



Renal damage in obstructive nephropathy is decreased in Skp2-deficient mice

| | |
|-------|---|
| 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: 鈴木, 小由里 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/10271/818 |

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 460号 | 学位授与年月日 | 平成21年 1月16日 |
| 氏名 | 鈴木 小由里 | | |
| 論文題目 | Renal damage in obstructive nephropathy is decreased in Skp2-deficient mice (閉塞的腎障害における腎臓損傷は Skp2 欠損マウスで減少する) | | |

博士(医学) 鈴木 小由里

論文題目

Renal damage in obstructive nephropathy is decreased in Skp2-deficient mice

(閉塞的腎障害における腎臓損傷は Skp2 欠損マウスで減少する)

論文内容の要旨

[はじめに]

腎炎は腎臓の炎症、細胞死および細胞増殖、線維化が連続して起こる病態である。近年、片側尿管結紮(Unilateral Ureteral Obstruction: UUO)マウスは、腎炎における腎線維化のメカニズム解明に用いられているモデルであり、このモデルを使って腎炎の発症や進行に関与している多くの分子が報告されつつある。この UUO モデルを用いて cyclin-dependent kinase (CDK) 阻害タンパク質 p27 のユビキチンリガーゼ構成因子である Skp2 が腎炎発症に伴い誘導されることが分かった。そこで、Skp2 ノックアウト(KO)マウスを用いて、腎炎における細胞増殖の変化と病態の進行における Skp2 の機能を解析した。

[材料ならびに方法]

C57BL/6J マウス(雄、6週齢)の左尿管を結紮し UUO モデルとし、1、3、5、7、14 日後に、またコントロールとして開腹のみ手術マウスから 7 日後に腎臓を摘出した。摘出した腎臓はパラフィン包埋後、組織切片にした。この組織切片を用いて、細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体により免疫組織染色を行い細胞増殖の変化を検討した。また、QRT-PCR 法により Skp2 mRNA の変動を検討した。

次に、野生型および Skp2KO マウスを用いて 7 日後の UUO モデルを作製した。これらの組織切片を用いて抗 Ki67 抗体による免疫組織染色を行い UUO 腎、対側腎それぞれの尿細管上皮細胞および間質細胞の細胞増殖、さらに TUNEL 法によりアポトーシスを検討した。また、細胞増殖を負に制御している p27 との関係を検討するために、連続切片を用いて抗 Ki67 抗体と抗 p27 抗体により免疫組織染色を行った。さらに、ウェスタンブロッティング法にて p27 のタンパク質レベルを比較検討した。

一方、腎線維化はマッソントリクローム染色および抗 α SMA 抗体を用いて免疫組織染色を行い評価した。

[結果]

尿細管は UUO 3 日後から顕著に拡張を示した。細胞増殖を見ると、UUO 3 日後で Ki67 陽性細胞が最も多く、それに伴い 1 尿細管あたりの尿細管上皮細胞数が UUO 3 日後から有意に増加した。一方、間質細胞では、Ki67 陽性細胞は UUO 1 日後から増加傾向を示すが開腹のみ手術腎と有意差はなかった。間質細胞数を数えてみると、UUO 3 日後から有意に増加していた。Skp2 mRNA は開腹のみ手術腎に比べ UUO 1 日後で 2.3 倍、UUO 3 日後で 7.1 倍まで上昇し、その後、減少傾向を示すものの UUO 14 日後でも 2.0 倍高かった。

野生型マウス UUO 7 日後では腎臓は萎縮し、尿細管の拡張、間質細胞の浸潤が見られたが、Skp2KO マウス UUO 腎では、それらが軽減され、腎臓の形態がよく保たれていた。細胞増殖を見てみると、野生型マウス UUO 腎で見られた尿細管上皮細胞数、Ki67 およびアポトーシス陽性細胞の増加は、Skp2KO マウス UUO 腎では減少していた。また、p27 タンパク質が野生型マウス UUO 腎より、さらに蓄積していた。個々の尿細管上皮細胞を見てみると、Ki67 陽性 p27 陰性の細胞が Skp2KO マウス UUO 腎で減少し、反対に、Ki67 陰性 p27 陽性の細胞が増加していた。

間質細胞数を数えてみると、Skp2KO マウス UUO 腎で減少した。Ki67 陽性およびアポトーシス陽性細胞も野生型マウス UUO 腎と比較して若干減少した。

腎線維化は、マッソントリクローム染色、 α SMA 共に Skp2KO マウス UUO 腎で抑制傾向を示した。

[考察]

Skp2 野生型マウスでは、UUO 腎炎の進行による腎萎縮、尿細管拡張、間質線維化が見られた。また、細胞増殖を正に制御している Skp2 の高発現に伴い腎の細胞増殖が亢進し、尿細管上皮細胞数および間質細胞数は共に顕著な増加を示した。この尿細管上皮細胞数の増加が起こることにより、尿細管の拡張を引き起こしたと示唆された。また、尿細管の拡張により尿細管の崩壊を導き、その後の腎線維化、腎炎進行につながる可能性が考えられる。

これに対し Skp2KO マウスでは腎炎の進行が抑制され、腎臓の形態も保たれていた。尿細管上皮細胞数および Ki67 陽性の尿細管上皮細胞の増加は Skp2KO によりほぼ完全に抑制されていた。また、間質細胞数の増加は Skp2KO で若干軽減された。このことにより、Skp2 は間質細胞に比べ、尿細管上皮細胞の細胞増殖をより顕著に制御していることが示唆された。一方、p27 タンパク質は野生型マウス UUO 腎で増加するが、Skp2KO マウスでは、さらに蓄積していた。個々の尿細管上皮細胞を比較すると、Skp2KO マウスでは野生型マウスと比較して Ki67 陽性 p27 陰性の増殖細胞が少なく、一方、Ki67 陰性 p27 陽性の静止細胞が増えていた。これらのことから、腎炎において Skp2 が高発現することで p27 を分解し、尿細管上皮細胞の細胞増殖を亢進させ、尿細管上皮細胞数の増加を引き起こしていることが示唆される。

UUO 腎炎に伴う腎線維化は Skp2KO で減少傾向を示した。これは、Skp2KO マウス UUO 腎での尿細管上皮細胞の細胞増殖が減少したため、上皮間葉移行の抑制が起こり、腎線維化が抑制されたため、Skp2KO マウスでは腎炎初期の段階で腎炎進行が阻害されたのではないかと考えられる。

[結論]

Skp2KO マウスでは、野生型マウスと比較して p27 が蓄積することにより腎炎に伴う尿細管上皮細胞の増殖が抑制され、腎炎進行が緩和されることが示唆された。また、腎炎の進行過程には尿細管上皮細胞および間質細胞の増殖が必要で、Skp2 が発現誘導されることによりこれらの細胞の増殖が誘導されると考えられた。

論文審査の結果の要旨

[はじめに]

腎炎は腎臓の炎症、細胞死および細胞増殖、線維化が連続して起こる病態である。近年、片側尿管結紮 (Unilateral Ureteral Obstruction: UUO) マウスは、腎炎における腎線維化のメカニズム解明に用いられているモデルであり、このモデルを使って腎炎の発症や進行に関与している多くの分子が報告されつつある。この UUO モデルを用いて、申請者のグループ (第一内科腎臓グループ・第一生化学) は cyclin-dependent kinase (CDK) 阻害タンパク質 p27 のユビキチンリガーゼ構成因子である Skp2 が腎炎発症に伴い誘導されることを明らかにしてきたが、申請者は、そこで、Skp2 ノックアウト (KO) マウスを用いて、腎炎における細胞増殖の変化と病態の進行における Skp2 の機能を解析した。

[材料ならびに方法]

C57BL/6J マウス (雄、6 週齢) の左尿管を結紮し UUO モデルとし、1、3、5、7、14 日後に、またコントロールとして開腹のみ手術マウスから 7 日後に腎臓を摘出した。摘出した腎臓はパラフィン包埋後、

組織切片にした。この組織切片を用いて、細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体により免疫組織染色を行い細胞増殖の変化を検討した。また、QRT-PCR 法により Skp2 mRNA の変動を検討した。

次に、野生型および Skp2KO マウスを用いて 7 日後の UUO モデルを作製した。これらの組織切片を用いて抗 Ki67 抗体による免疫組織染色を行い UUO 腎、対側腎それぞれの尿細管上皮細胞および間質細胞の細胞増殖、さらに TUNEL 法によりアポトーシスを検討した。また、細胞増殖を負に制御している p27 との関係を検討するために、連続切片を用いて抗 Ki67 抗体と抗 p27 抗体により免疫組織染色を行った。さらに、ウエスタンブロッティング法にて p27 のタンパク質レベルを比較検討した。

一方、腎線維化はマッソントリクローム染色および抗 α SMA 抗体を用いて免疫組織染色を行い評価した。

[結果]

尿細管は UUO 3 日後から顕著に拡張を示した。細胞増殖を見ると、UUO 3 日後で Ki67 陽性細胞が最も多く、それに伴い 1 尿細管あたりの尿細管上皮細胞数が UUO 3 日後から有意に増加した。一方、間質細胞では、Ki67 陽性細胞は UUO 1 日後から増加傾向を示すが開腹のみ手術腎と有意差はなかった。間質細胞数を数えてみると、UUO 3 日後から有意に増加していた。Skp2 mRNA は開腹のみ手術腎に比べ UUO1 日後で 2.3 倍、UUO 3 日後で 7.1 倍まで上昇し、その後、減少傾向を示すものの UUO 14 日後でも 2.0 倍高かった。

野生型マウス UUO 7 日後では腎臓は萎縮し、尿細管の拡張、間質細胞の浸潤が見られたが、Skp2KO マウス UUO 腎では、それらが軽減され、腎臓の形態がよく保たれていた。細胞増殖を見てみると、野生型マウス UUO 腎で見られた尿細管上皮細胞数、Ki67 およびアポトーシス陽性細胞の増加は、Skp2KO マウス UUO 腎では減少していた。また、p27 タンパク質が野生型マウス UUO 腎より、さらに蓄積していた。個々の尿細管上皮細胞を見てみると、Ki67 陽性 p27 陰性の細胞が Skp2KO マウス UUO 腎で減少し、反対に、Ki67 陰性 p27 陽性の細胞が増加していた。間質細胞数を数えてみると、Skp2KO マウス UUO 腎で減少した。Ki67 陽性およびアポトーシス陽性細胞も野生型マウス UUO 腎と比較して若干減少した。腎線維化は、マッソントリクローム染色、 α SMA 共に Skp2KO マウス UUO 腎で抑制傾向を示した。

[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。Skp2KO マウスでは腎炎の進行が抑制され、腎臓の形態も保たれていた。上記の所見からも、Skp2 は間質細胞に比べ、尿細管上皮細胞の細胞増殖をより顕著に制御していることが示唆された。一方、p27 タンパク質は野生型マウス UUO 腎で増加するが、Skp2KO マウスでは、さらに蓄積していた。個々の尿細管上皮細胞を比較すると、Skp2KO マウスでは野生型マウスと比較して Ki67 陽性 p27 陰性の増殖細胞が少なく、一方、Ki67 陰性 p27 陽性の静止細胞が増えていた。従って、腎炎において Skp2 が高発現することで p27 を分解し、尿細管上皮細胞の細胞増殖を亢進させ、尿細管上皮細胞数の増加を引き起こしていることが示唆される。

UUO 腎炎に伴う腎線維化は Skp2KO で減少傾向を示したが、これは、Skp2KO マウス UUO 腎での尿細管上皮細胞の細胞増殖が減少したため、上皮間葉移行の抑制が起こり、腎線維化が抑制されたため、Skp2KO マウスでは腎炎初期の段階で腎炎進行が阻害されたのではないかと考えられる。

[結論]

Skp2KO マウスでは、野生型マウスと比較して p27 が蓄積することにより腎炎に伴う尿細管上皮細胞の増殖が抑制され、腎炎進行が緩和されることが示唆された。また、腎炎の進行過程には尿細管上皮細

胞および間質細胞の増殖が必要で、Skp2 が発現誘導されることによりこれらの細胞の増殖が誘導されると考えられた。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) なぜ、Skp2 に焦点をあてたのか
- 2) UUO 腎炎の発生機転には水腎症を経ているのか
- 3) Skp2 KO マウスの尿量について
- 4) Ring finger domain を持つ分子はどのくらいあるのか
- 5) 間質の筋線維芽細胞における Skp2 の役割について
- 6) この実験系での筋線維芽細胞の定義について
- 7) 尿細管上皮の解剖学的な詳細について
- 8) p27 以外の分子の動態について
- 9) なぜ、このモデルで、ユビキチンリガーゼの構成分子をとりあげたのか
- 10) SkpKO マウスでの wound healing 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 瀬藤 光利

上里 忠良