

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成13年度博士課程入学

氏名 稲永 敏明

指導教官 吉川 泰弘

論文題目

Syrian hamster of APA strain, an animal model of diabetic nephropathy, and its initiation and progression mechanisms

(糖尿病誘発 APA ハムスターを用いた糖尿病性腎症発症・進展メカニズムの解析)

(要旨)

様々な原因で慢性腎不全になり、生存のために血液透析導入を余儀なくされる患者が年々増加している。慢性腎不全に至る原因疾患で現在最大のものが糖尿病である。糖尿病はそのものが患者の生存を脅かすことはあまりないが、血管を慢性的に傷害することから様々な合併症を起こす。糖尿病患者は近年増加の一途であり、それに合わせて合併症の一つである糖尿病性腎症（以下、腎症）の患者数も増加しており、2003年ではこの年に新規透析導入した患者約3万人のうち40%を占めている。合併症の多くは腎症をはじめとして慢性かつ進行性に起こり、やがてその臓器の不可逆的な機能不全を引き起こす。特に腎臓は生体の維持に重要な働きをしていることもあり、その機能不全(腎不全)は尿毒症による死に直結する。現在、腎症の治療は血糖コントロールに降圧剤の併用が中心であるが、このコントロールは容易ではない。このために「成因に基づく腎症治療法」開発のための研究がさまざまなモデル動物を用いて、現在も多く行われている。そのような治療法を開発するためには、ヒト腎症に近い病態を示すような動物モデルでの実験が不可

欠である。

APA系シリアンハムスター（以下、APAハムスター）は、他の1型糖尿病モデル動物に比べて体重1kgあたり30-45mgという低用量のストレプトゾトシン（以下、SZ）の腹腔内1回投与により、持続する高血糖状態を作出することができる。さらにこのモデルでは高血糖に加えて高コレステロール血症および高トリグリセリド血症という高脂血症状態を呈する。またヒトの糖尿病患者にとって致命的な大血管症、腎症という合併症に類似した変化を、それも高血糖誘発後4週以降という比較的早期より示すことが明らかになっており、これらの糖尿病合併症の新たなモデル動物として種々の解析が行われてきた。本研究では糖尿病性腎症モデルAPAハムスターを腎機能に注目して解析し、ヒト腎症のモデル動物としての特性を明らかにし（第1章）、本モデルを用いて、腎症の発症と進展に関連する因子の検索を行った（第2章）。

（第1章）

これまでに行われた糖尿病誘発APAハムスターモデルにおける腎症モデルとしての検索は病理組織学的なものが主であった。SZ投与後4週以降糸球体への細胞外基質（ECM）の沈着およびメサンギウム領域の拡大を特徴とする慢性の硬化性変化が見られた。また12週以降糸球体内には脂肪染色陽性の泡沫細胞の沈着が見られた。その他、腎症だけでなくさまざまな糖尿病合併症への関与が明らかになっている終末糖化物質（AGE）の糸球体基底膜（GBM）への沈着が見られた。またRT-PCR法や免疫染色により、硬化にかかわる炎症性サイトカインmRNAの増加および糸球体メサンギウム領域での染色性の増加が見られた。これらのことは糖尿病、もしくは持続する高血糖状態がAGE形成～沈着などを介して炎症性サイトカインの増加を促し、糸球体に硬化性変化を起こしているという、ヒトなどで考えられている腎症の病変形成メカニズムと類似の変化が起こっていることを示唆していると考えられた。

これらのことを踏まえ、本研究ではさらにこのモデルの特性を明らかにするため、8週齢時にSZを投与した糖尿病誘発APAハムスター（APA-D）、非誘発APAハムスター（APA-N）および系統間対照群としてage-matchな無処置ゴールデンハムスター（GOL）を置き、それらの3群について、腎症の表現型である腎機能のより詳細な検索を行い、並行して腎病変の変化を合わせて検討した。その結果、APA-NはGOLと比較して尿中総タンパク量が有意に高値を示した。両者

で糸球体の変化はほとんど見られなかったが、尿細管間質領域のフィブロネクチンの染色性および尿細管のクサビ状萎縮病変の出現頻度が APA-N で高いという差が見られ、これがタンパク排泄の差として現れている可能性が考えられた。一方、APA-D はさらに多量の尿中タンパクを排泄し、血液中の腎機能マーカー（尿素窒素値およびクレアチニン値）の有意な変化も見られ、実際の腎機能の低下が明らかになった。APA-D はクレアチニン値の変化から、SZ 投与後 4 週（12 週齢）前後では過濾過状態になっている可能性が示され、ヒト腎症における腎機能の低下に類似した変化が起こっていることが示唆された。

尿タンパクについてはさらに詳細な解析を行った。尿タンパクは血液タンパクがベースとなり、これが腎糸球体で濾過された後、さらに尿細管による再吸収や分泌の結果その組成が出来上がって出てくるものであるが、腎機能の変化はこの組成に変化をもたらすことが知られている。そこで尿タンパクの一次元および二次元の電気泳動や、尿中アルブミンのウエスタンブロットを行った。その結果、APA-D では高分子量性タンパク尿を示していること、ヒト腎症で報告があるものと同様な vitamin D-binding protein などの排泄の増加が見られることが明らかになった。このことはヒト腎症と同じ現象が腎臓で起こっていることを示していると考えられる。また糖尿病誘発群ではフラグメント化アルブミンが高分子量よりもシフトしていることより、ヒト腎症および他の腎症モデルで報告があったように、本モデルでもアルブミンの近位尿細管における再吸収機構の低下およびフラグメント化の低下が起こっていることを示していると考えられた。以上のことから、本モデルはヒト腎症のいくつかの重要な表現型を供えるモデル動物であると考えられた。

（第 2 章）

第 2 章では、このモデルを用いて腎症の発症および進展に関わる因子の検索を行った。本研究では、さまざまな利点を持つと考えられ、多くの研究に用いられはじめているプロテオーム解析の技術を導入し、糖尿病誘発群と非誘発群の腎臓より抽出したタンパクについて、プレリミナリーなプロテオーム解析を行ったところ、いくつかの報告のない因子が候補としてあがった。その中には細胞骨格タンパクや転写因子などが含まれていたが、それらの中で小胞体（ER）シャペロンタンパクである glucose-regulated protein 78kD（GRP78）および calreticulin に注目し、これらの抗体を用いて腎抽出タンパクのウエスタンブロットを行った。その結果、SZ 投与後 4 週、

24 週において高血糖 (HG) 群で有意に高い発現を認めた。また同じ抗体を用いた腎臓の組織切片の免疫染色では、いずれのタンパクも HG 群の遠位尿細管上皮、ボーマン囊上皮などで染色像が見られ、この領域でこれらの ER シャペロンタンパクの発現が上昇した状態、つまり ER ストレスがかかっている状態であることが示唆される結果となった。これまで糖尿病性腎症において ER ストレスが上昇しているという報告はない。しかし近年 ER ストレスがアルツハイマー病やパーキンソン病など慢性神経変性疾患をはじめとしてさまざまな病態に関与していることが報告されており、腎症においても何らかの病態への関与がある可能性も考えられる。

そこで HG 群に対して SZ 投与後 2 週から 4 週の間インスリン治療を行い (HGins 群)、同期間生理食塩水のみ投与した群 (HGsal 群) との比較を行った。2 週間のインスリン投与により血糖値の有意な低下が見られたことから、糖尿病状態が改善されたと考え、剖検を行い腎臓よりタンパクを抽出した。ウェスタンブロットにより GRP78 を半定量したところ、HGins 群においてより強い発現を認めた。また HGins 群では有意に腎肥大が抑制されていた。これらのことはインスリン治療が GRP78 の発現を増大させ、腎肥大抑制に働いたのではないかと考えられた。さらに遠位尿細管上皮で起こっていることを明らかにするため、腎遠位尿細管上皮の特徴を多く残している MDCK 細胞を高糖濃度負荷、糖化アルブミン負荷などいくつかの条件下で 48 時間の培養を行った。その結果、もっとも GRP78 の発現を誘導したのは浸透圧調節作用のあるマンニトール負荷であり、その浸透圧は 340-390mOsmol/l 付近であった。腎症初期は高血糖の影響による浸透圧利尿が起こっており、その状態では遠位尿細管は普段よりやや高い浸透圧 (約 350mOsmol/l) にさらされている状態であるといえる。今回の結果から、SZ 投与後 4 週の時点においては遠位尿細管上皮がやや上昇した浸透圧にさらされており、この状態が ER ストレスを惹起している可能性が示唆された。慢性期 (SZ 投与後 2-4 週) にも ER ストレスが同様に遠位尿細管上皮で上昇していることが観察されており、この原因、および結果何が起こるのかを検索することが必要である。ER ストレスそのものも治療のターゲットとなりうると考えられるが、ER は広範囲に存在するものであり副作用が心配される。このため、より下流の因子を検索することで新たな腎症に対する治療法をもたらすようなエビデンスを得られる可能性が考えられる。