

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12838

研究課題名（和文）閉塞性腎障害における腎保護性蛋白であるL-FABPの前臨床研究

研究課題名（英文）Preliminary study of L-FABP in obstructive nephropathy.

研究代表者

片山 泰章（Katayama, Masaaki）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：70436054

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：閉塞性腎障害の進行経過や予後評価に関して既存の検査法の感度が十分とは言えず、コンセンサスの得られた治療指針が明確化できていない。本研究では近位尿細管の腎障害評価マーカーであるL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)と閉塞性腎障害の進行と予後の関連性を生化学的かつ病理組織学的に明らかにすることを目的とした。ネコにおいてL-FABPは閉塞解除後の腎機能の予後を予測できることが示唆された。また、ラットにおいて腎盂尿中L-FABPは閉塞腎の組織学的変化に関連していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における最も独創的な点は、伴侶動物であるネコのCKDモデルを当該分野の研究に応用することである。本研究の目的は、ヒトの前臨床モデルとして、ネコ及びラットの閉塞性腎障害モデルを用いて病態進行とL-FABPとの関連性を生化学的および病理組織学的に明らかにし、L-FABPを用いた新たな治療戦略を提案することである。本研究から得られるデータは、ヒトの臨床研究では入手困難なL-FABPの必要不可欠な基礎データにもなり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The sensitivity of existing test methods is insufficient for the progress and prognosis evaluation of obstructive nephropathy, and the consensus treatment guidelines have not been clarified. The purpose of this study was to clarify the biochemical and histopathological relationship between the liver type fatty acid binding protein (L-FABP) and the progression/prognosis of obstructive nephropathy. In this study, it was suggested that L-FABP could predict the prognosis of renal function after relieving obstruction in cats. In addition, it was suggested that L-FABP in renal pelvic urine could be associated with histological changes in the obstructed kidney in rats.

研究分野：獣医外科学

キーワード：L-FABP 腎臓 水腎症

1. 研究開始当初の背景

水腎症では、尿管閉塞の結果として、停滞した尿の内圧で腎盂や腎杯が拡張し腎盂内圧が上昇するため、ネフロンへの負荷がかかり糸球体濾過率の低下が引き起こされる。この状態が長引けば閉塞性腎障害が惹起され著しい腎機能の低下あるいは不可逆的な腎障害への進行へとつながる。閉塞性腎症では腎血流量減少による虚血による腎尿細管内皮細胞への一次的あるいは二次的なダメージが病態進行に重要と考えられている。尿管閉塞により腎尿細管間質線維化が生じ、腎機能が徐々に低下していくプロセスについては既に多くの事実がマウスモデルを用いて実験的に解明されている。閉塞の程度が重度で期間が長いほど腎虚血が重度となり腎機能障害が著しいとされ、一方で閉塞の解除によって腎血流量が回復し腎機能の改善が期待できる。現在用いられている画像検査、一般血液・尿検査は閉塞性腎障害の進行経過や予後の評価に関して感受性が十分とは言えず、進行性の閉塞性腎障害の程度や残存腎機能を鋭敏に反映するような検査法あるいはバイオマーカーの出現が期待される。

近年ネコの慢性腎臓病の要因の一つとしてシュウ酸カルシウム結石による尿管閉塞が臨床的問題としてフォーカスされている。これまでのところ、水腎症により腎組織にどの程度ストレスがかかっているかを評価する方法が確立されていない。そのためネコにおける水腎症の治療としては、輸液療法による尿管結石の膀胱への排泄を目的とした保存的治療、あるいは外科的処置による機械的な閉塞解除といった方法しか行われておらず、重度の水腎症では腎摘出になるケースも存在する。現時点でネコでは閉塞解除治療が最善策と認識されているが、尿管閉塞や閉塞解除治療等が腎組織に与える影響やそれらをモニターする方法について明らかにされていないため、臨床現場では積極的な治療介入が後手に回り罹患動物の病状を悪化させることが多い。

L-FABP は腎臓の近位尿細管上皮細胞の細胞質に局在する分子量 14~15kDa の脂肪酸結合蛋白である。尿細管周囲に虚血・再灌流傷害が生じた場合、L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) は細胞毒性の強い過酸化脂質と結合し細胞外 (尿細管腔) へ排出することで腎保護作用を示す。これらの知見を踏まえ、腎血流量減少による虚血を伴う水腎症における虚血ストレスバイオマーカーとして L-FABP が利用できると考えた。

2. 研究の目的

水腎症では輸液等による内科治療あるいは外科的閉塞解除に踏み切るべきかかどうかが躊躇することがある。判断を誤ると罹患腎では不可逆的な腎組織障害が進行し慢性腎臓病へと移行する。本研究の目的は、ヒトの前臨床モデルとして、実験小動物のラット及びネコの水腎症モデルを用いて閉塞性腎障害の病態進行と L-FABP との関連性を生化学的および病理組織学的に明らかにし、L-FABP を用いた新たな治療戦略を提案することである。L-FABP は尿細管における虚血ストレスの増加に伴い尿細管が障害される前に速やかに尿中へ排泄される腎保護性蛋白であり、閉塞性腎傷害評価マーカーになりうる。採尿のみで検査は可能であり非侵襲的かつ安全といえる。本研究から得られるデータは、ヒトの臨床研究では入手困難な L-FABP の必要不可欠な基礎データにもなり得ると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ネコの慢性腎臓病 (CKD) モデルの作製

健常ネコ 2 頭 (避妊雌、体重 3.2、4.4kg) を用いた。一般身体検査、完全血球計算、血清生化

学検査、尿検査において異常は認められなかった。供試動物は手術 12 時間前から絶食とした。左尿管結紮により左腎に閉塞性腎症を惹起し、その後左尿管再開通及び同時に右腎摘出を行うことにより左腎の線維化誘導 (CKD 所見) を試みた。尿管閉塞期間は 4 週間とし、観察期間は 560 日とした。

(2) ラット片側尿管閉塞 (UUO) モデルの作製

ラットは Sham 群 (n = 9)、UUO 群 (n = 21)、UUO + ベラプロスト (BPS) 群 (n = 15) に群分けした。また、UUO 手術当日を Day0 とし、各群内で結紮期間を Day3、5 および Day14 に群分けした。

UUO 手術は、イソフルラン麻酔下で腹部正中線切開を行い、左尿管を腎臓側に 2 系、膀胱側に 1 系となるように 4-0 絹糸で結紮し、その間を切断した。尿管は逆行性感染を防ぎ、かつ永久的な閉塞を確実にするために切断した。その後、腹壁および皮膚を 3-0 ナイロン糸で単純連続縫合した。Sham 群は尿管を結紮せず開腹のみ実施した。各群それぞれ Day3、5 および Day14 にイソフルラン麻酔下で、後大静脈および腹大動脈を切断して放血致死させ、剖検を行った。

(3) 尿中 L-FABP の測定

ラット実験において Sham 群の採尿は、代謝ケージで剖検前の 12 時間に渡って実施した。UUO 群からは左腎盂尿を剖検時に採取した。

得られた尿は 3,000 rpm、5 分間遠心分離し尿上清を測定に用いた。尿中 L-FABP 濃度は、Feline あるいは Rat L-FABP ELISA Kit (シミックホールディングス株式会社、東京) を用いて測定した。尿中 L-FABP 濃度は、尿量による変動を避けるため、尿中クレアチニン濃度で補正した。尿中クレアチニン濃度は Fol in 法により測定した。

(4) 病理組織学的検査

4%パラホルムアルデヒドで腎臓を固定後、組織を流水で 30 分程度洗浄し、マイクロトームを使用して厚さ約 5 mm に切り出した。切り出した組織は 75% から 100% アルコールに段階的に浸漬させた後、キシレンに浸漬させた。その後、パラフィンに浸漬させた。以上の処理を行った後にパラフィンにて包埋し、厚さ 3 μ m に薄切した。この切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソン・トリクローム染色後、光学顕微鏡を用いて腎組織障害を評価、撮影した。病理組織学的検査は作成した組織標本全てについて実施した。

4. 研究成果

(1) ネコにおける尿管閉塞解除が腎組織病変に及ぼす影響および L-FABP の関連性の解明

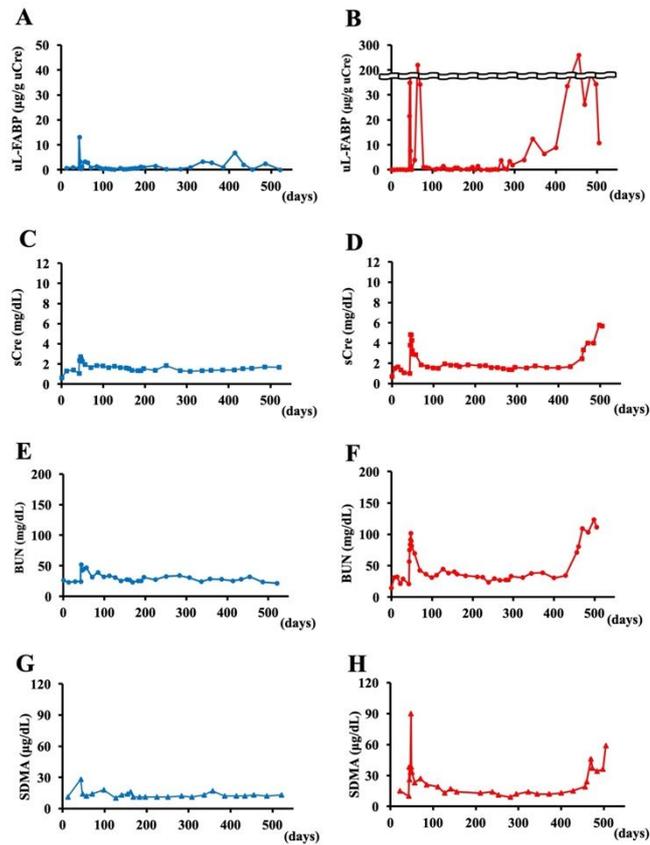
図 1 に両モデルネコにおける尿中 L-FABP と腎機能評価マーカーの推移を示す。ネコ の尿中 L-FABP 濃度は 43 日の右腎摘出後にピークに達し (13 μ g/g uCre) その後 ELISA の検出限界以下に低下した。ネコ では尿中 L-FABP 濃度は右腎摘出後に上昇し、64 日目にピークに達した (208 μ g/g uCre) その後ネコ と同様に徐々に低下した。最終的にネコ の尿中 L-FABP 濃度は <6 μ g/g uCre で安定した。対照的に、ネコ では 323 日後から徐々に上昇し 456 日目にピークに達した (263 μ g/g uCre) その後 505 日目には 10.9 μ g/g uCre まで低下した。

ネコ では従来の腎機能評価マーカーである血清クレアチニン、BUN、SDMA は Day46 にピークに達し (sCre, 2.8mg/dL; BUN, 51.6mg/dL; SDMA, 28 μ g/dL) その後正常範囲内に安定した (正常範囲: sCre, <1.6mg/dL; BUN, <36mg/dL; SDMA, <14 μ g/dL) 血清リン (sP) 血清カルシウム (sCa) 尿蛋白クレアチニン比 (UPC) は研究期間を通して正常範囲内で推移した (正常範囲:

sP, 2.2-6.5mg/dL; sCa, 8.0-11.1mg/dL; UPC, <0.4), 尿比重(USG)は研究期間を通して1.015-1.066の間で推移した。

ネコ では sCre、BUN、SDMA、sP は右腎摘出 2 日後に上昇し、456 日後までに安定した。その後、再度上昇し、505 日後にピークに達した (sCre, 5.7mg/dL; BUN, 111.2mg/dL; SDMA, 59 μg/dL; sP, 12.5mg/dL)。sCa は研究期間を通して正常範囲内であった。UPC は 428 日後(0.5)及び 456 日後(0.55)を除いて正常範囲内であった。USG は右腎摘出直後は等張尿であり、その後 1.014-1.034 の間で推移した。456 日後以降は持続的な等張尿を呈した。最終的に国際獣医腎臓病研究グループ(IRIS)の CKD ステージ分類ではネコ はステージ I、ネコ はステージ IV であった。

図 1



以上より、尿中 L-FABP は既存の腎機能評価マーカーよりも早期に上昇し、CKD の進行予測マーカーなる可能性が示唆された。また、右腎摘出後に尿中 L-FABP はネコ よりもネコ において重度の上昇を呈した。このことから尿中 L-FABP は CKD の進行予測のみならず予後予測にも有効である可能性が示唆された。

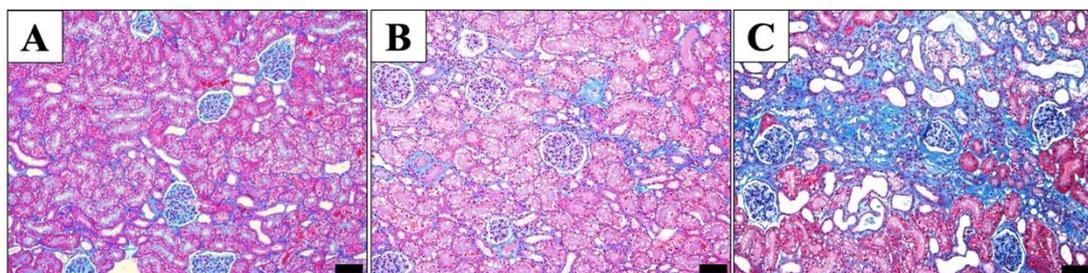
最終的に国際獣医腎臓病研究グループ(IRIS)の CKD ステージ分類ではネコ はステージ I、ネコ はステージ IV であった。

以上より、尿中 L-FABP は既存の腎機能評価マーカーよりも早期に上昇し、CKD の進行予測マーカーなる可能性が示唆された。また、右腎摘出後に尿中 L-FABP はネコ よりもネコ において重度の上昇を呈した。このことから尿中 L-FABP は CKD の進行予測のみならず予後予測にも有効である可能性が示唆された。

図 2 には CKD モデルの HE 及びマッソン・トリクローム染色の代表的な組織画像を示す。

図 2-A はネコ の正常腎組織であり、明らかな組織学的変化は認められなかった。剖検時の画像では腎間質害と尿細管新生はネコ よりもネコ の方が重度であった。最終的な組織学的評価はネコ が軽度(図 2-B)、ネコ が中等度(図 2-C)であった。これらより、尿中 L-FABP の持続的な上昇は腎組織障害の程度を反映しているのかもしれない。

図 2



(2) ラット閉塞性腎障害(UUO)モデルにおけるベラプロスト(BPS)治療中の腎障害指標としての腎盂尿中 L-FABP の有効性

UUO 群の閉塞左腎の全ての期間において、HE 染色で尿細管拡張、遠位尿細管における蛋白

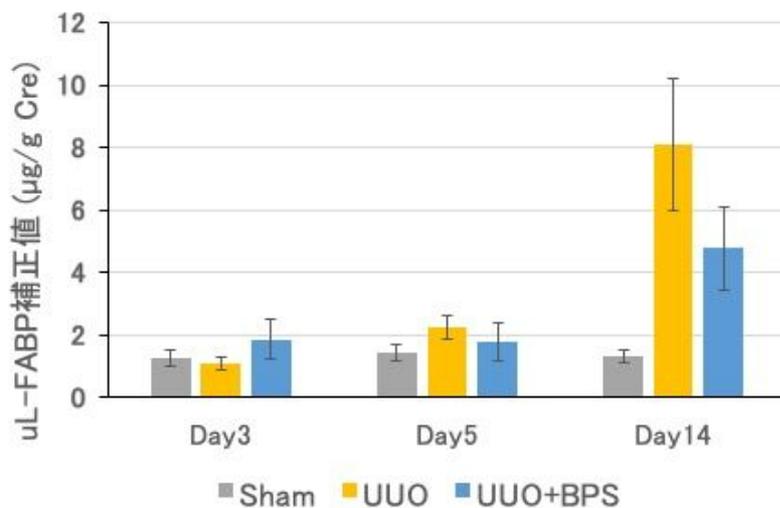
円柱の出現、炎症細胞浸潤、近位尿細管細胞の微細空胞変性および尿細管間質の線維化が観察された。UUO 群の Day5 では、Day3 と比較して、尿細管拡張がより顕著に観察された。また、UUO 群の Day14 では、Day5 と比較して、炎症性細胞の浸潤が多くみられ、尿細管間質の水腫も観察された。UUO 群の全ての期間において、マッソン・トリクローム染色で尿細管間質の線維化が観察された。また、UUO 群の Day3 および 5 と比較して、Day14 で尿細管間質の線維化がより広い範囲で観察された。UUO+BPS 群においても閉塞左腎の全ての期間において、尿細管拡張、遠位尿細管における蛋白円柱の出現、炎症細胞浸潤、近位尿細管細胞の微細空胞変性および尿細管間質の線維化が観察されたが、UUO 軍と比較すると軽度であった。全ての期間において、Sham 群の両腎、および UUO 群の右腎に顕著な組織学的変化は観察されなかった。

尿中 L-FABP の測定

には腎盂尿を用いた。

Sham 群では腎盂尿採取ができないため、代謝ケージによる蓄積尿を用いた。図 3 に示すように、3 群ともに Day3、5 ではほとんど差が認められなかったが、Day14 では UUO+BPS 群の腎盂尿中 L-FABP は UUO 群と比較して有意に低下した。Sham 群の尿中 L-FABP は観察期間中、大きな変化は認めなかった。

図 3



以上より尿管結紮後 5 日目以降に腎における酸化ストレスが増加してくると考えられた。また、腎盂尿中 L-FABP は UUO における腎組織障害の程度を示しているのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe A, Ohata K, Oikawa T, Sugaya T, Miyazaki M, Satoh H, Katayama M	4. 巻 85
2. 論文標題 Preliminary study of urinary excretion of liver-type fatty acid-binding protein in a cat model of chronic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 156-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部 晶子、大高 理子、大畑 敬一、及川 剛、片山 理恵子、宮崎 珠子、佐藤 洋、菅谷 健、宮崎 雅雄、片山 泰章
2. 発表標題 ネコの慢性腎臓病モデルにおける尿中L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)の変動
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	佐藤 洋 (Sato Hiroshi) (00726606)	岩手大学・農学部・教授 (11201)	
研究分担者	宮崎 雅雄 (Miyazaki Masao) (20392144)	岩手大学・農学部・教授 (11201)	

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
---------	---------