ) または bromodeoxyuridine (BrdU) (40 mg/kg) を 12 時間毎に投与し標識した。

### 1. slow cycling cell 特性、増殖動態及び成熟能の検討

急性腎不全モデルにて標的細胞を  $^3\text{H}$ -thymidine で標識し、標的細胞が分裂後早期に休止期となり標識を長期間保持するか、また分裂を繰り返し標識が減衰した娘細胞が megalin (成熟近位尿細管マーカー) を発現し近位尿細管細胞へ分化するかをオートラジオグラフィーと免疫染色で調べた。

### 2. 形質変化の検討

急性腎不全モデルにて標的細胞を BrdU にて標識し、3～7 日、21 日、40 週後の BrdU 陽性細胞について megalin、aquaporin-1 (AQP-1、成熟近位尿細管及びヘンレの細い下行脚マーカー)、vimentin (間葉系マーカー)、PAX-2 (胎生期のマーカー) の発現を蛍光二重染色で調べた。

### 3. S3 セグメントに分布する既報告の前駆様細胞との同異の検討

正常ラットに BrdU を 7 日間連日投与し、既報告の前駆様細胞を BrdU 標識保持細胞として標識する。BrdU 最終投与 2 週後に S3 セグメント全域に分布する BrdU 標識保持細胞が、UA 誘発尿細管障害後の再生に関与するかを BrdU/Ki67 (増殖マーカー) の蛍光二重染色で検討した。

### 4. 造血幹細胞の特性の一つである 5-fluorouracil (5-FU) に対する抵抗性の検討

急性腎不全モデルにて UA 投与後に 5-FU (50 mg/kg) を 5 日間投与し、また、標的細胞を BrdU にて標識した。標的細胞が 5-FU 投与で死滅せず、5-FU 中止後に増殖活性を示すかを BrdU/Ki67 の蛍光二重染色で調べた。また、標的細胞の細胞周期を BrdU/cyclin D1 (G1 期マーカー) の蛍光二重染色で調べた。

### 5. 再障害時の増殖活性の検討

急性腎不全モデルにて標的細胞を BrdU にて標識し、UA 投与 5 週後に再度 UA (4 mg/kg) を

静注し、標的細胞 (BrdU 陽性細胞) と Ki67 陽性増殖細胞を蛍光二重染色で検討した。

#### 6. 超微形態及び周囲環境の検討

急性腎不全モデルにおける BrdU 標識標的細胞と、実験 4 の 5-FU 投与群にて UA 投与 5 日後の BrdU 陽性細胞を免疫電顕で観察した。

#### [結果]

1. S3 セグメント遠位側の標的細胞は、UA 投与 3 日後から 40 週後まで標識を保持していた。標識が減衰した細胞は UA 投与 3 日後ではほとんど認めず、5 日目以降に S3 セグメント全域に認めた。また、7 日目に一部は megalin を発現した。
2. 正常では S3 セグメント遠位側のほとんどの尿細管細胞は megalin 陽性、AQP-1 陽性、vimentin 陰性、PAX-2 陰性であったが、UA 投与 3 日後の標的細胞は megalin 陰性、AQP-1 陰性、vimentin 陽性、PAX-2 陽性となり、21 日後では megalin 陽性、AQP-1 陽性、vimentin 陰性、PAX-2 陰性に戻った。
3. 既報告の BrdU 陽性前駆様細胞は軽度尿細管障害惹起後では 3 日目に約半数が Ki67 陽性増殖細胞となり 7 日目には増加した。急性腎不全惹起後では BrdU 陽性前駆様細胞は 3 日目にはほとんど Ki67 陰性で増殖活性を示さず、7 日目には減少した。
4. 5-FU 投与終了直後では S3 セグメント遠位側に限局し BrdU 陽性細胞を認め、多くは Ki67 陰性、一部 cyclin D1 陽性であった。5-FU 中止 3 日後には BrdU 陽性細胞は Ki67 陽性となり S3 セグメント近位側への分布が増加した。
5. 初回 UA 投与の 5 週後の BrdU 陽性標的細胞は、2 回目の UA 投与 3 日後にはその 16% が Ki67 陽性増殖細胞となった。
6. 標的細胞は核が大きく細胞質や刷子縁が少なく、未分化な細胞の形態的特徴を認めた。傍尿細管毛細血管の内皮細胞や線維芽様細胞との特異な関連は認められなかった。

#### [考察]

標的細胞は UA 投与による高度近位尿細管細胞障害後に一過性に脱分化し、高い増殖能を獲得し成熟近位尿細管へと分化する娘細胞を産生すると考えられた。また、標的細胞は分裂後に休止期に入る slow cycling cell の可能性が示唆された。また、5-FU 投与下でも死滅せずに一過性に G0/G1 arrest となり、5-FU 中止後再び増殖活性を示したことから造血幹細胞様の 5-FU 抵抗性が示唆された。さらに 2 回目の障害時にも再生に関与した。これらの特性から標的細胞が S3 セグメント遠位端に局在する前駆様細胞である可能性が示唆された。また既報告の S3 セグメントに散在性に存在する前駆様細胞は UA 惹起軽度尿細管障害では増殖活性を示したが、UA 惹起高度尿細管障害ではほとんど S3 セグメントの再生に関与せず、標的細胞はこれらとは異なる細胞集団であると考えられた。

#### [結論]

S3 セグメント遠位端に存在する標的細胞は UA 誘発急性腎不全後の S3 セグメント再生に関与する特異な細胞集団と考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

臓器特異的な前駆細胞が種々の組織再生に関与することが報告されているが、腎尿細管の再生細胞の起源や再生時の動態は明らかとは言えない。申請者は広範な近位尿細管S3セグメントの障害を惹起する酢酸ウラニウム (uranyl acetate, UA) 誘発ラット急性腎不全モデルを用い、UA投与2～3日後にS3セグメント遠位端より初期増殖細胞(以後、標的細胞)が出現することを見いだした。本論文は、この標的細胞が同モデルにおけるS3セグメントの再生を担う特異な細胞群との仮説を立て、その特性を既報の前駆様細胞の特性と比較しながら検討したものである。

### [材料ならびに方法]

Sprague-DawleyラットにUA 4 mg/kg静注し高度尿細管障害を伴う急性腎不全モデルを作成した。また、UA 0.25 mg/kg静注し軽度尿細管障害を作成した。このモデルにおいてUA投与後2～3日に出現する標的細胞を<sup>3</sup>H-thymidine (100 µCi/100g) またはbromodeoxyuridine (BrdU) (40 mg/kg) を投与しパルス標識した。

1. 前駆細胞の特性であるslow cycling cellであることの検討。急性腎不全モデルにて標的細胞を<sup>3</sup>H-thymidineにて標識し、標的細胞が分裂後休止期となり標識を長期間保持するか、また分裂を繰り返し標識が減衰した娘細胞がmegalin (成熟近位尿細管マーカー) を発現し近位尿細管細胞へ分化するかをオートラジオグラフィーと免疫染色で調べた。
2. 形質変化の検討。本モデルにて標的細胞をBrdUにて標識し、3～7日、21日、40週後のBrdU陽性細胞についてmegalin、aquaporin-1 (AQP-1, 成熟近位尿細管及びヘンレの細い下行脚マーカー)、vimentin(間葉系マーカー)、PAX-2(胎生期マーカー)の発現を蛍光二重染色で調べた。
3. 既報のS3セグメントの前駆様細胞との異同の検討。正常ラットにBrdUを7日間連日投与し、既報の前駆様細胞をBrdU標識保持細胞として標識する。BrdU最終投与2週後にS3セグメント全体に存在するこの細胞が、UA誘発尿細管障害後の再生に関与するかをBrdU/Ki67(増殖マーカー)の蛍光二重染色で検討した。
4. 造血幹細胞の特性の一つである5-fluorouracil (5-FU) に対する抵抗性についての検討。急性腎不全モデルにてUA投与後5-FU (50 mg/kg) を5日間投与し、標的細胞をBrdUにて標識した。標的細胞が5-FU投与で死滅せず、5-FU中止後に増殖活性を示すかをBrdU/Ki67の蛍光二重染色で調べた。また、標的細胞の細胞周期をBrdU/cyclin D1 (G1期マーカー)の蛍光二重染色で調べた。
5. 急性腎不全モデルにて標的細胞をBrdUにて標識し、UA投与5週後に再度UA (4 mg/kg) を静注し、同様に検討した。
6. 急性腎不全モデルにおけるBrdU標識標的細胞と、実験4の5-FU投与群にてUA投与5日後のBrdU陽性細胞を免疫電顕で検討した。

### [結果]

1. S3セグメント遠位側の標的細胞はUA投与3日後から40週後まで標識を保持していた。標識が減衰した細胞はUA投与3日後では殆ど認めず、5日目以降にS3セグメント全域に認め7日目に一部はmegalinを発現した。
2. 正常ではS3セグメント遠位側の殆どの尿細管細胞はmegalin陽性、AQP-1陽性、vimentin陰性、PAX-2陰性であったが、UA投与3日後の標的細胞はmegalin陰性、AQP-1陰性、vimentin陽性、

PAX-2陽性となり、21日後ではmegalin陽性、AQP-1陽性、vimentin陰性、PAX-2陰性に戻った。

3. 既報告のBrdU陽性前駆様細胞は軽度尿細管障害惹起後では3日目に約半数がKi67陽性となり7日目には増加した。急性腎不全惹起後ではBrdU陽性前駆様細胞は3日目に殆どKi67陰性であり、7日目には減少した。
4. 5-FU投与終了直後ではS3セグメント遠位側にBrdU陽性細胞を認め、多くはKi67陰性、一部cyclin D1陽性であった。5-FU中止3日後にはBrdU陽性細胞はKi67陽性となりS3セグメント近位側での分布が増加した。
5. 初回UA投与の5週後のBrdU陽性標的細胞は、2回目のUA投与3日後にはその16%がKi67陽性となった。
6. 標的細胞は核が大きく細胞質や刷子縁が少なく、未分化な細胞の形態的特徴を認めた。傍尿細管毛細血管の内皮細胞や線維芽様細胞との明らかな関連は認められなかった。

審査委員会は、S3セグメント遠位端に存在する標的細胞はUA誘発急性腎不全後のS3セグメント再生に關与する特異な細胞集団であると結論づけた点を高く評価した。

審査委員会ではこの研究について以下の質問をおこなった。

- 1) Day 2.5 モデルで BrdU のとりこみピークはいつか
- 2) 酢酸ウラニウムの尿細管傷害機序について
- 3) 尿細管のなかで、重金属のトランスポーターの分布は
- 4) Megalin とは何か
- 5) 蛍光染色の際の発色基質は何を用いたか
- 6) 尿細管セグメントによる血流支配の差はあるのか
- 7) S3 セグメントの寿命や分裂の頻度はどのくらいか
- 8) 使用した抗体はヒトに対してのものと交叉するか
- 9) 尿細管細胞増殖の cytokinetics について
- 10) この実験系でも acquired resistance があるのか

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	梶村 春彦	
	副査	大西 一功	加藤 明彦