

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 富 樫 裕 子

題 目 ラット腎障害モデルにおけるシスタチン C のバイオマーカーとしての有用性  
および腎臓内局在に関する研究

シスタチン C は分子量 13 kDa のペプチドで、恒常的に全身の有核細胞から血中に分泌され、そのほとんどが糸球体でろ過され、近位尿細管の再吸収および異化を受ける。このため、近位尿細管が障害されるとシスタチン C の再吸収が直接的に抑制され、糸球体が障害されると原尿に漏れ出した生体内高分子により再吸収が競合的に阻害され、尿中シスタチン C は増加する。近年、尿中シスタチン C は、近位尿細管障害および糸球体障害の両方を検出する新規腎障害バイオマーカーとして注目されているが、有用性および特徴について十分に解明されていない。本研究では、尿細管障害を病変の主体とする急性腎障害モデル、糸球体障害を病変の主体とする急性腎障害モデルおよび慢性腎臓病モデルの一つである糖尿病性腎症モデルを用いて、尿中シスタチン C の変動を検討し、従来型バイオマーカー（血中クレアチニン、尿素窒素）およびその他の新規腎障害バイオマーカー（尿中  $\beta 2$  ミクログロブリン、カルビンディン、クラステリン、EGF、GST- $\alpha$ 、GST- $\mu$ 、KIM-1、NGAL、オステオポンチン、TIMP-1）と比較し、尿中シスタチン C の腎障害バイオマーカーとしての有用性および特徴を明かにした。さらに、シスタチン C の腎臓内局在と腎障害との関連性について、免疫組織化学的に明かにした。

第 1 章において、尿細管障害を病変の主体とする急性腎障害モデルとして用いた CDDP 誘発急性腎障害ラットでは、尿中シスタチン C は、Day 1 から増加した。血中クレアチニンおよび尿素窒素は Day 3 から増加し、病理組織学的には、近位尿細管の壊死などの障害性変化が Day 3 からみられ、Day 5～Day 7 で顕著となった。従って、尿中シスタチン C は CDDP 誘発急性腎障害の早期検出に有用であることが示された。また、尿中 KIM-1、GST- $\alpha$  および EGF も Day 1 から変動し、腎障害の早期検出に有用で、特に尿中 KIM-1 および GST- $\alpha$  は増加率の点で尿中シスタチン C より優れることが示された。

第 2 章において、糸球体病変を主体とする急性腎障害モデルとして用いた抗 GBM 糸球体腎炎ラットでは、尿中シスタチン C は Day 7 で増加した。血中クレアチニンおよび尿素窒素は Day 7 までほとんど変動せず、抗 GBM 糸球体腎炎の診断マーカーである尿中アルブミンおよび総タンパクは Day 7 で増加した。病理組織学的には、Day 3 から糸球体の細胞増多および半月形成が軽度に見られ、Day 7 で顕著となった。従って、尿中シスタチン C は、従来型バイオマーカーに比較して、抗 GBM 糸球体腎炎の早期検出に有用であることが示されたが、尿中アルブミンおよび総タンパクに対する優位性はみられなかった。尿中  $\beta 2$  ミクログロブリン、クラステリン、GST- $\alpha$  および GST- $\mu$  は、尿中シスタチン C と同じく Day 7 で増加した。尿中 KIM-1 および NGAL は Day 3 から増加し、抗 GBM 糸球体腎炎の早期検出に尿中シスタチン C より優れることが示された。

第 3 章において、慢性腎臓病モデルとして用いた糖尿病性腎症を発症する ZDF ラットでは、尿中シスタチン C は対照である lean ラットと比較して 12 週齢から高値であり、週齢に依存して増加した。血中クレアチニンおよび尿素窒素は 12～25 週齢でほとんど変化しなかった。病理組織学的には、12 週齢では軽度の糸球体病変がみられるのみであったが、20 週齢では糸球体障害および尿細管障害が顕著となり、

25 週齢で増悪した。従って、尿中シスタチン C は、従来型バイオマーカーと比較して糖尿病性腎症の早期検出および病態把握に有用であることが示された。また、糖尿病性腎症の最も感度のよい診断マーカーとして用いられる尿中アルブミンは、lean ラットと比較して 12 週齢から高値であり、週齢に依存して増加したことから、尿中シスタチン C およびアルブミンの有用性は同程度と考える。尿中  $\beta 2$  ミクログロブリン、クラステリン、GST- $\mu$ 、KIM-1 およびオステオポンチンもまた、12 週齢で lean ラットと比較して高値であり、週齢に依存して増加した。これらは、尿中シスタチン C と同様に、糖尿病性腎症の早期検出および病態把握に有用であることが示された。

さらに、第 1, 2 および 3 章において、CDDP 誘発急性腎障害ラット、抗 GBM 糸球体腎炎ラットおよび ZDF ラットでは、シスタチン C は近位尿細管に局在し、腎障害の進行に関わらず、シスタチン C 免疫染色反応性および陽性領域はほとんど変化しないことが示された。

以上、尿中シスタチン C は、尿細管障害および糸球体障害のいずれかを病変の主体とする急性腎障害、ならびに慢性腎臓病の一つである糖尿病性腎症の早期検出に有用であり、糖尿病性腎症の病態把握が可能と考える。尿中アルブミンおよび総タンパクと比較すると、糸球体障害を病変の主体とする急性腎障害および糖尿病性腎症において、尿中シスタチン C の有用性はそれらと同程度と考える。新規腎障害バイオマーカーである尿中 KIM-1 は、尿中シスタチン C と同様に、3 つのタイプの腎障害の早期検出および糖尿病性腎症の病態把握に有用であることが示された。尿中  $\beta 2$  ミクログロブリンは、尿中シスタチン C と類似の変動を示した。その他、尿細管障害病変の主体とする急性腎障害では GST- $\alpha$  および EGF、糸球体障害を病変の主体とする急性腎障害ではクラステリン、GST- $\alpha$ 、GST- $\mu$  および NGAL が早期検出に有用であり、糖尿病性腎症ではクラステリン、GST- $\mu$  およびオステオポンチンが早期検出および病態把握に有用であることが示された。さらに、シスタチン C は、腎臓において、免疫組織化学的に近位尿細管に局在し、シスタチン C 免疫染色反応性および陽性領域は、尿細管障害および糸球体障害のいずれかを病変の主体とする急性腎障害ならびに糖尿病性腎症の進行と関連しないことが示された。

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 TOGASHI, Yuko

題 目 Studies on the Usefulness of the Cystatin C as a Renal Biomarker and its  
Localization in Kidney  
(ラット腎障害モデルにおけるシスタチン C のバイオマーカーとしての有用  
性および腎臓内局在に関する研究)

Cystatin C, a peptide of molecular weight 13 kDa, is produced and secreted to blood at a constant rate by all karyocytes, freely filtrated from blood into glomeruli, and completely reabsorbed and catabolized in proximal renal tubules. Due to these features, tubular damage directly reduces reabsorption of cystatin C to the proximal renal tubules, and glomerular alterations competitively inhibits tubular uptake of cystatin C by the leakage of high molecular weight protein, which causes the increase in urinary level. Recently, urinary cystatin C has attracted attention as a novel biomarker for detection of both proximal renal tubular and glomerular damage, however, the usefulness and characteristics have not been investigated enough. In this study, using acute kidney injury (AKI) model whose main lesion was renal tubular injury, AKI model whose main lesion was glomerular injury, and diabetic nephropathy model, one of chronic kidney disease (CKD) models, we measured urinary cystatin C level and compared it to the conventional biomarkers (blood creatinine, urea nitrogen (UN)) and the other novel biomarkers ( $\beta$ 2-microglobulin, calbindin, clusterin, EGF, GST- $\alpha$ , GST- $\mu$ , KIM-1, NGAL, osteopontin, and TIMP-1) in order to clarify the usefulness and characteristics of urinary cystatin C as a renal biomarker for damage. In addition, the relationship between the immunohistochemical localization of cystatin C in kidney and progression of renal damage was evaluated.

In Chapter 1, CDDP-induced AKI rat was used as a model of AKI whose main lesion was renal tubular injury. Urinary cystatin C level increased from Day 1. Blood creatinine and UN did from Day 3, and histopathological alternations of proximal renal tubule such as necrosis were observed from Day 3, and became more severe and spread on Days 5 and 7. These results indicated that urinary cystatin C was useful for the early detection of renal damage. Urinary KIM-1, GST- $\alpha$ , and EGF also changed from Day 1, indicating the usefulness for the early detection of renal damage, and KIM-1 and GST- $\alpha$  were superior to cystatin C in terms of high-fold increase.

In Chapter 2, anti-GBM glomerulonephritis rat was used as a model of AKI whose main lesion was glomerular injury. Urinary cystatin C level increased on Day 7. Blood creatinine and UN hardly changed until Day 7. Urinary albumin and total protein, diagnostic markers of anti-GBM glomerulonephritis, increased on Day 7. Histopathological alternations of glomeruli such as hypercellularity and crescent formation were observed from Day 3, and became apparent on Day 7. These results indicated that urinary cystatin C was useful for the early detection of renal damage compared to the conventional biomarkers, but it did not have the superiority to urinary albumin and total protein. Urinary  $\beta$ 2-microglobulin, clusterin, GST- $\alpha$ , and GST- $\mu$  also increased on Day 7. Urinary KIM-1 and NGAL increased from Day 3, indicating their superiority to cystatin C in terms of the early

detection of anti-GBM glomerulonephritis.

In Chapter 3, ZDF rat which developed diabetic nephropathy was used as a model of CKD. Urinary cystatin C level in ZDF rats were higher than that in lean rats (control rats) on Week 12, and it further increased age-dependently. Blood creatinine and UN hardly changed from Week 12 to Week 25. Histopathological slight change of glomeruli was observed on Week 12, and both glomeruli and renal tubule showed apparent alternations on Week 20, and it worsened on Week 25. These results indicated that urinary cystatin C was useful for the early detection of diabetic nephropathy compared to conventional biomarkers, and could monitor the progression of nephropathy. Urinary albumin in ZDF rats, the most sensitive marker of diabetic nephropathy in clinical settings, was also higher than lean rats on Week 12, and further increased age-dependently, indicating the usefulness of urinary cystatin C and albumin was similar. Urinary  $\beta$ 2-microglobulin, clusterin, GST- $\mu$ , KIM-1, and osteopontin in ZDF rats were also higher than those in lean rats on Week 12, and it further increased, indicating the usefulness for the early detection and monitor the progression of diabetic nephropathy.

Additionally, in Chapters 1, 2, and 3, cystatin C was immunohistochemically localized in the proximal renal tubule in the kidney, and the immunoreactivity and positive area for cystatin C were hardly changed regardless of the progression of renal damage in CDDP-induced AKI rats, anti-GBM glomerulonephritis rats, and ZDF rats.

In conclusion, urinary cystatin C was proved to be useful for the early detection of renal damage in AKI whose main lesion was renal tubular injury, AKI whose main lesion was glomerular injury, and diabetic nephropathy, one of CKD, and monitor the progression of diabetic nephropathy. Compared to urinary albumin and total protein, the usefulness of cystatin C was similar to those in AKI whose main lesion was glomerular injury and diabetic nephropathy. Regarding with novel renal biomarkers, urinary KIM-1 was also useful for the early detection for the three types of renal damages in this study, and monitor the progression of diabetic nephropathy. Urinary  $\beta$ 2-microglobulin level was similar to urinary cystatin C. Urinary GST- $\alpha$  and EGF were useful for the early detection of AKI whose main lesion was renal tubular injury, urinary clusterin, GST- $\alpha$ , GST- $\mu$ , and NGAL were useful for that of AKI whose main lesion was glomerular injury. Urinary clusterin, GST- $\mu$ , and osteopontin were useful for the early detection and monitor the progression of diabetic nephropathy. Additionally, cystatin C was immunohistochemically localized in the proximal renal tubule in the kidney, and the immunoreactivity and positive area for cystatin C were not related to the progressions of AKI whose main lesion was renal tubular injury, AKI whose main lesion was glomerular injury, and diabetic nephropathy.