一側完全尿管閉塞による両腎皮質 HSP-72 および c-fos 蛋白発現の変化

近田龍一郎・坂井 清英・太田 章三・久慈 了
畠山 孝仁・阿部 優子・千田 尚毅・折笠 精一

要 旨

生後3～4週のS-D rat に左完全尿管閉塞を作成し、腎皮質におけるheat shock protein-72 (HSP-72) とc-fos 蛋白出現の経時的变化を検討した。

HSP-72は水腎では、1～6時間後尿細管での強い発現が観察された。対側健腎では、3～6時間後尿細管に強い染色が認められた。糸球体はほとんど染色されなかった。c-fos は、水腎では3時間後に糸球体および尿細管(核、細胞質)に強い発現が認められ、その後1日まで尿細管に強い染色が観察された。健腎では、1日後に糸球体と尿細管に強い染色が認められた。5日後では、7日以降有意な細胞増殖が観察された近位尿細管(細胞質)に特異的にその発現が見られた。

以上の結果、HSP-72およびc-fos は、水腎には腎障害に対するcytoprotectant として、対側腎には機能の代償過程として発現してくると思われた。また、対側腎では、c-fos が尿細管増殖に先立って発現してくる可能性が示唆された。

序 言

我々は、これまでの臨床的および実験的検討から、1) 小児の一側水腎症例では、健側腎の発育が抑制されている可能性があること¹⁾、2) 腎が発育時期にあるweanling rat (生後3～4週、体重70～90g) を用いた実験では、水腎の存在が健側腎の尿細管細胞増殖を抑制している可能性があること²⁾、を明らかにしてきた。

今回は、こうした水腎に伴う対側健腎の変化に、ストレス蛋白質のheat shock protein-72 (HSP-72) および核内がん遺伝子産物のc-fos がどのように関与しているか検討した。

方 法

腎発育の状態が1歳前後の幼少時と同等と考えられる生後3～4週(体重70～90g)の雄Sprague-Dawley (S-D) rat³⁾を用いて実験を行った。なお、水分および食餌の摂取は自由にさせた。

Pentobarbital (40mg/kg腹腔内投与) 麻酔下に腰部斜切開をおき、左尿管を露出、腎盂から下約1/3の部位を完全閉塞した群(水腎群、27匹)と、尿管の観察のみを行った群(シャム群、27匹)を作製して閉腹した。各操作後、1, 3, 6, 12, 24時間, 2, 3, 5, 7日に、各群3匹ずつ水腎群では両腎、シャム群では右腎を摘出した。摘出腎は2分割し、それぞれ10%中性ホルマリン液、またはカルノア液に入れて固定した。固定標本は、パラフィン包埋後2μ切片とし、免疫染色に用いた。

使用した抗体は、HSP-72が抗HSPマウスモノクロ

Key Words : 水腎
HSP-72
c-fos
細胞増殖

東北大学医学部泌尿器科学教室
(〒980-77 仙台市星陵町1-1)

Effect of unilateral complete ureteral obstruction on the bilateral renal cortical expression of HSP-72 and c-fos protein

Ryuichiro Konda, Kiyohide Sakai, Shozo Ota, Satoru Kuji, Takahito Hatakeyama, Yuko Abe, Naoki Chida, Seiichi Orikasa

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine

(mean±SD, 水腎群水腎側は平均値のみ示す)

図1 水腎群（左完全尿管閉塞），腎摘群（左腎摘）およびシャム群の腎皮質における BruU (labelling index の経時的変化 (1992, 久慈ら²⁾)). p<0.05を有意とした。

表1 水腎皮質 HSP-72の経時的変化

			1hr	3hrs	6hrs	12hrs	1day	3days	5days	7days
糸 球 体			+	±	±	—	—	—	—	—
尿 細 管	皮 質 表 在	近位	±	++	+	—	—	—	—	—
		遠位	++	++	++	+	+	±	±	±
	皮 質 傍 髄 質	近位	+++	++	++	—	—	—	+	±
		遠位	+++	++	++	+	+	±	±	±

ナール抗体 (Amersham 社), c-fos が抗 c-fos ウサギポリクロナール抗体 (Oncogene Science および Santa Cruz 社) である。陰性コントロールには, DAKO 社の非免疫ウサギ血清およびマウス IgG 1を用いた。

免疫染色は, DAKO 社 LSAB キット (HRP 発色) を用いて行い, DAB にて発色させた。HSP-72は, ホルマリン切片を用いて, 脱パラフィン後1次抗体を一晩反応させ, ビオチン化2次抗体, パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを各々10分反応させた後, DAB 発色させた。c-fos はカルノア固定切片を脱パラ後, 0.05 % type I collagenase (Sigma 社) 処理し, 1次抗体を50分間反応させ, 後は HSP-72と同様の方法で操作を

行った。核染色は, メチルグリーンまたはヘマトキシリンで行った。

染色程度は, 陰性コントロールを (—), 最も強い染色を示したものを (+++) とし, その間を染色の強さにより, (±), (+), (++) とした。染色の強さは, 共著者3人で判定した。

結 果

〈腎皮質尿細管細胞増殖〉

図1に, 既報²⁾の水腎作製後および腎摘後の BrdU labelling index で評価した尿細管細胞増殖の変化について示した。この結果では, 腎摘群では腎摘後1日から

図2 水腎作製1時間後の水腎皮質表在ネフロンにおける HSP-72の発現 (×100)。

図3 水腎作製1時間後の水腎皮質傍髄質ネフロンにおける HSP-72の発現 (×100)。

表2 健側腎皮質 HSP-72の経時的変化

			1hr	3hrs	6hrs	12hrs	1day	3days	5days	7days
糸 球 体			—	—	+	—	—	—	—	—
尿 細 管	皮 質 表 在	近位	±	+	++	—	—	—	—	—
		遠位	±	++	++	+	+	±	±	±
	皮 質 傍 髄 質	近位	±	++	+	±	—	+	±	—
		遠位	±	++	+	±	±	+	±	±

図4 水腎作製1時間後の健側腎皮質傍髄質ネフロンにおける HSP-72の発現 (×100)。

図5 水腎作製3時間後の健側腎皮質傍髄質ネフロンにおける HSP-72の発現 (×100)。

主として近位尿細管に有意の細胞増殖の増加が観察された。水腎群の対側健腎では、5日まではシャム群と有意の差はなく、7日以降主として近位尿細管に細胞増殖の

増加が観察された。
 〈腎皮質 HSP-72の変化〉
 左水腎での変化を見ると、表1に示したように、皮質

表3 水腎皮質 c-fos 蛋白の経時的変化

		1hr	3hrs	6hrs	12hrs	1day	3days	5days	7days
糸球体		+	++	+	+	+	+	+	-
尿細管	近位	+	++	++	++	++	+	++	-
	遠位	+	++	+	++	++	+	+	-

図6 水腎作製3時間後の水腎皮質ネフロンにおける c-fos 蛋白の発現 (×80)。

図7 水腎作成5日後の健側腎皮質ネフロンにおける c-fos 蛋白の発現 (×100)。

表4 健側腎皮質 c-fos 蛋白の経時的変化

		1hr	3hrs	6hrs	12hrs	1day	3days	5days	7days
糸球体		+	±	±	±	++	±	+	-
尿細管	近位	+	+	+	+	++	+	+++	±
	遠位	+	±	±	±	++	+	+	±

の表在ネフロンと傍髄質ネフロンで違いが観察され、1時間後では、表在遠位尿細管(図2)および傍髄質近位、遠位尿細管が強く染色された(図3)。3時間後では、これに加え表在近位尿細管も強く染色されるようになった。その後6時間までは強い染色が認められたが、12時間以降は拡張した遠位尿細管管腔側に弱い染色を認めるのみであった。

右健腎(表2)についてみると、1時間後は弱い染色が認められるのみ(図4)であったが、3時間後には表

在遠位尿細管および傍髄質近位、遠位尿細管(図5)が強い染色性を示し、6時間後には表在の近位および遠位尿細管に強い染色を認め、傍髄質尿細管の染色性は低下した。12時間以降は、表在近位尿細管を除いた尿細管に弱い染色性を認めるのみであった。染色は尿細管の細胞質に比較的均一に認められた。

シャム群ではほとんど染色が確認できなかった。

〈腎皮質 c-fos の変化〉

左水腎側の変化(表3)をみると、水腎作製3時間後

に糸球体および近位、遠位尿細管の核および細胞質に強い染色(図6)が観察された。特に尿細管では、管腔側に強い染色が認められた。その後1日までは尿細管に強い染色が観察された。5日にも近位尿細管に強い染色が見られたが、これは非拡張尿細管が主として染色されていた。なお30分後についても検討したが、ほとんど c-fos は認められなかった。右健腎(表4)では、1日後に糸球体と近位・遠位尿細管が強く染色され、5日には、BrdU で細胞増殖の有意な増加が7日目に観察された近位尿細管の細胞質が、強く染色されていた(図7)。なお、c-fos の変化は、表在ネフロンと傍髄質ネフロンで違いはみられなかった。

シャム群では、尿細管に弱い染色を認めたのみで、術後の時期によって大きな変化は観察されなかった。

考 察

我々は臨床的検討から、腎が発育段階にある2歳以下の一側水腎症例の場合、根治的手術により水腎が改善すると、水腎のみでなく対側健腎にも機能の増加がDMSA 腎摂取率で観察されることを報告した¹⁾。このような現象は2歳以下の一側尿管異所開口例で半腎または片腎摘出後の対側健腎でも見られた⁴⁾。これらの結果から我々は、年齢的な要素あるいは腎の発育段階を考慮すると、一側に水腎がある場合対側腎の発育が抑制されており、水腎の開放に伴い健側腎の腎発育が回復、あるいは一部の例では促進されるのではと推測した。そこで、腎が1歳前後の幼少児と同様に発育段階にあるとされる生後3～4週、体重70～90gの雄 S-D rat を用いて、実験的に一側水腎(左尿管完全閉塞)の対側腎発育に及ぼす影響について、腎摘群およびシャム群と比較検討した²⁾。その結果、腎摘群では術後1日目から腎重量と尿細管細胞増殖増加が観察された。これに対して水腎群の健側腎では、腎重量の増加は3日目から認められたものの、尿細管細胞の増殖増加は7日目以降にならないとみられなかった。臨床例および動物実験例いずれも nephrogenesis は終了しているが、腎の発育、特に尿細管細胞の増殖が認められる時期であり、以上の結果より、水腎の存在が対側健腎の尿細管細胞の増殖を抑制しているのではと推測した。

そこで今回は、細胞増殖に関係すると考えられる c-fos および HSP-72が、一側水腎に伴う対側腎の変化とどのように関連しているか検討した。なお、c-fos は細胞周期のG 0 からG 1 への移行に関与するとされ⁵⁾、また、HSP-70の mRNA はG 1 からS期への移行の時期に発現が増大する⁶⁾とされている。また、HSP-72は細

胞が熱ショックに限らず種々のストレスに曝された時に cytoprotectant として合成が誘導される⁷⁾ことが知られており、一方、c-fos の遺伝子は、DNA 損傷により導入される DNA-damage-inducible genes の1つであり、細胞を DNA 損傷から保護する役割を担っている⁸⁾と考えられている。

まず、HSP-72についてみると、水腎側では術後1時間に傍髄質尿細管に最も強い発現が観察され、3時間後か6時間後にかけて腎皮質全体に発現が観察された。その後は減少し拡張した遠位尿細管の内腔側に認められるだけになった。健側腎では、水腎より遅れて3時間後に最も強い発現が傍髄質尿細管を中心に観察され、6時間後には表在尿細管が強く染色された。12時間以後は、主として遠位尿細管が弱く染色されるだけになった。この結果より、水腎側では HSP-72は、1～6時間の比較的早期の水腎に伴う腎盂内圧の上昇や、それに伴う血流の変化によるストレスに対して、発現してくると推測された。一般に腎血流の変化は傍髄質ネフロンに強く現れるとされており、これが表在ネフロンと傍髄質ネフロンにおける HSP-72発現の相違の一因とも考えられる。対側健腎では水腎側のような直接のストレスはないが、水腎側にやや遅れて3時間後に傍髄質尿細管を中心に強い発現が観察された。水腎側の尿排泄能は0に近い状態であり、健側腎の代償的な腎血流や尿排泄、再吸収の変化がストレスとなり、HSP-72が誘導される可能性が示唆された。HSP-72の発現は水腎、健側腎ともに糸球体にはほとんど見られず、尿細管を中心に認められた。一般的に HSP は蛋白の生合成や変性蛋白質の修復または処理に関与するとされており、水腎では尿細管障害に伴う変性蛋白の処理、健側腎では、水腎側の尿排泄、再吸収機能の低下に伴う代償的な健側腎尿細管機能亢進に伴う蛋白合成の亢進(諸種の酵素の生合成が促進されていると考えられる)がその原因の1つかもしれない。12時間以降は、一部の尿細管を除いてはほとんど染色されず、健側腎の尿細管細胞増殖には、ほとんど関係していないと考えられた。

次に、c-fos についてみると、水腎側では3時間後に強い発現が糸球体および尿細管に確認され、その後5日目まで尿細管を中心に染色された。組織学的に間質の繊維化や細胞浸潤、尿細管の変性が顕著になる7日目では、ほとんど染色されなくなった。水腎の c-fos mRNA の検討⁹⁾では、水腎作製30分後に mRNA の発現は peak となり、その後48時間後まで発現の増加が観察されたが、7日目ではほとんど認められなかった。これに対して、細胞障害のときに発現するとされる TRPM

-2が48時間後に peak となっている。c-fos mRNA の結果は、今回の我々の結果 (c-fos 蛋白は mRNA に遅れて発現しているが) と同様な動きを示しており、c-fos は水腎に伴う細胞へのストレスにより発現し、細胞障害が強くなり細胞死に至る時点では発現されなくなると推測された。健側腎についてみると、24時間後に糸球体および尿細管に強く発現し、その後5日目に近位尿細管に強い染色が観察された。24時間後の発現増加は、糸球体と尿細管双方に発現し、特に細胞増殖とは関連していないことから、代償性の機能亢進に対する刺激により誘導された可能性が強い。HSP-72に比べ c-fos は遅れて発現してくるのかもしれない。5日目に強く近位尿細管に発現を認めたのは、BrdU では7日から細胞増殖の増加が近位尿細管を中心に観察されていることから、細胞増殖の増加に先だって発現が増加してきたものと推測された。しかし、c-fos mRNA を用いた検討では⁹⁾、水腎対側腎での mRNA 発現増加は観察されておらず、この相違については今後検討の必要があると考えられた。c-fos の細胞内での分布は、水腎では核および細胞質が染色されたが、健側腎で最も発現の多い5日目では、主として細胞質が染色され、核はほとんど染色されなかった。c-fos は核内に局在して転写制御因子として機能する核内がん遺伝子産物であるが、慢性関節リウマチでは核のみでなく細胞質でも c-fos が染色されている¹⁰⁾。我々は、2種類の c-fos 抗体を用いたが、どちらの抗体でもほぼ同様な染色性を示した。また、c-fos と同様にプロトオンコジーン産生蛋白である c-myc は結腸・直腸上皮癌では、核はほとんど染色されず、主として細胞質に発現が観察されている¹¹⁾。c-fos の発現分布の変化が何を原因として起こってくるかに関しては、mRNA および蛋白レベルでさらに詳細な検討が必要と思われる。

結 論

一側完全尿管閉塞後における腎皮質 HSP-72および c-fos 蛋白発現の変化を検討した。

1) HSP-72は、水腎では1時間から6時間後まで皮質尿細管で強い発現が観察された。それ以降は、部分的に遠位尿細管管腔側が染色するのみであった。対側健腎

では、3時間から6時間後まで尿細管に強い染色が認められた。

2) c-fos は、水腎では3時間後に糸球体および尿細管(核、細胞質)に強い染色が観察され、その後1日目まで尿細管に強い染色が見られた。健腎では1日後に糸球体と尿細管に強い染色が観察された。5日後では、7日目以降有意な細胞増殖が観察される近位尿細管(細胞質)に、特異的に強い染色が認められた。

本研究の一部は、平成6年度科学研究費一般研究(C) 06671564によった。

文 献

- 1) 近田龍一郎, 折笠精一, 庵谷尚正, 坂井清英, 久慈 了, 太田章三, 阿部優子, 池田成徳: 小児一側先天性水腎症の術前後における腎機能の推移—DMSA 腎摂取率による分腎機能の検討—. 日泌尿会誌 82: 1576-1582, 1991.
- 2) 久慈 了, 近田龍一郎, 折笠精一, 太田章三, 坂井清英, 金田隆志: 一側水腎の対側腎発育に及ぼす影響. 日泌尿会誌 83: 2015-2021, 1992.
- 3) Provoost, A. P., Keijzer, M. H., Wolff, E. D. and Molenaar, J. C.: Development of renal function in rat. Renal Physiol., 6: 1-9, 1983.
- 4) 金田隆志, 近田龍一郎, 折笠精一, 坂井清英, 太田章三, 阿部優子, 畠山孝仁, 池田成徳, 久慈 了: 尿管異所開口例の半腎・患腎摘出後の対側腎機能の検討. 日泌尿会誌 84: 297-302, 1993.
- 5) Curran, T., Bravo, R. and Muller, R.: Transient induction of c-fos and c-myc is an immediate consequence of growth factor stimulation. Cancer Surveys, 4: 655-681, 1985.
- 6) 松本清治: 増殖・細胞周期におけるストレスタンパク質の機能. 細胞工学 10: 334-339, 1991.
- 7) Van Why, S. K., Hildebrandt, F., Ardito, T., Mann, A. S., Siegel, N. J. and Kashgarian, M.: Induction and intracellular localization of HSP-72 after renal ischemia. Am. J. Physiol. 263: F69-F775, 1992.
- 8) Papatheanasiou, M. A. and Fornace, A. J., Jr.: DNA-damage inducible genes., in Molecular and Clinical Advances in Anticancer Drug Resistance, edited by Ozols, R. F., Kluwer Academic Publishers, Boston. pp13-36, 1991.
- 9) Sawczuk, I. S., Hoke, G., Olsson, C. A., Connor, J. and Buttyan, R.: Gene expression in response to acute unilateral ureteral obstruction. Kidney Int. 35: 1315-1319, 1989.
- 10) 東北大病理 高橋裕人 personal communication
- 11) Royds, J. A., Sharrard, R. M., Wagner, B. and Polacz, S. V.: Cellular localisation of c-myc product in human colorectal epithelial neoplasia. J. Pathol. 166: 225-233, 1992.