

令和 5年 3月

上野祥太 学位論文審査要旨

主 査 香 月 康 宏

副主査 岡 田 太

同 大 林 徹 也

主論文

Kidney organoid derived from renal tissue stem cells is a useful tool for histopathological assessment of nephrotoxicity in a cisplatin-induced acute renal tubular injury model

(腎臓組織幹細胞由来のオルガノイドはシスプラチンにより誘発される急性尿細管障害モデルにおける腎毒性の病理組織学的評価に有用なツールである)

(著者：上野祥太、古倉健嗣、黒見靖、尾崎充彦、岡田太、喜多村真治、大林徹也)

令和4年 Journal of Toxicologic Pathology 35巻 333頁～343頁

参考論文

1. Cisplatin induces cell death in rat adult kidney stem/ progenitor cell-derived kidney organoids

(シスプラチンはラット成体腎臓幹細胞/前駆細胞由来の腎臓オルガノイドに細胞死を誘導する)

(著者：黒見靖、喜多村真治、遠藤猛、上野祥太、古倉健嗣、大林徹也)

令和5年 Yonago Acta Medica 66巻 153頁～158頁

学 位 論 文 要 旨

Kidney organoid derived from renal tissue stem cells is a useful tool for histopathological assessment of nephrotoxicity in a cisplatin-induced acute renal tubular injury model

(腎臓組織幹細胞由来のオルガノイドはシスプラチンにより誘発される急性尿細管障害モデルにおける腎毒性の病理組織学的評価に有用なツールである)

これまで、成体ラットの近位尿細管S3セグメントから分離した腎組織幹細胞 (KS細胞) 由来のオルガノイドが開発・評価されてきた。しかし、これらのオルガノイドの病理組織学的評価に関するデータは限られている。そこで本研究では、これらのオルガノイドの特性を病理組織学的に検討し、近位尿細管を傷害する代表的な薬剤であるシスプラチンの添加による腎毒性影響を評価した。

方 法

本研究では喜多村真治氏から提供されたKS細胞を用いた。ハンギングドロップ法により 1.0×10^5 個のKS細胞からなる細胞クラスターを作製し、マトリゲルを含む溶液に移して培養しオルガノイドを得た。14日間培養したオルガノイドに、0~30 μ Mのシスプラチンを24~144時間添加した。シスプラチンの添加試験後、オルガノイドのパラフィン組織標本作製した。形態学的検査のためにヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、免疫組織化学分析およびTerminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) 法を標本に対して実施し、さらにその特徴を検討した。また、電子顕微鏡観察のための固定処理を別途行い、標本の観察を行った。KS細胞由来のオルガノイドおよび二次元で培養したKS細胞をそれぞれ採取し、RNA抽出およびcDNA合成を行い、定量PCRにより腎臓マーカーに関する遺伝子発現の比較解析を行った。2群間の比較に関する統計解析としてStudentのt-testを用い、統計学的有意性を $P < 0.05$ とした。

結 果

オルガノイドの管状構造は、先行研究と同様に、概ね単層の細胞によって裏打ちされていることが確認された。電子顕微鏡観察において、この管状構造の内腔側で微絨毛が観察された。さらに、管状構造の内腔側は、近位尿細管のマーカーであるAquaporin-1 (Aqp1)

陽性であった。定量PCRによる遺伝子発現解析の結果、オルガノイドでは、2次元で培養したKS細胞に比べAqp1の発現が有意に高いことが示された。また、内腔側でのシスプラチンの細胞外排泄に関与するトランスポーターであるMate1の発現は、2次元培養と比較してオルガノイドで有意に高かった。しかし、シスプラチンの細胞外からの取り込みに関与するトランスポーターであるOCT1とOCT2、近位尿細管マーカーであるMegalinは、いずれの培養方法でも発現しなかった。シスプラチン添加により、オルガノイドの尿細管構造内の細胞に細胞質の空胞化を含む細胞死および変性が誘導された。また、細胞傷害の程度に関してシスプラチンの用量相関性が認められた。免疫組織化学的評価により、シスプラチン添加群においてphospho-histone H2A.X (DNA損傷のマーカー) の誘導とphospho-histone H3 (細胞分裂のマーカー) レベルの低下が認められた。加えて、アポトーシスの検出法であるTUNEL法およびアポトーシスのマーカーであるcleaved caspase 3いずれにおいても、管状構造の内部に陽性像が確認された。

考 察

本研究では、ラット腎臓近位尿細管S3セグメントから分離した細胞株から得られた腎臓オルガノイドの特性を、病理組織学的観察および尿細管マーカーの定量PCR解析により検討した。定量PCR解析の結果、オルガノイドでは尿細管マーカー (Aqp1、Mate1) が発現し、かつKS細胞の2次元培養に比べて遺伝子発現量が増加していることが分かった。ただし、OCT1, OCT2, Megalin などの近位尿細管に関連するいくつかの遺伝子発現がオルガノイドで検出されなかったことから、これらのマーカーを介することが知られる物質の毒性評価には注意を要すると思われる。シスプラチンをオルガノイドに添加すると、病理組織学的に変化がみられ、かつ細胞傷害性には用量相関性がみられた。本研究では細胞形態異常、アポトーシス、DNA損傷、細胞分裂頻度の低下に関する細胞レベルの毒性所見が得られ、これらはシスプラチンの生体における腎毒性影響を模倣していると考えられた。

結 論

本研究で用いた腎臓オルガノイドは生体の近位尿細管と類似したさまざまな特徴を示したこと、また、組織学的評価により腎毒性の発現機序に関する知見が得られたことから、本培養試験系は腎毒性の予測に利用できる可能性が示唆された。