

称号及び氏名	博士（獣医学）	湯浅 隆宏
学位授与の日付	平成26年3月31日	
論文名	<b>Pathological Studies on Thy-1-Expressing Cells in Rat Renal Interstitial Fibrosis, with Particular Relation to Myofibroblast Development</b> (ラットの腎間質線維化における Thy-1 発現細胞に関する病理学的研究：特に筋線維芽細胞形成との関連について)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	松尾 三郎
	副査	岡田 利也

## 論文要旨

### はじめに

腎間質線維化は種々の病因によって、腎組織が傷害を受けて起こる不可逆的な病的変化である。通常、組織が傷害されると、線維芽細胞が細胞外基質を産生し、蓄積した細胞外基質はその後分解され、組織は修復される。一方、重度又は慢性的な傷害が起こると、蓄積した細胞外基質の分解が不十分となり、組織は病的な線維化に陥る。線維化病変では筋線維芽細胞が出現する。筋線維芽細胞は、拘縮細胞とも呼ばれ、線維芽細胞と平滑筋細胞の双方の特性を有し、形成過程においてビメンチン、デスミン、 $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) を種々の割合で発現する。特に、高分化型筋線維芽細胞は $\alpha$ -SMAを発現し、細胞外基質を過剰産生することで、線維化の進行において中心的な役割を果たす。しかし、筋線維芽細胞の由来、形成機序は未だ不明な点が多い。

近年、様々な臓器において、膜糖タンパク質であるThy-1 (CD90) の発現が線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に影響を与えることが報告され、線維化の進展において注目されている。腎線維化における筋線維芽細胞は、尿細管間質の線維芽細胞、血管内皮細胞、血管周皮細胞、骨髄由来前駆細胞、そして傷害された尿細管の上皮 - 間葉転換

(EMT) に由来するとされているが、腎線維化における筋線維芽細胞の由来とThy-1発現との関連については、これまでに全く検討されていない。

本研究では、Thy-1発現細胞の動態解析が、腎線維化の病理発生機序を解明する一助になると考え、ここに記載する一連の実験を行った。第1章では、ラット胎子と新生子の腎組織を用いて、Thy-1発現細胞の組織発生における動態を追究した。第2章では、腎毒性を有する抗癌剤であるシスプラチン (CDDP) 誘発ラット腎線維化モデルを用いて、線維化の進行に伴うThy-1発現細胞の動態を、ビメンチン、デスミン、 $\alpha$ -SMAなど筋線維芽細胞の細胞骨格発現との関連で解析し、さらに筋線維芽細胞の新たなマーカーとしてカルポニンの発現を追究した。第1章と第2章の成績から、発生腎では未熟な間質細胞がThy-1を発現し、腎線維化では、Thy-1を発現する筋線維芽細胞は存在するが、Thy-1発現細胞は $\alpha$ -SMAを発現する筋線維芽細胞とは一致しないことが分かった。そこで、第3章では、線維原性因子TGF- $\beta$ 1によるThy-1と $\alpha$ -SMAの発現変化を、未分化間葉系細胞株を用いて*in vitro*で解析した。得られた成績は以下の通りである。

## 第1章 ラット腎発生過程におけるThy-1発現細胞の動態

F344ラットの胎齢18、21日と生後1、3、5、7、9、12、15、18日齢の発生腎、及び6週齢の成体腎を用い、Thy-1、ビメンチン、 $\alpha$ -SMAに対する免疫染色を施した。胎子から生後9日までの腎では、発達する尿細管の間質に疎に配列する後腎芽体由来の未熟な間葉系細胞が存在し、それら細胞はThy-1に強陽性を示し、 $\alpha$ -SMAに対しては弱く反応した。生後12日以降では、皮質の間質細胞はThy-1と $\alpha$ -SMAに対する陽性反応が徐々に減じ、成体腎ではこれら反応が消失した。一方、生後12日以降の発生腎と成体腎における髄質間質細胞はThy-1を常に発現していたが、 $\alpha$ -SMAに対する反応性は消失した。なお、全ての検査時点で、間質細胞はビメンチン陽性を示した。成体腎の血管周皮細胞は常にThy-1とビメンチンを発現した。以上より、後腎芽体細胞由来の間質の未熟な間葉系細胞はThy-1、ビメンチンと $\alpha$ -SMAを発現し、成熟に伴い皮質間質細胞はThy-1と $\alpha$ -SMA発現が消失し、一方、髄質間質細胞は、Thy-1発現は持続するが、 $\alpha$ -SMA発現が減じることが分かった。

## 第2章 ラット腎線維化におけるThy-1発現細胞と筋線維芽細胞との関連

6週齢のF344ラットにCDDP (6 mg/kg 体重) を腹腔内単回投与し、投与後1、3、5、7、9、12、15、20、25、35、45、60日において得られた腎を用い、HE染色による形態観察の他に、ビメンチン、デスミンと $\alpha$ -SMAに対する免疫反応性を検討した。成体平滑筋細胞に発現するカルポニンに対しても免疫反応性を検討した。これらの免疫反応性とThy-1発現細胞との関連を解析した。

CDDP投与後1-5日において、皮髄境界部の近位尿細管上皮が変性・壊死し、腔内に上皮が脱落した。投与後7-9日は、傷害された尿細管がやや拡張し、扁平から立方状の

再生上皮で内張りされた尿細管がみられ始めた。投与後 12-15 日には、傷害された尿細管周囲に線維化病変が形成され始め、その後投与 20 日以降線維化が徐々に進行した。投与後 60 日では、線維化部位は細胞成分が減じ癒痕化した。線維化部位には、炎症細胞や紡錘形の筋線維芽細胞がみられた。

ビメンチンとデスミン陽性細胞は、投与後 5-7 日で、皮髄境界部の傷害を受け拡張した尿細管周囲にみられ、線維化の経過とともにビメンチン陽性細胞は、増加したが、デスミンの反応性は投与後 35 日以降では減弱した。 $\alpha$ -SMA 陽性細胞も、投与後 5 日から拡張した尿細管周囲で認められ始め、その後線維化の進行に伴い陽性細胞が増加したが、投与後 60 日の癒痕組織では、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞は減少した。二重免疫染色の結果、線維化部位の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞にはビメンチンあるいはデスミンに対しても一部が陽性を示し、ビメンチンとデスミンの共陽性を示す細胞もみられた。線維化部位の筋線維芽細胞はこれらの細胞骨格を種々の割合で発現した。再生尿細管上皮は、ビメンチンに対して陽性を示したが、デスミンと  $\alpha$ -SMA に対しては陰性であった。

投与後 3 日で、傷害を受け、拡張した尿細管周囲の間質細胞がカルポニン陽性を示し始めた。その後カルポニン陽性細胞は線維化の進行に伴い増加した。二重免疫染色により、カルポニン陽性の一部の細胞は、ビメンチン、 $\alpha$ -SMA を共に発現することが分かった。カルポニンは筋線維芽細胞の一つのマーカーとなることが示された。再生尿細管はカルポニンを発現し、ビメンチン陽性の尿細管上皮と一致した。

投与後 5-7 日で、皮髄境界部の傷害尿細管周囲の線維化部位において Thy-1 陽性細胞が出現し始め、投与後 20 日まで線維化の進行に伴い増加した。しかし、投与後 25 日以降 Thy-1 陽性細胞は徐々に減少した。二重免疫染色の結果、線維化部位で増加した Thy-1 陽性細胞は、ビメンチンやデスミンと共陽性を示したが、 $\alpha$ -SMA やカルポニンに対しては陰性であった。腎線維化部位における Thy-1 の発現はビメンチンとデスミン陽性筋線維芽細胞に限られた。再生尿細管上皮は、Thy-1 陰性を示した。

### 第 3 章 培養細胞を用いた TGF- $\beta$ 1 による Thy-1 及び $\alpha$ -SMA の発現

ラット由来未分化間葉系細胞株 MT-9 を用いて、線維原性因子 TGF- $\beta$ 1 を添加し、Thy-1 と  $\alpha$ -SMA の発現変化を RT-PCR、細胞免疫染色、ウエスタンブロット法により解析した。TGF- $\beta$ 1 添加により、mRNA 及びタンパク質レベルいずれにおいても  $\alpha$ -SMA は増加し、Thy-1 は減少した。Thy-1 siRNA により Thy-1 の発現をノックダウンすると、TGF- $\beta$ 1 を添加しても  $\alpha$ -SMA は増加しなかった。一方、pCMV-THY1 のトランスフェクションにより Thy-1 を過剰発現させ、TGF- $\beta$ 1 を添加すると、 $\alpha$ -SMA の発現が増強された。以上より、Thy-1 は、未分化な間葉系細胞に発現し、TGF- $\beta$ 1 による筋線維芽細胞分化誘導において、重要なメディエーターとなることが示された。

## まとめ

1. Thy-1 は、発生期腎では後腎芽体由来の未熟な間質細胞に、成体腎では髄質の間質細胞に発現した。 $\alpha$ -SMA 発現は発生腎の未熟な間質細胞でみられた。
2. 傷害を受けた腎線維化部位において、筋線維芽細胞は、ビメンチン、デスミン、 $\alpha$ -SMA を様々な割合で発現することが示された。
3. 腎線維化部位における筋線維芽細胞はカルポニンを発現することが分かった。
4. 腎線維化部位において、Thy-1 陽性細胞が増加し、その陽性細胞はビメンチンとデスミンに共陽性を示したが、 $\alpha$ -SMA とカルポニンに対しては陰性を示した。
5. 未分化間葉系細胞株 MT-9 は Thy-1 を発現し、TGF- $\beta$ 1 の影響により、その発現が低下し、一方で  $\alpha$ -SMA 発現が増加した。また、TGF- $\beta$ 1 による筋線維芽細胞分化において Thy-1 は重要なメディエーターとなることが示された。
6. 以上のことから、Thy-1 は未分化な間葉系細胞に発現し、筋線維芽細胞の分化に伴いビメンチンやデスミンを共発現し、その後 Thy-1 発現を減じることで、 $\alpha$ -SMA やカルポニンを発現する筋線維芽細胞になることが示された。
7. Thy-1 発現細胞の解析により、筋線維芽細胞の特性を明らかにすることができた。Thy-1 が腎線維化進行抑制の重要なターゲットとなることが示された。

## 審査結果の要旨

腎間質線維化は、腎組織傷害後に生じる不可逆的な進行性の病態である。この線維化の進展には、細胞外基質を産生する筋線維芽細胞が重要な役割を演じる。筋線維芽細胞は、その形成過程においてビメンチンやデスミンなどの細胞骨格を種々の割合で発現する。特に、高分化型の筋線維芽細胞では、さらに  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) の発現が特徴的にみられる。近年、肺や子宮の線維化において、膜糖タンパク質である Thy-1 の発現が線維芽細胞からの筋線維芽細胞への分化を規定しているとの報告があり、線維化との関連で Thy-1 の役割が注目されている。腎間質線維化に出現する筋線維芽細胞は、尿細管間質の既存の線維芽細胞、血管周皮細胞、そして骨髄由来幹細胞など多様な間葉系細胞に由来するとされ、さらに傷害尿細管の上皮-間葉転換を介して形成されとも考えられている。しかし、腎間質線維化にみられる筋線維芽細胞と Thy-1 発現との関連性については検討されていない。本研究では、筋線維芽細胞の起源と特徴を追究する目的で、ラット腎発生過程と、抗癌剤であるシスプラチン (CDDP) 誘発ラット腎間質線維化

モデルにおけるThy-1発現細胞の動態を免疫組織化学的に解析し、さらに、Thy-1発現が $\alpha$ -SMAの誘導をどのように規定しているのかを線維原性因子であるTGF- $\beta$ 1の影響下で*in vitro*の実験系で追究している。成績の概要は以下のとおりである。

第1章では、ラット腎発生過程におけるThy-1発現細胞の動態を解析している。その結果、後腎芽体由来の未熟な間葉系細胞は皮質・髄質どちらにおいてもThy-1を発現し、このThy-1発現細胞の多くはビメンチンを共発現し、さらに一部の細胞は $\alpha$ -SMAも共発現していることが分かった。また、成熟に伴い腎皮質の間質細胞のThy-1発現は減少するが、一方髄質の間質細胞のThy-1発現は維持されていることが分かった。第2章で示すように線維化部位のThy-1は初期段階の筋線維芽細胞に発現することから、腎発生過程のThy-1発現細胞と成熟腎の髄質間質細胞は、筋線維芽細胞の一つの起源と考えられた。

第2章では、CDDP誘発ラット腎間質線維化モデルを用いて、Thy-1発現細胞の動態について、第1節ではビメンチン、デスミンや $\alpha$ -SMAなどの細胞骨格発現との関連で、第2節では平滑筋細胞に特異的な機能蛋白質であるカルポニン発現との関連で詳細に解析している。その結果、線維化部位にみられるThy-1発現間質細胞は、ビメンチンとデスミンを共発現したが、 $\alpha$ -SMAは発現していなかった。第1章の成績を含めて勘案すると、Thy-1は形成初期の筋線維芽細胞に限って発現することが示された。さらに、カルポニンの発現は傷害尿管周囲の筋線維芽細胞に主にみられ、ビメンチンや $\alpha$ -SMAを共発現するが、Thy-1発現細胞とは一致しないことが分かった。カルポニンは、比較的高分化型の筋線維芽細胞に発現することを明らかにした。

第3章では、筋線維芽細胞への分化能( $\alpha$ -SMA発現)を有する細胞株MF-9を用いて、Thy-1発現がTGF- $\beta$ 1誘導性の $\alpha$ -SMA発現に及ぼす影響を解析している。その結果、TGF- $\beta$ 1を添加すると、MF-9にもともと発現しているThy-1は低下したが、逆に $\alpha$ -SMA発現が増加することを示した。また、Thy-1発現をノックダウンするとTGF- $\beta$ 1誘導性の $\alpha$ -SMA発現は抑制され、Thy-1過剰発現ではTGF- $\beta$ 1による $\alpha$ -SMA発現が増強された。この成績は、Thy-1は、筋線維芽細胞の分化に伴いその発現は消失するものの、 $\alpha$ -SMAの発現誘導において重要な促進因子である可能性を示した。

以上の研究により、腎間質線維化の進行に関わる筋線維芽細胞は、後腎芽体由来の間葉系細胞あるいは髄質間質細胞に由来し、形成初期ではThy-1を発現し、分化に伴いその発現は消失するが、しかし、高分化型筋線維芽細胞に発現する $\alpha$ -SMAを誘導する重要な促進因子であることを明らかにした。この成果は、腎間質線維化における筋線維芽細胞の機能的な役割と、それに基づいた病理発生を解明する上で有用な情報を提示するとともに、この病態の治療法の探索に繋がる。これらの成果は、医学・獣医学の基礎・応用研究のさらなる発展に資するものである。従って、最終試験の結果と併せて、博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。