

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 rat

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 and molecular biological examinations on the kidneys as well as serum biochemistry and urinalysis were made on 93 Osborn-Mendel (OM) rats aged 3 to 25 weeks. In male rats, proteinuria appeared to be prominent at 7 weeks of age and it became exacerbated with age. Also, the ratio of serum albumin/globulin significantly decreased at 10 and 15 weeks of age. Real-time PCR revealed that gene expression of ICAM-1 and MCP-1 in the renal cortex of male rats had been gradually increased from 10 weeks of age when T-cell infiltration in the interstitium came to be prominent. These results suggest that proteinuria, cellular infiltration and up-regulation of chemokine and adhesion molecule simultaneously occur in the renal interstitium and they closely relate each other. Immunostaining of α -smooth muscle actin were carried out to detect transdifferentiation or phenotypic change of tubular epithelium into myofibroblasts, however no positive signals were seen in any tubular cells in male and female rats at any age. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (flk-1) was localized in the tubular and endothelial cells, respectively by immunohistochemistry. However, these positively stained-cells decreased in number with age in male rats. The amount of gene expression of both VEGF and flk-1 in the renal cortex of male rats decreased with age, especially from 10 weeks of age. These results might reflect decreasing number and impaired activity of reconstruction of blood vessels in the interstitium with development of tubulo-interstitial lesions.

目 的

オズボーン・メンデル (OM) ラットでは、生後6週位から糸球体変化が認められ、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。我々はこれまでOMラットの慢性腎症についていくつかの研究を行い、腎臓病変は糸球体のみならず、蛋白尿が高度になるにつれ尿細管・間質障害が重度となり、この変化が臨床的な腎不全の進行度、重度と関連すると考えている。近年、ヒトの糸球体腎炎の臨床的進行度、

重度と尿細管・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、尿細管・間質障害の発生・進展機序の解明が、その進行を抑制する治療法の開発に重要である事が知られるようになった。昨年度はOMラットの腎臓について、特に糸球体障害や尿細管・間質障害の形態学的変化と間質浸潤細胞の免疫表現型と間質への浸潤動態を経時的に観察し、本ラットにおける尿細管間質障害の発生にはヘルパーおよび細胞障害性T細胞の浸潤・活性化が重要で、それに引き続く、間質へのマクロファージやB細胞の浸潤にT細胞が何らかの役割を果たしていると考えられた。今回は病変が強く発現するオスを中心に、

継時的に（25週齢まで）細胞浸潤，間質線維化に関連するいくつかのサイトカイン，接着分子，酵素について腎臓を検索した。

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93匹を3週齢～25週齢で解剖し，腎臓について下記の検索を行った。また，血清，尿についても3～20週齢まで生化学検査を実施した。

1. 血清および24時間蓄尿の生化学検査（20週まで，90匹）：血清についてはクレアチニン，アルブミン・グロブリン比，トータル・コレステロール値，尿については総蛋白およびアルブミン濃度を測定した。
2. パラフィン切片による形態学的観察
3. パラフィン切片を用いた免疫組織学的検索： α -smooth muscle actin (α -SMA)，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。
4. ICAM-1，MCP-1，VEGF，flk-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。

（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）

結果と考察

1. 血清および24時間蓄尿の生化学検査（Figs. 1, 2）
血清クレアチニン値はオス，メス共に加齢とともに上昇したが，20週齢のオスで明らかな高値を示した。血清アルブミン・グロブリン比はオス，メス共に減少するが，10週，15週のオスで顕著に低下した。トータル・コレステロール値はオスで10週より明らかに増加した。尿中蛋白，アルブミン濃度はオスで7週より増加し，その後加齢と共に顕著に増加した。
2. 尿細管・間質におけるICAM-1およびMCP-1の発現（Fig. 3）

ICAM-1，MCP-1の免疫染色結果は良好な結果が得られなかった。腎皮質におけるこれらの遺伝子発現をreal-time PCR法により定量的に評価したとこ

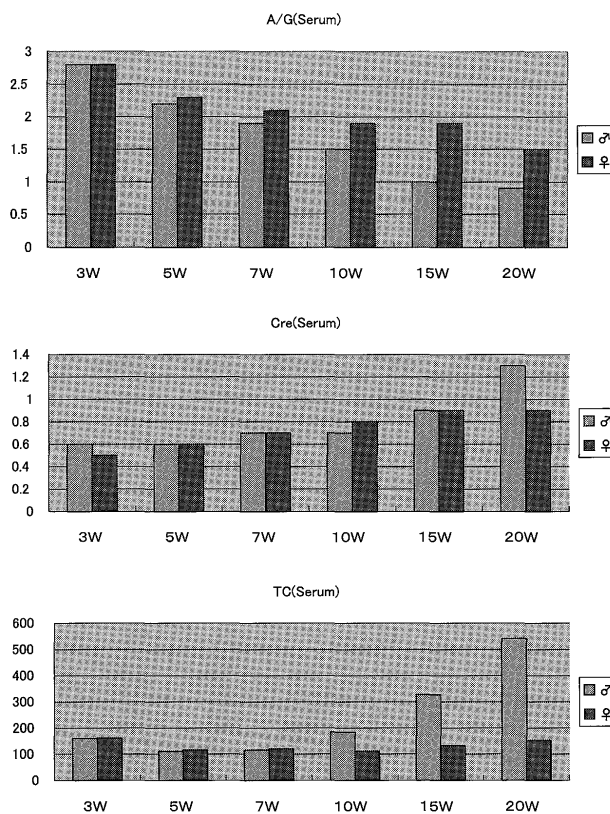


Fig. 1 Blood chemistry of male and female OM rats.
A/G: Albumin / Globulin ratio
Cre: Serum creatinine
TC: Total cholesterol

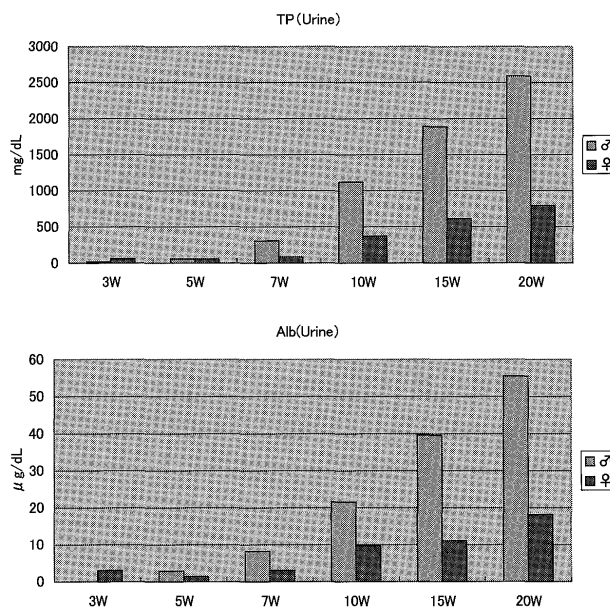


Fig. 2 Urinalysis of male and female OM rats.
TP: Total protein
Alb: Albumin

ろ，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

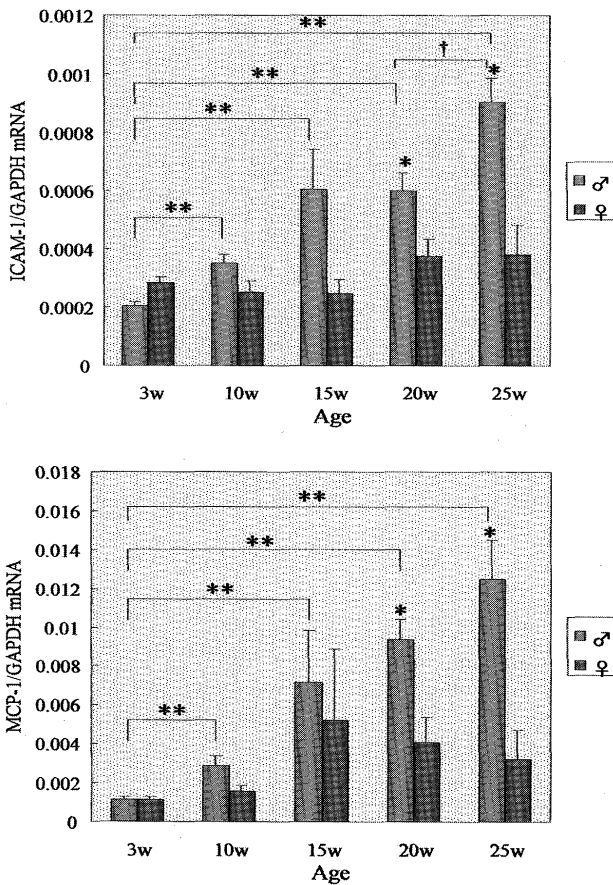


Fig. 3 Gene expression of ICAM-1 and MCP-1 in the renal cortex of male and female OM rats. The amount of each mRNA was standardized by amount of mRNA encoding GAPDH. *, ** Significant difference at P < 0.05.

推移したが、オスではT細胞の浸潤が顕著になる10週齢より有意に高くなり、加齢に伴い発現量が増加する傾向が認められた。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が、オスではICAM-1と同様に10週齢より有意に高くなり、加齢に伴い発現量が増加する傾向が認められた。

これらの結果から、これら2つの因子と特に間質におけるT細胞浸潤の関連が示唆されたが、今回免疫染色でこれらの蛋白の局在が明らかに出来なかった。ICAM-1やMCP-1はある種の腎炎や尿蛋白の刺激により、正常ではほとんど認められない尿細管上皮細胞に発現、分泌される事や炎症細胞の活性化や遊走に関与する事が示唆されている(1, 2, 4, 5)。今回の結果からも、蛋白尿が顕著になる時期にこれらの遺伝子発現が上昇しT細胞浸潤も顕著になる事が示され、今後、より詳細な遺伝子、蛋白の局在を確

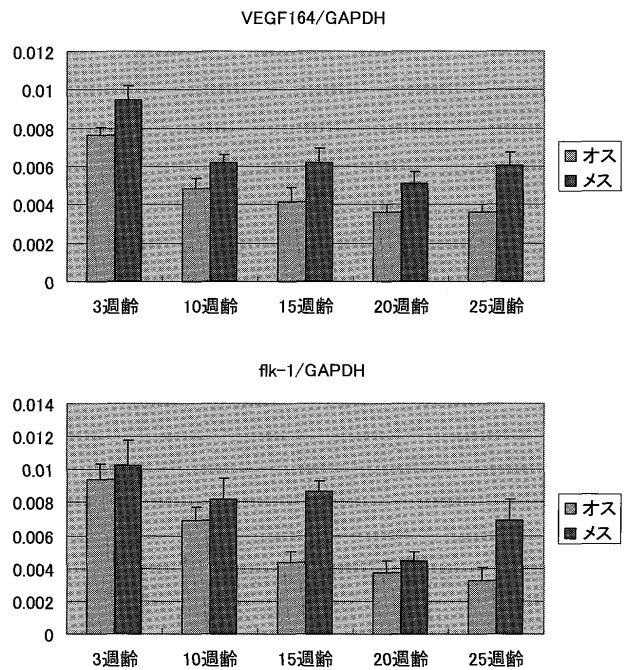


Fig. 4 Gene expression of VEGF and flk-1 in the renal cortex of male and female OM rats. The amount of each mRNA was standardized by amount of mRNA encoding GAPDH.

認しT細胞浸潤や尿蛋白との関わりを明らかにしたい。

3. 間質線維化に関わる要因 (Fig. 4)

細胞間基質(特にコラーゲン)代謝に関与するMMP-9およびTIMP-1についてはウェスタン法によって腎皮質での発現を確認することが出来たが、免疫染色では一定の結果が得られなかった。また、何れのラットにおいても尿細管上皮細胞にα-SMAの発現は認められず、尿細管上皮細胞の筋線維芽細胞への形質転換ないしtransdifferentiation(3)は確認できなかった。今後、*in situ* hybridization等で遺伝子発現についても検討したい。一方、皮質におけるVEGFおよびその受容体であるflk-1は、免疫染色で前者は尿細管上皮細胞、後者は血管内皮細胞に発現していたが、これら陽性細胞は病変の進行とともに減少した。腎皮質におけるこれらの遺伝子発現をreal-time PCR法により定量的に評価したところ、オスでは加齢とともに発現が低下し、この傾向は細胞浸潤が顕著となる10週以降に明らかであった。メスではこれらの遺伝子発現の傾向はごく緩やかであった。このように、オスではVEGFおよびその受容体であるflk-1の遺伝子発現が、間質病変の進行とともに低下しており、間質血管の減数とその修復の低下が示唆

された。flk-1 遺伝子発現の低下は血管内皮細胞の減数に因ると思われるが、VEGF 遺伝子発現の低下は内皮細胞への増殖シグナル低下を示唆している為、これがどのような機序で起こるか、あるいは尿蛋白、細胞浸潤とどのような関係を持つかは興味深い。

要 約

3週齢～25週齢のオスおよびメスのオズボーン・メンデル (OM) ラット93匹の腎臓について免疫組織学的、分子生物学的な観察と血清・尿の生化学的検索 (20週齢まで) を行った。オスでは蛋白尿は7週齢より顕著となりその後増悪した。血清のアルブミン・グロブリン比も10週, 15週で顕著に低下した。尿細管・間質におけるICAM-1およびMCP-1の遺伝子発現をreal-time PCR法により定量的に評価したところ、両者ともにオスでT細胞の浸潤が顕著になる10週齢より有意に高くなり、加齢に伴い発現量が増加する傾向が認められた。これらの結果は、尿蛋白、間質細胞浸潤そして間質におけるケモカインおよび接着分子のup regulationがほぼ同時期に起こり、これらが密接に関連する事を示唆するものと考えられた。間質線維化に関わる尿細管上皮細胞の筋線維芽細胞への形質転換ないしtransdifferentiationの指標として、尿細管上皮細胞における α -SMAの発現を免疫組織学的に観察したが、陽性細胞は何れの週齢でも確認できなかった。一方、皮質におけるVEGFおよびその受容体であるflk-1は、免疫染色で前者は尿細管上皮細胞、後者は血管内皮細胞に発現しており、これら陽性細胞は病変の進行とともに減少した。腎皮質におけるこれらの遺伝子発現を定量的に評価し

たところ、オスでは加齢とともに発現が低下し、この傾向は細胞浸潤が顕著となる10週以降に明らかであった。オスではVEGFおよびその受容体であるflk-1の遺伝子発現が、間質病変の進行とともに低下しており、間質血管の減数とその修復の低下が示唆された。

文 献

- 1) 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.
- 2) Hagerty DT. Intercellular adhesion molecule-1 is necessary but not sufficient to activate CD4 + T cells. Discovery of a novel costimulator on kidney tubule cells. *J Immunol.* 156: 3652-9. 1996.
- 3) Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.* 54: 864-76. 1998.
- 4) Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas (lpr) mice. *J Exp Med.* 190: 1813-24. 1999
- 5) Tesch GH, Schwarting A, Kinoshita K, Lan HY, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest.* 103: 73-80. 1999.