

令和元年6月5日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08056

研究課題名(和文) 犬猫の糸球体腎症におけるオーバーフィル理論の解明、バイオマーカーおよび治療法開発

研究課題名(英文) Overfill theory in canine and feline glomerular disease: mechanisms, biomarker, and therapy

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、犬と猫の糸球体腎症の病態メカニズムを解析した。臨床的に糸球体腎症が疑われて腎生検(あるいは死後の腎病理検査)の適応となった症例は24症例(犬17例、猫7例)であった。本研究では、犬および猫の糸球体腎症ではOverfill理論にもとづく病態はほとんど起きていないことが明らかになった。ネフローゼ症候群を起こした症例はすべて古典的なUnderfill理論にもとづく病態であると考えられた。また、同じ糸球体疾患でも免疫複合体性糸球体腎炎と非免疫複合体性糸球体腎症では病理学的な進行メカニズムが異なっており、これには蛋白尿の程度が大きく影響していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸球体腎症は難治性の腎疾患であり、その治療法も限られている。糸球体腎症はヒトで多く発生する疾患であるが、犬や猫ではその病態がヒト異なっており、ヒトの治療法を簡単には外挿できない。そのため、犬および猫の動物種の特性を明らかにすることが本疾患の治療戦略には欠かせない。本研究は、重篤な臨床症状であるネフローゼ症候群の発生および進行メカニズムの一端を明らかにしたものであり、本疾患の治療戦略の開発に向けて重要な知見を寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the pathophysiological mechanism of glomerulonephropathy in dogs and cats. Twenty-four cases (17 dogs and 7 cats) were clinically diagnosed with glomerulonephropathy and received renal biopsy (or postmortem renal pathology). As the results, it was suggested that Overfill theory is a rare mechanism in the incidence of nephrotic syndrome in dogs and cats with glomerulonephropathy. The pathophysiological mechanism of all cases with nephrotic syndrome was considered as the classical Underfill theory. In addition, even in the same glomerular disease, the pathological progression mechanism is different between immune complex-mediated glomerulonephritis and non-immune complex-mediated glomerulonephropathy. This difference might be induced by the magnitude of proteinuria.

研究分野：獣医陣泌尿器病学、獣医臨床病理学

キーワード：オーバーフィル 糸球体疾患 犬 猫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸球体腎症は、犬と猫のネフローゼ症候群(蛋白尿と低蛋白血症に腹水/皮下浮腫を併発)や高血圧症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の疾患である。近年、欧米では犬の糸球体腎症の病理診断を標準化しようとする動きがあり、“Renal Standardization Study Group”のもとで、光顕、電顕、免疫染色をセットで行う腎病理診断センターが開設されている。申請者は、欧米と同等の腎生検/診断レベルを確立し(図1)、これまで伴侶動物では例のない糸球体腎症を報告してきた(Yabuki *et al*, *Case Rep Vet Med*, 2011; *J Jpn Assoc Vet Nephrol Urol*, 2011, 2010)。

糸球体腎症の予後を左右する最大の要因はネフローゼ症候群であり、高血圧症も重要な合併症である。その発生機序には Underfill と Overfill の2つがある(図2)。Underfill は、低蛋白血症による血漿膠質浸透圧の低下を原因とする古典的な機序である。Overfill は、新たに提唱された機序であり、尿細管の機能異常による体内への Na 貯留を原因とし、これにより腹水/皮下浮腫、高血圧症といった重篤な病態が惹起される。近年、ヒトでは Overfill が治療ターゲットとして注目されている(Teoh *et al*, *Am J Physiol*, 2015)。

Overfill で直接的な役割を果たす因子は、尿細管上皮における上皮性 Na チャネル(ENaC)と Na⁺/K⁺-ATPase(Na ポンプ)であり、特に ENaC の活性化が重要である(Svenningsen *et al*, *Acta Physiologica*, 2013; Hamm *et al*, *NIH PA*, 2011)。この活性化には多くの因子が関わっており、線溶系(プラスミンやウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子、一酸化窒素合成酵素、レニン・アンジオテンシン系、シクロオキシゲナーゼなどが影響する。特に、腎障害により尿中に出現したプラスミンは、尿細管上皮の ENaC を直接刺激して Overfill を引き起こすことが知られている(Svenningsen *et al*, *J Am Soc Nephrol*, 2009)。これらの因子の Overfill への関与は、実験動物やヒトでのみ証明されている。

犬と猫の糸球体腎症の病態メカニズムはほとんど解明されていない。申請者は、犬と猫の慢性腎臓病(慢性腎不全に変わる疾患定義)について研究を行い、これまでに、上皮間葉転換(Yabuki *et al*, *Res Vet Sci*, 2010)、レニン・アンジオテンシン系(Mitani, Yabuki *et al*, *J Vet Med Sci*, 2012, 2013)、COX(Yabuki *et al*, *Res Vet Sci*, 2012)、糸球体のスリット膜関連分子(Ichii, Yabuki *et al*, *Histol Histopathol*, 2011)の関与を報告した。しかし、同時に大きな問題点も浮上してきた。すなわち、「慢性腎臓病のなかでも、糸球体腎症は独立した疾患として解析すべき」ということである。糸球体腎症は進行性かつ難治性であり、伴侶動物の腎疾患の治療戦略には糸球体腎症の病態機序の解明が急務である。しかし、ネフローゼ症候群や高血圧の治療に必須のメカニズムである Overfill については依然として未解明である。

2. 研究の目的

腎生検により糸球体腎症と診断された犬と猫の組織サンプルおよび血液、尿を用いて腎臓病理学的解析、臨床病理学的解析を行ない、様々なタイプ、臨床ステージの検索材料を集積する。詳細な臨床病理学的解析により、各々の症例における Overfill および非 Overfill の評価を行ない、糸球体腎症のタイプ、臨床徴候、治療成績、予後とどのように関連するのかを明らかにする。その後、Overfill と診断された症例については、Overfill を惹起・統制する因子の腎臓内発現について分子病理学的解析を行なうことで犬と猫の糸球体腎症における Overfill メカニズムの特性を明らかにする。また、Overfill、非 Overfill にかかわらず、糸球体腎症で臨床的に問題となるのは免疫複合体性糸球体腎炎である。このことから、本研究では免疫複合体性糸球体腎炎と非免疫複合体性糸球体腎症との病理学的な進行メカニズムの違いについても明らかにする。

3. 研究の方法

腎生検：蛋白漏出性腎症と臨床的に診断された犬および猫について腎生検を実施した。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 μm の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン、過沃素酸シッフ、過沃素酸メセナミン銀、マッソン・トリクロム、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 μm 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。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。

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ない、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、血漿尿素窒素濃度、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。

4. 研究成果

臨床的に糸球体腎症が疑われて腎生検(あるいは死後の腎病理検査)の適応となった症例は 24 症例(犬 17 例、猫 7 例)であった。臨床的に皮下浮腫や腹水などネフローゼ症候群を示した症例は犬の 5 症例であった。臨床病理学的検査では、この 5 症例の犬は重度の低アルブミン血症(2.0 g/dL 以下)を示していた。このことから、これらの症例のネフローゼ症候群の原因は、血漿膠質浸透圧の低下による血管外への水の漏出、すなわち Underfill であると考えられた。その他の症例では、高度な蛋白尿(尿蛋白/クレアチニン比が 2.0 以上)を示すものの、皮下浮腫や腹水といった体液異常の病態は示していなかった。よって、犬と猫の糸球体腎症では Overfill は極めてまれな病態であることが示唆された。

本研究の検索では、犬ではまれな糸球体腎症を明らかにした。分類不能の糸球体腎症は、その電子顕微鏡所見がヒトのアルポート症候群に類似していた。犬ではアルポート症候群の報告はまれである。すでに報告されている犬の原因アレルについて遺伝子解析を行なったが、既知の異常アレルは検出されず、本症例についてはさらに詳細な解析が必要であると考えられた。さらに、犬の一例は、動物ではほとんど報告のない糸球体血栓症と診断された。この症例は、皮下浮腫や胸水の貯留といったネフローゼ症候がみられているが、低アルブミン血症が顕著であり Underfill を起こしていると考えられた。糸球体腎症の鑑別のために死後に摘出した腎臓の病理検査が実施された。腎臓病理検査では、糸球体に高度な血栓が認められ、当初は免疫複合体性糸球体腎炎によるヒアリン血栓が疑われた。しかしながら、蛍光抗体法や電子顕微鏡観察の結果から免疫複合体性糸球体腎炎は否定的であり、さらに精査した結果からフィブリン血栓による糸球体血栓症と診断された。本症例は急性の転帰を向かえたために詳細な臨床病理学的情報が得られておらず、

糸球体血栓症の明らかな原因を確定することはできなかった。

解析を行った猫はすべて腎アミロイドーシスであった。このうち3症例は同一家系の猫であり、遺伝性の腎アミロイドーシスの可能性もある。実際に、その病理学的所見も当該家系外の猫とは明らかに異なっていた。当該家系の猫3頭では、アミロイドの沈着は糸球体に強く認められた。一方、家系外の猫2頭では、アミロイドの沈着は腎髄質の間質に強く認められた。猫の遺伝性の腎アミロイドーシスはアピシニアン以外には報告されておらず、当該家系の猫の腎アミロイドーシスについてはさらに解析が必要と考えられた。

さらに、本研究では犬の糸球体腎症の病態進行メカニズムに関するレトロスペクティブ解析を行った。免疫複合体性糸球体腎炎 (ICGN) あるいは非免疫複合体性糸球体腎症 (Non-ICGN) と診断された24頭 (ICGN : 18頭、Non-ICGN : 6頭) の犬の腎組織を使用した。ICGN : 間質線維化スコアと血漿クレアチニン値との間に有意な正の相関が認められた ($r=0.611$, $P<0.01$)。一方、糸球体硬化スコアと血漿クレアチニン値との間に相関は認められなかった。血中尿素窒素濃度、尿蛋白/クレアチニン値、血漿アルブミン濃度、収縮期血圧など他の臨床パラメータは、間質線維化および糸球体硬化のいずれとも有意な相関を示さなかった。間質線維化と糸球体硬化との間には弱い正の相関が認められた ($r=0.472$, $P<0.05$)。Non-ICGN : 糸球体硬化スコアと血漿クレアチニン値との間には有意な正の相関が認められた ($r=0.928$, $P<0.05$)。同様の相関はBUNとの間にも認められた ($r=0.900$, $P<0.05$)。糸球体の硬化は収縮期血圧との間にも有意な正の相関を示した ($r=1.000$)。一方、間質線維化スコアと血漿クレアチニン値との間には有意な相関は認められなかった。血中尿素窒素濃度、尿蛋白/クレアチニン値、血漿アルブミン濃度など他の臨床パラメータは、糸球体硬化および間質線維化のいずれとも有意な相関を示さなかった。間質線維化と糸球体硬化との間にも有意な相関が認められなかった。この結果から、ICGNでは、糸球体の硬化よりむしろ間質の線維化が腎機能の低下と密接に関係していることが示唆された。糸球体疾患では蛋白尿が重篤なことが多いが、尿細管腔にオーバーフローした蛋白質は尿細管上皮細胞の機能負荷を引き起こすことで尿細管間質障害を誘発することが知られている。さらに、尿細管間質障害の結果として起きる間質の線維化は腎機能の低下を引き起こすことも知られている。今回の結果から、ICGNでは免疫複合体が糸球体に沈着することで高度な蛋白尿が引き起こされ、それにより進行する間質の線維化が腎機能の低下を導くことが示唆された。ICGNでは低蛋白血症や蛋白尿が重篤になることでネフローゼ症候群を起こしやすいが、血漿アルブミン濃度や尿蛋白/クレアチニン値といった臨床的なパラメータからは腎病態の進行程度を予測できないことも示唆された。一方、Non-ICGNでは間質の線維化よりむしろ糸球体の硬化が腎機能の低下と関係していた。一般的にNon-ICGNはICGNに比べて蛋白尿が軽度であり、これは本研究で調査した症例でも同様であった。そのためNon-ICGNでは尿細管上皮細胞への負荷がICGNよりも軽度であり、尿細管間質障害の進行が緩やかであると考えられる。その結果、Non-ICGNでは間質の線維化よりも先に糸球体の硬化が進行し、これが腎機能の低下を導くと考えられた。

以上、本研究では、犬および猫の糸球体腎症ではOverfill理論にもとづく病態はほとんど起きていないことが明らかになった。ネフローゼ症候群を起こした症例はすべて古典的なUnderfill理論にもとづく病態であると考えられた。また、同じ糸球体疾患でもICGNとNon-ICGNでは病理学的な進行メカニズムが異なっており、これには蛋白尿の程度が大きく影響していると考えられた。

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Nakamura, R., Yabuki, A., Ichii, O., Mizukawa, H., Yokoyama, N. and Yamato, O. 2018. Changes in renal peritubular capillaries in canine and feline chronic kidney disease. *J. Comp. Pathol.* 160: 79-83. (査読あり)
2. Yabuki, A., Hamamoto, T., Rahman, M. M. and Yamato., O. 2018. Changes in lectin-binding patterns in the kidneys of canines with immune-complex mediated glomerulonephritis. *J. Vet. Med. Sci.* 80: 1562-1566. (査読あり)
3. Yabuki, A., Sawa, M., Kohyama, M., Hamamoto, T. and Yamato, O. 2017. Paraffin immunofluorescence for detection of immune complexes in renal biopsies: an efficient salvage technique for diagnosis of glomerulonephritis in dogs. *BMC Vet. Res.* 13: 371. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 矢吹 映、浜本岳志、大原優美子、下川孝子、大和 修：犬の糸球体疾患における腎組織障害と臨床病態の関連性：免疫複合体糸球体腎炎と非免疫複合体糸球体腎炎の違い .平成 29 年度日本獣医師会獣医学術大会 .別府国際コンベンションセンター ビーコンプラザ (大分県別府市) .2018 年 2 月 10-12 日.
2. 矢吹 映、浜本岳志、Rahman Mohammad Mahbubur、三好 宣彰、大和 修：若齢犬の異形成腎におけるシクロオキシゲナーゼ - 2、レニンおよび神経型 NO 合成酵素の発現に関する免疫組織化学的検索 .第 161 回日本獣医学会 .つくば国際会議場 (茨城県つくば市) .2018 年 9 月 11-13 日.
3. 矢吹 映、安藤崇則、田邊美加、大和 修：糸球体血栓症の犬の 1 例：第 11 回日本獣医腎泌尿器学会学術集会 .品川フロントビル (東京都品川区) .2018 年 8 月 19 日.
4. Akira Yabuki, Takeshi Hamamoto, Yumiko Ohara, Takako Shimokawa, Osamu Yamato. Correlation between renal damage and clinicopathological changes in immune-complex glomerulonephritis and non- immune-complex glomerulonephritis in dogs. The 43th World Small Animal Veterinary Association Congress (WSAVA) 2018. Singapore. 25-28 September/2018.

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：市居 治、大和 修、神山 萌子, Mariko Sawa

ローマ字氏名：Osamu Ichii, Osamu Yamato, Moeko Kohyama, Mariko Sawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。