

論文審査の結果の要旨

申請者名 安田 英紀

本論文は腎臓のネフロン数が約 20%に減少し、それにより慢性腎臓病(CKD)を発症する Astrin 遺伝子欠損ラットにおいて、胎生期のネフロン減少機構と生後の病態進行を解析し、さらにその病態に対する治療法の検討を行った一連の研究を纏めたものである。

第1章は本論文全体の序論であり、申請者は CKD に関する一般的な見解を示している。CKD は全世界的に罹患率の高い疾病であり、先進諸国では末期患者に対して人工透析や腎移植が行われるが、QOL の低下や透析患者の急増が問題になっている。獣医学領域においても、CKD は犬や猫の死因の上位であるが、様々要因により透析や移植の普及に限界がある。このような状況から、CKD の病態進行の解明や早期マーカーの同定により CKD の進行を阻止することだけでなく、腎臓再生医療の進展が求められている。しかし、腎臓の構造は複雑で、発生機構が完全には解明されていないため、その再生技術は遅れている。一方、CKD の発生には様々な要因が関わるが、ネフロン数の減少と残存ネフロンへの負荷の増大が不可逆的に腎病態を悪化させ、末期病態として共通して腎性貧血と腎線維症が起こる。さらに、出生時のネフロン数に大きな個人差があり、低体重児におけるネフロン数の低下が CKD の発症や予後に影響を及ぼす可能性が指摘されている。これらのことから申請者は、腎臓においてネフロン数が決定される機構を解明することにより、腎臓の再生や生後の CKD のリスクに関わる重要な情報が得られる可能性があること、さらに先天的なネフロン数の減少に起因する CKD の病態進行メカニズムを解明することで、様々な CKD に共通する腎病態進行阻止の手がかりが得られる可能性があることを指摘している。このことにより申請者は、細胞周期 M 期の進行や mTOR シグナルの制御に関わる微小管結合タンパク質 Astrin の遺伝的欠損により約 80%のネフロン数減少を示す腎低形成症(HPK)ラットに着目し、同ラットを用いて以下の研究を行った。

第2章で、申請者は HPK ラットの CKD 進行に伴う貧血病態を解析し、同ラットが大球性の赤血球減少症を示すことを明らかにした。骨髄の赤血球造血を刺激するエリスロポエチン(EPO)は腎臓の傍髄質尿管間質線維芽細胞から分泌される。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し、EPO 産生が低下する結果、一般的に正球性正色素性貧血を呈する。しかし、HPK ラットで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、定常状態で血中 EPO 濃度は維持されていた。また、低酸素誘導によって腎臓と肝臓における EPO の遺伝子発現は上昇し、線維化が開始した腎臓においても低酸素に反応して EPO を産生する能力が保持されていることが明らかとなった。一方、HPK ラットでは赤血球膜脆弱性と脾臓におけるヘモジデロシスの亢進が認められた。さらに、尿中漏出による血中トランスフェリン濃度の低下が認められたが、結合鉄濃度は低下しておらず、鉄欠乏を示す所見はなかった。これらのことから、HPK ラットでは血中 EPO 濃度は維持され、鉄欠乏も存在しないため、造血の顕著な抑制は見られないが、血球破壊が赤血球減少症を助長している可能性が示された。

第3章で、申請者は HPK ラットの CKD の進行を、線維化に着目して病理学的に解析し、HPK ラットの腎線維症が糸球体病変から開始するものの、その病理学的変化は比較的ゆっくりと進行し、間質病変は後から明らかになるものの、筋線維芽細胞の出現を伴って急速に進行することを明らかにした。Brenner の過剰濾過説によれば、ネフロン数の減少は残存糸球体への負荷を亢進させ、糸球体の肥大や硬化を引き起こし、その悪循環が腎障害を進行させるが、そもそも正常な腎機能を維持するのにどれくらいのネフロン数が必要なのかという基本的な問題は解決されていない。HPK では 35 日齢において糸球体肥大や糸球体基底膜に沿った podocin の連続性の消失が見られ、糸球体内へのマクロファージの浸潤が観察された。その後、糸球体内における PDGF や TGF- β の増加を伴って、メサングウム細胞の増加と細胞外基質の蓄積を伴う硬化症がゆっくりと進行した。この過程で、ボーマン嚢壁に α SMA 陽性細胞が出現するものの、糸球体係蹄に筋線維芽細胞の増加は認められなかった。一方、尿細管間質ではマクロファージの間質への浸潤は糸球体病変よりも遅れて起るが、PDGF の発現の増大を伴う線維芽細胞の増加と筋線維芽細胞への形質転換が起こり、細胞外基質の蓄積は急速に進行した。これらの結果は、HPK ラットではネフロン数減少による負荷の増大が糸球体硬化症や間質線維症を引き起こし、これらの異常に 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。以上のことから、先天的な 80% のネフロン数減少が線維化を伴う進行性の CKD を引き起こすことが立証された。

第4章で、申請者は HPK ラットにおけるネフロン数減少の原因を明らかにするために胎生期の後腎発生を解析し、Astrin 欠損が後腎間葉(MM)の減少に起因する尿管芽(UB)分岐数の低下によりネフロン数の減少を引き起こすことを明らかにした。後腎のネフロン形成はウォルフ管から分岐した UB と MM との相互作用によって進行する。HPK の後腎では MM においてアポトーシスの増加と細胞増殖の低下が確認された。また、MM 由来の上流シグナ

ルである *Sall1* および *Pax2* の陽性細胞が胎齡(E)14.5 で減少しており、それらと *Kif26b* の遺伝子発現レベルも低下していたが、下流の相互作用シグナルに関する因子の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示す *Six2* 陽性の凝集塊を形成する。HPK では E14.5 から後腎サイズは小さく、*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 E15.5 から確認され、*Astrin* の欠損はまず 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された。一方で、MM 凝集塊から尿細管やポドサイトなどへの間葉上皮転換は HPK ラットの後腎でも正常に起こっていた。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。雄の HPK ラットに併発する精巣形成不全では、未熟セルトリ細胞の分裂異常とアポトーシス亢進により精細管の成長が重篤に障害される。このことから申請者は MM 細胞の減少の原因として M 期進行異常を仮定し、M 期特異的マーカーであるリン酸化ヒストン H3 を検出したが、HPK の後腎で M 期細胞の増加は認められなかった。一方、*Astrin* のもう一つ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、申請者は mTOR シグナルに関して解析し、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 のリン酸化レベルが上昇していることを明らかにした。以上の結果から、後腎発生における mTOR シグナルの調節に *Astrin* が関与している可能性が示唆された。

第 5 章で、申請者は HPK ラットで明らかになった後腎の表現型を *in vitro* で再現し、MM 細胞における *Astrin* 欠損の影響を解析した。まず、器官培養によって後腎発生を再現し、E14.5 の HPK ラット由来の後腎の 3 日間の培養において、*Six2* 陽性の MM 細胞が顕著に減少することを確認した。この器官培養系に mTOR 阻害剤の Everolimus を低濃度 (0.05ng/ml) で添加したところ、後腎の成長が一部抑制されたが、正常より HPK の方がその影響は小さかった。さらに、溶媒投与では HPK の後腎の成長は正常より遅延していたが、エベロリムス添加においては HPK の後腎の成長は正常を上回った。これらのことから HPK の後腎発生の異常に mTOR シグナルの活性化が関与していることが示唆された。次に MM 細胞における *Astrin* 欠損の影響を直接調べるために、申請者は MM 細胞の単離培養系を確立した。初代培養の正常な MM 細胞は間葉系マーカーと *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は発現していなかった。一方、HPK の passage1 の細胞は間葉系マーカーの発現の減少と間質細胞マーカーの発現の上昇を示し、*Astrin* 遺伝子をほ

とんど発現していなかった。このことは **Astrin** 欠損の **MM** 細胞で幹細胞性の変化が生じている可能性を示唆している。さらに、**HPK** 由来の単離 **MM** 細胞において、*in vivo* と器官培養の表現型との一致して、**Six2** 陽性細胞のアポトーシスの増加が観察された。最後に胎子脊髄組織によって、これらの細胞を分化誘導したところ、**HPK** の **MM** 細胞は正常より未熟な **Podoplanin** 陽性の細胞塊を形成し、糸球体形成の進行遅延が示唆された。

第6章において申請者は総合考察を示すとともに、今後の研究の展望を述べている。まず、本論文で明らかになった **HPK** ラットの異常を胎生期から加齢期まで順を追って解説している。後腎における **Astrin** の欠損は **mTOR** シグナル調節機構の異常を伴って、**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し、**MM** 細胞のアポトーシスを引き起こす。これにより、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ネフロン数減少が引き起こされる。更に、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。申請者はさらに腎線維症の進行に関わる成長因子のシグナル経路を抑制する **Everolimus** の長期低用量投与により、**HPK** の腎機能の低下と線維症が抑制されるという共同研究の実験結果を示している。この研究においては、**PDGF** を介する間質における線維芽細胞の増加と基質産生は抑制されたが、**TGF- β /Smad** シグナルを介するポドサイトの脱落や筋線維芽細胞への形質転換は抑制されなかった。このため申請者はこれらの経路を抑制する薬剤の併用が線維化を阻止する有効な治療法となる可能性があると考えしている。さらに、**mTOR** シグナルが幹細胞維持に関わることを文献的に検証し、**mTOR** シグナル経路が胎生期のネフロン数決定と成熟後の腎線維化の両方の制御に関わるという仮説を示し、これらの過程における **Astrin** の関与をより明確にするために、**Astrin** 欠損ラットでのさらなる研究の必要性を指摘している。

以上のように、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であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。