

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 28日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580364
 研究課題名(和文) 犬と猫の腎疾患におけるCOXとRA系を介した新規病態解明と診断治療法開発
 研究課題名(英文) Novel pathological mechanisms and therapy strategy for canine and feline kidney diseases: association with COX and RA
 研究代表者
 矢吹 映(YABUKI AKIRA)
 鹿児島大学・共同獣医学部・准教授
 研究者番号：10315400

研究成果の概要(和文)：犬と猫の腎疾患の病態解析、特に、シクロオキシゲナーゼ(COX)とレニン・アンジオテンシン(RA)系の関与を解析した。その結果、腎疾患の進行には腎臓内COXとRA系が複雑に関与しており、その機序は犬と猫で異なることが明らかになった。また、モデルマウスを用いた解析では、COX阻害剤であるピロキシカムには腎保護作用があり、その作用にはTGF- β の発現抑制が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated pathological mechanisms of kidney diseases in dogs and cats, especially involvement of cyclooxygenase (COX) and renin-angiotensin (RA) system. Results from pathological investigation demonstrated close and complicated relationships between renal COX and RA system and progression of the kidney diseases, and such mechanisms were clearly different between dogs and cats. Investigation using model mice demonstrated the renoprotective effect of piroxicam (COX inhibitor), and it was suggested that such renoprotective effect was induced from the downregulation of TGF- β .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：腎疾患、シクロオキシゲナーゼ、レニン・アンジオテンシン系、犬、猫

1. 研究開始当初の背景

シクロオキシゲナーゼ(COX)はアラキドン酸の代謝でプロスタグランジンやトロン

ボキサンなど生成に関与する酵素である。COXには、恒常的に発現するCOX-1と炎症や腫瘍などで発現する誘導型のCOX-2がある。腎臓におけるCOXの重要性が学術的に証明さ

れたのは、Harris らの 1994 年の報告が初めてであり (J Clin Invest, 1994)、以来、その生理機能、特に、レニン・アンジオテンシン (RA) 系との関連について活発な研究が行なわれている。その後、Komers らが 2001 年に糖尿病性腎症のモデルラットで腎臓の COX (特に COX-2) が過剰発現することを初めて報告し (J Clin Invest, 2001)、それ以来、COX/RA 系を介した腎疾患の病態メカニズムおよび COX 阻害剤の腎保護効果についての活発な研究が進められている。近年では、COX-2 選択的阻害剤の腎保護効果が糖尿病性腎症のモデルラットで証明され (Komers et al, Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007)、さらに、ヒトでも非選択的 COX 阻害剤に抗蛋白尿作用があることが報告されるなど (Vogt et al, Nephrol Dial Transplant, 2009)、腎疾患の新規治療ターゲットとして研究が進められている近年注目の研究分野である。しかしながら、獣医学領域では、腫瘍細胞での COX 発現やアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤の腎保護作用に関するプロ/レトロスペクティブ調査がみられる程度であり、腎臓病理学的観点から COX/RA 系を介するメカニズムを解明し、新規の診断・治療法の開発に繋げようとする動きはみられない。

我々は、これまで各種動物の腎臓の形態学的・病理学的研究を行い多くの研究成果を残してきた。犬と猫の腎疾患についても研究を開始しており、すでに、腎疾患の組織病理学的特性が犬と猫で異なることを報告した。また、申請者は、腎疾患と COX/RA 系との関連についても研究を始めており、高血圧モデル (Yabuki et al, Exp Anim, 2004) や糖尿病モデルの腎障害において COX-2 が過剰発現することを報告した。さらに、犬と猫の臨床例においても解析を始めており、少数での解析ながら、犬や猫の腎疾患でも COX-2 やレニンを過剰発現する症例が存在することを報告した。これらの結果は、犬と猫では腎疾患の発現・進行メカニズムに COX や RA 系の活性化が関与していることを強く示唆しているが、これまで十分な研究が行なわれていない。

2. 研究の目的

本研究では、犬および猫の腎疾患について、腎疾患のタイプ、動物種、進行度に特異的な COX/RA 系の発現パターンを解析し、これまで明らかにされていなかった腎疾患の病理メカニズムを明らかにすることを目的とした。また、腎疾患のモデル動物を用いて、COX 阻害剤の腎保護効果を検討し、そのメカニズムの解明を行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 組織病理学的解析：各種臨床検査から腎疾患と診断された症例、画像診断で腎臓に異常を認める症例、持続的な蛋白尿や高血圧を認める症例において行なわれた腎生検サンプルを解析する。採取した組織は、常法に従い、光学顕微鏡、電子顕微鏡および免疫組織化学的 (免疫複合体について) に精査し、組織病理学的特性と臨床徴候から詳細な疾患分類を行なう。分類はヒトの WHO 分類に従う。

2) COX/RA 系の発現パターンの解析: COX-1、COX-2、レニン、アンジオテンシン II (Ang II) およびアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 発現と分布を免疫組織化学的に解析する。その結果を定量的に解析し、疾患のタイプ、動物種、進行度の別に COX/RA 系の発現パターンを明らかにする。

3) 尿細管間質障害 (TID) モデルにおける COX 阻害剤の腎保護効果: すでに、申請者は、猫の腎疾患では TID が腎疾患の進行と関連することを報告した。TID モデルマウスへの COX 阻害剤投与実験を行なう。実験には、信頼性の高い片側尿管結紮 TID マウスを使用する (Chevalier et al, Kidney Int, 2009)。COX 阻害剤は、齧歯類での阻害効果と臨床応用を考慮してアスピリン、ピロキシカム、メロキシカムの 3 剤とし、薬用量は過去の報告に従う (Liu et al, Nutr Cancer, 2008; Oba et al, Int J Cancer, 2008; Denda et al, Carcinogenesis, 1997)。1) 一般食群、2) アスピリン給餌群、3) ピロキシカム給餌群、

4)メロキシカム給餌群を設定し、光顕および免疫組織化学的に精査して腎保護効果を検証した。

4. 研究成果

1) 組織病理学的解析：腎生検により得られた犬4頭、猫1頭の腎臓を解析した。

その結果、犬では膜性腎症と膜性増殖性糸球体腎炎が各々2例ずつであり、猫の1例は腎アミロイド症であった。犬では4例全てで免疫複合体の沈着が認められ、特にIgMと補体C3は全ての症例で、IgGは3例に沈着が認められた。一方、IgAの沈着を認める症例はいなかった。ヒトではIgAの沈着を認めるIgA腎症が多く、膜性腎症と膜性増殖性糸球体腎炎はむしろ小数であるとされており、犬の糸球体腎症の発生メカニズムはヒトとは異なることが示唆された。特に、4例中3例で膵炎の併発が認められており、膵炎は犬の糸球体腎症の原因疾患として重要であると考えられた。猫の腎アミロイド症はアミロイドが糸球体ではなく、間質に沈着するまれなタイプであったが、猫の腎アミロイド症に関する報告は少ないため、今後も例数を重ねて検討しなければならない。

2) COX/RA系の発現パターンの解析：23例の犬と13例の猫で検索を行なった。

2-1) COXの発現パターン：まず、正常な腎臓における局在を解析した。COX-1は犬猫ともに正常な腎臓では陽性反応が認められなかった。COX-2は犬猫ともに遠位尿細管の緻密斑に陽性反応が認められたが、陽性反応を示さない個体もあった。症例でのCOX-1については、10例の犬でヘンレープの上行脚に陽性反応が認められ、4例に間質の浸潤細胞に陽性反応が認められた。猫では、3例で腎乳頭の間質細胞に陽性反応が認められた。COX-2については、14例の犬で緻密斑に陽性反応が認められ、集合管に陽性反応を示すケースもあった。猫では5例で緻密斑に陽性反応が認められ、1例にのみ集合管に陽性反応が観察された。

定量的解析では、まず、COX-1あるいはCOX-2に陽性の症例と陰性の症例で腎病変の重症度に違いがあるかを解析した。解析は血漿クレアチニン値、糸球体の肥大、糸球体の硬化度、間質の細胞浸潤および間質の線維化について行なった。その結果、全てのパラメータにおいて、犬猫ともに陽性群と陰性群との間に有意差は認められなかった。次いで、緻密斑におけるCOX-2の陽性率と腎病変との関連性を解析した。その結果、犬で糸球体の肥大と緻密斑のCOX-2陽性率に有意な正の相関が認められた。猫では糸球体の硬化度と緻密斑のCOX-2陽性率に有意な正の相関が認められた。

以上の結果から、犬と猫の腎障害のメカニズムには腎内COXの誘導、特にCOX-2の誘導が関与することが明らかになった。さらに、犬と猫では関与する糸球体の病変が異なるため、その病理メカニズムに動物種差が存在することが示唆された。

2-2) RA系：レニンの陽性反応は、犬では22例に、猫では12例にみられ、全ての症例で陽性反応は糸球体細動脈に観察された。正常動物と腎疾患動物との間にはレニンの局在の違いは認められなかった。AIIの陽性反応は、犬では23例全てに認められ、近位尿管上皮に顆粒状に陽性反応が観察された。猫では10例に陽性反応が認められたが、犬とは異なり、近位尿管と集合管に陽性反応が観察された。正常動物と腎疾患動物との間には尿管の陽性反応の違いは認められなかったが、陽性領域の広さは個体により様々であった。また、腎疾患動物では、17例の犬と9例の猫で間質の浸潤細胞に陽性反応が観察され、連続切片を用いた解析によりマクロファージであることが確認された。ACEの陽性反応は、犬猫ともに全ての症例で近位尿管上皮の刷子縁に認められた。正常動物と腎疾患動物では陽性反応の局在の違いはなかったが、陽性領域の広さは個体により様々であった。また、本研究ではACEのホモログであるACE2についても検索を行なった。ACE2の陽性反応はACEと同じく近位尿管上

皮細胞の刷子縁に観察され、それ以外にも遠位尿管や集合管の細胞頂部にも陽性反応が観察された。正常動物と腎疾患動物では陽性反応の局在に違いはなかったが、陽性領域の広さは個体により様々であった。

定量的解析では、レニンの陽性スコアは犬で糸球体の肥大と正の相関関係が認められた。一方、猫ではレニンの陽性スコアは如何なる腎病変のパラメータとも相関を示さなかった。AII の定量は尿管と間質で分けて行なった。その結果、犬では、間質のAII陽性スコアが血漿クレアチニン値、糸球体の硬化、間質の細胞浸潤、間質の線維化といった様々なパラメータと相関を示した。猫では、尿管と間質の両方でAII陽性スコアが糸球体の硬化と間質の細胞浸潤と相関を示した。ACE の定量的解析では、腎疾患動物ほど ACE の分布領域が狭い傾向が認められ、特に犬の皮質で顕著であった。ACE2 では、犬には腎疾患に伴う明らかな変化は認められなかったが、猫では髄質の陽性領域が正常動物よりも広い傾向が認められた。

以上のことから、犬と猫の腎疾患では腎内 RA 系の各因子の亢進および低下が複雑に絡み合って関与していることが明らかになった。また、その病理メカニズムには動物種差が存在することが明らかになった。

3) TID モデルにおける COX 阻害剤の腎保護効果：片側尿管結紮 (UUO) 誘発性 TID モデルを用いて検索した。

UUO により、結紮腎には間質の線維化、尿管の萎縮および単核細胞浸潤といった TID と一致する病変が観察された。しかし、その重症度には UUO+COX 阻害剤投与群 (アスピリン、ピロキシカムおよびメロキシカム) と UUO+非投与群との間で明らかな違いは観察されず、定量的解析でも有意差は認められなかった。一方、免疫組織化学的観察は、レニン、AII、ベータ型変異増殖因子 (transforming growth factor- β , TGF- β)、プラスミノゲン活性化抑制因子 (plasminogen activator inhibitor-1,

PAI-1) について行なった。このうち、TGF- β に明らかな違いが認められた。すなわち、UUO により尿管間質の TGF- β の陽性反応は増強し、これはピロキシカム投与群で軽減する傾向がみられ、定量的解析でもピロキシカム投与群が有意に低い値を示した。レニン、AII および PAI-1 の陽性反応には、COX 阻害剤投与群と非投与群との間に明らかな違いが観察されず、定量的解析でも有意差は認められなかった。

以上の結果から、UUO による腎臓の TGF- β 発現がピロキシカム投与により抑制されることが明らかになった。TGF- β は TID 進行の主要なメディエーターであり、COX 阻害剤の中でもピロキシカムには腎保護効果がある可能性が示唆された。

総括：本研究では、犬と猫の腎疾患の病態発現に COX と RA 系が関与することを明らかにした。また、モデル動物を用いた解析では、ある種の COX 阻害剤、すなわちピロキシカムには腎保護効果があることを明らかにした。ピロキシカムは獣医学領域でも抗腫瘍薬としてよく用いられるものであり、本研究の結果は、ピロキシカムが新しい腎保護薬となる可能性を秘めている。しかしながら、どのような腎病態の時にピロキシカムが腎保護効果を現すのか、犬や猫でも今回のマウスと同様に腎保護作用を示すのかは明らかではなく、今後の更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件、全て査読あり)

1. Mitani S, Yabuki A, Taniguchi K, Yamato Q. Association between the intrarenal renin-angiotensin system and renal injury in chronic kidney disease of dogs and cats. *J Vet Med Sci.* 2013, 75:127-133.
2. Yabuki A, Mitani S, Sawa M, Mizukami K, Fujiki M, Yamato Q. A comparative study of chronic kidney disease in dogs and

cats: induction of cyclooxygenases. *Res Vet Sci.* 2012, 93:892-897.

[学会発表] (計6件)

1. 富永 なおみ・矢吹 映・大和 修: 片側尿管結紮マウスモデルにおけるシクロオキシゲナーゼ阻害剤投与の影響. 第154回日本獣医学会学術集会, 2012年9月(盛岡)
2. 矢吹 映・宮 豊・宮 紀子・野添伸樹・大和 修: 糸球体腎炎と膀胱炎を併発した犬の3例. 第5回日本獣医腎泌尿器学会学術総会 2012年8月(東京)
3. Yabuki A, Mitani S, Mizukami K, Yamato O. Cyclooxygenase induction in canine and feline kidney diseases: Immunohistochemical expression and relation with pathological changes. WSAVA World Congress 2011. 2011 Oct (Jeju, Korea)
4. Mitani S, Yabuki A, Mizukami K, Yamato O. Immunohistochemical analysis of renin and angiotensin II in the kidneys of dogs and cats with kidney diseases. WSAVA World Congress 2011. 2011 Oct (Jeju, Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢吹 映 (YABUKI AKIRA)
鹿児島大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号: 10315400

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大和 修 (YAMATO OSAMU)
鹿児島大学・共同獣医学部・教授
研究者番号: 80261337

市居 修 (ICHHI OSAMU)
北海道大学・獣医学部・助教

研究者番号: 60547769

保坂善真 (HOSAKA YOSHINAO)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号: 00337023

(4) 研究協力者

水上圭二郎 (MIZUKAMI KEIJIRO)
鹿児島大学・共同獣医学部・大学院生

美谷沙和音 (MITANI SAWANE)
鹿児島大学・共同獣医学部・大学院生

富永なおみ (TOMINAGA NAOMI)
鹿児島大学・共同獣医学部・学部学生