研究科分　麻布大学雑誌　第11・12巻・2005年

オズボーン・メンデルラットの進行性腎障害に関する研究

Study on the pathogenesis of progressive nephropathy in Osborn-Mendel rats

代田欣二，斑目広郎，村上　賢

麻布大学大学院獣医学研究科

Kinji Shirota, Hiroo Madarame, Masaru Murakami

Graduate School of Veterinary Medicine, Azabu University

Abstract. Histopathological examination on the kidneys of 129 Osborn-Mendel rats aged 3 to 35 weeks revealed that tubulo-interstitial lesions including cellular infiltration and fibrosis developed with age and were associated with irreversible glomerular lesions such as segmental sclerosis and capsular adhesion following podocyte injury. Inflammation was first initiated by T-lymphocyte infiltration at 5 weeks of age in male rats and was associated with infiltration of B-lymphocytes and macrophages later on. The macrophages were far less than lymphocytes among the infiltrating cells. A half of the infiltrating lymphocytes was CD8-positive ones. In female rats the population of the infiltrating cells was similar to that in male rats but the severity of the tubulo-interstitial lesions was less intense. The expression of genes and their products of ICAM-1 and MCP-1 in the renal cortex of male rats was increased with age. Immunohistochemistry showed that the expression of MMP-1 was decreased and that of its inhibitor, TIMP-1 was increased in the cortex with age. Urinary excretion of TIMP-1 and several chemokines such as MCP-1 was detected in the early age of male rats and their change in excretory amount with age was seemed to be in accordance with those in the serum.

目　的

オズボーン・メンデル（OM）ラットは，微細形態学的に生後6週位から腎臓の糸球体変化が認められ，高度な非選択的蛋白尿を呈し，約20週齢で慢性腎症に進展する。本ラットの腎障害は他のラットに認められる自然発生慢性腎症に比較して，その進行がかなり早いという特徴を持っている。本ラットの慢性腎症では尿細管・間質障害に糸球体障害が先行し，糸球体上皮細胞の障害と共に急速に進行する。ヒトや実験腎炎では，蛋白尿の間質障害への関与明らかにされつつあり[1]，本ラットにおいても蛋白尿が高度になるにつれ尿細管間質障害が重度になることから，蛋白尿が腎不全の進行度・重度と関連するものと考えられる。近年，ヒトの糸球体腎炎の臨床的な進行度と尿細管・間質障害の程度が密接に関連していることが示唆されており[2]，尿細管・間質障害の発生・進展機序の解明が，慢性腎疾患の治療法の開発に重要である事が知られるようになった。また，動物においても間質障害と腎不全の重度，進行が関連する事が示唆されている[3] 本研究は，他のラットの系統に比較して早期に高度蛋白尿を発症し，慢性腎不全に進行するOMラットの慢性進行性腎症に焦点をあて，間質への炎症細胞浸潤の引き金とその病理学的意義，間質線維化の病理発生と進展機序の解明に迫ろうとするものである。平成16年度は動物を経時的に観察し，腎間質に浸潤する細胞のポピュレーションとその動態，細胞浸潤に関わるケモカイン，接着分子とその遺伝子発現状態を観察した。また，尿中へのサイトカイン排泄についても予備的

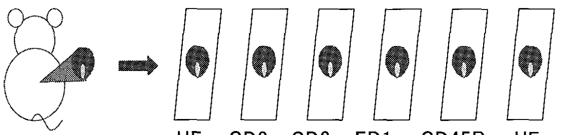

Figure 1. Immunostaining for cell markers of lymphocytes and macrophages on the serial sections of the rat kidney.

な分析を行った。

なお，本研究は麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた（承認番号：040731)。

方 法

日本エスエルシー株式会社より導入したオスおよびメスのOMラット129匹を3週齢～35週齢で解剖し，腎臓について下記の検索を行った。

1. パラフィン切片による形態学的観察
2. パラフィン切片を用いた免疫組織学的検索：CD3，CD8，CD45R，ED-1，ICAM-1，MCP-1，MMP-9およびTIMP-1について酵素抗体法ないし蛍光抗体法で検索した。腎皮質における浸潤細胞のポピュレーションはCD3，CD8，CD45R，ED-1をマーカーとし，高倍視野をランダムに抽出して1視野あたりの陽性細胞数を算出した[4)]。この際，連続切片に対してこれらの細胞表面マーカーの免疫を行い，同一部での評価を行った（Figure 1)。
3. ICAM-1，MCP-1遺伝子発現の定量解析：腎皮質よりtotal RNAを抽出し，cDNAを作成後real-time PCR法によって定量的に解析した。各々の遺伝子発現量はGAPDH遺伝子発現量との比で表した。
4. 血清および尿中のサイトカインの検出：3週齢～20週齢のオスOMラットの尿と血清中のサイトカインの検出を行った。検出にはRat Cytokine Array 1（RayBiotech Inc.Atlanta, GA）を用い，反応の半定量的解析はNIH imageを用い，キットの陽性コントロールとの比を算出して数値化した。

結果と考察

1. 腎重量・体重比および光学顕微鏡的変化

腎重量（両側）・体重比は3～7週例では性差は認められなかったが，10齢以降はメスでほとんど変化しないのに対して，オスでは明らかに増加し，メスのそれとの間に有意差が認められた。

組織学的にオス，メスともに3週齢より糸球体上皮細胞および尿細管上皮細胞の細胞質に微細な硝子滴が出現した。また，同時期より一部の尿細管腔に蛋白円柱も認められた。5週齢ではオスの腎間質に軽度の単核円形細胞浸潤が認められ，7週齢頃になるとオス，メスともにボウマン嚢腔内にも蛋白液が認められ，オスの糸球体ではメサンギウム細胞の増加を認めた。10週齢以降になると特にオスで病変形成が顕著となり，糸球体病変が進行し，間質にも単核円形細胞浸潤がより高度となり，間質線維化も認められるようになった。13週ころからは糸球体では分節性硬化，ボウマン嚢との癒着が頻繁に認められ，間質線維化や細胞浸潤は週齢が増すにつれて顕著となった。

以上の事から，OMラットでは糸球体の分節性硬化や癒着といった上皮細胞障害に続発する非可逆的糸球体病変の進展に伴って尿細管・間質病変が進行し，この結果腎臓が腫大していくと考えられた。

2. 間質浸潤細胞のポピュレーション（Figures 2, and 3）

オスでは間質にCD3およびCD8陽性細胞が5週齢より認められ，10週齢から25週齢まで加齢に伴って有意に増加した。メスではこれらの細胞がオスに比較してかなり少数ではあったが，17週齢以降に増加した。CD45RA陽性細胞（B細胞）は若齢期にはT細胞に比較して極めて少なく，間質に散在する程度であったが，オスで13週齢，メスで週齢以降に有意に増加した。ED-1陽性細胞はリンパ球に比較してかなり少なく，オスでは13週齢より間質に認められ，尿細管腔にも存在し，尿細管上皮に接着しているものも観察された。雌雄間で比較すると，CD3，CD8，CD45RA陽性細胞数は10週齢より，ED-1陽性細胞数は13週齢よりオスで有意に多くなった。また，今回CD4については免疫染色の結果が安定せず検索出来なかったが，CD8陽性細胞の数はCD3陽性細胞のほぼ半数であったため，CD4陽性細胞もCD8陽性細胞とほぼ同数浸潤しているものと考えられた。25週齢以降はCD45RA陽性細胞とCD3陽性細胞はほぼ同数となった。各マーカー陽性細胞の出現のパターン

a b c

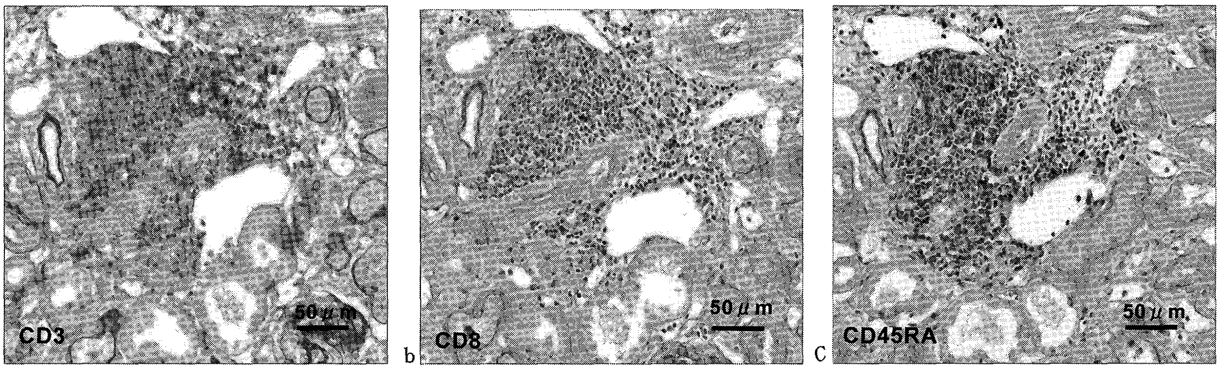

Figure 2. Photomicrographs of immunostaining for CD3 (a), CD 8(b) and CD45RA (c) in the same field. The kidney of 25-month-old male OM rat.

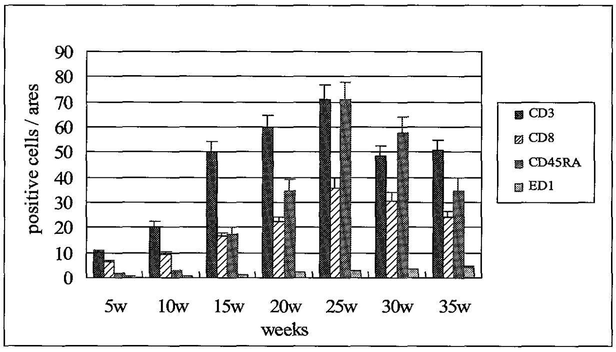

Fig. 3. Changes of infiltrating cell population in the renal intersititum with age. Male OM rats.

をみるとオスとメスでは出現細胞のポピュレーションとその比率は同様であったが，オスにおいてはるかに早期に間質に出現し，その数もはるかに多数であった。

3. ICAM-1 免疫染色

ICAM-1は，オスでは7週齢より尿細管上皮細胞の管腔側に陽性像が観察された，メスではオスと同様な陽性像が15週より観察された。

4. MCP-1 免疫染色

MCP-1はオス，メスともに尿細管に陽性像が観察され，加齢性に陽性尿細管が増加した。20週齢では明らかにオスが強い反応を示した。糸球体では7週齢以降，上皮細胞に陽性反応が認められた。また，係蹄とボウマン嚢癒着部の上皮細胞などにも発現し，15週齢，20週齢のオスでは糸球体内陽性細胞数がメスに比べて有意に多かった。

5. 腎皮質におけるICAM-1およびMCP-1遺伝子発現

ICAM-1はオス，メスともに3週齢よりごくわずかな発現が認められ，メスではほぼ一定の発現量で推移した。一方，オスでは加齢に伴い発現量が増加する傾向が認められ，20週以降はメスに比較して有意に多かった。MCP-1はオス，メスともに3週齢よりわずかな発現が認められ，メスではほぼ一定の発現量で推移した。オスではICAM-1と同様に加齢に伴い発現量が増加する傾向が認められ，20週以降はメスに比較して有意に多かった。

6. MMP-9 免疫染色

MMP-9はオス，メスともに尿細管に陽性像が観察されたが，間質線維化を伴い萎縮した尿細管では明らかに発現が低下していた。糸球体に陽性像は認められなかった。

7. TIMP-1 免疫染色

TIMP-1はオス，メスともに尿細管に陽性像が観察され，間質の浸潤細胞にも陽性のものが存在した。糸球体では上皮細胞，ボウマン嚢上皮が陽性で，7週齢以降のオスでは糸球体内陽性細胞数がメスに比べて多い傾向が認められた。

8. 血清および尿中のサイトカイン

MCP-1およびTIMP-1は腎臓に病変がほとんど見られない3週齢から尿・血清中に比較的多量に検出され，加齢と共に増加する傾向が認められた。MCP-1，TIMP-1共に尿中の量的変化は血清中のそれとほぼ同様であった。

以上，平成16年度に実施した研究によって，OMラットの腎間質にはTリンパ球が早期から浸潤し，マクロファージやB細胞は遅れて出現することが明らかになり，これら浸潤Tリンパ球では，CD8およびCD4陽性細胞がほぼ同数存在すると考えられた。これまで薬剤誘発性の間質障害モデルにおいてCD8陽性細胞には尿細管障害性が指摘されているが[5]，CD4陽性細胞にはむしろ障害へのprotect作用があることを示唆する報告もあり[6]，今後，本ラットにおいてはT，Bリンパ球にどのようなinteractionがあるのか，尿細管・間質障害にどのように関与するのかについて検索を進める。また，白血球浸潤とTリンパ球活性化に関与するICAM-1，ケモカインであるMCP-1の蛋白分子およびその遺伝子共に病変の進行と共に皮質における発現が増加していることが明らかになったことから，今後，皮質におけるT細胞動員の機序，特にすでに指摘されているような細胞浸潤における尿細管上皮細胞の役割[7]についても検討する。間質線維化については浸潤マクロファージより分泌されるTGF-βなどのサイトカインによる間質筋線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生[8]，あるいは尿細管上皮細胞の線維芽細胞への形質転換ないしtransdifferentiation[9]などが示唆されているが，本ラットではマクロファージの浸潤が弱く，蛋白尿刺激による尿細管上皮細胞のtransdifferentiationの可能性や皮質におけるMMP-9の減少についても今後詳細に検討する必要があると考えられた。網羅的に行った尿，血清中のサイトカイン等については，糸球体硬化や間質線維化と関連深いTIMP-1，細胞浸潤と関連するケモカインが高い値し，興味ある結果が得られたが，今後，病変の軽いメスや他の系統と比較し，腎病変との関連を明らかにしたい。

（本研究は獣医学部学生の浅野智子，柏原亮太，金地裕美および大学院獣医学研究科動物応用科学専攻・櫻田陽右君達の協力によって行われた。）

要　約

3週齢～35週齢のオスおよびメスのオズボーン・メンデル（OM）ラット129匹の腎臓について形態学的観察を行い，細胞浸潤や線維化といった尿細管・間質病変が，糸球体の分節性硬化や癒着といった上皮細胞障害に続発する非可逆的糸球体病変の進展に伴って，加齢と共に進行することを確認した。免疫組織学的観察から，オスでは5週齢より腎間質にTリンパ球が浸潤したが，B細胞やマクロファージは遅れて出現し，後者は特に少数であることが明らかになった。浸潤Tリンパ球の約半数はCD8陽性細胞であった。メスでは間質浸潤細胞のポピュレーションとその比率は同様であったが，間質病変はオスよりも軽度であった。また，ICAM-1，MCP-1分子およびその遺伝子の皮質における発現は，共に病変の進行につれ増加していた。免疫組織学的に，皮質におけるMMP-9の発現は減少し，その作用を阻害するTIMP-1のそれはむしろ増強する傾向が認められた。尿中には，TIMP-1やMCP-1などのケモカインが若齢時より検出されたが，加齢にともなう変化は血清のそれとほぼ同様のパターンを示した。

文　献

1）Kuusniemi AM, Lapatto R, Holmberg C, Karikoski R, Rapola J, Jalanko H. Kidney Int. 68: 121-32, 2005.
2）D'Amico G. Nephron 83: 289-295, 1999.
3）Sawashima K, Mizuno S, Mizuno-Horikawa Y, Shimada A, Kudo T, Kurosawa T. Am J Vet Res. 61: 1080-1086, 2000.
4）Ide M, Yamate J, Machida Y, Nakanishi M, Kuwamura M, Kotani T, Sawamoto O. J Comp Pathol. 128: 41-51, 2003.
5）Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Kidney Int. 59: 941-949, 2001.
6）Wang Y, Wang Y, Feng X, Bao S, Yi S, Kairaitis L, Tay YC, Rangan GK, Harris DC. Kidney Int. 59: 975-984, 2001.
7）van Kooten C, Daha MR. Curr Opin Nephrol Hypertens. 10: 55-59, 2001.
8）Gong R, Rifai A, Tolbert EM, Biswas P, Centracchio JN, Dworkin LD. Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. J Am Soc Nephrol. 15: 2868-2881, 2004.
9）Jinde K, Nikolic-Paterson DJ, Huang XR, Sakai H, Kurokawa K, Atkins RC, Lan HY. Am J Kidney Dis. 38: 761-769, 2001.