

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450446

研究課題名(和文) 犬と猫の糸球体腎症における病態機序の解明と新規診断・治療マーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of pathological mechanisms for diagnostic and treatment strategy of glomerulonephropathy in dogs and cats

研究代表者

矢吹 映 (Yabuki, Akira)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：10315400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、犬と猫(特に犬)の糸球体腎症の病態機序の解明を目的として研究を行った。犬の糸球体腎症では腎機能の低下には間質の線維化が深く関与しており、その病態には糖鎖構造、ネフリン、グレリンなど様々な因子が関連することが明らかになった。しかしながら、糸球体腎症、特に免疫複合体糸球体腎炎(ICGN)に共通する機序は存在せず、これは犬のICGNの進行や病態の複雑さに関連していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to clarify the pathological mechanisms of glomerulonephropathy in dogs and cats, especially in dogs. In pathologically, interstitial fibrosis was closely related with the deterioration of renal functions. Changes of several factors including carbohydrate chains, nephrin, and ghrelin were demonstrated in the cases with glomerulonephropathy, especially immune-complex mediated glomerulonephritis (ICGN). However, no common changes were detected in the course of ICGN, and this finding was thought to be reflected the complexity of pathological changes and clinical features of this disease.

研究分野：獣医臨床病理学

キーワード：犬 糸球体腎症 免疫複合体糸球体腎炎 病態機序

1. 研究開始当初の背景

糸球体腎症は、犬と猫(特に犬)のネフローゼ症候群の代表的な原因疾患であり、効果的な治療法のない進行性、難治性の疾患である。この根本的な原因として、犬と猫の糸球体腎症の病態メカニズムが十分に解明されていないことが挙げられる。

糸球体腎症で最も重要な病理学イベントは蛋白尿であり、これは糸球体への免疫複合体の沈着とそれに続く糸球体濾過バリアの破綻により起こる。ヒト医学では、糸球体腎症における免疫複合体の沈着様式は詳細に解析されており、蛋白尿の発現機序についてもスリット膜関連分子(濾過バリアの機能に必須の分子)や糖鎖など、様々な分子の異常が深く関与することが明らかにされている。

一方、伴侶動物については、犬で免疫複合体の沈着パターンが僅かに知られているのみであり、蛋白尿が発現する分子メカニズムの解明は進んでいない。

申請者は、腎臓病理学的観点から犬と猫の慢性腎臓病について研究を行い、これまでに、犬と猫では慢性腎臓病の進行機序が異なること(Yabuki et al, *Res Vet Sci*, 2010)、腎臓内のレニン・アンジオテンシン系(Mitani and Yabuki et al, *J Vet Med Sci*, 2012)やシクロオキシゲナーゼの活性化(Yabuki et al, *Res Vet Sci*, 2012)が関与することを見出した。また、糸球体のスリット膜関連分子であるネフリン、ポドシンおよびACTN4について検索を行い、犬の慢性腎臓病では糸球体濾過バリアの破綻にネフリンの発現低下が関与する可能性を示した(Ichii, Yabuki et al., *Histol Histopathol*, 2011)。

このような研究は、犬と猫の慢性腎臓病の進行機序を解明したもののだが、慢性腎臓病は臨床的な包括的疾患名であり、その根底にある腎疾患の特徴は考慮されていない。特に、糸球体腎症はその臨床的挙動が非糸球体腎症とは異なるため、独立した疾患としてその病態機序を解明するべきである。

2. 研究の目的

(1)腎生検による病態解明:糸球体腎症の診断には腎生検が必須であるが、腎生検の病理検査には複数種類の染色を用いた光学顕微鏡検査だけでなく、電子顕微鏡や新鮮凍結切片による蛍光抗体法が必須である。本研究では、臨床的に蛋白漏出性腎症と診断された犬や猫において腎生検を実施し、詳細な病理検査を行うことで糸球体腎症のタイプ分類と免疫複合体の沈着様式の決定を試みる。さらに、病理組織学的な進行度と臨床病理学的特徴との関連性を分析する。また、腎生検で生じる問題点、特に、輸送サンプルでの蛍光抗体法に関する問題点を

改善するために、パラフィン切片での蛍光抗体法や輸送液(Michel's solution)の有用性についても検討する。

(2)糖鎖修飾の変化:細胞がその機能を発揮するためには細胞表面の糖鎖修飾が重要であるが、犬や猫の糸球体腎症について腎臓の構成細胞における糖鎖修飾の変化は明らかにされていない。そこで、糸球体腎症と診断された症例の腎生検サンプルについてレクチン組織化学的解析を行い、腎臓組織の糖鎖修飾の変化と糸球体腎症の病態との関連性を明らかにする。

(3)スリット膜関連分子の変化:糸球体が濾過バリア機能を維持するためにはスリット膜関連分子といわれる各種分子の発現が必要である。しかし、犬や猫の糸球体腎症についてはスリット膜関連分子の発現異常は明らかにされていない。そこで、糸球体腎症と診断された症例の腎生検サンプルについて各種スリット膜関連分子(ネフリン、ポドシンおよびACTN4)について免疫組織化学的解析を行い、各分子の発現の変化と糸球体腎症の病態との関連性を明らかにする。

(4)腎臓内グレリンの変化:グレリンは胃で発現する成長ホルモン分泌促進および食欲増進ホルモンであるが、腎臓でも発現しており重要な尿細管機能を担っている。ヒトでは糸球体腎症により腎臓のグレリン発現が低下するという報告があるが、犬や猫の糸球体腎症では明らかにされていない。そこで、糸球体腎症と診断された症例の腎生検サンプルについて腎臓内グレリンの発現を免疫組織化学的に解析し、その変化と糸球体腎症の病態との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)腎生検:蛋白漏出性腎症と臨床的に診断された犬について腎生検を実施した。猫については、研究期間中に蛋白漏出性腎症の発症例には遭遇しなかったが、CT検査でCT値の異常低値を認めた症例について腎生検を実施した。16G半自動Tru-cut針により腎組織を採取した。光学顕微鏡観察のためには組織を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従ってパラフィン包埋した。2 μ mの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)、過沃素酸シッフ(PAS)、過沃素酸メセナミン銀(PAM)、マッソン・トリクロム(MT)、コンゴ・レッド、チオフラビンT染色を施した。電子顕微鏡観察のためには、組織を2.5%グルタルアルデヒド/カコジル酸緩衝液で前固定、1%OsO₄で後固定し、常法に従ってエポキシ樹脂(Quetol 812)に包埋した。超薄切片を酢酸ウランとクエン酸・酢酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。蛍光抗体法のためには、採取した組織をO.C.Tコンパウンドに包埋

し、常法通りドライアイス/アセトンで凍結した。クリオスタットにより3 μ mの凍結切片を作製し、IgG、IgA、IgMおよび補体C3に対する蛍光免疫染色を行った。シグナルの検出は、Alexa 488 標識二次抗体を用いた間接法で行った。また、本学外で採取された組織はMichel's solutionに浸漬して輸送した後に上記と同様の工程で標本作製を行った。

(2)病態解明：糸球体腎症と診断された13頭の犬の腎組織を使用した(アミロイド腎症を除く)。定量的解析はマッソン・トリクロム染色で行い、糸球体の障害および間質の線維化を評価した。糸球体の障害は半定量法で、間質の線維化はデジタル画像でのポイントカウンティング法で解析した。計測したスコアと各種パラメータ、すなわち血漿クレアチニン値(pCre)、血漿尿素窒素濃度(BUN)、血漿総蛋白質濃度、血漿アルブミン濃度、尿蛋白/クレアチニン比(UP/C)および血圧(ドプラ法)との相関関係を統計学的に評価した。

(3)レクチン組織化学：健常犬3頭および糸球体腎症の犬12頭の腎組織を使用した。常法に従って3 μ mのパラフィン切片を作製し、7種類のビオチン化レクチン(WGA, ConA, RCA120, PNA, DBA, SBA および UEA-1)を用いた組織化学的検索を行った。レクチンの特異性はハプテン糖吸収試験で確認した。各々のレクチン反応性の変化が腎臓病変の程度や臨床病理学的検査値とどのように関連するかを検討した。

(4)スリット膜関連因子およびグレリンの解析：健常犬3頭および糸球体腎症の犬12頭の腎組織を使用した。常法に従って3 μ mのパラフィン切片を作製し、ネフリン、ポドシンおよびACTN4に対する免疫染色を行った。糸球体基底膜における陽性反応が腎臓病変の程度や臨床病理学的検査値とどのように関連するかを検討した。

4. 研究成果

(1)腎生検による病態解明：研究期間中に10頭の犬と1頭の猫について腎生検を実施した。6頭の犬は免疫複合体糸球体腎炎(Immune-complex glomerulonephritis; ICGN)、3頭は非免疫複合体糸球体腎炎(Non-ICGN)、1頭は腎アミロイドーシスと診断された。ICGNのうち1頭は犬では発生が希なIgA腎症と診断された。Non-ICGNのうち1頭では電子顕微鏡所見がヒトのアルポート症候群と類似していた。猫の1頭はCT検査において腎臓のCT値が異常低値を示しており、腎生検の結果から動物では報告のない尿管管性リポドーシスと診断された。

蛍光抗体法による免疫複合体の解析について、パラフィン切片およびMichel's solutionの有用性を検討した。その結果、

パラフィン切片では様々な検出法を試しても高い特異性をもって免疫複合体を検出することはできなかった。一方、Michel's solutionで郵送された組織では免疫複合体の検出が可能であった。Michel's solutionはヒトの腎生検では蛍光体法用の輸送液として知られているが、犬の腎生検においても有用性が高いことが証明された。しかしながら、形態的保存度は新鮮凍結切片に比べると明らかに低く、免疫複合体の診断に苦慮することもあったため、検討の余地があると考えられた。

定量的解析では、糸球体の障害値と間質の線維化値は、ともに血液学的な腎機能マーカーである血漿クレアチニン値(pCre)および血中尿素窒素(BUN)との間に有意な正の相関を示したが、尿蛋白/クレアチニン比(UP/C)など他のパラメータとの間には相関を示さなかった。初期の慢性腎臓病(IRISステージ1、pCre<1.4 mg/dl)でみると、pCreは間質の線維化値との間に有意な正の相関を示したが、糸球体の障害値との間に相関は認められなかった。このことから、犬の糸球体疾患では、腎臓の組織障害に伴ってpCreやBUNは上昇し、特に、初期のpCreの上昇は間質の線維化によって起こることが明らかになった。また、蛋白尿、ネフローゼ症候群、高血圧といった病態は腎組織障害の程度とは関係なく起こることも明らかになった。

(2)レクチン組織化学：健常犬の腎臓における各種レクチンの結合パターンは過去の報告と一致していた(Yabuki et al., *Res Vet Sci*, 2012)。ConA, WGA, PNA, および SBAでは、ほとんどのICGN症例で腎臓のレクチン結合パターンが健常犬と類似していた。RCA120, PNA および UEA-1では尿管上皮の反応性が健常犬と異なる症例が多かった。この違いは、RCA120では近位尿管に、PNAとUEA-1では遠位尿管に観察された。DBAでは、健常犬には認められないボウマン壁の陽性反応を示す症例が多かった。糸球体のレクチン結合性は、多くの症例で健常犬と同様であったが、健常犬では染まらない足細胞やメサングウム細胞に陽性反応を示す症例も存在した。このようなレクチン結合パターンの変化は、糸球体の濾過機能や尿管の再吸収能の異常に関連していると考えられた。また、症例間で共通する結合パターンは認められず、また、臨床病理学的な各種パラメータとも関連性はなかった。このことから、ICGNで起きる腎組織の糖鎖修飾の変化は症例により異なっていると考えられた。

(3)スリット膜関連分子：正常犬では、ネフリン、ポドシン、ACTN4のすべてで糸球体基底膜に強い陽性反応が認められた。ICGN症例では、ネフリンの染色強度が症例により異なり、正常犬より明らかに染色性の弱い症例が認められた。しかしながら、

糸球体腎炎のタイプ、組織障害の程度および臨床病理学的パラメータとの関連性は明らかではなかった。ポドシンとACTN4の免疫染色では、ICGN症例と正常犬で明らかな違いは認められなかった。このことから、犬のICGNにおける糸球体濾過機構の破綻にはスリット膜関連分子の一つであるネフリンの発現低下が関与していると考えられた。しかし、これは症例によって異なっており、犬のICGNに共通する機序とは考えられなかった。

(4)腎臓内グレリン：正常犬では、グレリンに対する陽性反応は遠位尿細管上皮細胞認められた。ICGN症例では、遠位尿細管上皮におけるグレリンの発現は明らかに低下しており、統計学的にも正常犬と有意差が認められた。グレリンの発現スコアは、糸球体腎炎のタイプや組織障害の程度とは関連していなかったが、pCreと有意な正の相関が認められた。この結果は、グレリンの腎保護作用に関係していると考えられた。

以上の結果から、犬の糸球体腎症では腎機能の低下には間質の線維化が深く関与しており、その病態には糖鎖構造、ネフリン、グレリンなど様々な因子が関連することが明らかになった。しかしながら、糸球体腎症、特にICGNに共通する機序は存在せず、これは犬のICGNの進行や病態の複雑さに関連していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

1. Yabuki A, Shimokawa Miyama T, Kohyama M, Yamato O. Canine IgA nephropathy: a case report. J Vet Med Sci. 2016, 78: 513-515. doi:10.1292/jvms.15-0161. (査読有り)

2. Yabuki A, Mizukami K, Tokunaga S, Yamato O. Change in intrarenal Ghrelin expression in immune complex-mediated glomerular disease in dogs. J Vet Med Sci. 2016, 78:109-1012. doi:10.1292/jvms.15-0404. (査読有り)

[学会発表](計 6件)

1. 矢吹 映, 小山 奈菜美, 川畑貴裕, 大和 修: 糸球体疾患を発症した血縁の犬 2例. 平成 27 年度日本獣医師会獣医学術大会. 秋田キャスルホテル(秋田県秋田市). 2016年2月26日~2016年2月28日

2. 矢吹 映, 小山 奈菜美, 川畑貴裕, 大和 修: 糸球体疾患を発症した血縁の犬 2例. 平成 27 年度獣医学術大会九州地区学会. メルパルク熊本(熊本県熊本市). 2015年

10月16日

3. 矢吹 映, 島(澤)真理子, 神山萌子, 大和 修: 犬の免疫複合体糸球体腎炎におけるレクチン組織化学的検索. 第158回日本獣医学会学術集会. 北里大学獣医学部(青森県十和田市). 2015年9月7日~2015年9月9日

4. 矢吹 映, 徳永 暁, 大和 修: 犬の糸球体疾患における腎組織障害と臨床的病態との関連性. 平成 26 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会. 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市北区駅元町). 2015年2月13日~2015年2月15日.

5. 島田 大, 島田のぞみ, 坂本栄一, 矢吹 映: 腎アミロイドーシスの1例. 腎生検による病理所見と臨床病理学的所見. 第35回動物臨床医学会年次大会. 大阪国際会議場(大阪市北区中之島). 2014年11月20~2014年11月22日

6. 矢吹 映, 徳永 暁, 大和 修: 犬の糸球体疾患における腎組織障害と臨床的病態との関連性. 第63回九州地区獣医師大会. 鹿児島県民交流センター(鹿児島県鹿児島市山下町). 2014年10月4日

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢吹 映(AKIRA YABUKI)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・

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 (OSAMU YAMATO)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・

教授

研究者番号：80261337

市居 修 (OSAMU ICHII)

北海道大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60547769