

称号及び氏名	博士（獣医学）三野 将城
学位授与の日付	平成19年3月31日
論文名	「幼若期ラット腎臓に関する研究：慢性腎不全モデルの作製と蛋白摂取量制限の効果」
論文審査委員	主査 岡田 利也 副査 小川 和重 副査 小谷 猛夫 副査 加藤 啓子

論文要旨

緒言

近年、高齢化や生活習慣の変化による糖尿病を原疾患とした腎不全の増加が問題となっている。腎不全モデル動物として尿管結紮モデルや 5/6 腎臓摘出モデルが使用されることが多い。これらは血中尿素窒素(BUN)の上昇、マクロファージの浸潤および間質の線維化等が認められ、慢性腎不全と同様の症状を示すことが報告されている。また、蛋白摂取量を制限することにより、腎不全の進行が緩和されることから、腎不全患者には低蛋白食の処方を与えられることが多い。蛋白摂取量の制限は腎不全の進行に関与していると報告されている renin、TGF- β 等の成長因子ならびに一酸化窒素(NO)の発現の変化に影響を及ぼし、腎不全進行の抑制に関与していると考えられている。しかし、成長因子やNOは正常な腎臓の発生および発達においても重要な役割を果たしている因子でもある。このように、まだ腎臓が発達段階にある幼若期の動物が腎不全を患った場合、腎臓が成熟した動物の腎不全とは異なった変化が生じている可能性がある。そのため、幼若期の腎不全における成長因子やNOの発現の変化および蛋白摂取量制限が幼若期の腎臓の成長や腎不全の進行に与える影響を明らかにすることは重要な意味を持つ。一方、子供の糖尿病の発症数は増加の傾向を示しており、若くして腎不全に陥る危険性が増してきている。しかし、幼若期の腎不全モデルは確立されておらず、蛋白摂取量制限による効果も明らかではない。そこで、本研究では幼若期のラットを用い、5/6 腎臓摘出モデルを作製し、残存腎臓の変化を観察し、蛋

白摂取量制限を行った場合の効果を検討した。

第1章 幼若期慢性腎不全モデルとしての5/6腎臓摘出幼若ラットの評価

3週齢のWistar系ラット（雄、30g～40g）を用い、まず右側腎臓を摘出した。さらに右側腎臓摘出より1週間後に左側腎臓の2/3を切除し、5/6腎臓摘出モデルとした。モデル作製完了時より正常蛋白飼料（蛋白含有率18%）を与えるNp群と低蛋白飼料（蛋白含有率12%）を与えるLp群に分けた。また、偽手術を行ったものにも同様にそれぞれの飼料を与えNp-s群、Lp-s群とした。モデル作製後、2、4、6および8週後に血液を採取した。モデル作製後4週および8週後に腎臓を採取し、検索した。

本章では5/6腎臓摘出幼若ラットの慢性腎不全モデルとしての有用性を評価するためにNp群、Np-s群間におけるBUN値、糸球体硬化の程度（糸球体硬化指数, GSI）および間質の線維化の割合（IFS）を比較した。さらに蛋白摂取量制限の効果を検証するためNp群、Lp群間におけるBUN値、renin mRNA発現量、マクロファージの浸潤およびTSIを比較した。

第1節 正常飼料給餌時の変化

Np群のBUN値は、時間経過とともに上昇する傾向を示し常にNp-s群より有意に高い値を示した。Np群のGSIおよびIFSは時間経過とともに有意な増加が認められNp-s群よりも常に高い値を示していた。

以上のことから、幼若期ラットに5/6腎臓摘出手術を施すとBUNの上昇、糸球体硬化および間質の繊維化の進行を示し、慢性腎不全の様子を示すことから幼若期における慢性腎不全モデルとして有用であると考えられた。

第2節 低蛋白飼料給餌による変化

モデル作製後8週間にわたり体重の変化を測定したがNp, Lp群間に有意な差は認められなかった。モデル作製後常にLp群のBUN値はNp群よりも有意に低かった。renin mRNAの発現量および間質へのマクロファージ浸潤はモデル作製4週および8週後においてLp群がNp群よりも有意に低かった。IFSはモデル作製4週後においてLp群はNp群よりも有意に低かった。

以上のことから、蛋白摂取量の制限は成長に影響を与えることなく腎不全の進行を和らげる効果があることが示された。

第2章 幼若期の腎不全モデルにおける腎小体の変化と蛋白摂取量制限の効果

成熟ラットの5/6腎臓摘出モデルに関して、腎小体における細胞増殖活性が上昇した後

アポトーシスが発現し、糸球体硬化に陥ることが報告されている。一方、endothelial NO synthase (eNOS)には糸球体の内皮細胞を酸化ストレスから保護する作用があると報告されている。本章では幼若期の腎不全モデルにおける腎小体の形態変化並びに細胞増殖活性、アポトーシスおよび eNOS の発現に対する蛋白摂取量制限の効果を調べた。

腎小体の断面積はモデル作製 4 週後で Lp 群が Np 群より有意に小さかった。Lp 群の GSI は Np 群に比べて常に有意に低かった。PCNA 陽性細胞の出現率は Lp、Np 両群において、時間経過とともに有意に減少したが、両群間で有意な差は認められなかった。TUNEL 陽性細胞は両群においてほとんど認められず、蛋白摂取量制限による変化も認められなかった。モデル作製 4 週後において Lp 群の eNOS の発現は Np 群よりも有意に高かった。

以上のことから、幼若期の 5/6 腎臓摘出による腎小体の障害は成熟ラットにおけるものより軽度であると考えられ、蛋白摂取量制限は糸球体硬化の進行を緩和すると考えられる。さらに、蛋白摂取量制限は eNOS の減少を抑制する効果があることがわかった。

第3章 幼若期の腎不全モデルにおける尿細管の変化と蛋白摂取量制限の効果

成熟ラットの 5/6 腎臓摘出モデルでは尿細管の拡張や尿細管上皮のアポトーシスが認められることが報告されている。一方、細胞増殖因子に関して EGF が細胞増殖作用と形態維持作用を有していることや TGF- β がアポトーシスや形質転換に関与していることが報告されている。また、慢性腎不全モデルにおいて TNF- α によって活性化されることで知られる転写因子 NF- κ B の活性の増加やプロモーター領域に NF- κ B 結合部位を持つ inducible NO synthase (iNOS) の増加が報告されている。本章では、尿細管における形態変化並びに EGF、TGF β 、iNOS ならびに TNF- α を活性化型に変換する ADAM17 の発現および NF- κ B および iNOS の活性を調べた。

第1節 尿細管の形態変化

PCNA 陽性細胞の出現率は時間経過とともに減少する傾向にあったが、蛋白摂取量制限による変化は認められなかった。TUNEL 陽性細胞は主に遠位尿細管に局在しており、モデル作製 4 週および 8 週後において Lp 群が Np 群より有意に少なかった。以上のことから、蛋白摂取量の制限は尿細管の成熟には影響を与えることはなくアポトーシスを抑制することで腎臓を保護する働きがあると考えられた。

第2節 EGF および TGF- β の発現

EGF は Lp、Np 両群において遠位尿細管に局在しており、時間経過とともに減少したが、その EGF の染色性は Lp 群の方が Np 群に比べて強かった。また、TGF- β は Lp、Np 両群において、遠位尿細管に局在し、その染色性は時間経過とともに増加する傾向が認められ、Lp 群では Np 群よりもモデル作製 4 週および 8 週後において弱い傾向が認められた。

Np 群において EGF が減少し、TGF- β が増加するにつれて遠位尿細管のアポトーシスが多くなっていることから、EGF は遠位尿細管の形態維持作用を示すが、TGF- β は遠位尿細管のアポトーシスを増加させると考えられる。さらに、蛋白摂取量の制限は EGF の減少と TGF- β の増加を抑え、遠位尿細管を保護する働きがあると考えられた。

第3節 NF- κ B 活性と ADAM17 および iNOS の発現

ADAM17 の発現量は時間経過とともに増加する傾向にあり、Lp 群では Np 群より常に有意に低い値を示した。NF- κ B の活性は時間経過とともに増加する傾向にあり、モデル作製後 4 週において Lp 群では Np 群に比べ低い活性を示した。iNOS は両群において、遠位尿細管に発現が認められ、時間経過とともに増加し、モデル作製後 4 週において Lp 群では Np 群より有意に少なかった。

iNOS は大量の NO を産生することで知られており、大量に産生された NO は $[O_2^-]$ と反応し $[ONOO^-]$ を生成することが報告されている。 $[ONOO^-]$ はチロシンのニトロ化や脂質過酸化反応を引き起こし、細胞障害やアポトーシスを誘導すると考えられている。このことから、ADAM17 の発現増加によって活性化した NF- κ B により iNOS の発現が増し、それに伴う NO の大量産生によって遠位尿細管におけるアポトーシスが引き起こされる可能性が示された。また、蛋白摂取量の制限は iNOS の発現を抑え、尿細管の障害を和らげていると考えられた。

総括

1. 幼若期における 5/6 腎臓摘出モデルは BUN の上昇、糸球体硬化および尿細管間質の線維化などの慢性腎不全様の変化を示した。
2. 12% の低蛋白飼料給餌による蛋白摂取量制限は成長に影響を与えることなく腎不全の進行を緩和する働きがあると考えられた。
3. 幼若期のラットにおける 5/6 腎臓摘出モデルでは、糸球体にアポトーシスがあまり認められないことがわかった。また、蛋白摂取量制限は eNOS の減少を抑える働きがあると考えられた。
4. 幼若期のラットにおける 5/6 腎臓摘出モデルにおいて EGF の減少および TGF- β の増加が遠位尿細管の障害に関与していると考えられ、蛋白摂取量の制限はこれらの変化を和らげ、腎不全の進行を緩和するものと考えられた。
5. 幼若期のラットにおける 5/6 腎臓摘出モデルにおいて ADAM17 の増加に伴う NF- κ B の活性の増加が認められ、それにより発現を増した iNOS による大量の NO 産生が遠位尿細管のアポトーシスの増加に関与している可能性が示された。また、この変化は蛋白摂取量制限により抑えられることがわかった。

審査結果の要旨

近年、高齢化や生活習慣の変化による糖尿病を原疾患とした腎不全の増加が問題となっている。しかし、慢性腎不全に対する決定的な治療法は存在せず、アンギオテンシン変換酵素阻害剤や低蛋白療法によって、腎不全の進行を遅延させる治療が中心となっている。腎不全の解析のために尿管結紮モデルや5/6腎臓摘出モデルが使用されることが多い。これらのモデルでは血中尿素窒素 (BUN) 値の上昇、糸球体硬化および間質の線維化等が認められ、慢性腎不全と同様の症状を示す。また、慢性腎不全においてepidermal growth factor (EGF)、transforming growth factor- β (TGF- β)などの成長因子や一酸化窒素(NO)の発現が変化することが報告されているが、これらは腎臓の発生や発達にも重要な役割を果たしている。それゆえ、腎臓が発達段階にある幼若期に腎不全に陥った場合、成熟期の腎不全とは異なった現象があらわれることが考えられる。さらに、幼児の糖尿病の発症数は増加の傾向を示しており、若くして腎不全に陥る危険性が増している。しかし、現在用いられている腎不全モデルは成熟動物を対象としたものであり、幼若期の腎不全モデルは未だ確立されていない。本研究では幼若期のラット(3週齢)に5/6腎臓摘出手術を施し、残存腎臓の変化を観察し、幼若期の慢性腎不全モデルとしての有用性を評価するとともに蛋白摂取量制限を行った場合の腎不全に対する効果を検討し、以下の成果を得た。

第1章では標準蛋白飼料(蛋白含有率18%)給餌時の5/6腎臓摘出幼若ラットにおけるBUN値、糸球体硬化および間質の線維化を調べた。さらに低蛋白飼料(蛋白含有率12%)給餌によるBUN値および体重、残存腎臓重量、renin mRNAの発現、マクロファージの浸潤および間質の線維化の変化を調べた。5/6腎臓摘出手術後の時間経過とともに標準蛋白飼料給餌時のBUN値は上昇し、糸球体硬化ならびに間質の線維化が進行した。蛋白摂取量制限による体重増加に対する影響は認められなかったが、残存腎臓の肥大は抑制された。蛋白摂取量制限によってBUN値の上昇、renin mRNAの発現、間質へのマクロファージ浸潤および間質の線維化の増加は抑制された。以上の結果から、5/6腎臓摘出幼若ラットは幼若期の慢性腎不全モデルとして有用であることが示唆された。

第2章では幼若期の腎不全モデルにおける腎小体の変化[糸球体硬化指数(GSI)、細胞増殖活性(PCNA陽性細胞の出現率)、アポトーシス(TUNEL陽性細胞)ならびに糸球体内皮細胞を酸化ストレスから保護する作用を有するendothelial NO synthase (eNOS)の発現]に対する蛋白摂取量制限の効果を検討した。低蛋白飼料給餌群のGSIは標準蛋白飼料給餌群に比べて有意に低かった。PCNA陽性細胞の出現率には両群間で有意な差は認められなかった。TUNEL陽性細胞は両群ともにほとんど認められなかった。eNOSの発現は両群において手術後の時間経過とともに減少する傾向が認められたが、低蛋白飼料給餌

群の方が標準蛋白飼料給餌群よりも強かった。以上の結果から、幼若期の5/6腎臓摘出モデルに対する蛋白摂取量制限は糸球体硬化の進行ならびにeNOSの減少を抑制し、糸球体を保護する効果があることが示唆された。

第3章では幼若期の腎不全モデルにおける尿細管の形態変化ならびに尿細管の発達や腎不全の進行に関与するEGFおよびTGF- β の局在を調べた。さらに、幼若期の腎不全におけるNOの関与を明らかにするために、inducible NO synthase (iNOS)の発現およびその発現に関わっていると考えられるADAM 17ならびにNF- κ Bの活性を調べ、これらのパラメーターに対する蛋白摂取量制限の効果を検討した。低蛋白飼料給餌、標準蛋白飼料給餌両群において、TUNEL陽性細胞はモデル作製後の時間経過とともに増加したが、その出現率は低蛋白飼料給餌群の方が標準蛋白飼料給餌群に比べて有意に低かった。両群において遠位尿細管におけるEGFはモデル作製後の時間経過とともに減少したが、その染色性は低蛋白飼料給餌群の方が標準蛋白飼料給餌群に比べて強かった。また、両群において、TGF- β はモデル作製後の時間経過とともに増加したが、その染色性は低蛋白飼料給餌群の方が標準蛋白飼料給餌群よりも弱かった。両群においてADAM 17、NF- κ Bの活性ならびにiNOSの発現はモデル作製後の時間経過とともに増加したが、低蛋白飼料給餌群では標準蛋白飼料給餌群に比べて低かった。以上のことから、蛋白摂取量の制限はアポトーシスを抑制し、尿細管障害を遅延させる働きがあることが示唆された。さらに、EGFの減少、TGF- β の増加およびNO過剰産生に対する蛋白摂取量制限による抑制と尿細管障害の軽減との関連が考えられた。

以上、本研究は5/6腎臓摘出幼若ラットが幼若期の慢性腎不全モデルとして有用であることおよび12%蛋白含有飼料給餌による本モデルに対する蛋白摂取量制限が成長に影響を与えることなく腎不全の進行を遅延させることを明らかにした。これらの成果は、医学、獣医学の発展に貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。