

称号及び氏名 博士（獣医学） 鈴木 唯

学位授与の日付 平成27年3月31日

論文名 **Pathological Study on the 5/6 Nephrectomy Renal Failure Model Using Common Marmoset Monkey (*Callithrix jacchus*)**  
(コモンマーモセットを用いた 5/6 腎摘出による腎障害モデルの病理学的研究)

論文審査委員  
主査 山手 丈至  
副査 大橋 文人  
副査 岡田 利也

## 論文要旨

### 【はじめに】

慢性腎臓病（**Chronic Kidney Disease: CKD**）とは、糖尿病や高血圧症、慢性糸球体腎炎など、様々な原因により進行性に経過する腎臓病の総称である。**CKD**は、蛋白尿あるいは糸球体ろ過量の低下が3カ月以上継続する状態と定義されており、進行すると人工透析や腎移植の対象となる慢性腎不全に移行する。現在、日本の**CKD**患者数は成人人口の**12.9%**にあたる約**1,330**万人、透析患者数は**30**万人と報告されている。**CKD**は食事制限など患者の**QOL**に関わるだけでなく、心血管系疾患の危険因子である。また、人工透析は医療費の大きな負担となることが知られている。**CKD**の予後改善は医学的、社会的、医療経済的に重要な課題である。

**CKD**及び腎線維化の基盤研究や医薬品開発のため、様々な疾患モデルが確立、応用されている。なかでも、げっ歯類を用いた部分腎摘出モデルは巣状分節性糸球体硬化症及びそれに起因する尿細管間質傷害のモデルとして頻繁に用いられている。部分腎摘出術による機能ネフロン数減少によって惹起される糸球体傷害が起点となり、糸球体から漏出した蛋白が尿細管間質傷害を導くことが病態メカニズムとして報告されている。このモデルは腎障害を簡便に作出できる再現性の高いモデルとして知られるが、雌雄差、動物種差が存在する。

バイオテクノロジー応用医薬品（バイオ医薬品）とは、細菌や哺乳類細胞等の発現系を活用して作製された医薬品と定義されており、組み換え血漿因子、モノクローナル抗体などが該当する。バイオ医薬品はターゲット選択性が高いためその薬理作用に動物種差が存在することが多く、ヒトにより近い動物での評価が必要である。げっ歯類は背景データが蓄積され、多彩な疾患モデルが確立されているが、ヒトとげっ歯類の遺伝的背景が異なることから、バイオ医薬品のターゲット分子の評価系としてげっ歯類が適切でないことが多い。げっ歯類よりもヒトに近い、非ヒト霊長類を用いた様々な疾患モデルの確立は、バイオ医薬品の開発において重要である。

コモンマーモセットは新世界ザルに属する小型の霊長類である。繁殖やハンドリングが容易であることから、生命科学の基盤研究や医薬品研究開発で使用されている。バイオ医薬品の市場拡大に伴い、コモンマーモセットの使用は今後益々増加するものと考えられる。

本研究では、マーモセットを用いた腎障害モデルの確立と有用性の検討を目的として、マーモセットの **5/6** 腎摘出モデルを作製した。第 **1** 章では、**5/6** 腎摘出マーモセットの臨床学的あるいは病理学的解析を行い、腎機能を含む全身への影響を検討した。第 **2** 章では、**5/6** 腎摘出マーモセットの腎障害発症メカニズム解明を目的として、糸球体を中心に病理学的観点から解析した。第 **3** 章では、尿細管間質傷害、特に線維化と炎症性細胞の特性と相互の関連について解析を加えた。この一連の研究により **5/6** 腎摘出マーモセットの腎病変の病態を初めて明らかにすることができた。

## 【第 1 章】 **5/6** 腎摘出マーモセットの臨床学的あるいは病理学的解析

腎障害時には尿中へのリンの排泄機能が低下するため高リン血症となり、血液中のカルシウム濃度を低下させる。また、腎障害によりビタミン **D** の活性化が阻害されるため、消化管からのカルシウム吸収が低下して更に低カルシウム血症が促進される。**CKD** のカルシウムとリンの血中濃度異常を調節するため上皮小体ホルモンの分泌が増加する。上皮小体ホルモンは骨溶解によって血中カルシウム濃度を増加させる作用をもつため、腎障害による二次性上皮小体機能亢進は骨量の減少を招く。更に、腎障害は腎臓の間質に存在するエリスロポエチン産生細胞を傷害するため、腎性貧血を招く。本章では、**5/6** 腎摘出マーモセットモデルの血液学的、血液生化学的検査と病理学的検査を行い、腎障害及びその全身に及ぼす影響を解析すると共に、既に確立されている **5/6** 腎摘出ラットモデルのデータと比較解析した。

**5/6** 腎摘出後 **5** 週間と **13** 週間観察した。その結果、**5/6** 腎摘出マーモセットの腎関連パラメータ（血中尿素窒素、クレアチニンなど）は **5/6** 腎摘出ラットと同様に増加傾向を示し、腎障害が起こっていることが示された。一方、**5/6** 腎摘出マーモセットの尿蛋白は **5/6** 腎摘出ラットに比べて増加が少ない傾向にあり、病理学的にも糸球体硬化は認められなかった。また、尿細管上皮傷害パラメーター（尿中 **N-acetyl-β-D-glucosaminidase: NAG**）は **5/6** 腎摘出マーモセットでは増加傾向にあったが、**5/6** 腎摘出ラットでは変化は認められなかった。血清リン濃度は **5/6** 腎摘出マーモセットで **5** 週に高値が認められ、血清カルシウム濃度は **5** 週で高値が、**13** 週で低値傾向を示したが、**5/6** 腎摘出ラットでは血清リン及びカルシウム濃度に著変は認められなかった。病理学的には **5/6** 腎摘出マーモセットで上皮小体の過形成及び骨量の減少（ハーバス管の拡張）が認められ、高い骨代謝回転状態が示唆された。**5/6** 腎摘出マーモセットでは **5** 週及び **13** 週で貧血傾向が認められ、病理学的にも造血細胞の減少が認められた。

以上の結果から、**5/6** 腎摘出後の腎障害はラットと同様にマーモセットでも惹起されていること

が確認された。一方で、**5/6** 腎摘出後のマーモセットは、**5/6** 腎摘出ラットに比べ、**1)** 蛋白尿の程度が軽く、糸球体硬化はみられず、**2)** 血清リン及びカルシウム濃度の変化、並びにそれに伴う上皮小体と骨の組織学的変化が顕著で、更に **3)** 貧血が高度であるという特徴が分かった。

### 【第 2 章】**5/6** 腎摘出マーモセットの腎障害モデルの病態解析、糸球体を中心として

**5/6** 腎摘出ラットでは、機能ネフロン数の減少による糸球体傷害が病態の起点となる。そこで、第 2 章では **5/6** 腎摘出マーモセットの腎障害モデルにおける糸球体傷害を、形態学的、免疫組織化学的及び微細構造学的に解析した。

**5/6** 腎摘出後、**5** 週及び **13** 週経過したマーモセットとラットの腎臓を対象に、タコ足細胞の減少及び傷害時の細胞骨格蛋白発現、並びにメサンギウム細胞の基質産生及び傷害時の細胞骨格蛋白発現を解析したが、いずれも無処置マーモセットと比べ大きな変化は認められなかった。糸球体のろ過機能は血管内皮細胞、糸球体基底膜及びタコ足細胞が担う。電顕観察では、**5/6** 腎摘出マーモセットでは、糸球体のこのような構成細胞には傷害は認められず、また、マーモセットの糸球体基底膜はラットに比べ約 **2~5** 倍厚いことがわかった。マーモセットは糸球体基底膜がラットに比べ厚いため、機能ネフロン数の減少によって糸球体内が高血圧になっても、重篤かつ不可逆的糸球体傷害に至らなかったと考えられた。

以上の結果から、**5/6** 腎摘出マーモセットでは、糸球体傷害とは異なる機序により腎障害が生じている可能性が示された。

### 【第 3 章】**5/6** 腎摘出マーモセットの腎障害モデルの病態解析、尿細管と間質を中心として

第 2 章で糸球体傷害がほとんどみられなかったことから、本章では、**5/6** 腎摘出マーモセットの腎障害発症メカニズムを更に解析するために、尿細管及び間質の病態を、主として免疫組織化学的手法により解析した。

**5/6** 腎摘出マーモセットは術後 **13** 週で顕著な線維化が認められ、その程度はラットより高度であることが示された。線維化領域では、ビメンチンや $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) 共陽性の筋線維芽細胞が出現していることが示された。**5/6** 腎摘出ラットと比較すると、**5/6** 腎摘出マーモセットでは線維化の程度がより高度であった。

また、線維化領域では顕著な炎症性細胞浸潤がみられた。炎症部位では、術後 **5** 週と **13** 週ともに、マクロファージは稀に観察された程度であったが、**T** 細胞と **B** 細胞が著しく増加していた。特徴として、**T** 細胞はび慢性に浸潤し、**B** 細胞はしばしば濾胞を形成していた。**5/6** 腎摘出ラットと比較すると、**5/6** 腎摘出マーモセットでは炎症性細胞数、特にリンパ球数がより多かった。加えて、**T** 細胞、**B** 細胞及びマクロファージは、**5/6** 腎摘出マーモセットでは経時的に増加していたが、ラットでは増加の程度は **5** 週と **13** 週で一定であった。

**5/6** 腎摘出マーモセットでは、尿細管の傷害後の再生は、術後 **13** 週で顕著となる線維化に先立って術後 **5** 週から炎症部位に一致して認められた。傷害を受け拡張、萎縮あるいは上皮細胞が重層化した尿細管及び再生性尿細管はビメンチンやデスミンを発現していた。再生性尿細管上皮の一部は **PCNA** 陽性の増殖活性を示したが、**5/6** 腎摘出ラットに比較して少数であり、尿細管の再生能が低いことが示された。

以上の結果から、**5/6** 腎摘出マーモセットの腎障害では高度の炎症性細胞の反応を伴う尿細管間

質傷害とその後の線維化がより重要であることが示された。

#### 【まとめ】

本研究では、コモンマーモセットを用いて、部分腎摘出術による腎障害モデルを作製し、その病態の発現メカニズムについて、**5/6**腎摘出ラットと比較した。得られた成績は、以下のとおりである。

- 1. 5/6** 腎摘出術はマーモセットにおいても腎障害が惹起されることが示された。また、ミネラル代謝異常、高い骨代謝回転及び貧血など腎障害の全身的影響は、ラットよりも強い傾向が認められた。
- 2. 5/6** 腎摘出マーモセットは、**5/6** 腎摘出ラットに比べ糸球体傷害が軽微であった。それは、マーモセットは糸球体基底膜がラットよりも厚いため、ろ過機能が破綻され難いためと考えられた。
- 3. 5/6** 腎摘出マーモセットでは尿細管傷害及び間質傷害が特徴的に認められ、特に間質の線維化は **5/6** 腎摘出ラットに比べ顕著であった。この線維化の形成には、尿細管の重篤かつ不可逆的な傷害と、リンパ球を中心とした炎症性細胞浸潤が重要であると思われた。

コモンマーモセットを用いた部分腎摘出術で腎障害が惹起できることを明らかにした。本研究成果は、**CKD**を対象としたバイオテクノロジー医薬品の研究開発において、**5/6**腎摘出マーモセットをモデル動物として応用することが可能であることを示すとともに、本研究で得られた成果はその利用において有用な情報を提供すると考える。

#### 審査結果の要旨

慢性腎臓病 (**Chronic Kidney Disease: CKD**) とは、糖尿病や高血圧症、慢性糸球体腎炎など、様々な原因により進行性に経過する腎臓病の総称であり、進行すると人工透析や腎移植の対象となる慢性腎不全に移行する。**CKD**は食事制限など患者の **QOL**に関わるだけでなく、心血管系疾患の危険因子である。また、人工透析は医療費の大きな負担となることが知られている。**CKD**の予後改善は医学的、社会的、医療経済的に重要な課題である。

**CKD**及び腎線維化の基盤研究や医薬品開発のため、様々な疾患モデルが確立、応用されている。なかでも、げっ歯類を用いた部分腎摘出モデルは、巣状分節性糸球体硬化症及びそれに起因する尿細管間質傷害のモデルとして頻繁に用いられている。しかし、近年研究が盛んなバイオテクノロジー応用医薬品 (バイオ医薬品) の開発においては、その医薬品のターゲット選択性が高いため薬理作用において大きな動物種差が存在することが問題となっている。そこで、げっ歯類よりもヒトにより近い非ヒト霊長類の疾患モデル動物を用いた薬効及び毒性評価が必要となっている。本研究では、新世界ザルに属する小型の霊長類であるコモンマーモセットに注目し、マーモセットを用いた腎障害モデルを作製し、その特性を臨床学的、病理学的及び免疫組織化学的に解析するとともに、その応用性について検討している。

第1章では、5/6腎摘出マーモセットを術後13週間観察し、臨床学的あるいは病理学的解析を行い、既に確立されている5/6腎摘出ラットモデルのデータと比較解析することにより、腎機能を含む全身への影響を検討している。5/6腎摘出マーモセットの腎関連パラメータ（血中尿素窒素やクレアチニンなど）は5/6腎摘出ラットと同様に増加傾向を示し、腎障害が起こっていることが示された。一方、糸球体硬化と尿蛋白漏出はマーモセットでより弱いことが分かった。上皮小体の変化、ミネラル代謝異常に伴う高い骨代謝回転並びに貧血など腎障害の全身的影響は、ラットよりも強い傾向が認められた。

第2章では、5/6腎摘出マーモセットの腎障害発症メカニズム解明を目的として、術後5週及び13週における糸球体変化を病理学的観点から解析している。5/6腎摘出後、5週及び13週経過したマーモセットでは、タコ足細胞及びメサンギウム細胞に傷害を示唆する変化は認められなかった。電顕観察では、5/6腎摘出マーモセットでは、糸球体のこのような構成細胞には傷害は認められず、また、マーモセットの糸球体基底膜はラットに比べ約2~5倍厚いことが分かった。マーモセットは糸球体基底膜がラットに比べ厚いため、機能ネフロン数の減少によって糸球体内が高血圧になっても、重篤かつ不可逆的糸球体傷害に至らなかったものと考えられた。

第3章では、術後5週及び13週における尿細管間質傷害、特に線維化と炎症性細胞の特性と相互の関連について解析を加えている。5/6腎摘出マーモセットは術後13週で顕著な線維化が認められた。線維化領域では、線維芽細胞がビメンチンや $\alpha$ -平滑筋アクチン（ $\alpha$ -SMA）を共発現していた。5/6腎摘出ラットと比較すると、5/6腎摘出マーモセットでは線維化の程度がより高度であった。また、線維化領域では顕著な炎症性細胞浸潤がみられた。炎症部位では、マクロファージは稀に観察された程度であったが、T細胞とB細胞が著しく増加していた。T細胞、B細胞及びマクロファージは、5/6腎摘出マーモセットでは経時的に増加していたが、ラットでは増加の程度は5週と13週で一定であった。さらに、5/6腎摘出マーモセットでは、尿細管の傷害後の再生が線維化に先立って炎症部位に一致して認められており、それら尿細管はビメンチンやデスミンを発現していた。再生細管上皮の一部はPCNA陽性の増殖活性を示したが、5/6腎摘出ラットに比較して少数であり、尿細管の再生能が低いことが示された。従って、5/6腎摘出マーモセットの腎障害では高度の炎症性細胞の反応を伴う尿細管間質傷害とその後の線維化がより重要であることが示された。

本研究成果は、CKDを対象としたバイオテクノロジー医薬品の研究開発において、5/6腎摘出マーモセットをモデル動物として応用することが可能であることを示すとともに、その病理発生機序に関する知見は、CKDの新たな治療法探索に向けた医学・獣医学における基礎・応用研究のさらなる発展に資するものである。従って、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。