

論文内容の要旨

2018（平成 30）年度

Irradiation-induced premature cellular senescence
involved in glomerular diseases in rats

放射線照射によって誘導された細胞老化は
糸球体病変の発症機序に関与する
- ラットを用いた実験 -

平成 31 年 1 月 23 日（水）

日本医科大学大学院医学研究科 腎臓内科学分野

大学院生 博士課程 4 年生 荒谷 紗絵

SCIENTIFIC REPORTS. 第 14 卷 第 8 号

2018 年 11 月 14 日発行 掲載

【背景】

『細胞老化』とは、細胞が不可逆的に分裂を停止し、一方で代謝は維持された状態を言う。近年、『細胞老化』が様々な慢性臓器障害の進展に寄与することが報告されている。私たちはこの報告に着目し、慢性腎臓病の病態にも細胞老化が関わっていると推察した。細胞老化の一因に放射線による DNA 障害が報告されている。私たちは放射線腎症モデルラットを作成し、放射線誘導の早期細胞老化と慢性腎臓病関わりを、糸球体病変に注目しながら形態的・機能的に解析した。

【方法】

放射線腎症モデルラットは、7-8 週齢、雄 DA ラットを用い、片側腎臓に放射線を照射し（照射群）、反対側は遮蔽し（対照群）、作成した。予備実験の結果から放射線量は 18 Gy とした。照射しないラットを正常群とした。照射後 3, 6, 9 カ月目に、全身状態（体重、血圧）、腎機能障害（蛋白尿、血清 BUN 値）、貧血、および腎組織を採取した（各群 N=3-6）。細胞老化は、SA- β gal, p21, p16, Ki-67, および Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)を用いて評価した。

次に、糸球体病変の病理像から、糸球体内皮細胞がとくに影響を受けていると考え、In vitro の実験で糸球体内皮細胞の解析を行った。ラット培養糸球体内皮細胞に放射線 20 Gy を照射し、照射後 20 日目まで評価した。DNA 障害は γ H2AX を用いて、細胞老化マーカー

一は SA- β gal, p21, p16, p53, および SASP を用いて評価した。さらに SASP の発現と NF- κ B の関わりを評価した。

【結果】

放射線腎症モデルラットでは、正常ラットに比べて、体重は 3 カ月目以降に増加がみられず、9 カ月目に有意に体重増加不良が認められた。血圧、尿蛋白、血清 BUN 値は 9 カ月目に有意に上昇した。貧血は 9 カ月目に認められたが、正常群と比較して有意な差は認められなかった。

腎病理像は、照射群の糸球体に血栓性微小血管症や虚脱糸球体を認め、時間経過とともにその頻度が上昇した。照射群の糸球体内皮細胞の数は、時間経過とともに減少した。照射群の糸球体上皮細胞に上皮細胞障害マーカー (Desmin) の発現が認められたが、3, 6, 9 カ月で時間経過に伴う変化は認められなかった。対照群・正常群では、血栓性微小血管症や虚脱糸球体の出現、糸球体内皮細胞数の減少、Desmin の出現は認められなかった。

照射群で、SA- β gal は、照射後 3 カ月目に陽性がみられ、9 カ月目まで漸増した。p21 の免疫染色は、照射群のみで陽性となった。3 カ月目から照射群の糸球体内皮細胞、上皮細胞で p21 が陽性となったが、3 カ月目は糸球体内皮細胞有意であった。その後、p21 陽性内皮細胞の数は、時間経過とともに減少したが、p21 陽性上皮細胞の数は、時間経過に伴う変化は認められなかった。p21 の mRNA は、3, 6, 9 カ月目いずれも照射群が対照群・正常

群と比べて有意に上昇を認めた。同様に p16 の mRNA は、9 か月目で照射群が上昇傾向を示したが、有意な差は認められなかった。細胞増殖マーカー Ki-67 は、照射群・対照群・正常群いずれにおいても有意な差は認められなかった。SASP のうち IL-6 は、照射群で 9 か月目に発現上昇が認められた。

放射線照射ラット培養内皮細胞で、SA- β gal が陽性となり、20 日目まで時間経過とともに漸増した。DNA 障害マーカー γ H2AX の発現を確認した。次に p53 の免疫染色、p21 ならびに p16 の mRNA も照射細胞で発現上昇が認められた。照射後 15、20 日目に、SASP のうち、IL6、TNF α 、VEGF-A、ICAM、VCAM の mRNA が上昇した。さらに NF- κ B の mRNA が上昇し、その核内移行（活性化）も示された。

【考察】

本研究では、放射線腎症モデルラットを当教室で初めて作成し、細胞老化を介した糸球体病変の発症機序を解明した。放射線による細胞老化は、糸球体内皮細胞でより影響を受けやすく、内皮細胞障害の表現型として血栓性微小血管症や虚脱糸球体の組織像を呈すると考えられた。とくに p21 陽性内皮細胞と糸球体内皮細胞の数は並行して減少しており、それと同時に血栓性微小血管症や虚脱糸球体の出現頻度が増していくことから、老化による内皮細胞の障害や脱落が糸球体病変の形態形成機序に関与していると推察した。

SASP は、老化のマーカーであると同時に慢性臓器障害の進展にも寄与し、その SASP

の誘導に NF- κ B 活性化が関わっていることが近年注目されている。私たちの検討でも、糸球体ならびに糸球体内皮細胞は老化とともに SASP の発現が亢進していた。また糸球体内皮細胞において NF- κ B の活性化も示され、SASP の誘導にかかわると推察された。

【結語・今後の展望】

本研究は放射線の DNA 障害に誘導された細胞老化を研究テーマとしたが、加齢においても DNA 障害から細胞老化に至ることが知られている。私達は今回の研究成果を踏まえ、加齢に伴う慢性腎臓病発症で、細胞老化との関わりや、進展予防・治療法の開発につなげることを今後の展望にしたい。

(1905 文字)