

腎虚血—再灌流モデルにおけるアポトーシスの 発現と病理組織学的変化

— Fas 介在性アポトーシス異常マウスを用いた検討—

立浪康晴*, 森 士郎**, 能勢真人***
城戸幹太*, 猪狩俊郎*, 岩月尚文*

はじめに

腎血流量の著しい低下によって誘発された急性腎不全はこれまで急性尿細管壊死等のネクロシスを主体とした病態として捉えられてきたが、近年アポトーシスという細胞死の概念が急速に広まってきたのに伴い虚血性腎障害においてもアポトーシスの関与を示す報告がなされるようになってきた^{1,2)}。

このアポトーシスを誘導するタンパクとして、Fas および Fas ligand (Fas L) が知られている。Fas は Tumor Necrosis Factor (TNF) ファミリーに属す I 型膜蛋白質で³⁻⁵⁾、同じく TNF ファミリーに属する II 型膜蛋白質の Fas L が⁶⁻⁸⁾、その受容体である Fas に結合することにより細胞にアポトーシスを誘導する⁹⁾。この Fas L-Fas システムは免疫系における不要な細胞の除去に関与しており^{7,10,11)}、このシステムの機能欠損が自己免疫疾患を起こすことも知られている^{6,12)}。虚血性腎障害においても Fas-Fas L 系を介したアポトーシスの関与が考えられるが、その詳細については不明な点が多い。本研究においては、機能的な Fas の遺伝子を欠損している C3H/HeJ-*lpr/lpr* (C3H/*lpr*) および MRL/MpJ-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) 系マウス¹³⁾、さらに Fas L を規定する遺伝子を欠

損している C3H/HeJ-*gld/gld* (C3H/*gld*) および MRL/MpTn-*gld/gld* (MRL/*gld*) 系マウスを使用し^{14,15)}、腎虚血—再灌流モデルにおけるアポトーシスの発現、および病理組織学的変化の程度とアポトーシス発現程度との関係、またそれらに際しての Fas および Fas ligand の役割について検討した。

材料および実験法

1. 実験動物

Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) 由来の 2 カ月齢の雄マウス C3H/*+*, C3H/*lpr*, C3H/*gld*, MRL/*+*, MRL/*lpr* を用い、東北大学医学部動物実験施設にて同施設の実験指針に準じて飼育・実験を行った。また、上記 MRL/*+* に、戻し交配により、C3H/*gld* 由来の *gld* 遺伝子を導入した MRL/*gld* を同施設にて同様に飼育し、実験に用いた¹⁵⁾。

2. 実験群

Fas 欠損マウスとして C3H/*lpr*, MRL/*lpr*, Fas L 欠損マウスとして C3H/*gld*, MRL/*gld*、さらに、対照正常マウスとして C3H/*+*, MRL/*+* を用い、マウスの系と処置法により実験群を 5 Group に分けた。(表 1)

腎虚血モデルは、エーテル麻酔下で、右背側皮切にて注意深く右腎臓を引き出し、血管用止血クリップにて腎動・静脈をクリッピングすることにより作成した。その後、腎を腹腔内に戻し、各 Group の虚血時間の後クリップを解除し再灌流とし、縫合した。

*東北大学歯学部附属病院歯科麻酔科

** 同 口腔外科学第二講座

***愛媛大学医学部病理学第二講座

表1 実験群

	Group I	Group II	Group III	Group IV	Group V
マウス (2カ月齢, ♂)	C3H/+ 正常マウス (n=28)	C3H/+ (n=8) C3H/lpr (n=7) C3H/gld (n=7)	C3H/+ (n=7) C3H/lpr (n=7) C3H/gld (n=6)	MRL/+ (n=7) MRL/lpr (n=7) MRL/gld (n=8)	MRL/+ (n=7) MRL/lpr (n=6) MRL/gld (n=6)
虚血時間 (右腎)	15 min (n=7) 30 min (n=6) 60 min (n=7) 120 min (n=8)	60 min	60 min	60 min	60 min
腎摘出日	3日後	1日後	3日後	1日後	3日後

表2 尿管における病理組織学的所見の評価

	cortex	outer medulla	inner medulla
dilatation			
protein casts	- ; normal		(score 0)
cellular casts	+ ; mild		(score 1)
eosinophilic cytoplasm	++ ; moderate		(score 2)
pyknotic nuclei	+++ ; severe		(score 3)
Subtotal Index	0~15	0~15	0~15
Pathological Index		0~45	

また、標本の摘出の際は、対照としてクリッピングしなかった左腎（非虚血腎）も、同時に摘出した。

3. TUNEL法による染色、陽性細胞数のカウント

プロトコルに従い摘出した腎を、ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、組織切片を作製、これらの切片上にて、TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)法を用い、アポトーシス発現細胞を同定した¹⁶⁾。染色には TaKaRa in situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa社製)を用いた。そこで、切片の0.25平方ミリメートルの範囲50視野を無作為に選び、50視野12.5平方ミリメートルにふくまれる TUNEL 陽性細胞数を算出した。

4. 病理組織学的検討

病理組織学的検討のため、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施行し、尿管の障害の程

度を皮質、髓質外層・内層の各部位において、表2のように病理組織学的に評価し、その総合点を障害の強いものほど数値が大きくなる Pathological Index として算出した。

5. 統計学的検定

統計学的検定は、TUNEL 陽性細胞数の比較においては、student t検定を、Pathological Index の比較においては、Kruskal-Wallis 検定を行い、いずれも危険率5%未満をもって有意差ありとした。

結 果

病理組織学的所見

Group Iにおいて、腎への虚血一再灌流により尿管の拡張、尿管における蛋白円柱・細胞質円柱の出現、尿管上皮細胞質の染色性の好酸性化、核濃縮等の変化が認められ、糸球体・間質には主だった変化は認められなかった。また、炎症性細胞の浸潤は認められなかった。これらの変化を、Pathological Index として算出し、C3H/+マウスにおける虚血時間とこれらの病理組織学的変化を検討したところ (Group I)、15分から60分の虚血において虚血時間の延長と共に病的変化が強く発現していた (図1)。

Group II~Vにおいて、lpr および gld マウスの Pathological Index は、+マウス (正常) と比較し低値を示した。 (図2) また、虚血再灌流後、摘出までの時間 (1日後と3日後) の比較 (すなわち Group II と III, IV と V の比較) においては有意差は認められなかった。

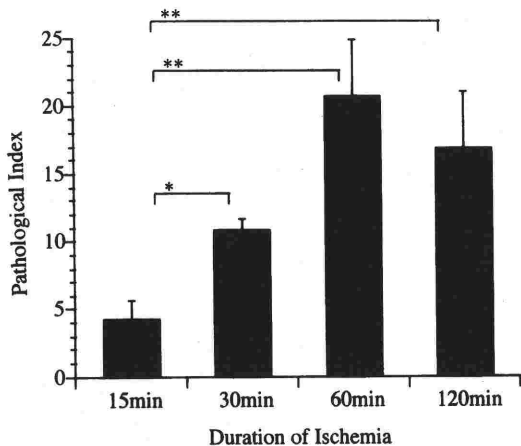


図1 虚血時間に伴う Pathological Index の変化 (Group I : C3H/+ , 3日後摘出)

Data are expressed as means ± SE.
*P<0.05. **P<0.01.

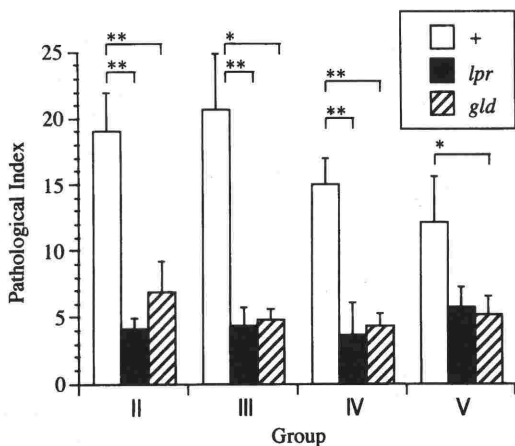


図2 背景遺伝子および虚血一再灌流後の時間の違いによる Pathological Index の差異

Group II: C3H系/1日後摘出
Group III: C3H系/3日後摘出
Group IV: MRL系/1日後摘出
Group V: MRL系/3日後摘出
Data are expressed as means ± SE.
*P<0.05. **P<0.01.

TUNEL 陽性細胞数の検討

対照正常マウス (C3H/+マウス) における虚血時間と TUNEL 陽性細胞数の関連を検討したところ (Group I), どの虚血時間においても虚血腎では、非虚血腎と比較して陽性細胞数が有意に多

く、さらに虚血時間の延長に伴い増加することが示された。(図3A, B)

非虚血腎と虚血腎における TUNEL 陽性細胞数を比較したところ、Group I ~ Vのすべての群において非虚血腎より虚血腎では有意に高値を示した。(図3B, 図4)

欠損マウスと正常マウスを比較したところ、虚血腎においては、TUNEL 陽性細胞数が、Fas 欠損マウス (C3H/*lpr*, MRL/*lpr*), Fas L 欠損マウス (C3H/*gld*, MRL/*gld*) では、対照正常マウス (C3H/+, MRL/+) と比較して、低値を示した。

(図4) 背景遺伝子の違いによるアポトーシスの発現への影響を検討する目的で MRL 系と C3H 系の比較を行ったところ (すなわち Group II と IV, III と V の比較) 有意差は認められなかった。

また、虚血再灌流後、摘出までの時間 (1日後と3日後) の比較 (すなわち Group II と III, IV と V の比較) においても有意差は認められなかった。さらに非虚血腎においても TUNEL 陽性細胞数は、Fas 欠損マウス (C3H/*lpr*, MRL/*lpr*), Fas L 欠損マウス (C3H/*gld*, MRL/*gld*) では、対照正常マウス (C3H/+, MRL/+) と比較して、低値を示した。(図4)

考 察

虚血性腎障害における Fas 介在性アポトーシスの関与について検討するため、Fas 介在性アポトーシスの2種の異常マウス2系統を用いて検討した。

常染色体劣性遺伝形式をとる単一の突然変異遺伝子である *lpr* 遺伝子は第19染色体に位置し、アポトーシスに関与する Fas の欠損遺伝子であることが明らかとなっており、胸腺におけるアポトーシスの障害が関与し、異常リンパ球の増殖がみられる¹⁰⁾。一方 *gld* 遺伝子は C3H/HeJ 系マウスの交配によって生じた突然変異遺伝子で第1染色体に位置し、*lpr* 遺伝子同様に常染色体劣性遺伝形式を持ち、*lpr* 遺伝子と非常に類似した表現型を示すリンパ球の増殖と自己免疫疾患を誘導することが知られており¹⁴⁾、FasL の欠損遺伝子であることが報告されている⁷⁾。

lpr, あるいは *gld* 遺伝子の存在により、表3に示すように、約4~5カ月齢でマウスに自己抗体の発現・リンパ節の腫大等の病態が発生する

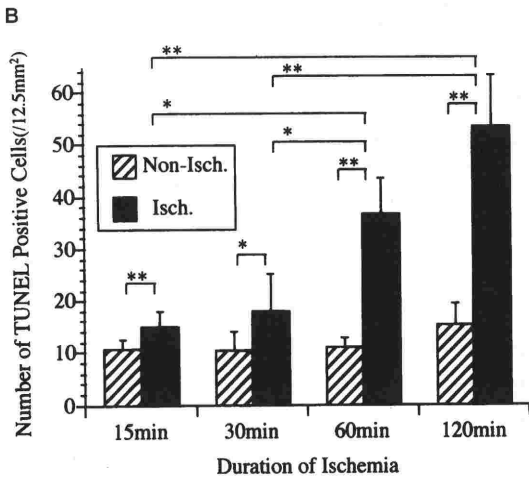
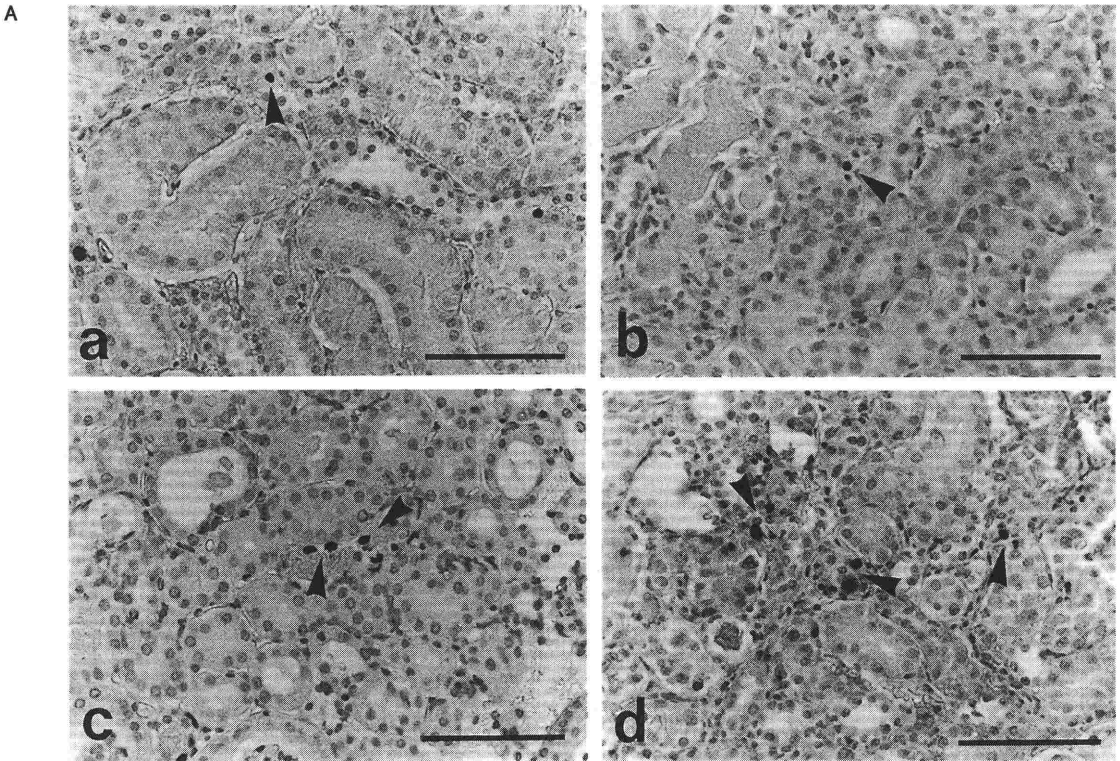


図 3 A 虚血時間に伴う腎組織における TUNEL 陽性細胞発現の差異

(Group I) a: 15分虚血 b: 30分虚血 c: 60分虚血 d: 120分虚血

いずれも C3H/+, 3日後摘出, TUNEL 染色, Bars=100 μ m

B 虚血時間に伴う TUNEL 陽性細胞数の変化 (Group I)

Data are expressed as means \pm SE.

* $P < 0.05$. ** $P < 0.01$.

ことが知られており¹³⁾, 糸球体腎炎・動脈炎・関節リウマチ等の発症には MRL 系マウスの有する背景遺伝子が必要であると報告されている¹⁷⁾. そこで, この背景遺伝子の違いによるアポトーシスの発現への影響を検討する目的で MRL と C3H の 2 系統の 2 ヶ月齢のマウスを使用し, 比較検討したところ, TUNEL 陽性細胞数, Pathological In-

dex 共に有意差はなく, マウスの系の違いによる差は示されなかった. 従って, 虚血負荷アポトーシスの誘導及び病理組織学的変化において少なくとも C3H と MRL 系マウスの背景遺伝子による違いはないことが示唆された.

TUNEL 法は組織切片上にて鋭敏かつ簡便にアポトーシス発現細胞を検出することができる. 本研究においてはアポトーシスの発現部位, 定量的な比較, 病理組織学的変化との比較などを目的としたためこれらの要件を満たす TUNEL 法を用いてアポトーシス発現細胞を同定した. しかしな

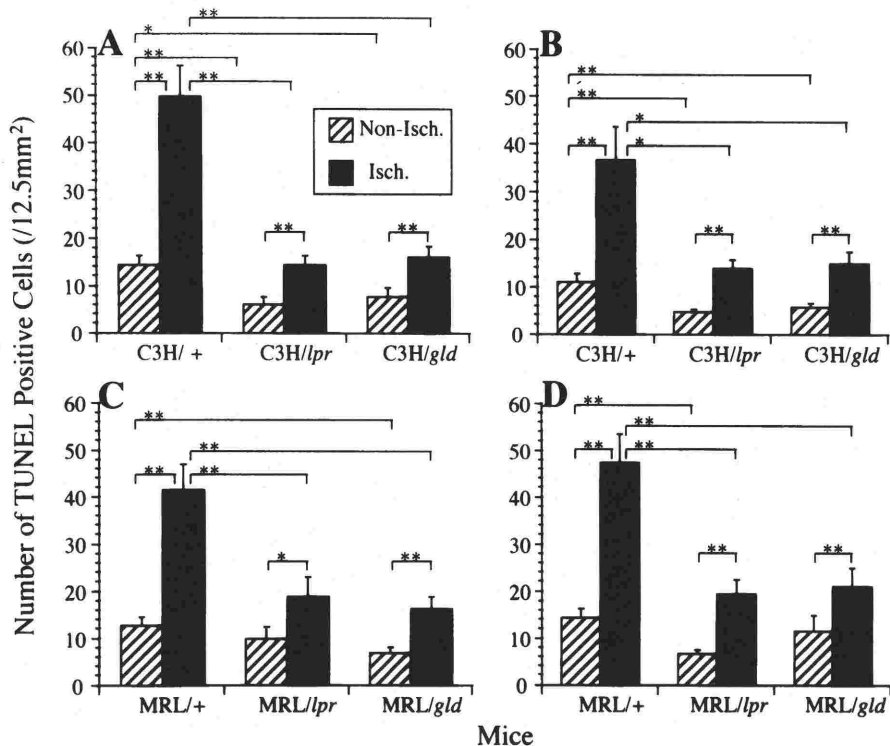


図4 背景遺伝子および虚血—再灌流後の時間の違いによる TUNEL 陽性細胞数の差異
 A : Group II (C3H 系/1 日後摘出) B : Group III (C3H 系/3 日後摘出)
 C : Group IV (MRL 系/1 日後摘出) D : Group V (MRL 系/3 日後摘出)
 Data are expressed as means ± SE. *P < 0.05. **P < 0.01.

表3 実験使用マウス

マウスの系	MRL		C3H		MRL&C3H
	<i>lpr</i>	<i>gld</i>	<i>lpr</i>	<i>gld</i>	
遺伝子	<i>lpr</i>	<i>gld</i>	<i>lpr</i>	<i>gld</i>	+
遺伝子の特徴	Fas 欠損	Fas ligand 欠損	Fas 欠損	Fas ligand 欠損	正常 (対照群)
病態 (4~5カ月齢 で発症)	自己抗体の発現 免疫複合体の増加 リンパ節の腫大				認められない
	免疫複合体型糸球体腎炎 肉芽腫型動脈炎 慢性関節リウマチ SLE 様病変			認められない	

がら、壊死組織や不適切な酵素処理を施した組織の切片においては、核内 DNA のランダムな断裂が起こっており、その末端の一部に TdT が結合し、非特異的な偽陽性の発現がみられるので注意が必要であると思われる。

対照正常マウス (C3H/+マウス) における虚血

時間と TUNEL 陽性細胞数の関連を検討したところ、どの虚血時間においても虚血腎では、非虚血腎と比較して陽性細胞数が有意に多く、さらに虚血時間の延長に伴い増加することが示された。すなわち、虚血負荷はアポトーシスの誘導因子であり、虚血時間に相関しアポトーシスが誘導され

ることが示唆された。非虚血腎においても TUNEL 陽性細胞がみられたが、そこで非虚血腎における TUNEL 陽性細胞数を検討したところ、Fas 欠損マウス (C3H/*lpr*, MRL/*lpr*)、Fas L 欠損マウス (C3H/*gld*, MRL/*gld*) では、対照正常マウス (C3H/*+*, MRL/*+*) と比較して、低値を示した。すなわち、この結果は、非虚血腎においても Fas 介在性の生理的アポトーシスが存在していることを示唆するものである。

虚血腎における TUNEL 陽性細胞数を検討したところ、Fas 欠損マウス (C3H/*lpr*, MRL/*lpr*)、Fas L 欠損マウス (C3H/*gld*, MRL/*gld*) では、対照正常マウス (C3H/*+*, MRL/*+*) と比較して、低値を示した。これは、虚血腎におけるアポトーシスの発現に際して FasL-Fas システムが関与していることを示唆するものである。一方、Fas および Fas L の欠損マウスにおいても正常マウスと比較して数は少ないものの、アポトーシスの発現がみられた。このことは、虚血負荷により非 Fas 介在性のアポトーシスも発現することを推察させるものである。

FasL-Fas システムは自己反応性の T 細胞の除去や、細胞障害性 T 細胞の細胞障害機構等に関与していると考えられており^{7,10,11)}、FasL-Fas システムを介して誘導されるアポトーシスは、放射線や温熱刺激、ホルモン刺激によるアポトーシス誘導に較べて蛋白合成を必要としないため短時間でアポトーシス誘導が可能であると言われている¹⁹⁾。

本研究では、虚血-再灌流ののち 1 日後と 3 日後に標本を摘出し時間的な違いによるアポトーシスの発現を検討した。当初、著者らは腎虚血-再灌流におけるアポトーシスは、虚血により短時間に直接誘導されるものと、虚血後の尿細管修復の過程における過剰な細胞の除去のために、ある程度の時間の後に誘導されるものがあると仮定し、その発現に違いがあるのではないかと考えた。しかし、今回の結果では両者の間では少なくとも数量的な差は認められなかった。時間的なアポトーシスの発現を検討するためには、さらに長期間にわたる実験が必要であると思われる。

虚血腎の病理組織学的所見を、15分、30分、60分、120分において検討したところ、腎への虚血-再灌流により尿細管の拡張、尿細管における蛋

白円柱・細胞質円柱の出現、尿細管上皮細胞質の染色性の好酸性化、核濃縮等の変化が認められ、糸球体・間質には主だった変化は認められなかった。これらは、従来の虚血による初期の急性尿細管壊死の病態に近い所見と思われた。従来の報告では、腎髄質外層に強い病変が認められたとされているが¹⁸⁾、腎実質各層の病変の強さについて Subtotal Index (表 2) を用いて検討したところ、本研究においても同様な所見が得られた。しかし、従来報告されたような 90~120分虚血における著明な尿細管壊死は認められず、120分虚血の一部に軽度の急性尿細管壊死が認められるにすぎなかった。また、120分の Pathological Index が 60分と比較し低かったのは、この尿細管壊死の部分を Pathological Index から除外したためによるものと思われる。

虚血に伴う病理組織学的変化の指標である Pathological Index と、アポトーシス発現の指標である TUNEL 陽性細胞数の変化には同様の傾向が認められた。すなわち、C3H/*+*と MRL/*+*の Pathological Index は、Fas 介在性アポトーシス遺伝子欠損マウスの C3H/*lpr*と C3H/*gld*, MRL/*lpr*と MRL/*gld*のそれぞれと比較して有意に Index が高く(病的変化が強く)、同様に、TUNEL 陽性細胞数に関しても、C3H/*+*と MRL/*+*の TUNEL 陽性細胞数は、C3H/*lpr*と C3H/*gld*, MRL/*lpr*と MRL/*gld*のそれぞれと比較して有意に多かった。言い換えれば、アポトーシスの発現の多い群においては、虚血に伴う病的腎組織変化が強かった。従って、虚血における腎障害の病理組織学的変化の初期段階において、Fas L-Fas システム介在性のアポトーシスが重要な役割を演じている可能性が示唆された。

結 論

以上より、腎虚血によるアポトーシスの発現には、Fas および Fas ligand が強く関与しており、虚血による腎障害の病理組織学的変化において、Fas L-Fas システム介在性アポトーシスが重要な役割を演じている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Allen J, Winterford C, Axelsen RA, et al : Effect of hypoxia on morphological and biochemical characteristics

- of renal epithelial cell and tubule cultures. *Ren Fail* 14 (4) : 453-460, 1992
- 2) Schumer M, Colombel MC, Sawchuk TS, et al : Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 140 : 831-838, 1992
 - 3) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M : A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine* 169(5) : 1747-1756, 1989
 - 4) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al : The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66(2) : 233-243, 1991
 - 5) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, et al : The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *Journal of Immunology* 148 (4) : 1274-1279, 1992
 - 6) Suda T, Takahashi T, Golstein P, et al : Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75(6) : 1169-1178, 1993
 - 7) Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, et al : Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76(6) : 969-976, 1994
 - 8) Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, et al : Human Fas ligand ; gene structure, chromosomal location and species specificity. *International Immunology* 6(10) : 1567-1574, 1994
 - 9) Nagata S, and Golstein P : The Fas death factor. *Science* 267 : 1449-1456, 1995
 - 10) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, et al : Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356(6367) : 314-317, 1992
 - 11) Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S : Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of *lpr* mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(5) : 1756-1760, 1993
 - 12) Cheng J, Zhou T, Liu C, et al : Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263(5154) : 1759-1762, 1994
 - 13) Murphy ED. and Roths JB : Autoimmunity and lymphoproliferation : Induction by mutant gene *lpr*, and acceleration by a male-associated factor in strain BXSb mice.: *Genetic Control of Autoimmune Disease* (ed. by Rose, N.R. et al) Elsevier North Holland Inc., NY, 207, 1979
 - 14) Roths JB, Murphy ED, Eicher EM : A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *Journal of Experimental Medicine* 159 (1) : 1-20, 198
 - 15) Ito RM, Terasaki S, Nose M, et al : Rheumatic diseases in an MRL strain of mice with a deficit in the functional Fas Ligand. *Arthritis & Rheumatism* 40(6) : 1054-1063, 1997
 - 16) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119 : 493-501, 1992
 - 17) Nose M, Nishimura M, Kyogoku M : Analysis of granulomatous arteritis in MRL/Mp autoimmune disease mice bearing lymphoproliferative genes. The use of mouse genetics to dissociate the development of arteritis and glomerulonephritis. *American Journal of Pathology* 135 (2) : 271-280, 1989
 - 18) Kreisberg JJ, Bulger RE, Trump BF, et al : Effects of transient hypotension on the structure and function of rat kidney. *Virchows Archiv B Cell Pathology* 22(2) : 121-133, 1976
 - 19) Takahashi S, and Kikuchi K : Pathologic basis of apoptosis in cancer therapy. *Surgery Frontier* 3(2) : 15-20, 1996