

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06385

研究課題名(和文) 犬猫の糸球体疾患における上皮・内皮/間葉転換機構の解明と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Mechanisms and biomarkers of epithelial/endothelial-mesenchymal transition in glomerular disease of 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・教授

研究者番号：10315400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、犬と猫の糸球体疾患における上皮間葉転換について検索を行った。糸球体疾患を発症したのは殆どが犬であった。腎生検により糸球体疾患が診断された犬の腎臓について免疫組織化学的解析を行った結果、犬の糸球体疾患では、その病型にかかわらず上皮間葉転換の発現および筋線維芽細胞の出現を認めることが明らかになり、筋線維芽細胞が出現するメカニズムとして上皮間葉転換が起こることが犬の糸球体疾患でも証明された。一方、上皮間葉転換以外のメカニズムでも筋線維芽細胞が出現することも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸球体疾患は難治性かつ進行性の腎疾患である。本疾患は人だけでなく犬や猫にも発生し、特に犬で多く発生する。犬や猫では、糸球体疾患の根本的な治療は難しく、本疾患に罹患した動物の飼い主の心的および経済的負担は非常に大きい。本疾患の予防および治療に有効的な方法を見出すには、その病理学的な進行機序を明らかにする必要がある。本研究の成果は、その機序の一つである上皮間葉転換について明らかにしたものと学術的および社会的な意義を有している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the epithelial-mesenchymal transition in glomerular disease of dogs and cats. Incident of the glomerular disease was found in dogs. Immunohistochemical analysis was performed in the kidneys of dogs that were diagnosed with glomerular disease by renal biopsy. The results showed that epithelial mesenchymal transition occurred in most dogs but it did not depend on the type of the glomerular disease. It was considered that myofibroblasts were derived not only from epithelial mesenchymal transition but also from other mechanisms.

研究分野：獣医腎泌尿器病学

キーワード：糸球体疾患 犬 上皮間葉転換 筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

糸球体疾患は、犬と猫のネフローゼ症候群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。糸球体疾患の原発部位は文字通り糸球体であるが、ヒトや実験動物では、糸球体疾患においても糸球体の障害ではなく間質の線維化が腎機能の低下に深く関与することが明らかにされている。この間質の線維化において近年注目を集めているのが上皮・内皮/間葉転換の機構である。腎臓に様々な刺激(感染、炎症、薬物、蛋白尿など)が加わると、炎症細胞の浸潤や毛細血管の粗鬆化による組織の低酸素化が起こる。その結果として、障害を受けた尿細管上皮細胞や血管内皮細胞は本来の形質を失い、その代わりに間葉系細胞の形質を獲得する。このようにして形質転換した細胞は平滑筋アクチンと線維芽細胞の双方の形質を有し、「筋線維芽細胞」と呼ばれる。上皮・内皮/間葉転換により誘導された筋線維芽細胞は非常に活動的な細胞であり、多量の細胞外基質を産生することで間質の線維化を加速化する。この上皮・内皮/間葉転換の一連のイベントには、数多くのサイトカインや成長因子が関与する複雑な分子機構が存在する。しかしながら、犬と猫の糸球体疾患については、そのような進行機序はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

- (1) 臨床的に糸球体疾患が疑われる犬および猫について、腎生検および死後剖検で得た腎臓を病理組織学的に解析し、糸球体疾患の病型や犬と猫の違いを明らかにする。
- (2) 犬と猫の糸球体疾患について、上皮間葉転換の発現や筋線維芽細胞の出現について免疫組織化学的に解析し、糸球体疾患の病型との関連性、尿細管間質の線維化との関連性を明らかにする。
- (3) 猫の慢性腎臓病について、糸球体疾患の関与やトランスフォーミング増殖因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) の関与を明らかにする。
- (4) その他: 糸球体の発生異常を示す疾患である犬の腎異形成についても解析を行った。特に、レニン・アンジオテンシン系および尿細管糸球体フィードバック機構を担うレニン、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の腎臓での発現変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 糸球体疾患の症例収集と病態解析

臨床的に糸球体疾患が疑われる犬と猫において、腎生検もしくは死後の病理剖検により腎臓組織を採取した。光学顕微鏡観察のためには採取板腎臓組織を 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・トリクロームおよびコンゴ・レッド染色を施した。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。染色

は、Alexa 488 標識二次抗体を用いた間接法で行った。

(2) 糸球体疾患における上皮間葉転換の発現および筋線維芽細胞の出現

上記で収集した症例およびこれまで蓄積した犬の糸球体疾患の 27 症例について腎臓組織を免疫組織化学的に解析した。3 μm のパラフィン切片を作製し、ポリマー法により免疫染色を行った。上皮系マーカーとしては、汎サイトケラチン AE1/AE3、サイトケラチン 18 (CK18) および E-カドヘリンの検出を行った。間葉系マーカーとしてはビメンチンの検出を行った。筋線維芽細胞のマーカーとしては α -平滑筋アクチン (α -SMA) の検出を行った。

(3) 猫の慢性腎臓病における糸球体疾患の関与および TGF- β の発現

鹿児島大学で病理剖検された猫 41 頭の腎臓組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを実験に使用した。このうち、カルテの記録および病理組織学的所見から安定状態の慢性腎臓病と判断された 12 頭の猫を選抜した。3 μm のパラフィン切片を作製し、ポリマー法による免疫染色で TGF- β 1 の検出を行った。抗 TGF- β 1 の特異性はウェスタンブロットにより確認した。

(4) 犬の腎異形成における COX-2、レニンおよび nNOS の発現

臨床的に若年性腎症と診断され、病理組織学的解析から腎異形成と診断された犬 3 頭のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを実験に使用した。対照群として、健全な成犬 3 頭および腎臓に病変を認めない幼若犬 3 頭から得たホルマリン固定パラフィン包埋ブロックも使用した。3 μm のパラフィン切片を作製し、ポリマー法により COX-2、レニンおよび nNOS に対する免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 糸球体疾患の症例収集と病態解析

研究期間中に腎生検が実施されたのは犬 9 頭であった。すべての症例で光学顕微鏡、電子顕微鏡および蛍光抗体法による解析が行われ、7 症例は非免疫複合体性糸球体腎炎、2 症例は免疫複合体性糸球体腎炎と診断された。非免疫複合体性糸球体腎炎の 7 症例は、その病理組織学的特徴から、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS; focal segmental glomerulosclerosis) もしくはそれが進行した全節性糸球体硬化症と診断された (図 1)。FSGS は、以前は犬や猫

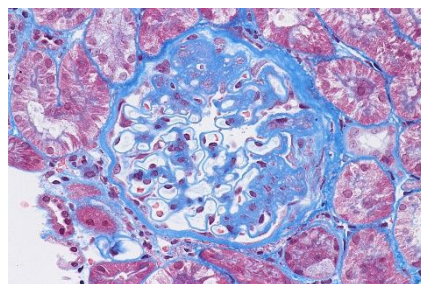


図 1 . FSGS と診断された犬の腎臓の光学顕微鏡写真 . マッソン・トリクローム染色

ではまれな糸球体疾患とされていた病型である。近年、腎生検による詳細な病理解析が行われるようになり、海外では犬の非免疫複合体性糸球体腎炎の多くが FSGS であることが報告されている (Aresu et al, 2017; Lorbach et al, 2020)。本研究では、国内においても犬の非免疫複合体性糸球体腎炎では FSGS の病態が主体であることが明らかになった。一方、免疫複合体性糸球体腎炎は 2 例と少なかった。海外の報告では、犬の糸球体疾患は非免疫複合体性糸球体腎炎と免疫複合体性糸球体腎炎の発生率が同程度であることが示されている (Aresu et al, 2017)。犬の免疫複合体性糸球体腎炎は感染性疾患、炎症性疾患、免疫介在性疾患など様々な要因から続発することが多い。特に、エールリヒア症は免疫複合体性糸球体腎炎の主要な原因疾患であるが日本国内には存在しない感染症であり、このような基礎疾患の背景が免疫複合体性糸球体腎炎の発生の低さに影響していると考えられる。2 例のうち、1 例は膜性糸球体腎炎であり、海外で犬の免疫複合体性糸球体腎炎で最も多いとされている病型と一致した (Aresu et al, 2017)。一方、残

りの 1 例はループス腎炎様の病型を示した。ループス腎炎は全身性エリテマトーデスに特徴的な糸球体疾患の病型である。犬では、教科書的には知られているものの、実際には過去に報告のない糸球体疾患の病型であり、学術的に貴重な症例であった。

猫では、研究期間を通して腎生検の適応となる症例は得られなかった。しかしながら、死後剖検において得られた 9 症例の腎臓組織を解析したところ、5 症例には糸球体疾患が認められ、すべてアミロイドーシスであった。この 5 症例はすべて血縁のある同一家系の猫であり、遺伝性的アミロイドーシスの可能性が示唆された。一般的に、猫の腎臓へのアミロイド沈着は尿管間質に起こる。一方、この家系猫群では糸球体へのアミロイド沈着が顕著であった。この症例群は学術的に貴重であり、今後も解析を継続していく必要がある。

(2) 糸球体疾患における上皮間葉転換の発現および筋線維芽細胞の出現

糸球体疾患の犬 27 例（免疫複合体性糸球体腎炎 14 例、非免疫複合体性糸球体腎炎 13 例）において解析を行った。正常な犬の腎臓では、上皮系のマーカーである AE1/AE3、CK18 および E-カドヘリンは遠位ネフロン（遠位尿管、ヘンレループ、集合管）に観察された。糸球体疾患 27 例でもすべての症例で同様の所見であった。これらのマーカーは近位尿管上皮には発現しておらず、シグナルの認められない小型の尿管が萎縮した近位尿管であるのか、上皮系の特性を失った遠位ネフロンであるのかを判別することは困難であった。一方、間葉系マーカーであるビメンチンを用いた解析では、上皮間葉転換の特徴である尿管上皮（主に遠位ネフロン）でのビメンチン発現が認められた（図 2）。このような尿管上皮でのビメンチン発現は、27 例中 20 例に認められた。糸球体疾患の型（免疫複合体性糸球体腎炎と非免疫複合体性糸球体腎炎）による違いは認められなかった。筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA 陽性シグナルは、全 27 例に認められた。そのうち、19 例で筋線維芽細胞と思われる陽性間質紡錘形細胞が観察された（図 3）。このような筋線維芽細胞の発現についても、糸球体疾患の型による違いは認められなかった。 α -SMA とビメンチンの所見を比較すると、多くの症例で上皮間葉転換の発現と筋線維芽細胞の出現が同時に認められた。一方、筋線維芽細胞が発現していない 8 例中 3 例にも上皮間葉転換が認められ、上皮間葉転換を起こしていない 7 例中 6 例にも筋線維芽細胞の発現が認められた。以上の結果から、犬の糸球体疾患では、その病型にかかわらず上皮間葉転換の発現および筋線維芽細胞の出現を認めることが明らかになり、筋線維芽細胞が出現するメカニズムとして上皮間葉転換が起こることが犬の糸球体疾患でも証明された。一方、上皮間葉転換以外のメカニズムでも筋線維芽細胞が出現することも示唆された。

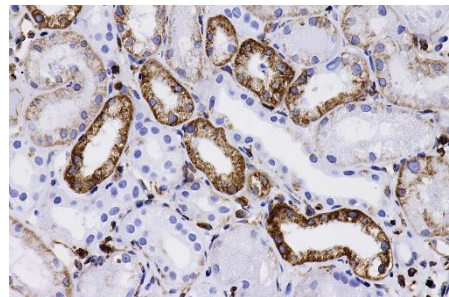


図 2. ビメンチンの検出。免疫複合体性糸球体腎炎の犬の腎臓。遠位尿管上皮に間葉系マーカーであるビメンチンの発現が認められる。

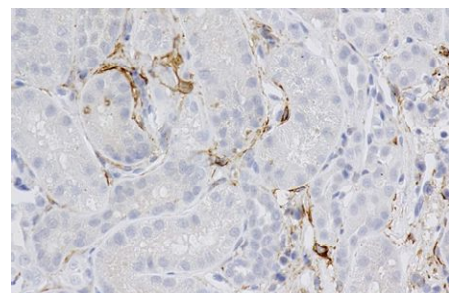


図 3. α -SMA の検出。免疫複合体性糸球体腎炎の犬の腎臓。尿管周囲の間質に陽性シグナルを示す紡錘細胞が観察される。

(3) 猫の慢性腎臓病における糸球体疾患の関与および TGF- β 1 の発現

12 頭の慢性腎臓病の猫の腎臓を解析したところ、明らかな免疫複合体性糸球体腎炎を示す症例は認められなかった。また、上述した犬の非免疫複合体性糸球体疾患のような典型的な FSGS の病型を示す症例も認められなかった。一方、巣状分節性とは診断されないが、糸球体の硬化症はすべての症例で観察された。猫の慢性腎臓病の特徴である尿管間質障害はすべての症例で

認められた。TGF- β 1 の免疫組織化学的解析では、すべての症例で遠位ネフロン（遠位尿細管および集管）の細胞頂部および管腔表面で観察された。統計学的な解析では、遠位ネフロンの管腔表面の TGF- β 1 陽性スコアが血漿クレアチニン値と糸球体硬化症スコアとの間に有意な正の相関が示した。また、陽性シグナルは近位尿細管上皮にも観察され、その定量的スコアは血漿クレアチニン値の間に有意な負の相関関係を示した。陽性シグナルは、ボーマン嚢壁、糸球体メサンギウム細胞、血小板、血管平滑筋および間質浸潤細胞にも検出され、血小板の陽性スコアは血漿クレアチニン値の間に有意な負の相関関係を示した。すべての TGF- β 1 陽性スコアは間質の線維化スコアとは有意な相関関係を示さなかった。

以上の結果から、猫の慢性腎臓病では糸球体疾患は顕著ではないものの、糸球体硬化症が多くの症例で認められた。この糸球体硬化症の進行と遠位ネフロンにおける TGF- β 1 の発現の関係性は不明である。一方、尿細管間質の線維化には腎臓組織における TGF- β 1 の発現には関連性を認めなかったものの、近位尿細管における TGF- β 1 の発現は慢性腎臓病の初期段階で尿細管の損傷に関与する可能性がある。すでに、猫の慢性腎臓病で上皮間葉転換が発現し、筋線維芽細胞が出現することは我々が報告しており（Yabuki et al, 2010）、今回の結果は、近位尿細管における TGF- β 1 の発現がそのトリガーになる可能性を示している。

（4）犬の腎異形成における COX-2、レニンおよび nNOS の発現

糸球体の発生異常の一つとして、犬の腎異形成について解析を行った。COX-2 は、成犬、若齢犬ともに健常腎では緻密斑に陽性反応が観察された。異形成腎では陽性反応は、緻密斑のみならず、腎臓組織に陽性シグナルはほとんど観察されなかった。レニンは、成犬の健常腎では糸球体傍細胞に陽性反応が観察された。若齢犬の健常腎では、糸球体傍細胞だけでなく尿細管上皮にも陽性反応が観察された。異形成腎のレニンの発現部位は若齢犬の健常腎と同様であった。nNOS は、健常腎では、成犬、若齢犬ともに緻密斑に陽性反応が観察された。異形成腎では、緻密斑における陽性反応は明らかに減弱していたが、最も高度な異形成腎では広範な尿細管上皮で陽性反応が観察された。以上の結果から、若齢犬の異形成腎における COX-2 の発現低下は、レニン・アンジオテンシン系に直接的な影響を与えるものではないことが明らかにされた。一方、nNOS の発現低下は、糸球体ろ過量の調整に重要な尿細管糸球体フィードバック機構の減弱に関与する可能性がある。犬の腎臓の糸球体の発生異常により起こる腎機能不全のメカニズムは不明であり、NOS の発現低下がそのメカニズムに関連している可能性がある。

引用文献

- Aresu L, Martini V, Benali SL, Brovida C, Cianciolo RE, Dalla Riva R, Trez D, Van Der Lugt JJ, Van Dongen A, Zini E. European Veterinary Renal Pathology Service: A Survey Over a 7-Year Period (2008-2015). *J Vet Intern Med.* 2017 Sep;31(5):1459-1468. doi: 10.1111/jvim.14796. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28763127; PMCID: PMC5598877.
- Lorbach SK, Hokamp JA, Quimby JM, Cianciolo RE. Clinicopathologic characteristics, pathology, and prognosis of 77 dogs with focal segmental glomerulosclerosis. *J Vet Intern Med.* 2020 Sep;34(5):1948-1956. doi: 10.1111/jvim.15837. Epub 2020 Jul 7. PMID: 33463760; PMCID: PMC7517845.
- Yabuki A, Mitani S, Fujiki M, Misumi K, Endo Y, Miyoshi N, Yamato O. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: induction of myofibroblasts. *Res Vet Sci.* 2010 Apr;88(2):294-9. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.09.003. Epub 2009 Oct 12. PMID: 19822338.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yabuki A, Furusawa Y, Miyoshi N, Taniguchi K, Yamato O.	4. 巻 83-5
2. 論文標題 Expression of neuronal nitric oxide synthase and renin in dysplastic kidneys of young dogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 837-840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0074.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uehara Y, Furusawa Y, Islam MS, Yamato O, Hatai H, Ichii O, Yabuki A.	4. 巻 9-3
2. 論文標題 Immunohistochemical expression of TGF- 1 in kidneys of cats with chronic Kidney disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vet Sci	6. 最初と最後の頁 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vetsci9030114.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢吹 映、井上理人、田邊美加、大和 修
2. 発表標題 ループス腎炎様の糸球体疾患と診断した犬の1例
3. 学会等名 2019年度獣医学術九州地区学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原由季、矢吹 映、中村麗菜、小野一大原優美子、大和 修
2. 発表標題 慢性腎臓病のネコの腎臓におけるTGF- の発現
3. 学会等名 第12回日本獣医腎泌尿器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢吹 映、山崎寛文、時村元気、大和 修
2. 発表標題 メサングウム融解を示した巣状分節性糸球体硬化症の犬の一例
3. 学会等名 第13回日本獣医腎泌尿器学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------