



A high ratio of G1 to G0 phase cells and an accumulation of G1 phase cells before S phase progression after injurious stimuli in the proximal tubule

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-05-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩倉, 考政 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2818

博士(医学) 岩倉 考政

論文題目

A high ratio of G1 to G0 phase cells and an accumulation of G1 phase cells before S phase progression after injurious stimuli in the proximal tubule

(近位尿細管での高い G1/G0 期細胞比率と傷害刺激後における S 期進行前の G1 期細胞蓄積)

論文の内容の要旨

[はじめに]

消失と増殖の割合を調整する動的かつ相補的な過程によって、尿細管は正常の機能及び構造を維持していると考えられる。生理的状态では尿細管細胞の回転率は遅く、多くは G0 期と呼ばれる静止期にあるとされてきた。

一方で、近位尿細管 (Proximal tubule, PT) は傷害後に盛んな増殖細胞により修復する能力を有する。この PT に備わる傷害後即座の細胞増殖の機序の一つとして、近年、Vogetseder らは、PT 細胞はその多くが G1 期で静止しており、ある種の刺激に対して速やかに S 期へ細胞回転できるために備えている、という仮説を報告した。

本研究では正常及び増殖または傷害刺激投与後のラット PT 及び遠位尿細管 (Distal tubule, DT) 細胞を単離し、細胞周期 (G0 期、G1 期、S 期、G2/M 期) の変化を確認した。また、G0-G1 および G1-S 期移行に関連する p27 の発現の変化も検討した。

[材料並びに方法]

正常雄性 Sprague-Dawley ラットに酢酸鉛 (増殖刺激) または酢酸ウラニウム (uranyl acetate, UA : PT の S3 セグメント傷害) を投与し、モデルを作成した。今回の実験は浜松医科大学の動物実験委員会の承認を得ている。

・単離 PT および DT 細胞の純度の検討

正常および酢酸鉛、UA (準毒性量:0.2 mg/kg または毒性量:4 mg/kg) 投与後の尿細管細胞をコラゲナーゼにて単離し、パーコールによる濃度勾配法にて PT、DT を別々に単離した。メガリン (PT マーカー) の蛍光染色にて PT、DT の純度を評価した。

・単離 PT および DT 細胞の細胞周期の検討

フローサイトメトリーにて各モデルの細胞周期を解析した。G0 期と G1 期の分離はヘキスト 33342/ピロニン Y または Cdt1 (G1 期マーカー) の免疫染色にて評価した。

・酢酸鉛投与後の増殖活性および形質変化の検討

酢酸鉛投与後の尿細管細胞数、Ki67 (増殖マーカー) 陽性細胞の変化を腎組織にて経時的に観察した。間葉系マーカーのビメンチンの発現の有無も評価し

た。

- ・ UA 投与後の傷害または増殖活性の検討

0.2 mg/ kg または 4 mg/kg の UA 投与後の尿細管傷害、terminal uridine nick-end labeling (TUNEL)陽性細胞(アポトーシスマーカー)、Ki67 陽性細胞の変化を腎組織にて経時的に観察した。

- ・増殖または傷害刺激後の PT における p27 発現量の変化の検討

酢酸鉛または UA 投与後の腎組織の蛍光染色にて、p27 陽性 PT 細胞の割合を経時的に観察した。また、ウエスタンブロットにて S 期進行前 G1 期細胞蓄積時の p27 の変化を観察した。

[結果]

- ・単離 PT 細胞の多くはメガリン陽性で、一方単離 DT 細胞の多くはメガリン陰性であったことから、PT と DT は十分分離されていることが確認された。
- ・正常 PT 及び DT 細胞の大多数は G0/G1 期にあり、G1 期の割合は PT 36.8%、DT 13.6% で G1 期の割合は PT で有意に高かった。Cdt1 陽性細胞の割合はフローサイトメトリーの結果と概ね一致した。
- ・酢酸鉛投与にて PT、DT 共に S 期進行前に G0-G1 の移行が見られた。S 期進行細胞の割合は PT で有意に高かった。組織での尿細管細胞数は PT、DT 共に増加したが、Ki67 陽性細胞は PT で有意に多かった。Ki67 陽性細胞はビメンチン陰性だった。
- ・0.2 mg/ kg または 4 mg/ kg の UA 投与にて PT は S 期進展前に G0-G1 の移行が見られた。DT の細胞周期は変化しなかった。組織傷害、TUNEL 陽性細胞、Ki67 陽性細胞の変化に先行して G0-G1 の移行が見られた。
- ・G0-G1 移行時の p27 の蛋白量は酢酸鉛投与後では増加し、0.2 mg/ kg の UA 投与後では変化なく、S 期進行時に減少した。一方、4 mg/ kg の UA 投与後では G0-G1 の移行時に p27 の蛋白量は著明に減少した。

[考察]

正常 PT 及び DT 細胞の大多数は G0/G1 期にあり、G1 期の割合は DT よりも PT で有意に高かった。G0 期では代謝活性が低いことが報告されており、PT の G1 期細胞は PT の高い代謝活性に寄与している可能性がある。また、G0-G1 期の移行には時間を要することが報告されており、PT の G1 期細胞は必要時に迅速に増殖するために G1 期に停止している可能性がある。

増殖および傷害刺激に対して、PT は S 期進行前に G0-G1 の移行が見られた。細胞は G1 期において S 期進行前に DNA 傷害を認知し、修復することが報告されている。PT における G1 期細胞蓄積はそれらを行うための G1 停止を示唆する。

p27 陽性 PT 細胞は増殖および傷害刺激後、S 期の増加時またはその直前に減少し、p27 の発現減少は G1-S の移行を促進することが示唆された。G0-G1 移行期の p27 の蛋白量は増殖刺激後増加し、準毒性量の UA 投与後変化がなかった。G0-G1 移行期

にp27は分解されることが報告されており、p27が減少しなかったのは、G1停止細胞でのp27の増加が示唆される。一方、毒性量のUA投与後、p27はG0-G1移行期に著明に減少しており、迅速なS期進行に寄与している可能性がある。

[結論]

PTはG1期の占める割合がDTより多く、増殖・傷害刺激により、まずG0からG1へ移行し、その後S期の増加を認めた。また、p27は、G1停止に関与していた。これらは、PTの傷害後の爆発的な増殖に関与している可能性がある。