

Astrin 欠損ラットにおけるネフロン数減少機構と
慢性腎不全の病態進行に関する研究

(Analysis on the mechanism of reduced nephron number and the
pathological progression of chronic renal failure in Astrin
deficient rats)

学位論文の内容の要約

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医学専攻博士課程平成 25 年入学

安 田 英 紀

(指導教授：鈴木 浩悦)

Astrin 欠損ラットにおけるネフロン数減少機構と慢性腎不全の病態進行に関する研究

世界的に見ても慢性腎臓病(CKD)は罹患率の高い疾患であり、日本では一般人口の10-13%に相当する推定1,330万人がCKDに罹患していると言われていいる。しかし、末期腎臓病患者に対する有効な治療が人工透析と腎移植に限られており、QOLを大きく改善する治療法は未だ確立されていないため、近年透析患者数は年々急増している。獣医学領域においても透析療法が普及していないことや腎移植の適用に限界があることから、犬と猫のどちらにおいても死因の上位を占める疾患である。そのため、CKDの病態発生の解明と早期マーカーや治療法の確立が望まれ、再生医療分野においても様々な手法による研究が進められている。しかし、腎臓は3次元的に複数の細胞によって複雑に構成され、発生機構においても未解明な部分が多いため、腎臓の再生医療領域における発展は大きく遅れている。先天のおよび後天的に様々な原因によってCKDは引き起こされるが、それらは共通して機能的なネフロン数の減少により個々のネフロンに対する負荷が増大することで不可逆的に病態が進行し、末期病態として腎性貧血と腎線維症を発症する。出生時のネフロン数には大きな個体差があり、その数は出生時の体重と相関することが報告されている。そのため、先天的なネフロン数低下は生後のCKDの発症や予後のリスクを高める。したがって、腎臓における発生学的なネフロン数決定のメカニズムの解明は腎臓の再生や生後のCKDリスクに関与する重要な情報を提供し、ネフロン数減少のみに起因して進行するCKDの病態メカニズムの解明は様々なCKDに共通する病態進行を抑制する手がかりを示すものとなる可能性がある。本研究において我々は、細胞周期M期の進行やmTORシグナルの制御に関与するとされている紡錘糸結合タンパク質Astrinの遺伝的欠損によって80%のネフロン数減少を示す腎低形成症(HPK)ラットを用いてネフロン数減少機構とCKDの病態進行を解析し、それに基づいた治療法の検討を行った。

まず第2章において、CKDの進行に伴いHPKが特有の大球性の赤血球減少症を発症することを示した。赤血球造血に関わるホルモンであるエリスロポエチン(EPO)は腎臓の傍髄質尿細管間質の線維芽細胞から分泌されるが、末期CKDでは間質の線維化によってEPO産生細胞が筋線維芽細胞に形質転換することで産生能が低下し、正球性正色素性貧血を示す。HPKにおいては間質の線

維化によって低減した腎臓の EPO 産生を肝臓の産生が代償し、血中濃度が維持されていることが判明した。また、腎臓と肝臓における EPO の遺伝子発現は低酸素誘導によってどちらも上昇し、線維化が開始した腎臓においても低酸素に反応して EPO を産生する潜在的能力を保持していることを示した。一方で赤血球膜脆弱性と脾臓におけるヘモジデローシスの亢進が認められたが、鉄代謝において鉄欠乏を示す所見は見られなかった。これらのことから、HPK では血中 EPO 濃度は肝臓による代償的産生によって維持されているが、脾臓などにおける血球破壊が HPK の赤血球減少症に関与している可能性が示された。

第 3 章では、80%のネフロン数減少を示す HPK において腎線維症は糸球体病変から開始することを明らかにした。糸球体数の減少は残存ネフロンへの負荷を増大させ腎障害を引き起こすが、正常な腎機能の維持にどの程度のネフロン数が必要であるかはまだ明らかにされていない。HPK の糸球体では 35 日齢の早期から肥大およびポドサイトや基底膜の障害が見られ、マクロファージによる炎症反応が糸球体内で見られた。その後糸球体内において複数の細胞外基質の蓄積とメサンギウム細胞の増加を伴う硬化症が引き起こされることが明らかになった。これらの変化に合わせ、糸球体内における PDGF や TGF- β などの成長因子の増加も確認された。また、尿細管間質においては細胞外基質の蓄積や線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化形質転換が糸球体病変に遅れて起り、マクロファージの間質への浸潤も 140 日齢以降に見られた。間質線維症の進行に伴い PDGF の発現も尿細管間質において増大していた。これらの結果は HPK の CKD が負荷の増大による糸球体障害から糸球体硬化症や間質線維症へと進展し、これらの腎線維症の進行に PDGF や TGF- β などの成長因子が関与していることを明らかにした。また、先天的な 80%ネフロン数減少が進行性の CKD を引き起こすことを明らかにした。

第 4 章では胎生期の後腎において Astrin 欠損が後腎間葉(MM)の減少による尿管芽(UB)分岐数の低下を介してネフロン数減少を引き起こすことを明らかにした。腎臓の発生は集合管の原基であるウォルフ管から分岐した尿管芽上皮とその周囲の後腎間葉組織の相互作用によって進行して行くが、HPK の後腎においては MM 領域に局限したアポトーシスと増殖不良が確認された。また、MM 由来の上流シグナルである Sall1 および Pax2 陽性細胞は胎齢 (E) 14.5 日で既に減少し、遺伝子発現レベルでも Sall1、Kif26b および Pax2 発現の低下が見られた。一方で、他の相互作用シグナルに関与する因子の遺伝子発現に差は見ら

れなかった。MM は分岐した UB 末端の周囲にキャップ構造をとる Six2 陽性の MM 凝集塊を形成するが、E14.5 日から後腎サイズは低下し、Six2 陽性の凝集塊の面積は減少し菲薄化していた。UB 分岐数の減少はその後の E15.5 日から確認され、Astrin 欠損の主に MM に影響し二次的に UB 分岐の減少を引き起こすことが示唆された。また、MM 凝集塊は間葉上皮転換によって尿細管やポドサイトなどの糸球体構成成分へと分化するが、この過程は HPK でも正常に起きていることが示された。HeLa 細胞での Astrin のノックダウンは細胞周期 M 期での停止とアポトーシスを引き起こすが、雄の HPK ラットに併発する精巢形成不全は、未熟セルトリ細胞の分裂異常とアポトーシスによる精細管の成長不全が原因となっている。そのため、腎発生の異常の原因として Astrin の細胞周期 M 期進行における機能との関連性を想定したが、いずれの胎齢の HPK 後腎においてもリン酸化ヒストン H3 陽性の M 期細胞数の増加は観察されなかった。Astrin の他の機能としてストレス条件下の HeLa 細胞で mTORC1 の構成要素である Raptor をストレス顆粒に引き込むことで mTOR シグナルの高度活性化によるアポトーシスを抑制することが報告されている。そこで、mTOR シグナルに関して解析したところ、HPK の後腎において mTOR とその下流因子である S6K1 の遺伝子発現と S6K1 のリン酸化レベルの増加が確認され、発生腎において Astrin が mTOR シグナルの調節に関与している可能性が示唆された。

第 5 章では前章で明らかにした HPK の後腎の表現型の *in vitro* における再現と MM 細胞における Astrin 欠損の影響の解析を試みた。後腎に mTOR 阻害剤を低濃度(0.05ng/ml)で添加して培養したところ、正常においても後腎サイズが減少したが、HPK の後腎サイズの低下は軽度であった。また、溶媒投与においては培養期間での HPK の後腎サイズの増分は正常に比べ小さかったが、0.05ng/ml のエベロリムス添加においては HPK のサイズの増分が正常を上回った。このことから、Astrin の mTOR シグナルの調節が HPK の発生腎における異常に関与している可能性が示唆された。また、3 日間培養した E14.5 日の HPK の後腎において、Six2 陽性の MM 細胞が顕著に減少していたことから、HPK の後腎では MM 細胞が早期に枯渇する可能性が示唆された。更に MM 細胞における Astrin 欠損の影響を調べるために MM 細胞の単離培養系を確立した。初代培養の正常な MM 細胞はいくつかの間葉系細胞マーカーと Astrin タンパク質を発現していたが、上皮系および間質細胞マーカーを発現しなかった。また、HPK の passage1 細胞はいくつかの間葉系細胞マーカーの発現の減少と一部の間質

細胞マーカーの発現の増加を示し、Astrin 遺伝子をほとんど発現していなかった。これによって Astrin 欠損の MM 細胞では幹細胞性が変化していることが示唆された。また、HPK 由来の MM 細胞において Six2 陽性細胞におけるアポトーシスの亢進が観察され、器官培養および *in vivo* における表現型との関連が示唆された。更に胎子脊髄を用いてこれらの細胞の分化を誘導したところ、HPK の MM 細胞は Podoplanin 陽性の正常より未熟な細胞塊を形成し、HPK の糸球体形成は正常より時間を要する可能性が示唆された。

まとめると、本研究において、発生腎における Astrin の欠損が MM 細胞の上流シグナルの減少と、幹細胞性の変化を引き起こすことが示唆された。また、MM 細胞のアポトーシスと増殖不良により、ネフロン形成帯の菲薄化と幹細胞数の減少が生じ、UB 分岐数が減少することで、80%のネフロン数の減少が引き起こされると考えられる。また、これらの異常には Astrin の mTOR シグナルの調節機構が関与していることが示唆される。更に、80%のネフロン数減少は糸球体障害から始まる腎線維症と大球性赤血球減少症を引き起こすことが示された。また、最終章で腎線維症への関与が確認された成長因子を抑制する Everolimus が HPK において腎機能の低下と線維化の進行を抑制することを述べた。本研究におけるこれらの結果は先天的な CKD リスクや腎臓の再生技術および CKD の分子標的薬治療に有用な情報を提供するものとなると考えられる。