



Acquired resistance to rechallenge injury in rats recovered from mild renal injury with uranyl acetate

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: 孫, 媛 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/803

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 541号	学位授与年月日	平成21年 3月18日
氏名	孫 媛		
論文題目	Acquired resistance to rechallenge injury in rats recovered from mild renal injury with uranyl acetate (軽度の腎障害から回復したラットにおける酢酸ウラニウム再投与時の抵抗性獲得)		

博士(医学) 孫 媛

論文題目

Acquired resistance to rechallenge injury in rats recovered from mild renal injury with uranyl acetate

(軽度の腎障害から回復したラットにおける酢酸ウラニウム再投与時の抵抗性獲得)

論文内容の要旨

[はじめに]

腎毒性物質による急性腎不全からの回復後の動物は、同一物質による2度目の障害に対して抵抗性を示す、この現象は急性腎不全に対する抵抗性獲得と呼ばれる。腎毒性用量酢酸ウラニウムによる急性腎不全においても同様の現象が認められる。しかし、腎機能低下を認めない程度の低用量酢酸ウラニウムによる軽度障害から回復した腎が腎毒性用量の酢酸ウラニウムに同様の抵抗性を示すかどうかは不明である。臨床の場では、腎毒性薬剤による腎機能低下の明らかでない軽度尿細管障害は見逃され、再投与されることが日常的に行われていると考えられる。

本研究は、低用量酢酸ウラニウムによる軽度近位尿細管障害から回復した動物が、急性腎不全惹起量の酢酸ウラニウムに対し抵抗性獲得を認めるかどうかを検討し、さらに抵抗性獲得機序に関与する因子を検討した。

[材料ならびに方法]

1. 軽度障害から回復した近位尿細管細胞における抵抗性獲得の検討

雄 SD ラットに軽度近位尿細管障害惹起量の 0.2 mg/kg 酢酸ウラニウムあるいは生食を静注し、2週後の回復時に急性腎不全惹起量の 4 mg/kg 酢酸ウラニウムを静注した。0, 3, 5, 7 日後に各 3 匹を屠殺し、血清クレアチニン値にて腎機能を、腎組織にて近位尿細管細胞の壊死(PAS 染色)と増殖(S 期細胞マーカー Ki67 免疫染色)を検討した。

2. 抵抗性獲得における細胞増殖促進と関連因子の検討

上記モデルにおいて、抗有糸分裂作用を持つコルヒチン 1 mg/kg あるいは生食を腹腔内投与するコントロール群を作成し抵抗性獲得における細胞増殖促進機序の関与を検討した。屠殺前に S 期マーカーのプロモデオキシウリジン (BrdU)を腹腔内投与し 0, 1, 2, 3, 5, 7 日後に 3~5 匹を屠殺し以下の検討を行った。1) 血清クレアチニン値、2) 腎組織にて近位尿細管細胞の壊死(PAS 染色)、増殖(BrdU 免疫染色)アポトーシス(TUNEL 染色)、3) 細胞形質(近位尿細管マーカーのメガリン、間葉系マーカーのビメンチン免疫染色)、4) 細胞回転をサイクリン D1、リン酸化レチノブラストーマタンパクのウェスタンブロット、5) 抗アポトーシス関与因子の接着班キナーゼを免疫染色とウェスタンブロット、6) 尿細管細胞増殖因子関連の肝細胞増殖因子 (HGF)をウェスタンブロット、HGF/c-Met mRNA を RT-PCR 法にて検討した。

[結果]

1. 軽度近位尿細管細胞障害から回復したラット(実験群)は、一度目に生食を投与したコントロール群に比し、2度目の酢酸ウラニウムにより血清クレアチニン値と尿細管壊死数の増加が有意に抑制された。また Ki67 陽性増殖細胞数の有意な増加を示した。
2. 実験群ではコントロール群に比し、近位尿細管 S3 セグメント 3/4 領域での壊死数と TUNEL 陽性アポトーシス数のピーク値の低下を示したが、予想に反し早期にピークを認めた。

3. 実験群はコントロール群に比し、S3 セグメント遠位領域で BrdU 陽性細胞数の有意な増加(増殖促進)を示した。また、近位尿細管細胞での早期メガリン消失と新たにビメンチン及び接着班キナーゼの発現を認めた。さらにサイクリン D1 とリン酸化レチノブラストーマタンパク増加(細胞回転促進)と HGF/c-Met mRNA 発現亢進を認めた。
4. コルヒチン投与により、サイクリン D1 とリン酸化レチノブラストーマタンパク発現の抑制と BrdU 陽性細胞数の低下(増殖抑制)をきたし、同時にコントロール群と同等の血清クレアチニン値増加と細胞障害を認め抵抗性は完全に消失した。接着班キナーゼと HGF/c-Met 発現の変化はなかった。

[考察]

軽度障害から回復したラットは、2 度目の酢酸ウラニウムに対して腎障害の部分的軽減を示したが、尿細管細胞でのアポトーシスの早期誘導と増殖促進を認めた。

この早期尿細管障害は、1 度目の障害で酢酸ウラニウムに暴露された非致死性の細胞の障害感受性が高まり、2 度目の暴露時に早期にアポトーシスから壊死に進展し、周囲の抵抗性獲得細胞も障害した可能性が考えられた。

増殖抑制実験により回復の遅延だけではなく抵抗性が完全に消失したことより、増殖促進が抵抗性発現に関与することが示された。さらに、HGF/c-Met 経路の亢進や脱分化形質の早期発現が増殖促進に関与すること、増殖促進細胞が S3 遠位領域に局限したことから、同部細胞群の特殊性も考慮された。

本研究結果より、腎毒性薬剤使用時には腎障害を早期から正確にモニターする必要性が強く求められること、急性腎不全からの回復促進療法に内因性尿細管細胞を標的とした細胞回転促進が有用である可能性が示唆された。

[結論]

軽度障害から回復したラットでは2度目の腎毒性用量酢酸ウラニウムによって近位尿細管細胞の障害のピークが早期となるが、障害のピークの強さは軽減され、抵抗性を有することが示される。HGF/c-Met 経路の発現亢進と尿細管細胞の増殖促進が、急性尿細管障害からの回復促進に関与している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

[はじめに]

腎毒性物質による急性腎不全からの回復後の動物は、同一物質による2度目の障害に対して抵抗性を示す、この現象は急性腎不全に対する抵抗性獲得と呼ばれる。腎毒性用量酢酸ウラニウムによる急性腎不全においても同様の現象が認められる。申請者のグループは、長年にわたり、急性腎不全に対する抵抗性獲得を種々の物質を検討してきたが、低用量を投与した際の抵抗性については不明な部分が多かった。本研究は、低用量酢酸ウラニウムによる軽度近位尿細管障害から回復した動物が、急性腎不全惹起量の酢酸ウラニウムに対し抵抗性獲得を認めるかどうかを検討し、さらに抵抗性獲得機序に関与する因子を検討したものである。

[材料ならびに方法]

1. 軽度障害から回復した近位尿細管細胞における抵抗性獲得の検討

雄SDラットに軽度近位尿細管障害惹起量の0.2 mg/kg 酢酸ウラニウムあるいは生食を静注し、2週

後の回復時に急性腎不全惹起量の 4 mg/kg 酢酸ウラニウムを静注した。0, 3, 5, 7 日後に各 3 匹を屠殺し、血清クレアチニン値にて腎機能を、腎組織にて近位尿細管細胞の壊死(PAS 染色)と増殖(S 期細胞マーカーKi67 免疫染色)を検討した。

2. 抵抗性獲得における細胞増殖促進と関連因子の検討

上記モデルにおいて、抗有糸分裂作用を持つコルヒチン 1 mg/kg あるいは生食を腹腔内投与するコントロール群を作成し抵抗性獲得における細胞増殖促進機序の関与を検討した。屠殺前に S 期マーカーのブロモデオキシウリジン (BrdU)を腹腔内投与し0, 1, 2, 3, 5, 7 日後に3~5 匹を屠殺し以下の検討を行った。1) 血清クレアチニン値、2) 腎組織にて近位尿細管細胞の壊死(PAS 染色)、増殖(BrdU 免疫染色)アポトーシス(TUNEL 染色)、3) 細胞形質(近位尿細管マーカーのメガリン、間葉系マーカーのビメンチン免疫染色)、4) 細胞回転をサイクリン D1、リン酸化レチノブラストーマタンパクのウェスタンブロット、5) 抗アポトーシス関与因子の接着班キナーゼを免疫染色とウェスタンブロット、6) 尿細管細胞増殖因子関連の肝細胞増殖因子 (HGF)をウェスタンブロット、HGF/c-Met mRNA を RT-PCR 法にて検討した

[結果]

1. 軽度近位尿細管細胞障害から回復したラット(実験群)は、一度目に生食を投与したコントロール群に比し、2度目の酢酸ウラニウムにより血清クレアチニン値と尿細管壊死数の増加が有意に抑制された。また Ki67 陽性増殖細胞数の有意な増加を示した。
2. 実験群ではコントロール群に比し、近位尿細管 S3 セグメント 3/4 領域での壊死数と TUNEL 陽性アポトーシス数のピーク値の低下を示したが、予想に反し早期にピークを認めた。
3. 実験群はコントロール群に比し、S3 セグメント遠位領域で BrdU 陽性細胞数の有意な増加(増殖促進)を示した。また、近位尿細管細胞での早期メガリン消失と新たにビメンチン及び接着班キナーゼの発現を認めた。さらにサイクリン D1 とリン酸化レチノブラストーマタンパク増加(細胞回転促進)と HGF/c-Met mRNA 発現亢進を認めた。
4. コルヒチン投与により、サイクリン D1 とリン酸化レチノブラストーマタンパク発現の抑制と BrdU 陽性細胞数の低下(増殖抑制)をきたし、同時にコントロール群と同等の血清クレアチニン値増加と細胞障害を認め抵抗性は完全に消失した。接着班キナーゼと HGF/c-Met 発現の変化はなかった。

[考察]

これらの結果について申請者は以下のように考察した。軽度障害から回復したラットは、2 度目の酢酸ウラニウムに対して腎障害の部分的軽減を示したが、尿細管細胞でのアポトーシスの早期誘導と増殖促進を認めた。これは 1 度目の障害で酢酸ウラニウムに暴露された非致死的細胞の障害感受性が高まり、2 度目の暴露時に早期にアポトーシスから壊死に進展し、周囲の抵抗性獲得細胞も障害した可能性が考えられる。

増殖抑制実験により回復の遅延だけではなく抵抗性が完全に消失したことより、増殖促進が抵抗性発現に関与することが示された。さらに、HGF/c-Met 経路の亢進や脱分化形質の早期発現が増殖促進に関与すること、増殖促進細胞が S3 遠位領域に局限したことから、同部細胞群の特殊性も考慮された。本研究結果より、腎毒性薬剤使用時には腎障害を早期から正確にモニターする必要性が強く求められること、急性腎不全からの回復促進療法に内因性尿細管細胞を標的とした細胞回転促進が有用である可能性が示唆された。

[結論]

申請者は、軽度障害から回復したラットでは 2 度目の腎毒性用量酢酸ウラニウムによって近位尿細管細胞の障害のピークが早期となるが、障害のピークの強さは軽減され、抵抗性を有することを示した。HGF/c-Met 経路の発現亢進と尿細管細胞の増殖促進が、急性尿細管障害からの回復促進に関与している可能性がある」と結論づけた。

審査委員会は申請者の一連の実験及び解釈、さらに臨床的応用性を高く評価した。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) 獲得抵抗性は物質特異的か
- 2) なぜ酢酸ウラニウムは尿細管 S3 領域に傷害をあたえるのか
- 3) S3 領域に局在するトランスポーターについて
- 4) ラットにおける急性腎不全の定義
- 5) 低用量値として、0.2 mg/kg を用いた理由
- 6) この実験系でラットの系統差はないのか
- 7) なぜ PAS 染色を用いたのか
- 8) 対照群に用いた vehicle は何か
- 9) 染色の定量的評価は何人で行ったか
- 10) 尿細管上皮の細胞回転について

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 大園 誠一郎 加藤 明彦