

氏名(本籍)	馬場智成(福岡県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第120号
学位授与年月日	平成21年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	Osborne-Mendel ラットの尿細管間質障害の発生機序に関する研究
論文審査委員	(主査) 代田欣二 (副査) 土屋亮 斑目広郎

論文内容の要旨

慢性糸球体疾患では、腎機能の低下やその予後は糸球体障害よりも尿細管間質障害(TII)と強く相関することが示唆されており、TIIの抑制が腎機能保護にとって重要な治療戦略と考えられている。TIIは組織学的に尿細管の萎縮、間質への単核細胞浸潤、間質の線維化を包含し、腎組織の退行性変化とともに浸潤細胞、尿細管上皮細胞(TEC)、筋線維芽細胞の相互作用によって間質線維化が進行する。糸球体病変に伴うTIIは、従来糸球体の機能廃絶の結果、付随する尿細管が萎縮し、周囲に二次的な炎症を引き起こされると考えられてきたが、近年では蛋白尿自体がTIIの原因または悪化因子として腎不全進行を促進させることが示唆されており、病理生物学的に重要な因子として蛋白尿が注目されている。

Osborne-Mendel系ラット(OM)は、若齢より大量の蛋白尿を伴う糸球体障害を発症し、他のラットに認める自然発症性慢性腎症に比べて進行がかなり早く、進行すると慢性腎不全となることから、ヒトのネフローゼ症候群の慢性腎不全進行モデルとして期待されているが、現在のところ尿細管間質病変の病理発生に関する研究は行われていない。

本研究は、OMの糸球体病変に続くTIIの進行メカニズムと、糸球体病変および尿細管間質病変の進展と蛋白尿との関連を探求することを目的とし、OMの進行性腎障害の病理学的検索を行った。また、OMのTIIの発生・進展には蛋白尿が関連していると仮定し、アンジオテンシン変換酵素阻害薬(ACEi)、ウシ血清アルブミン(BSA)の投与により蛋白尿を軽減ないし増悪させ、尿細管間質障害の変化について考察した。

第1章 OMにおける進行性腎障害の病理学的検索

OMの病変の糸球体病変および尿細管間質病変は、進行の早いオスの5週齢から20週齢を用いて病理学的に検索した。

24時間蓄尿による尿検査では、総蛋白質量 (TP) は7週齢以降、同週齢のメスよりも有意に上昇した。尿のSDS-PAGEでは、5週齢からアルブミン (Alb) の分子量と一致したバンドを認め、10週齢でバンドは明らかに太くなり、またAlbよりも高分子のバンドを形成し、その後これらのバンドは加齢性に太さを増した。血清クレアチニン (Cre) 値は20週齢で雌雄間に有意差を認めた。組織学的に、糸球体は5週齢から足細胞の細胞質内に硝子滴の沈着が認められた。また、ボーマン嚢と血管係蹄との癒着、糸球体硬化といった硬化性病変は7週齢頃から観察され、その後加齢性に増加した。なお、糸球体に炎症反応は認められなかった。尿細管間質では5週齢からTECの細胞質内に硝子滴が認められ、13週齢で大小の硝子滴が大量に沈着してTECが膨化するほか、空胞変性などの重度の病変が散見された。間質には5週齢から単核細胞が確認されたが、著明な細胞浸潤は、10週齢より観察された。その後、これらの病変は間質の線維化を伴いながら加齢性に進展し、20週齢でびまん性に病変を形成した。免疫組織化学的に検索したところ、尿細管は形態学的な変化に先行して10週齢よりマクロファージ (mφ) の誘導因子であるとともに、TECの障害マーカーとして知られる osteopontin (OPN) に陽性を示し、13週齢でOPN陽性の尿細管数は有意に増加した。また、糸球体では肥厚したボーマン嚢上皮細胞が陽性を示したが、足細胞、メサングウム細胞は陰性であった。浸潤細胞は5週齢からmφ、T細胞、B細胞のすべてが散在性に浸潤しており、浸潤した細胞の主体はT細胞で、10週齢以降顕著に増加した。また、間質線維化の際に線維芽細胞から形質転換する筋線維芽細胞について、 α -smooth muscle actin (α -SMA) の抗体を用いて検索したところ、陽性細胞は13週齢から拡張した尿細管、ボーマン嚢周囲に認められた。次に、TEC障害と間質に浸潤した単核細胞の関連を検索するために、最も強力な単核細胞のケモカインである monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) と、mφを誘導するサイトカインであるOPNについて、Laser microdissection 法を用いて切片から尿細管間質領域のみを採取し、リアルタイムPCRによりOPN、MCP-1のmRNA発現の定量解析を行ったところ、OPNmRNAは5週齢、MCP-1mRNAは10週齢から発現を認め、これらは加齢性に増加した。

以上の結果をまとめると、OMは観察を開始した5週齢で蛋白尿を発症しており、間質にはT細胞を主体とした単核細胞の浸潤が起こっていることが確認された。尿細管間質領域ではこれらの単核細胞を誘導するOPNmRNAが5週齢で発現しており、明らかに細胞浸潤が増加した10週齢ではOPN陽性TECを認め、さらにMCP-1mRNAも発現していた。TECにおけるOPN発現はTECの形質転換を意味し、これは硝子滴の存在から尿蛋白質の過剰な再吸収によることが示唆された。形質転換したTECからはOPNやMCP-1のほかに、OPNの発現との関連が報告されている interleukin 1 (IL-1) や腫瘍壊死因子 (TNF- α)、また主要組織適合抗原 (MHC-II) などが発現することがin vitroの実験によって示されており、これらも単核細胞浸潤に関連していることが推察された。以上のことより、OMのTIIの発症・進展には、蛋白尿によるTECの刺激が関連している可能性が示唆された。

第2章 ACEi投与による蛋白尿抑制時における尿細管間質の変化

第1章の結果から、蛋白尿を抑制すると尿細管間質病変は軽減されるという仮説を立て、OMに

ACEi (Lisinopril) を3週齢より飲水に混ぜて投与し、13、20週齢の糸球体および尿細管間質病変を検索した。

ACEi投与により糸球体高血圧ないし過剰濾過の抑制を期待したところ、OMの収縮期血圧は低下し、尿中のTPが有意に低下した。尿のSDS-PAGEではAlbの分子量にバンドが認められたが、それ以上の高分子蛋白質のバンドは形成されず、未処置群に比べて有意に抑制された。投与群の血清Cre値は未処置群に比べて有意に減少した。組織学的に、ACEiの投与によって未処置群にみられた足細胞における硝子滴の高度な沈着、ポーマン囊上皮細胞への癒着は有意に抑制された。また、TECの細胞質内に硝子滴が認められたが、著明な形態学変化はなくOPN抗体にも陰性であったが、間質にはmφ、T細胞がわずかに浸潤していた。尿細管間質領域におけるOPNmRNAの発現は未処置群に比べて有意に抑制されたが、13、20週齢ともわずかに発現していた。また、20週齢ではMCP-1mRNAが発現していた。糸球体では、投与群はどちらの週齢もOPNmRNA、MCP-1mRNAの発現はなかった。

以上、蛋白尿の抑制によるTIIの変化から、尿細管間質領域におけるOPN、MCP-1といったサイトカインの発現が蛋白尿によって誘導され、間質への細胞浸潤を惹起することが予想された。

第3章 BSA投与による蛋白質負荷下における尿細管間質の変化

次に、蛋白尿を増悪させることを目的として、BSAを投与して糸球体に蛋白質負荷を加え、自然発症よりも早期かつ重度に蛋白尿を発症させ、TIIが発症、増悪するかを調べた。BSAは4週齢より3.5mL (1.0g/100g) を3週間腹腔内投与した。また、同時にBSAの腹腔内投与とACEi (Lisinopril) の自由飲水による経口投与を併用した群 (併用群)、生理食塩液3.5mLを腹腔内投与した群 (対照群) を設定し、これらの病変と比較した。

BSAのみを投与した群 (BSA群) の尿中TPは対照群に比べて顕著に増加した。併用群ではBSA群と比べて有意に抑制されたが、対照群より高い値を示した。尿のSDS-PAGEでは、対照群はAlbの分子量付近にバンドを形成したが、これより高分子のバンドは認められなかったのに対し、BSA群ではAlbの分子量付近に血清よりも太いバンドが認められ、また血清と類似した高分子のバンドを形成した。併用群ではBSA群と比べて高分子のバンドは明らかに細くなったが、対照群と比べて太いAlbのバンドを形成した。血清Cre値は3群間に有意差はなかった。組織学的には、対照群の糸球体にはほとんど病変はなかったが、BSA群で足細胞の高度な硝子滴沈着と、ポーマン囊上皮細胞と血管係蹄の癒着像を多数認めた。併用群では硝子滴の沈着した足細胞が散見されたが、ポーマン囊との癒着はほとんど認められなかった。なお、BSA投与による糸球体の炎症反応は観察されなかった。尿細管間質では対照群ではTEC内に硝子滴を認めるほかに病変はなかったが、BSA群では尿細管の高度な拡張やTECの空胞変性が散見され、また間質に単核細胞の集簇、線維化を多巣状性に認められた。併用群ではBSA群よりも病変は軽減し、間質には散在性に単核細胞の浸潤を認めたが、集簇巣や線維化はほとんど観察されなかった。また、間質に浸潤した単核細胞について免疫組織化学的に検索した結果、いずれの群においてもmφ、T細胞、B細胞の浸潤が確認されたが、BSA群、併用群では浸潤細胞の割合が対照

群とは異なっており、mφが最も多く浸潤していた。尿細管間質におけるサイトカイン発現の検索では、対照群はOPNmRNAのみわずかに発現していたが、BSA群ではOPNmRNAの高度な発現に加えてMCP-1mRNAが発現していた。併用群のOPNmRNAの発現量はBSA群に比べて減少したが、対照群より高い値を示した。また、MCP-1mRNAの発現は認められなかった。

以上の結果から、自然発症よりも強い糸球体障害を惹起し、より大量に糸球体から蛋白尿が漏出すると、高度なTIIが引き起こされることが示された。

以上、OMの糸球体および尿細管間質の自然発症病変の病理学的検索と、蛋白尿の軽減、増悪による腎組織病変の変化の解析から、OMのTIIの発現・進展には糸球体障害による蛋白尿が関連し、蛋白尿の加齢性の悪化と一致して尿細管障害、単核細胞浸潤は進行することが示された。また、間質への細胞浸潤は尿細管間質領域で発現するOPN、MCP-1といったサイトカインの発現量の変化に関連し、これらの病変およびサイトカインの発現は、蛋白尿を増減させることにより変化することが示された。このことから、OMのTIIでは、糸球体障害に起因する蛋白尿がTECの形質転換、サイトカインの発現を誘導し、間質への細胞浸潤を惹起すると結論づけられた。

論文審査の結果の要旨

慢性糸球体疾患では、腎機能の低下やその予後が尿細管間質障害と強く相関することが示唆されており、尿細管間質障害の抑制が腎機能保護にとって重要な治療戦略と考えられている。尿細管間質障害は組織学的に尿細管の萎縮、間質への単核細胞浸潤、間質の線維化を包含し、腎組織の退行性変化とともに浸潤細胞、尿細管上皮細胞(TEC)、筋線維芽細胞の相互作用によって間質線維化が進行する。糸球体病変に伴う尿細管間質障害は、従来糸球体の機能廃絶の結果、付随する尿細管が萎縮し、周囲に非特異的な炎症が引き起こされると考えられてきたが、近年、蛋白尿自体が尿細管間質障害の原因または悪化因子であることが示唆されている。

Osborne-Mendel系ラット(OM)は、若齢より高度の蛋白尿を伴う糸球体障害を発症し、他のラットに認める自然発症性慢性腎症に比べて進行がかなり早く、慢性腎不全となることから、ヒトのネフローゼ症候群の慢性腎不全進行モデルとして期待されているが、現在のところ尿細管間質病変の病理発生に関する研究は行われていない。

本研究では、OMの尿細管間質障害の進行メカニズムと、糸球体病変および尿細管間質病変の進展と蛋白尿との関連を探求することを目的とし、OMの進行性腎障害の病理学的検索を行っている。

第1章では腎障害の進行が早いオスの5週齢～20週齢のOMについて病理形態学的、分子病理学および臨床病理学的に検索した。SDS-PAGEによる尿解析では、5週齢からアルブミン(Alb)のバンドを認め、10週齢以降そのバンド幅が明らかに増大すると共に高分子量の蛋白質が出現し、その後これらのバンドが加齢性に太さを増した。同様に、尿の総蛋白質量(TP)、血清クレアチニン値やBUN値も加齢性に上昇した。組織学的に、糸球体では5週齢から足細胞の硝子滴変性、7週齢頃から硬化性

病変が出現し、その後加齢性に増悪した。尿細管・間質では5週齢からTECの硝子滴変性を認め、13週齢ではさらに高度となりTECが膨化するなど尿細管病変が進行した。間質の細胞浸潤は5週齢から確認され、10週齢より顕著になり、その後間質の線維化を伴いながら加齢性に進展した。免疫組織化学的には、尿細管では強い形態学的変化に先行して10週齢よりマクロファージ (mφ) 誘導因子でありTECの障害マーカーでもある osteopontin (OPN) が発現し、13週齢で陽性尿細管数が有意に増加した。smooth muscle actin (α -SMA)をマーカーとして間質の筋線維芽細胞の出現を検索したところ、陽性細胞は13週齢から認められた。TEC障害と間質細胞浸潤の関連を検索するため、laser microdissection 法によって切片から尿細管間質領域を採取し、monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) とOPNのmRNAについて、リアルタイムPCRにより定量解析を行ったところ、OPNmRNAは5週齢、MCP-1mRNAは10週齢から発現を認め、これらは加齢性に増加していた。

以上の自然発症例の検索結果から、著者はOMでは糸球体病変の進展とタンパク尿の出現・増悪、尿細管間質障害の発現と進展が関連して起こる事を示した。

第2章では、蛋白尿を抑制すると尿細管間質病変は軽減されるという仮説を立て、OMにアンギオテンシン変換酵素阻害薬ACEiを3週齢より投与し、13、20週齢の糸球体および尿細管間質病変を未処置群と比較検討した。その結果、ACEi投与群OMでは収縮期血圧が低下し、尿TPは有意に減少した。尿SDS-PAGEではAlbの分子量にバンドが認められたが、それ以上の高分子蛋白質のバンドは形成されず、未処置群に比べて有意タンパク尿が軽減された。また、投与群の血清Cre量やBUN値も未処置群に比べて有意に低値を示した。さらに、組織学的にも、ACEiの投与により糸球体病変が有意に抑制され、TECは細胞質内に軽度の硝子滴変性を認めたもののOPNも陰性であった。間質にはmφ、T細胞がわずかに浸潤していたが、尿細管間質領域におけるOPNmRNAの発現は未処置群に比べて有意に抑制された。以上、蛋白尿の抑制によるOMの尿細管間質障害の変化から、著者は尿細管間質領域におけるOPN、MCP-1といったサイトカインの発現とそれらに誘導されると考えられる間質への単核細胞浸潤が、糸球体病変に起因するタンパク尿により惹起されることを示唆した。

第3章では、牛血清アルブミン (BSA) を4週齢より3週間腹腔内投与し (BSA群)、糸球体に蛋白質負荷を加え自然発症例よりも早期かつ重度に蛋白尿を発症させ、尿細管間質障害が増悪するかを調べた。同時にBSAの腹腔内投与とACEi投与を併用した群 (併用群)、生食を投与した群 (対照群) を設定し、病変を比較した。その結果、BSA群の尿中TPは対照群に比べて顕著に増加した。併用群ではBSA群と比べて有意に抑制されたが、対照群より高い値を示した。尿のSDS-PAGEでは、対照群ではAlbの分子量付近にバンドを形成したが、より高分子の蛋白質は認められなかったのに対し、BSA群ではAlbの分子量付近に血清よりも太いバンドが認め、また血清と類似した多数の高分子量蛋白質のバンドを形成した。併用群ではBSA群と比べて高分子量蛋白質のバンドは明らかに薄かった。病理組織学的には対照群の糸球体にはほとんど病変はなかったが、BSA群では糸球体に足細胞の高度な硝子滴変性、ポーマン嚢壁へ癒着が頻繁に認められた。併用群の糸球体病変は認められるもののBSA群よりも明らかに軽度であった。尿細管間質病変については、対照群ではTECの硝子滴変性を認めるのみで

あったが、BSA群では尿細管のより高度な病変を認め、また間質には単核細胞の集簇、線維化を多巣状性に認められた。併用群ではBSA群よりも病変は軽度で、間質に散在性に単核細胞の浸潤を認めた。尿細管間質におけるサイトカイン発現の検索では、対照群はOPNmRNAのみわずかに発現していたが、BSA群ではOPNmRNAの高度な発現に加えてMCP-1mRNAが発現していた。併用群ではOPNmRNAの発現量がBSA群に比べて低値であったが、対照群より高い値を示した。また、MCP-1mRNAの発現は認められなかった。以上、著者は本章の実験において、自然発症よりも強い糸球体障害を惹起することにより、糸球体からより多量に蛋白が漏出し、高度な尿細管間質障害が引き起こされることを示し、蛋白尿と尿細管の形質転換、尿細管の形質転換と細胞浸潤、蛋白尿と尿細管間質障害の関連性を強く示唆した。

以上、本研究はOMの自然発症腎臓病に関する詳細な形態病理学的、分子病理学的、臨床病理学的検索と実験的な蛋白尿の軽減・増悪による腎組織病変修飾の解析から、OMにおける尿細管間質障害の発現・進展に糸球体障害による蛋白尿が関連することを示しており、糸球体障害と尿細管質障害の関連、尿たんぱく質の腎病変増悪因子としての重要性、さらに本ラットの進行性糸球体疾患病態モデルとしての有用性を示したものであり、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績と判定した。