

氏 名	右田 平八
博士の専攻分野の名称	博士（保健科学）
学位授与の日付	2016年 3月 19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	虚血/再灌流障害における HBO の apoptosis 抑制と細胞増殖効果の検討
論文審査員	主査 教授 川野 純一 副査 教授 鬼塚 信 副査 教授 戸畑 裕志

## 論文内容の要旨

### 【目的】

高気圧酸素治療 (hyperbaric oxygen therapy: HBO) は、腎虚血/再灌流 (ischemia-reperfusion: I/R) 障害における尿細管損傷および炎症の重症度を軽減することが先行研究で示されている。しかし、HBO による細胞死の抑制と細胞増殖の亢進については検証されていない。HBO の腎 I/R に対する細胞死抑制と細胞増殖に関連する論文は散見されないことから、I/R に対する HBO の影響を確認するため、組織標本を作製して形態観察を行い、免疫染色法を用いて I/R 後の apoptosis と細胞増殖について検討した。

### 【対象および方法】

#### 1. 実験動物と対照群

Sprague-Dawley (SD) ラットを無作為に Sham 群、I/R 群、I/R +HBO 群の3群 (各群 n = 10) に分類して行った。動物飼育室では急激な温度と湿度変化が起きないように温度 (24 ~ 26℃) と湿度 (40 ~ 70%) を空調管理し、餌と水は自由に摂取した。I/R の24時間、48時間後に安楽死させて標本作製した。当該の動物実験は、動物の愛護及び管理に関する法律 (法律第105号1973年) を遵守し、九州保健福祉大学内の動物実験委員会の承認 (受付番号 25105) を得て行った。特記する利益相反 (conflict of Interest: COI) はない。

#### 2. 外科的手順

ラットの麻酔は、ペントバルビタール (pentobarbitone: 50 mg/kg) を注射器で腹腔内に投与し、術野の剃毛、皮膚をエタノール消毒後に直腸温度が 34 ~ 36℃ に維持するように加温テーブル上に置いて体温調節した。痛覚が無いことを確認して、腹部正中切開を実施した。右腎を摘出し、次に左腎動静脈を非外傷性クリップ (Fine Science Tools Inc., Foster City, CA) で30分間クランプすることにより虚血腎を作製した。クランプ解除後に再灌流を視覚的に確認して切開部を縫合した。Sham ラットは同様に開腹して腎臓を露出したが、右腎摘出と左腎虚血を行わずに腹部を縫合した。

### 3. HBO 処置

I/R +HBO 群は動物実験用 HBO 装置 (Barotec Hanyuda P-5100 Tokyo, Japan) を使用して 2.5 気圧下 (酸素濃度 100%) で 60 分間の HBO 処置を施行した。

### 4. 標本製作

対照臓器を I/R の 24 時間後と 48 時間後に還流固定して摘出した。切片標本は 2 切片で 2 標本を作製し、そのうち片方を予備標本とした。パラフィン切片の標本は 24 時間後の切片で hematoxylin and eosin (HE) 染色、および断片化 DNA 末端標識法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling: TUNEL) を行い、凍結切片の標本は 48 時間後の切片で Ki-67 染色を行った。

#### 1) HE 染色

病理組織の一般的染色法である HE 染色を用いて、細胞および組織構造を光学顕微鏡で全体像の把握を行い、組織の形態観察を目的に行った。

#### 2) apoptosis 標識

apoptosis の標識には、TUNEL を用いた。染色は、ラベリング反応、次いで抗体反応、発色反応の各工程で行い、封入後に光学顕微鏡で観察し、四塩酸塩 (3,3'-Diaminobenzidine, Tetrahydrochloride: DAB) による反応で核内に黒褐色に発色を認めるものを陽性とした。

#### 3) 抗 Ki-67 抗体二重染色

Ki-67 は細胞増殖のマーカーとして用いた。染色は、抗 Ki-67 抗体で 1 次反応させ、Alexa 488 Rabbit で 2 次反応させた後に核染色 (4',6-diamidino-2-phenylindole: DAPI) した。陽性細胞は抗 Ki-67 抗体と DAPI を組合せ、蛍光観察で発光した核の陽性細胞のみを計測した。

### 5. 組織形態観察

標本を、デジタルカメラを備えた光学兼蛍光顕微鏡を用いて各群の皮質、髄質を観察した。観察記録として、それぞれの皮質、髄質をデジタルカメラで撮影した。TUNEL と Ki-67 陽性細胞数は 1 標本中の計測を 10 視野で行い、全標本の 1 視野 (240 mm × 180 mm) 毎の平均値を求めた。

### 6. 統計分析

数値は平均値 ± 標準偏差 (mean ± SD) で表示した。統計学的解析には、統計ソフトウェア Stat Mate IV (ATMS Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。TUNEL 陽性細胞数と Ki-67 陽性細胞数の計測は、Sham 群、I/R 群、I/R +HBO 群で行った。3 群間の比較には、Tukey 法を用いた。有意水準  $p < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。

## 【結果】

#### 1. HE 染色

I/R 24 時間後の皮質の観察では、エオジンに濃染し、微絨毛を有する大型細胞からなる近位尿細管と細胞境界明瞭な遠位尿細管を観察した。I/R と I/R +HBO の皮質の尿細管と腎小体の形態変化は明瞭には観察されなかった。髄質では、I/R の尿細管の膨化、近位尿細管の刷子縁・基底陥入の消失が観察された。また、脱落細胞による壊死様の核変化、尿細管腔の拡張、尿管腔の崩れが観察された。I/R +HBO の髄質は尿細管組織が比較的良好に保たれていた。

## 2. TUNEL 陽性細胞

I/R 24 時間後の観察において、TUNEL 陽性細胞は、Sham 群の皮質と髄質で発現が観察されなかった。I/R 群の皮質と髄質の尿細管上皮細胞で TUNEL 陽性細胞の発現が多く観察された。I/R +HBO 群では、皮質と髄質に TUNEL 陽性細胞の発現を観察したが、I/R 群に比べて発現が少なかった。

TUNEL 陽性細胞の発現数を Sham 群と I/R 群、I/R +HBO 群で計測した結果は、Sham 群は計測されなかった。Sham 群は I/R を実施していないので、TUNEL 陽性細胞の発現がないと推測された。

I/R 群については、皮質が  $21.2 \pm 8.5$  /視野であった。髄質は  $47.9 \pm 18.0$  /視野であった。皮質および髄質において、I/R +HBO 群に比べて TUNEL 陽性細胞の発現数の有意差があった。I/R 群は髄質に多くの TUNEL 陽性細胞の発現数を計測したことで、皮質よりも血流の少ない髄質に apoptosis が発生していると推測された。

I/R +HBO 群では、皮質が  $1.0 \pm 0.1$  /視野であった。髄質は  $1.5 \pm 0.2$  /視野であった。I/R +HBO 群は、皮質および髄質において、I/R 群に比べて TUNEL 陽性細胞の発現数の有意差があった。I/R +HBO 群は皮質、髄質での TUNEL 陽性細胞の発現数は I/R 群に比べて少ないことが認められ、I/R +HBO 群は皮質、髄質での apoptosis の発生が抑制されたと推測された。

## 3. 抗 Ki-67 抗体陽性細胞

Sham の抗 Ki-67 抗体陽性細胞の発現は、皮質と髄質の尿細管上皮で散在的に少数が観察された。I/R は皮質と髄質で抗 Ki-67 抗体陽性細胞の発現が観察された。I/R +HBO 群は発現した陽性細胞が I/R 群に比べて多く観察された。

抗 Ki-67 抗体陽性細胞数を Sham 群と I/R 群、I/R +HBO 群で計測した結果では、Sham 群は、皮質が  $0.5 \pm 0.7$  /視野であった。髄質は  $0.4 \pm 0.8$  /視野であった。Sham 群は I/R を実施していないので、抗 Ki-67 抗体陽性細胞の発現が少ないと推測された。

I/R 群は、皮質が  $1.9 \pm 0.8$  /視野であった。髄質は  $5.2 \pm 0.7$  /視野であった。I/R 群は、皮質および髄質において、I/R +HBO 群に比べて抗 Ki-67 抗体陽性細胞数の有意差があった。I/R 群は I/R +HBO 群と比較して、抗 Ki-67 抗体陽性細胞数が少ないことから、皮質と髄質で細胞増殖の発生が起き難いと推測された。

I/R +HBO 群では、皮質が  $17.7 \pm 0.9$  /視野であった。髄質は  $10 \pm 0.6$  /視野であった。I/R 群は、皮質および髄質において、I/R +HBO 群に比べて抗 Ki-67 抗体陽性細胞数の有意差があった。I/R +HBO 群は I/R 群と比較して、抗 Ki-67 抗体陽性細胞数が有意に多いことから、皮質と髄質で細胞増殖が発生していると推測された。

### 【考察】

HBO を腎 I/R 後に行うことで、apoptosis は有意に抑制された。腎組織の形態観察では、I/R 群は壊れた組織が頻繁に観察され、I/R +HBO 群では I/R に比べて壊れた組織が少なく観察された。一因として、低酸素組織への酸素供給は、組織周囲の動脈血の血液循環に依存しており、HBO によって上昇した動脈血酸素分圧による酸素拡散能と動脈血中に増加した溶解型酸素によって低酸素組織に酸素供給が効率よく供給されたと考えられる。

apoptosis については、apoptosis 陽性細胞を TUNEL で評価したところ、I/R と比べて I/R +HBO で有意に抑制されていた。HBO で処置したラットは I/R に比べて TUNEL 陽性細胞の発現数が少ないことから、apoptosis の抑制に関与していることが推察された。また、apoptosis について、Sharples らは、

造血因子である erythropoietin (EPO) の産生で I/R 障害後の apoptosis を減少したという EPO の抗 apoptosis 効果を報告した。その機序として、I/R 障害に起因する caspase-3、caspase-8、および caspase-9 の活性を抑制することを証明している。

これらを今回の実験と照合すると、HBO が造血因子に係わることから apoptosis 抑制に関連していることが推測される。しかし、現段階では、HBO が apoptosis 開始段階の caspase-8 と実行段階の caspase-3 を活性抑制することは確認されていない。抗 Ki-67 抗体については、I/R の抗 Ki-67 抗体の発現は少なく、I/R +HBO では、I/R に比べて多く発現した。I/R には尿細管の崩れが多いことから、早期に細胞周期に進行すると予測したが発現は少なかった。これは、I/R により損傷を受けた核の細胞周期が長くなり、修復前に細胞死に至ることが推測された。I/R の尿細管細胞増殖のダイナミックな評価には、抗 Ki-67 抗体が有効である。しかし、染色強度をどのレベルで陽性とするかによって陽性率が大きく変わることが懸念される。確実性を高めるには、抗 Ki-67 抗体の発現とフローサイトメトリーのデータと照合して検討する必要がある。あるいは、細胞周期の初期に発現する蛋白 (minichromosome maintenance protein: MCM) に対する免疫染色と組み合わせて検討する必要がある。

I/R 障害に選択した腎臓は他臓器と比べると解剖学的、機能的に複雑であり、未解明な部分が多い。しかし、HBO は細胞障害とその回復過程において重要な役割を果たす蓋然性があり、細胞組織に正常な尿細管、または残存した上皮細胞を量的、機能的に残すことが腎障害の進行を抑制する上で重要である。

#### 【結論】

腎 I/R 障害に対して HBO は、I/R 後の apoptosis を抑制し、尿細管上皮細胞の再生を亢進させる可能性がある。

今後、更なる研究を進めて、I/R 障害が局所だけでなく二次的に全身の主要臓器に障害をきたす遠隔臓器障害、とくに脳・肺・肝・腎などに対して HBO の障害抑制と再生亢進効果が期待される。

公表論文：Heihachi Migita, Shigenori Yositate, Yoshihiro Tange, Narantsog Chojookhuu, Yoshitaka Hishikawa.

Hyperbaric oxygen therapy suppresses apoptosis and promotes renal tubular regeneration after renal ischemia/reperfusion injury in rats.

Nephro-Urology Monthly. 2016;8(1):e34421

## 論文審査結果の要旨

### 1. 論文の内容

再還流障害機序の一つがアポトーシスであり、高圧酸素療法がそれを防ぐという画期的な内容である。これを、HE 染色、TUNEL 法等を用いて証明している。

HE の図に関しては、前回より見やすくなった。この HE 染色については、グラフ等の結果がなく、あくまで主観なので、著者が最も表したいこの図でよろしいかと考える。以前に指摘されたマイナーポイントも殆ど訂正されており、学位論文として十分可であると考ええる。

### 2. 評価

本研究は、再還流障害機序の一つがアポトーシスであり、高圧酸素療法がそれを防ぐという極めて、新規かつ画期的な内容を一貫して研究されており、且つ査読付きの英語論文としてその研究内容が掲載、公開されているという点において、学位論文として十分に値するものである。

再三にわたる予備審査において、厳正に審査、修正されており大きな問題点は見当たらない。

今後、この分野は、東九州メディカルバレー構想と相まって、大いに発展することが期待される分野であり、本研究は今後の、高圧酸素療法のこの分野における新たな貢献が期待され学位論文として十分評価に値する研究内容である。

### 3. 口頭発表（公聴会）ならびに口頭試問における評価

発表態度は実に堂々たるもので、言語は明瞭であり、論文内容が順を追って理路整然と発表され、理解しやすい発表であった。発表スライドは観やすく、特に染色図は美しく、要点が矢印等で端的に示されており理解しやすかった。質問にも、理路整然と質疑応答がなされていた。

以上の点を踏まえ、今後、この分野は、東九州メディカルバレー構想と相まって、大いに発展することが期待される分野であり、本研究は今後の、高圧酸素療法のこの分野における新たな貢献が期待され学位論文として十分評価に値する研究内容である。

### 4. 審査結果

12 人の審査員による無記名投票の結果、賛成 10 票、反対 2 票により賛成多数につき、本研究論文が学位取得に値することが可決、承認された。