

博士(医学) 藤倉知行

## 論文題目

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  
(c-Met のセリン 985 脱リン酸化は無症候性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に関連する)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

急性腎障害は腎虚血や腎毒性物質により惹起され、その治療法の多くが補助的な治療法で、死亡率を改善しない。急性腎不全から回復した動物は、同一物質による 2 度目の障害に対して抵抗性を示し、この現象は急性腎不全に対する抵抗性獲得と呼ばれる。その機序解明は、急性腎障害治療法開発の良い機会となる。

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は、尿細管細胞のアポトーシス軽減や増殖促進を介して急性腎障害を軽減する。我々は無症候性腎障害から回復したラットは、二回目の毒性量酢酸ウラニウムに対して部分的抵抗性を獲得し、HGF/ c-Met シグナルの活性化が寄与する可能性を報告した。

本研究は無症候性腎障害から回復したラットより尿細管細胞を初代培養し、HGF/ c-Met シグナルを介した増殖能・遊走能亢進、その下流シグナルへの影響、セリン 985 脱リン酸化を介した HGF への感受性を検討した。

[材料並びに方法]

### 1. 無症候性腎障害から回復した尿細管細胞の HGF に対する感受性の検討

雄 SD ラットに準毒性量 0.2 mg/ kg の酢酸ウラニウムあるいは生食を静注し、2 週間後の回復期にコラゲナーゼを用いて尿細管細胞を単離、初代培養した。培養細胞を尿細管マーカーで染色評価した。培養尿細管細胞を HGF 添加もしくは非添加において以下を検討した。①細胞抵抗性試験 (酢酸ウラニウム添加し、その抵抗性を MTS (3- (4, 5- dimethylthiazol- 2- yl)- 5- (3 carboxymethoxyphenyl)- 2- (4- sulphophenyl)- 2H- tetrazolium, inner salt) 試験で評価)、②細胞増殖試験 (MTS 試験、ブロモデオキシウリジン取り込み試験)、③細胞遊走能試験 (スキヤッターリング試験、創傷治癒試験)、④HGF 添加におけるシグナル蛋白質 (c-Met (phospho-Tyr1234/1235)、AKT、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2) のリン酸化をウエスタンブロットで検討した。

### 2. c-Met のセリン 985 リン酸化蛋白質の検討

①上記培養細胞に HGF 添加前後におけるセリン 985 リン酸化蛋白質発現を免疫沈降/ ウエスタンブロットを用いて検討、②上記モデルによる腎組織においてセリン 985 リン酸化蛋白質の発現、局在を免疫組織化学的に検討した。

[結果]

1. 培養細胞の多くは近位尿細管マーカー (N-カドヘリン) 陽性で、一部遠位尿細管マーカー (E-カドヘリン) 陽性であった。酢酸ウラニウムによる主な障害部位である近位尿細管の多くが採取されたことを確認した。
2. 細胞抵抗性試験; HGF 添加時には、酢酸ウラニウム投与群尿細管は有意に高い抵抗性を示した。一方 HGF 非添加時には両群間に差はなかった。
3. 細胞増殖試験; HGF 添加時には、酢酸ウラニウム投与群尿細管は有意に高い増殖能を示した。一方 HGF 非添加時には両群間に差はなかった。
4. 細胞遊走試験; HGF 添加時には、酢酸ウラニウム投与群尿細管は有意に高い創傷治癒能力を示し、スキヤットリングを起こし、高い遊走能を示した。一方 HGF 非添加時には両群間に差はなく、ともにスキヤットリングを起こさなかった。
5. シグナル検討; 酢酸ウラニウム投与群尿細管のリン酸化蛋白質 (c-Met (phosphor-Tyr1234/1235)、AKT、ERK1/2) は、HGF 添加後に有意な発現亢進を認め、シグナル伝達増強が示唆された。一方 HGF 非添加時には両群間に差はなかった。
6. c-Met のリン酸化セリン 985 の検討; c-Met のセリン 985 リン酸化は、c-Met のシグナル伝達を陰性調節すると報告されている。免疫沈降/ウエスタンブロットによる検討では、酢酸ウラニウム投与群尿細管は有意にリン酸化セリン 985 が減少し、HGF 添加しても有意な減少を維持した。免疫組織化学的検討では、酢酸ウラニウム投与群腎臓の近位尿細管において、リン酸化セリン 985 の発現低下を認めた。

#### [考察]

酢酸ウラニウム投与ラットから単離初代培養した尿細管細胞は HGF 添加によりシグナル伝達が有意に亢進し、細胞抵抗性、増殖能、遊走能が亢進した。HGF による尿細管細胞障害軽減、増殖能亢進、遊走能亢進は、急性腎障害軽減に寄与することが報告されている。我々の既報告では、近位尿細管における HGF/c-Met シグナル伝達が部分的抵抗性獲得において重要な働きをなす事を示した。これらの報告を考慮すると、本研究結果である尿細管細胞の HGF に対する感受性亢進は、in vivo における部分的抵抗性獲得に関与していることが示唆される。

HGF/c-Met のシグナル伝達をセリン 985 のリン酸化が陰性調節することが報告されている。本研究で抵抗性獲得群のリン酸化セリン 985 の発現低下が観察された。部分的抵抗性獲得尿細管は、リン酸化セリン 985 の抑制調節が減弱することによって HGF に対する感受性が亢進していることが示唆された。

#### [結論]

酢酸ウラニウム投与群尿細管は、セリン 985 脱リン酸化を介して、HGF に対する感受性亢進、細胞増殖亢進、細胞遊走亢進を引き起こし、これが in vivo における部分的抵抗性獲得機序に関連すると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

尿細管障害は腎不全のもっとも重要な側面で、その病態の解明は急性腎障害の治療や予防に大変重要である。申請者らのグループは尿細管に種々の障害を与える実験において、二回目の障害において抵抗性をしめす現象を観察してきた。本研究は酢酸ウラニウムによる尿細管障害の再投与に対する抵抗性の機構について *in vitro* で詳細に解析した研究である。酢酸ウラニウム尿細管障害再投与による抵抗性のモデルの回復期ラットから、尿細管を単離し初代培養し抵抗性、細胞増殖性、HGF 添加における下流蛋白質のシグナル解析、セリン 985 リン酸化蛋白質発現の検討、その局在の免疫組織学的検討を行った。

その結果、培養細胞が、障害部位に相当する近位尿細管と確認でき、HGF 添加時では、酢酸ウラニウムの再投与への抵抗性が低下、増殖能の増加、損傷治癒力の増加、細胞遊走能の増加をみとめた。この現象の基礎として、HGF による Met、AKT、ERK1/2 のリン酸化がみとめられた。一方、HGF/Met シグナルを陰性に制御するといわれるセリン 985 の発現低下が組織上でもみとめられた。

本研究論文は、放射線暴露、抗がん剤投与といった尿細管障害が臨床的に重要な問題になる状況下での、その軽減に対する戦略の基礎となる知見である。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与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 副査 馬場 聡