

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本尿路結石症学会誌 (2002.12) 1巻1号:103～109.

シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞での
phosphatidylserine発現の定量的評価とapoptosis pathwayへの関与の検
討

山口 聡, 加藤祐司, 高下紀子, 中園周作, 奥山光彦, 八竹
直

◆ Session 4-4

シュウ酸カルシウム結石形成モデルにおける腎集合管細胞での phosphatidylserine 発現の定量的評価と apoptosis pathway への関与の検討

1)旭川医科大学 泌尿器科 2)遠軽厚生病院 泌尿器科

山口 聡¹⁾、加藤 祐司¹⁾、高下 紀子¹⁾、中園 周作¹⁾、
奥山 光彦²⁾、八竹 直¹⁾

背景と目的(1)

- 1 尿路結石形成の初期過程において、結晶細胞間相互作用 (crystal cell interaction)は重要である。
- 2 尿路上皮細胞の傷害時に、シュウ酸カルシウムなどの結晶の接着が増加することが知られている。
- 3 その要因の一つに細胞膜を構成するリン脂質の変化が考えられている。特に、細胞傷害時の細胞膜表面への phosphatidylserine (PS)の露出が重要であり、これは早期apoptosisにも関与している。
- 4 シュウ酸曝露により細胞膜外方のPSが増加し、細胞にCOM結晶が接着しやすくなることが*in vitro*で明らかになっている。

スライド2に一つの schema を示しますが、正常細胞の細胞膜では外方、内方のリン脂質の構成はほぼ一定であり、phosphatidylserine は通常、内方にしか存在しないと考えられています。ところがこれに、細胞の傷害、apoptosisや細胞内カルシウムの増加などの変化があると、細胞膜のリン脂質の構成が変化し、phosphatidylserine が外方に出現してきます。これが、主に電氣的にCOM結晶を引きつけ、結晶を細胞に付着させます。これが以後の結石形成に重要な因子の一つと考えられているわけです。

▲ スライド1

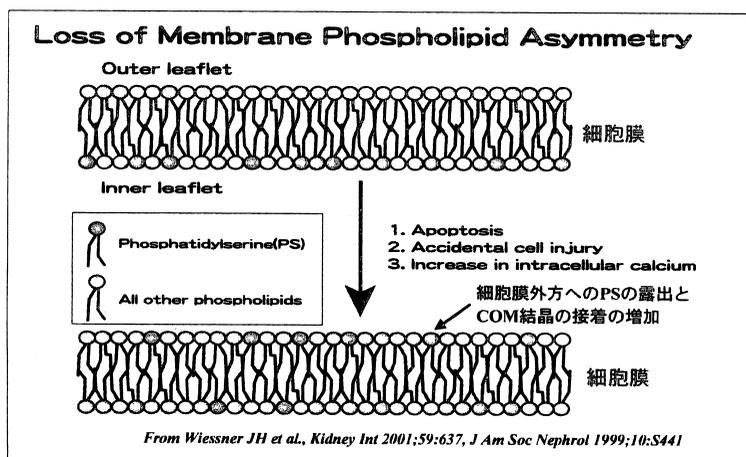
尿路結石形成の初期過程において、腎上皮細胞とシュウ酸カルシウムなどの結晶細胞間相互作用～crystal cell interactionは重要と考えられています。尿路上皮細胞傷害時にシュウ酸カルシウムなどの結晶の接着が増加することが知られ、その要因の一つに細胞膜を構成するリン脂質、特に phosphatidylserine の局在の変化があります。これまで細胞培養による*in vitro*実験では、高濃度のシュウ酸が細胞傷害を惹起し、通常、細胞膜内方にしか存在しない phosphatidylserine が、細胞膜外方に発現することによって、細胞にCOM結晶が接着しやすくなることが明らかになっています。

背景と目的(2)

- 5 すなわち、細胞膜表面でのPS発現動態を検査することにより、結晶細胞間相互作用の機序の一つを解明することができる。
- 6 *in vivo*実験において、細胞傷害によるPSの発現は不明であり、*in vitro*においてもその定量的評価は行われていない。
- 7 われわれは、シュウ酸カルシウム結石形成モデル(ラット)を用い、高シュウ酸尿状態における腎集合管細胞のPSの発現を、Flowcytometryにより検討した。
- 8 細胞膜外方へのPS出現は、細胞のapoptosis早期に深く関与し、apoptosis pathwayに重要な役割を担うcaspase familyについても検討を加えた。

▲ スライド3

したがって、このような変化を細胞で観察することにより、crystal cell interaction の機序の一つが解明されるこ



Dr. Yamaguchi

◀ スライド2

とが期待されます。ただいまだにこれら変化は、*in vivo*実験では再現されておらず、また *in vitro*においてもその定量的評価が行われていません。そこで私たちは、ラットのシュウ酸カルシウム結石形成モデルを用いて、高シュウ酸尿下における腎集合管細胞でのphosphatidylserineの発現をまずflowcytometryを用いて検討しました。またこの変化は、主に早期 apoptosis で観察されると考えられていますが、それより更に早期に起こる apoptosis pathway で重要な caspase family についての検討も加えました。

方法

I 動物実験

6週齢、雄性SDラットに、以下の調整水を自由摂水(n=12)

Group 1: 0.1% EG + 1.0% AC (9 days)

Group 2: 0.2% EG + 1.0% AC (9 days)

Group 3: 0.4% EG + 1.0% AC (9 days)

Group 4: 0.4% EG alone (14 days)

Group 5: 0.8% EG alone (14 days)

Control : tap water

(EG : ethylene glycol, AC : ammonium chloride)

▲ スライド 4

まず動物実験の方法を示しますが、昨年の研究会で発表しました結果をもとに、腎実質障害を最小限に抑制し、かつ確実に高シュウ酸尿を誘発するように調整した実験群を設定しました。6週齢雄性SDラットを使用し、グループ1から3は、Ethylene glycolと1%塩化アンモニウムを9日間、自由摂取させた群、それぞれEthylene glycolの濃度は、0.1-0.2-0.4%と設定しました。グループ4、5は0.4-0.8%のEthylene glycolを単独で14日間投与しました。なおコントロール群は、通常の水道を自由摂取させました。

II 検討項目

1 24時間代謝ケージ飼育(24時間尿採取):
尿量, Ca, IP, Cre, Mg, oxalate, NAG

2 採血: Ca, IP, Cre, BUN

3 腎組織:

右腎: 腎乳頭部切離~細胞分離、FCMによる解析、
腎集合管細胞のcaspase activity (MBL kit)

左腎: HE染色, von Kossa染色, Pizzolato染色

4 膀胱穿刺尿の結晶分析: 偏光顕微鏡

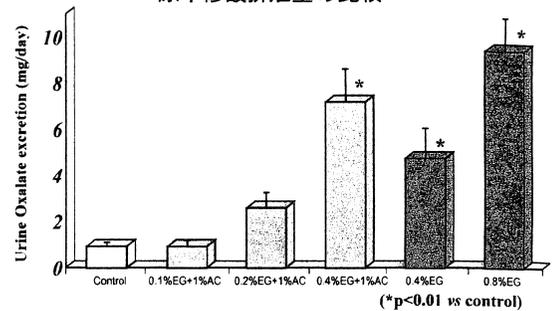
(FCM: Flowcytometry)

▲ スライド 5

代謝ケージにて24時間尿を収集、採血後に速やかに膀胱穿刺を行い、尿の結晶分析を偏光顕微鏡にて施行しました。また右腎は、腎乳頭部を切除、細切後、dispaseとcollagenase処理にて腎集合管細胞を単離し、flowcytometryに供しました。一方、これとは別に細胞溶解処理を行い、apoptosisの細胞内情報伝達系に重要な役割を果たすcaspase cascadeのうち、caspase 3、8、9についてその活性を測定しました。左腎は、HE染色、von Kossa染色、Pizzolato染色の組織学的検討に供しました。

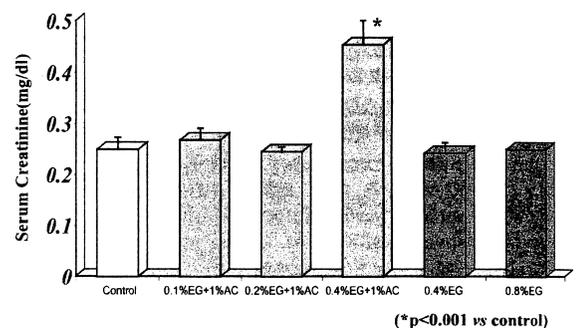
I 検査成績

尿中尿酸排泄量の比較



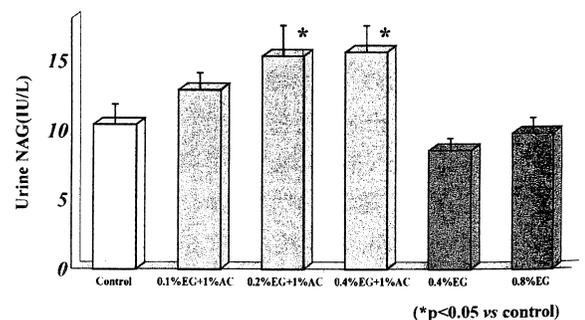
▲ スライド 6

血清クレアチニン値の比較



▲ スライド 7

尿NAGの比較

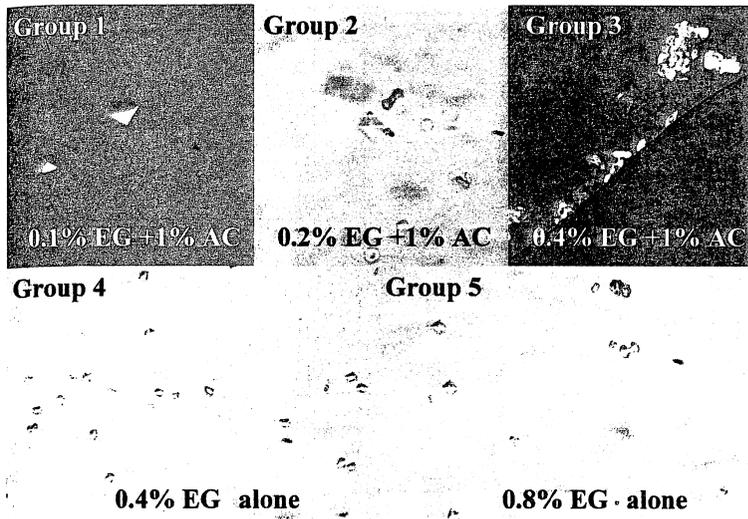


▲ スライド 8

実験の結果ですが、まず尿中のシュウ酸排泄量は、Ethylene glycolの投与量に従い増加しておりました。同じ濃度の比較では、塩化アンモニウム投与群の方が若干排泄量が多い傾向でした(スライド6)。

また血清クレアチニンは、0.4% Ethylene glycol + 塩化アンモニウム投与群で有意に上昇していました(スライド7)。

尿細管障害の状態を、尿NAGで検討してみました。全体に塩化アンモニウム投与群で高値、またEthylene Glycol



腎の病理組織学的所見

Group 5 (0.8% EG alone)



▲ スライド 11

◀ スライド 10

の濃度依存性であり、特に0.2%-0.4%では有意に増加していました。一方、Ethylene glycol 単独投与では、0.8%でも増加は認めませんでした(スライド8)。

II 尿中の結晶と腎組織

Experimental Group	Urine				Kidney
	Amorphous	COD	COM	COD/COM	
Control	7%	0	0	0	0
G1; 0.1%EG+1%AC	42%	8%	0	0	8%
G2; 0.2%EG+1%AC	8%	8%	25%	0	25%
G3; 0.4%EG+1%AC	0	29%	14%	50%	93%
G4; 0.4%EG alone	33%	25%	0	0	8%
G5; 0.8%EG alone	8%	17%	8%	50%	83%

▲ スライド 9

各実験群の膀胱穿刺尿による尿中のシュウ酸カルシウム結晶の出現頻度とその種類、および腎組織内のシュウ酸カルシウム結晶沈着の出現頻度のまとめを示します。尿中および腎組織内の結晶の出現はEthylene Glycol濃度依存性に増加しており、尿中の結晶分析では、Ethylene Glycol濃度にとまないCOM結晶が増加する傾向でした。

尿中の結晶形態を示しますが、低濃度のEthylene Glycolでは、COD結晶が多く認められ、濃度が高くなるにつれてCOM結晶が認められる傾向でした。塩化アンモニウム投与群では、全体に結晶サイズが大きく、その数も多い傾向でした(スライド10)。

スライド11には、0.8%Ethylene Glycol 単独投与群の腎乳頭部の病理組織像を示しますが、papillary tipにシュウ酸カルシウム結晶の沈着を認め、それが腎盂側へ流出している像が観察されました。

同様な所見は、0.4%Ethylene Glycol + 塩化アンモニウム投与群でも認められ、近接切片をKossa、Pizzolato染色

Group 3 (0.4% EG+1.0% AC)



スライド 12 ▶

Kossa stain

Pizzolato stain



で見ますと、結晶には、リン酸塩とシュウ酸塩が含有されていることがわかりました(スライド12)。

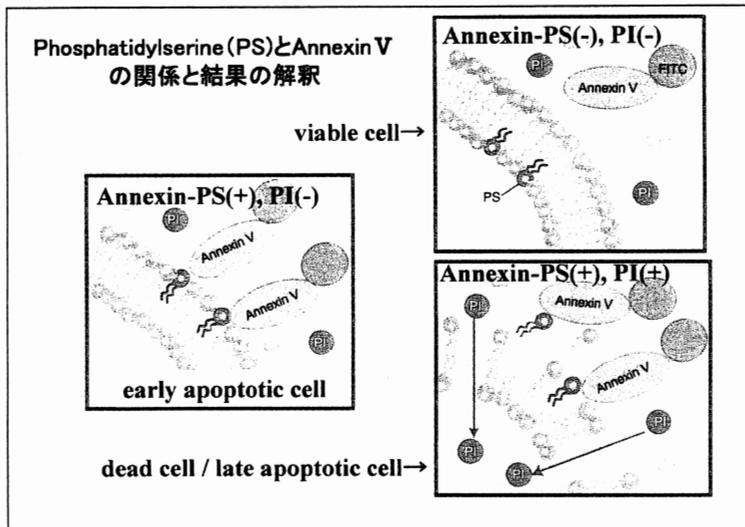
III Flowcytometry

・方法

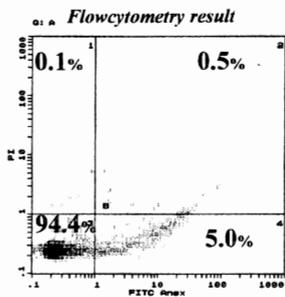
- 1 腎集合管細胞の分離・分散
 - 1) 右腎の腎乳頭部を切除、PBS洗浄、細切
 - 2) dispase(400U/ml) + collagenase S1(500U/ml)
37°C, 120min., incubation
 - 3) 細胞数カウント、生死判別
- 2 細胞調整(MEBCYTO® Apoptosis Kit, MBL Co. Ltd.)
 - 1) 2 × 10⁶ cellとし、PBS洗浄後、binding buffer添加
 - 2) Annexin V-FITC, propidium iodode(PI)の反応
15min., incubation (dark room, ambient)
- 3 FCM解析(EPICS Elite™, Beckman-Coulter Inc.)

▲ スライド 13

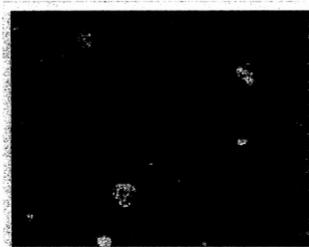
これらの結果を踏まえて、腎集合管細胞における細胞膜のリン脂質の構成変化、特にphosphatidylserineの変化をflowcytometryにより検討しました。実験手順を示しますが、細胞をダメージ無きように均等に分散させ、phosphatidylserineを特異的に認識するFITC標識Annexin Vを反応させ、propidium iododeと二重標識の後、flowcytometryによる解析を行いました。装置としては、Beckman-Coulter社のEPICS Eliteを用いました。



◀ スライド 14

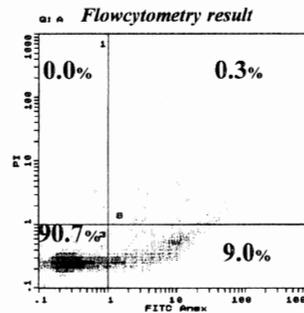


Control



Fluorescent microscope

▲ スライド 15

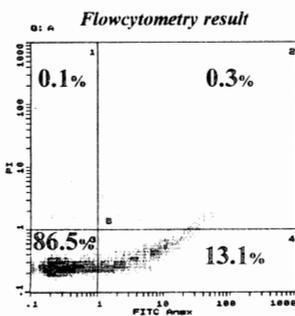


Group 1; 0.1% EG+1% AC

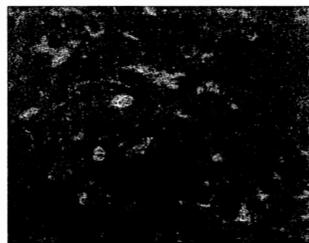


Fluorescent microscope

▲ スライド 16

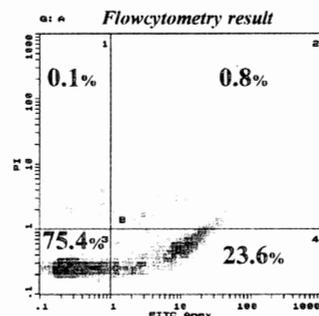


Group 2; 0.2% EG+1% AC



Fluorescent microscope

▲ スライド 17



Group 3; 0.4% EG+1% AC



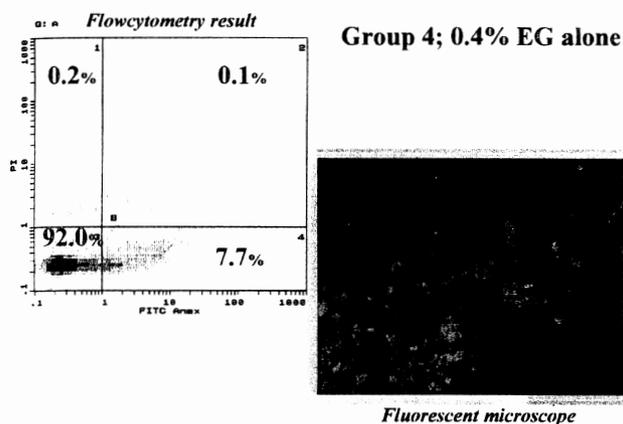
Fluorescent microscope

▲ スライド 18

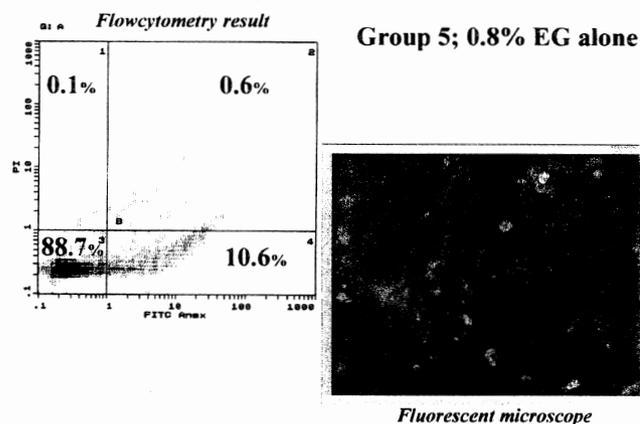
結果の解釈について schema を示しますが (スライド 14)、細胞が全く傷害を受けていない場合 (右上)、phosphatidylserine は細胞膜の内方に位置しているため、Annexin は結合しませんし、細胞膜構造が保たれているため propidium iodode も核内に到達せず、両者の染色は陰性となります。これに対し早期 apoptosis 細胞では (左)、細胞膜構造を保ちつつ、リン脂質のうち phosphatidylserine

のみが細胞膜外方に変位するため、Annexin が結合し、FITC 染色されます。この細胞数をカウントすることにより、phosphatidylserine 陽性細胞～早期 apoptosis 細胞の相対数が判明します。一方、完全に necrosis になった細胞では (右下)、細胞膜構造の崩壊により、Annexin、propidium iodode の両者が結合し、染色されることとなります。

実際の flowcytometry の結果と細胞の蛍光顕微鏡像を対

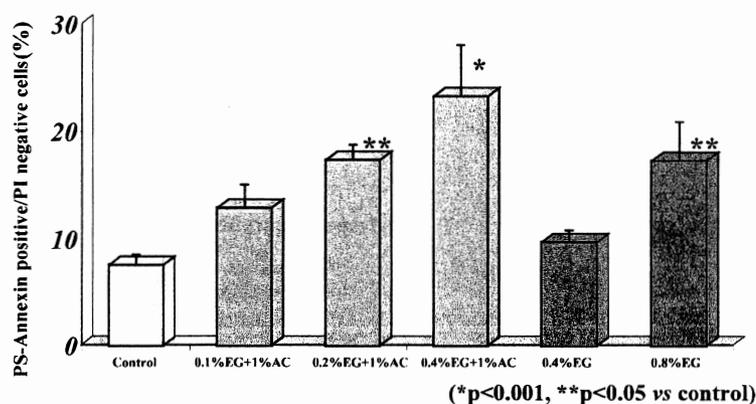


▲ スライド 19



▲ スライド 20

PS-Annexin陽性細胞の出現率 (flowcytometry)



◀ スライド 21

比して示します。

スライド 15 には、コントロール群を示しますが、phosphatidylserine 陽性細胞は、この area (右下) でカウントされ、ここでは 5.0% 存在していました。右上の area は壊死細胞を中心とする細胞群、左下の area は正常細胞群です。

0.1% Ethylene Glycol + 塩化アンモニウム投与群ですが、phosphatidylserine 陽性細胞はコントロールより増加し、9.0% カウントされました (スライド 16)。

0.2% Ethylene Glycol + 塩化アンモニウム投与群ですが、phosphatidylserine 陽性細胞は更に増加し、13.1% カウントされました (スライド 17)。

0.4% Ethylene Glycol + 塩化アンモニウム投与群ですが、phosphatidylserine 陽性細胞は最も増加し、23.6% カウントされました。しかし同時に右上の壊死細胞群も 0.8% と増加しております (スライド 18)。

0.4% Ethylene Glycol 単独投与群ですが、phosphatidylserine 陽性細胞は 7.7% にカウントされました (スライド 19)。

0.8% Ethylene Glycol 単独投与群ですが、phosphatidyl-

serine 陽性細胞は 10.6% にカウントされましたが、塩化アンモニウム投与群に比して、少ない傾向でした (スライド 20)。

以上の解析を、各群 12 腎について行い、そのまとめをスライドに示します (スライド 21)。phosphatidylserine 陽性細胞は、Ethylene Glycol 投与濃度～シュウ酸排泄量ともなって増加していました。0.2%、0.4% Ethylene Glycol と塩化アンモニウム併用群と 0.8% Ethylene Glycol 単独投与群で有意差を認めました。Ethylene Glycol 単独群と塩化アンモニウム併用群の比較では、Ethylene Glycol 単独群の方が、phosphatidylserine 陽性細胞が少ない傾向でした。

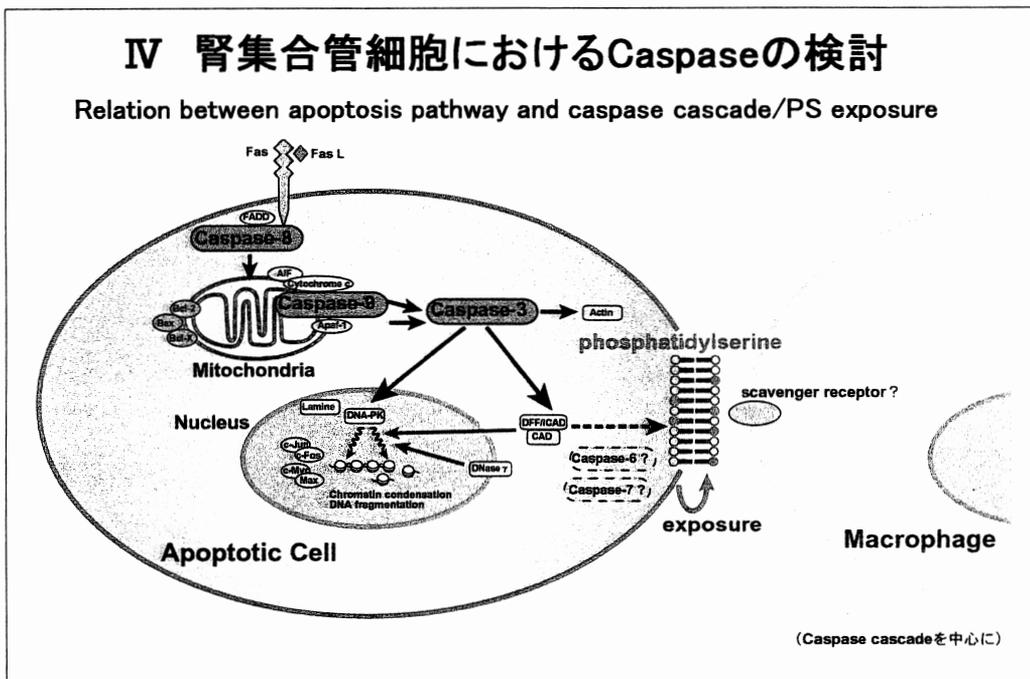
最後に、細胞内 caspase 活性解析について検討しました。

細胞膜外方への phosphatidylserine 出現は、細胞の apoptosis 早期に深く関与しておりますが、これには、その変化よりさらに上流に位置する細胞内の apoptosis 情報伝達系が、重要な役割を担っていると考えられています。その中で私たちは、caspase family についてその活性を検討しました。

スライド 22 に、その関係を schema で示しますが、phosphatidylserine の細胞外方への露出は最終的には、マ

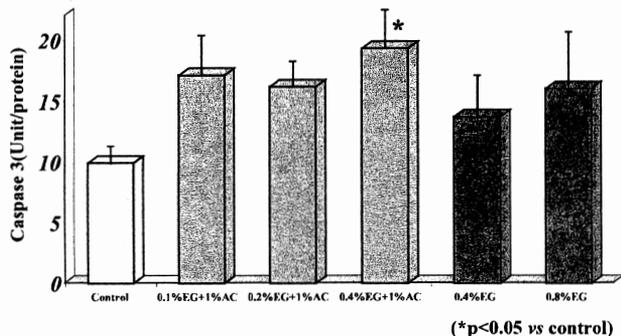
IV 腎集合管細胞におけるCaspaseの検討

Relation between apoptosis pathway and caspase cascade/PS exposure



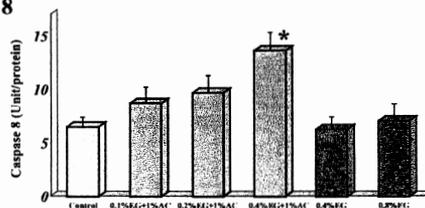
◀ スライド 22

Caspase 3 activity

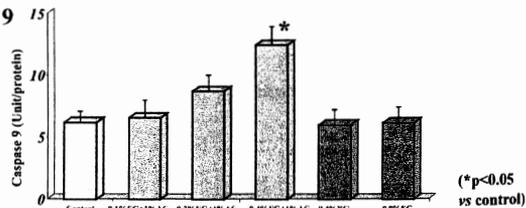


▲ スライド 23

Caspase 8



Caspase 9



▲ スライド 24

クロファージに認識され貪食される方向に進めます。phosphatidylserineの露出は、これらのcaspaseの一部が制御していると考えられており、そのcaspase cascadeのうち、caspase 3、8、9について分析してみました。測定の詳細は割愛しますが、細胞を溶解処理した材料を用い、各caspase活性をMBL caspase protease assay kitで測定しました。

caspase 3活性を示しますが、コントロールと比較して全体に高値を示し、0.4% Ethylene Glycolと塩化アンモニ

ウム併用群では、有意差を認めました(スライド23)。このことは、phosphatidylserineの検討結果とも一致し、caspase cascadeにも何らかの影響があることが示唆されました。

caspase 8、9活性では、0.4%Ethylene Glycolと塩化アンモニウム併用群でのみ有意差を認めましたが、他の群での変化はcaspase 3活性ほどではなく、caspase cascade内でも活性の違いが存在することが考えられました(スライド24)。

まとめ(1)

- 1 尿酸前駆物質の投与により、その濃度依存性に尿中尿酸排泄量は増加した。尿中のCOD、COM結晶も数、大きさともに徐々に増加していた。
- 2 細胞表面にphosphatidylserine(PS)が発現している細胞(Annexin V陽性細胞)は、尿酸排泄量に伴って徐々に増加していた。すなわち、尿酸曝露により微小細胞傷害が生じていることが定量的にも確認された。

▲ スライド 25

今回の結果のまとめを示します。

- 1 シュウ酸前駆物質の投与により、その濃度依存性に尿中シュウ酸排泄量は増加し、尿中のCOD、COM結晶も数、大きさともに徐々に増加していました。
- 2 細胞表面にphosphatidylserineが発現している細胞は、シュウ酸排泄量に伴って徐々に増加していました。すなわち、シュウ酸曝露によりapoptosisに導かれる微小細胞傷害が生じていることが定量的にも確認されました。

まとめ(2)

- 3 同様な変化は、PS変化より更に上流に位置し、apoptosis pathwayに主要な役割を担う細胞内情報伝達系(caspase family)においても確認された。
- 4 腎機能障害が認められた群でも、PS-Annexin陽性細胞の増加やcaspase cascadeの活性化を認めたが、これには細胞壊死の関与が大きいものと考えられる。*in vivo*実験においては、使用する実験系の腎機能障害には常に留意する必要がある。

▲ スライド 26

- 3 同様な変化は、細胞膜リン脂質phosphatidylserineの変化より更に上流に位置し、apoptosis pathwayに主要な役割を担う細胞内情報伝達系においても確認されました。
- 4 しかし、腎機能障害が認められた群でも、phosphatidylserine陽性細胞の増加やcaspaseの活性化を認めましたが、これには細胞壊死などの高度な細胞障害の関与が大きいものと考えられました。従って*in vivo*実験においては、使用する実験系の腎機能障害には常に留意する必要があると考えられます。

結論

- 1 Flowcytometryにより、PS発現細胞の定量的評価は可能であり、*in vivo*実験においても、細胞傷害によるcrystal-cell interactionへの影響がより明確に分析されるものと考えられる。
- 2 細胞傷害によるcrystal-cell interactionと早期apoptosisとの関連において、PSの細胞外方への露出のみならず、caspaseなどの細胞内情報伝達系の関与にも注目すべきかも知れない。
- 3 他の要因による腎上皮細胞の細胞傷害の検討への応用も可能である。

▲ スライド 27

結論として、

- 1 Flowcytometryにより、phosphatidylserine発現細胞の定量的評価は可能であり、*in vivo*実験においても、微小細胞傷害によるcrystal-cell interactionへの影響がより明確に分析されるものと考えられます。
- 2 細胞傷害によるcrystal-cell interactionと早期apoptosisとの関連において、phosphatidylserineの細胞外方への露出のみならず、caspaseなどの細胞内情報伝達系の関与にも注目すべきかも知れません。
- 3 これらの結果は、他の要因による腎上皮細胞の細胞傷害の検討への応用も可能と思われました。