

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月20日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590884

研究課題名（和文） 近位尿細管 S3 セグメント遠位領域の前駆様細胞の存在・分裂様式と多剤耐性形質の検討

研究課題名（英文） Mode of existence and cell division and multi-drug resistance of progenitor-like cells in distal area of S3 segment of proximal tubules

研究代表者

藤垣 嘉秀 (FUJIGAKI YOSHIHIDE)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20283351

研究成果の概要（和文）：ラット急性腎障害モデルにおいて近位尿細管障害後の修復を担う初期再生細胞群(標的細胞)が前駆様細胞である可能性を検討した。標的細胞群は、幹細胞の特徴である不等分裂様式をしばしば示し、同一ネフロン内に複数が見られた。単離細胞としての検討では、多剤耐性形質としての ABC トランスポーターの蛋白発現には標的細胞と他の近位尿細管細胞との差を認めなかったが、酢酸ウラニウムおよび 5-fluorouracil 耐性を示した。これらは、標的細胞が尿細管上皮前駆様細胞である可能性を支持する。

研究成果の概要（英文）：We investigated the possibility that the initially proliferating cells (target cells) which are responsible for recovering the damaged proximal tubules are progenitor-like cells in tubules in acute kidney injury model of rat. The target cells showed unequal cell division which is characterized in stem cells and more than one such a cell located in the same nephron. ABC transporter as multiple drug resistant phenotype in the isolated target cells were not different from those in other proximal tubular cells, but the target cells were resistant to uranyl acetate and 5-fluorouracil. The data support the possibility that the target cells are tubular epithelial progenitor-like cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：急性腎障害、近位尿細管細胞、再生、前駆様細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、急性腎障害(AKD)後の再生尿細管細胞の由来として、腎内外の幹/前駆細胞の存在とその尿細管修復への関与が検討されてきた。遺伝子標識研究では、近位尿細管 S3 セグメント障害後の再生は内在性尿細管細胞の関与が確

定的であるとされた (Humphreys BD et al. Cell Stem Cell. 2008, 2:284-91)。一方、正常尿細管維持において幹/前駆細胞系の関与は否定的であるとする報告がある (Vogetseder A. et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292:C807-13, Vogetseder A, et al. Am

J Physiol Cell Physiol. 2008;294:C22-8)。
我々は、酢酸ウラニウムによるラット AKI モデルの近位尿細管 S3 セグメント修復動態において、多くの近位尿細管細胞が死滅する障害下では S3 セグメント遠位領域の細胞群(標的細胞)が S3 セグメントの広範な修復を担うことを報告した (Fujigaki Y, et al. Kinetics and characterization of initially regenerating proximal tubules in S3 segment in response to various degrees of acute tubular injury. Nephrol Dial Transplant. 21:41-50, 2006. Sakakima M, Fujigaki Y. et al.. A distinct population of tubular cells in the distal S3 segment contributes to S3 segment regeneration in rats following acute renal failure induced by uranyl acetate. Nephron Exp Nephrol. 109:e57-70, 2008)。標的細胞が S3 セグメントの上皮幹/前駆細胞系である可能性の検討においてラット尿細管上皮幹細胞マーカーが存在しないため *in vivo* での検討には限界がある。一方で、近位尿細管細胞が後天的な種々の刺激により前駆様細胞性質を獲得する特性を有する可能性もあり、*in vitro* で幹/前駆細胞の証明として多分化能などを示す従来の方法は必ずしも有用とは言えない。本研究では、多くの上皮組織のように、標的細胞がラット近位尿細管細胞障害後の再生に関与する尿細管上皮前駆細胞系である可能性を細胞分裂様式や多剤耐性に注目して検討した

2. 研究の目的

酢酸ウラニウム誘発ラット AKI モデルにおいて S3 セグメント遠位領域に存在する初期再生細胞群(標的細胞)が、近位尿細管 S3 セグメントの激しい障害後の修復を担う前駆様細胞である可能性をさらに明らかにするため *in vivo* での分裂様式、局在、細胞形質と周囲微小環境を明らかにするとともに、*in vitro* で幹細胞特性の一つである多剤耐性形質の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AKIをSDラットに酢酸ウラニウム(1mg/kg, 0.2mg/kg)またはvehicle)静注にて惹起し、それぞれ初期再生細胞出現時に屠殺した。分裂期での細胞回転の停止目的に屠殺12時間前にvincristine 1mg/kgを投与し

(Sunter JP et al. Br J Cancer. 1978;37:662-72)、S期細胞マーカーのbromodeoxyuridin (BrdU)40mg/kgも続けて腹腔内投与した。また、酢酸ウラニウム、vincristineを投与しない正常群も作成し、PAS染色および免疫組織化学法にてBrdU陽性細胞を検討した。また、エポキシ樹脂包埋した巨大ブロックからの切片で作成した連続

組織切片の3次元構築から分裂細胞やその同一尿細管内の分布を観察した。

近位尿細管 S1 + S2 障害を惹起するゲンタマイシンによる AKI モデルにおいても同様の検討をし、初期再生細胞の局在を解析した。

(2) 酢酸ウラニウム(1mg/kg, 0.2mg/kg)静注後に *in vivo* で標的細胞を初期再生・増殖細胞として BrdU 標識し、近位尿細管細胞を Percoll にて単離し *in vitro* で BrdU 陽性細胞と BrdU 陰性細胞に FACS で選別し、それぞれウエスタンブロットにて ABC transporter である MDR1 (Abcb1)、MRP2 (Abcc2)、BCRP (Abcg2)の検討をした。さらに、BrdU 陽性細胞と BrdU 陰性細胞に酢酸ウラニウム或いは 5-fluorouracil を添加して MTS assay にて生存細胞の割合を検討した。

4. 研究成果

(1) *in vivo* での検討

- ① Vehicle 群では、無処置正常群に比して近位尿細管内腔への細胞の脱落と近位尿細管に散在性に BrdU 陽性細胞を多く認め、vincristine による細胞回停止効果が確認された。軽い障害を惹起する酢酸ウラニウム 0.2mg/kg 投与群では、近位尿細管内腔への細胞の脱落と BrdU 陽性細胞の増加を認めた。Vehicle 群および酢酸ウラニウム 0.2mg/kg 投与群では BrdU 陽性核の不等分裂を示唆する所見を認めなかった(図 1 A、B)。
- ② 激しい障害を惹起する酢酸ウラニウム 1mg/kg 投与群では、S3 セグメント遠位領域での BrdU 陽性細胞の増加を認め、他の領域に比して有糸分裂像と不等分裂を疑う像が散見された(図 1 C)。標的細胞の光顕三次元構築像でも不等分裂と同一ネフロン内に複数存在する可能性が示唆された。また、光顕三次元構築像で標的細胞は傍尿細管毛細血管に隣接したが、電顕観察にて同部位の特異な構造は明らかではなかった。
- ③ 近位尿細管 S1+S2 障害を惹起するゲンタマイシン誘発 AKI モデルでは、BrdU 陽性初期再生細胞の出現部位は S1+S2 に限局して観察され、ボウマン囊細胞でも有意な陽性所見は認めなかった。
- ④ 標的細胞は、幹細胞マーカー CD133 および多剤耐性形質マーカーの ABC2 と ABC2 (ABC transporter) の特異的な発現は認めなかった。

(2) *In vitro*での検討

酢酸ウラニウム(1mg/kg, 0.2mg/kg)静注後に単離した、BrdU陽性近位尿細管細胞BrdU陰性近位尿細管細胞は、ウエスタンブロットに

てABC transporterであるMDR1 (Abcb1)、MRP2 (Abcc2)、BCRP (Abcg2)のタンパク量の差を認めなかった。一方で、BrdU陽性近位尿細管細胞は陰性細胞に比して、酢酸ウラニウムあるいは5-fluorouracilに対する抵抗性を認めた。

図1A Vehicle群におけるBrdU陽性近位尿細管細胞。分裂後細胞の核は等分列像である。

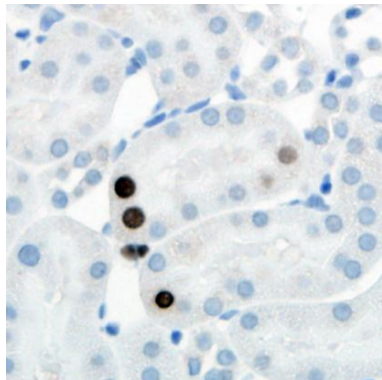


図1B 0.2mg/kg酢酸ウラニウム投与後のBrdU陽性初期再生細胞。分裂後細胞の核は等分列像である。

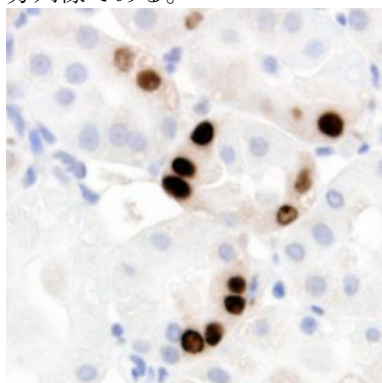
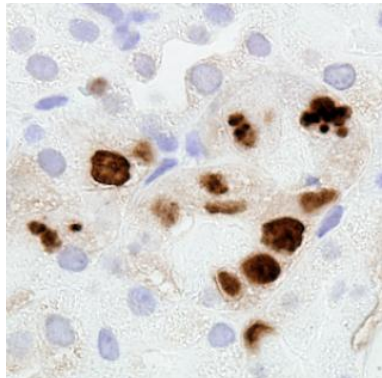


図1C 1mg/kg酢酸ウラニウム投与後のBrdU陽性初期再生細胞。分裂後細胞は不等分列像を示唆するものが散見される。



(3) まとめ

S3 セグメント遠位領域に存在する標的細胞は、不等分裂する可能性があり、同一ネフロンの近位尿細管遠位領域に複数存在する。一方、多剤耐性形質のABC transporterを介さずに腎毒性物質である酢酸ウラニウムに耐性を示すと考えられた。また、造血幹細胞で耐性を示す5-fluorouracilへの耐性が示され、前駆様細胞としての特性を有する特異な細胞群であることが示唆された。標的細胞の保護および増殖促進機序の解明は、重症近位尿細管障害の修復促進に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Fujigaki Y. Different modes of renal proximal tubule regeneration in health and disease. *World J Nephrol* 1, 2012, 92-99. doi: 10.5527/wjn.v1.i4.92 査読有
- ② 藤垣嘉秀 AKIにおける遺伝子治療の可能性. 特集 急性腎障害 (AKI) -概念の確認から、さらなる予後改善を目指して内科 110, 2012, 451-454 査読無
- ③ Fujikura T, Togawa A, Sun Y, Iwakura T, Yasuda H, Fujigaki Y. Dephosphorylated Ser985 of c-Met is associated with acquired resistance to rechallenge injury in rats that had recovered from uranyl acetate-induced subclinical renal damage. *Clin Exp Nephrol* 2012, Dec 19. [Epub ahead of print] 査読有
- ④ 藤垣嘉秀. 尿細管壊死 別冊日本臨床. 領域別症候群シリーズ 腎臓症候群 下 18 2012 29-32 査読無
- ⑤ 藤垣嘉秀. AKI (Acute kidney injury) 日本腎臓学会誌 54, 2012, 21-25 査読無
- ⑥ 藤垣嘉秀. 急性腎不全 *Medicina* 48, 2012, 335-337 査読無
- ⑦ 藤垣嘉秀. 急性腎不全における尿細管修復過程と再生 *Nephrology Frontier* 10, 2011, 228-231. 査読無
- ⑧ Sun Y, Fujigaki Y, Sakakima M, Fujikura T, Togawa A, Huang Y, Hishida A. Acquired resistance to rechallenge injury in rats that recovered from mild renal damage induced by uranyl acetate : accelerated proliferation and hepatocyte growth factor/c-Met axis. *Clin Exp Nephrol* 5,2011,666-675. doi: 10.1007/s10157-011-0453-x 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 藤倉知行, 岩倉 考政, 大橋温, 安田日出夫, 加藤明彦, 藤垣嘉秀. 急性腎障害 (AKI) のラット尿細管細胞におけるリン酸化C-Met (p-Ser985) 発現の検討. 第56回日本腎臓学会総会 平成25年5月10日 東

京

- ② 岩倉考政、藤倉知行、大橋温、安田日出夫、加藤 明彦、藤垣嘉秀. 酢酸ウラニウムによる部分抵抗性獲得後のラット尿細管細胞における細胞周期の検討 第56回日本腎臓学会総会 平成 25年5月10日 東京
- ③ 岩倉考政、藤倉知行、大橋温、安田日出夫、加藤 明彦、藤垣嘉秀 ラット正常近位尿細管細胞における細胞周期の検討 第55回日本腎臓学会総会 平成 24年6月1日 横浜
- ④ 藤倉知行、戸川証、岩倉考政、大橋温、安田日出夫、加藤明彦、藤垣嘉秀. 低用量酢酸ウラニウム(UA)による軽度尿細管障害回復後の抵抗性獲得における HGF/c-Met 経路の関与 第55回日本腎臓学会総会 平成 24年6月1日 横浜
- ⑤ 藤倉知行、戸川証、岩倉孝政、小野雅史、坂尾幸俊、鈴木 洋行、安田日出夫、加藤明彦、藤垣嘉秀. 低用量酢酸ウラニウムによる急性尿細管障害回復後の抵抗性獲得と hepatocyte growth factor/c-Met シグナルの関与第 54 回日本腎臓学会学術総会 平成 23年6月16日横浜
- ⑥ 藤倉知行、Yuan Sun、岩倉孝政、安田日出夫、藤垣嘉秀. Possible involvement of Hepatocyte growth factor (HGF)/c-Met signaling in the acquired resistance after subclinical acute kidney damage with uranyl acetate. 第 48 回欧州移植透析学会 平成 23年6月25日プラハ、チェコ
- ⑦ 藤倉知行、戸川証、Yuan Sun、藤垣嘉秀 Hepatocyte growth factor /c-Met signaling contributes to the acquired resistance after acute subclinical kidney damage with uranyl acetate. 第 43 回米国腎臓学会 H22年11月19日米国、コロラド州デンバー

[図書] (計1件)

和田隆 AKI の診断. AKI のすべて基礎から臨床までの最新知識、南江堂、2012、2-13.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤垣 嘉秀 (FUJIGAKI OSHIHIDE)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20283351

(2) 研究分担者

安田 日出夫 (YASUDA HIDEO)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：60432209

(3) 研究協力者

藤倉 知行 (FUJIKURA YOMOYUKI)
浜松医科大学・医学部・RA
研究者番号：00444349