

(1)

氏名（本（国）籍）	富 樫 裕 子（神奈川県）
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 柳 井 徳 磨
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第140号
学位授与年月日	平成28年3月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	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
審査委員	主査 岐阜大学 教授 柳 井 徳 磨 副査 帯広畜産大学 教授 古 林 与志安 副査 岩手大学 教授 御 領 政 信 副査 東京農工大学 教授 渋 谷 淳 副査 岐阜大学 教授 海 野 年 弘

### 学位論文の内容の要旨

シスタチンC（これよりCとする）は、分子量13 kDaのペプチドで、全身の有核細胞から血中に分泌され、腎糸球体でろ過後、近位尿細管で再吸収および異化を受ける。近位尿細管が障害された場合、Cの再吸収は抑制され、糸球体障害では、原尿に漏れ出した生体内高分子により競合的に再吸収が阻害され、尿中Cは増加する。近年、尿中Cは、近位尿細管および糸球体の障害の双方を検出するバイオマーカーとして注目されているが、その動態について完全には解明されていない。本研究では、尿中Cの動態を解明すべく、尿細管障害性の急性腎障害モデル、糸球体障害性の急性腎障害モデルおよび慢性腎臓病モデルとしての糖尿病性腎症モデルを用いて、尿中Cの変動を調べ、既存のバイオマーカー（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、カルビンディンなど）と比較検討し、尿中Cの種々の腎障害におけるバイオマーカーとしての有用性を明かにした。

第1章では、尿細管障害を示すCDDP誘発急性腎障害ラット用い、尿中Cの

動態を調べたところ、投与 1 日目から C は上昇した。一方、血中クレアチニンおよび尿素窒素は、投与 3 日目から上昇を示し、組織学的には、近位尿細管の壊死が投与 3 日目からみられ、5~7 日目で顕著となった。これらのことから、尿中 C は CDDP 誘発急性腎障害では、早期の傷害マーカーとして有用であったが、既知の KIM-1 および GST- $\alpha$  は投与 1 日目から顕著な変化を示したことから、C より優位であると考えられた。

第 2 章では、糸球体病変を示す抗 GBM 糸球体腎炎ラットについて、尿中 C の動態を調べたところ、実験 7 日目から上昇した。血中クレアチニンおよび尿素窒素は 7 日目までほとんど変化せず、抗 GBM 糸球体腎炎のマーカーである尿中アルブミンおよび総タンパクも 7 日目で上昇した。織学的には、3 日目から糸球体の細胞増多および半月形成が軽度に見られ、7 日目で顕著となった。これらのことから、尿中 C は、抗 GBM 糸球体腎炎の早期におけるマーカーとして有用であったが、尿中アルブミンおよび総タンパクに対して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τεリン、GST- $\alpha$  および GST- $\mu$  は、尿中 C と同じく 7 日目で上昇した。尿中 KIM-1 および NGAL は 3 日目から上昇したことから、糸球体腎炎の早期検出に尿中 C よりも優れていると考えられた。

第 3 章において、慢性腎臓病モデルとして ZDF ラットの糖尿病性腎症について、尿中 C を対照の lean ラットと比較したところ、12 週齢から高値を示し、週齢に依存して上昇傾向が認められた。一方、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。組織学的には、12 週齢では軽度の糸球体病変が認め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。これらのことから、尿中 C は、既知の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はより有用であることが示された。また、糖尿病性腎症の診断マーカーとして用いられる尿中アルブミンは、12 週齢から高値を示し、週齢に依存して上昇したことから、尿中 C と同程度の有用性が確かめられた。尿中  $\beta 2$  ミクログロブリン、クラスτεリン、GST- $\mu$ 、KIM-1 およびオステオポンチンもまた、12 週齢で高値を示し、週齢に依存して上昇したことから、尿中 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った。

C の局在につき免疫組織学的に検索したところ、近位尿細管に局在し、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、腎障害の進行に関わらず、C 免疫染色反応性および陽性領域には、変化は見られなかった。

以上、尿中 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、さら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る。尿中アルブミンおよび総タンパクとの比較では、糸球体障害性の急性

腎障害および糖尿病性腎症において、尿中 C のマーカーとしての有用性はそれらと同程度と考える。新規の腎障害バイオマーカーである尿中 KIM-1 は、尿中 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と考えられた。

本研究の成果は、シスタチン C および既知の腎障害の生化学的マーカーの各種の腎障害の過程における動態の特徴を明らかにし、それぞれの有用性について検討した。これらの成果は腎障害の研究における基礎的な情報として、極めて有用である。

### 審 査 結 果 の 要 旨

シスタチン C (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。そのため、近位尿細管の障害により、Cの再吸収が抑制され、糸球体の障害では生体内高分子との競合的な再吸収が阻害され、尿中に増加する。これらの性質を利用して、近位尿細管および糸球体の障害の双方を検出する新しい腎障害バイオマーカーとして注目されている。

申請者は、Cの腎障害バイオマーカーとしての有用性を評価する基礎的検討を行うために、尿細管障害を病変の主体とする急性腎障害モデル、糸球体障害を病変を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 C の変動を調べ、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 B2 ミクログロブリン、カルビンディンなど）と比較し検討し、その結果を三つの章にまとめた。

第1章では、尿細管障害を示した CDDP 誘発急性腎障害ラットにおいて、尿中 C は、投与1日目から上昇を示し、血中クレアチニンおよび尿素窒素も投与3日目から上昇し、組織学的にも、近位尿細管壊死が投与3日目から認められ、5日～7日目では著明であった。これらのことから、尿中 C は誘発性急性腎障害の早期における変化の検出に有用であった。一方、尿中 KIM-1、GST- $\alpha$  および EGF も投与1日目から変動を示したことから、早期検出に有用で、中には尿中 C のそれよりも明確な上昇を示したものもあった。

第2章では、糸球体を主体とする急性腎障害を示す抗 GBM 糸球体腎炎ラットにおいて、尿中 C は実験7日目では上昇したのに対し、血中クレアチニンおよび尿素窒素は7日目までほとんど変動せず、尿中アルブミンおよび総タンパクは7日目で上昇した。組織学的には、3日目から糸球体の細胞増多および半月形成が軽度に見られ、7日目には顕著となった。これらのことから、尿中 C は、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 KIM-1 および NGAL は3日目から上昇したことから、同糸球体腎炎の早期

検出には、Cより優れていた。

第3章において、慢性的な糖尿病性腎症を発症するZDFラットを用いて比較検討した。尿中Cは、対照のleanラットに比較し、12週齢から高値を示し、週齢に依存して上昇した。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。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。これらのことから、尿中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、尿中アルブミンは、leanラットと比較して12週齢から高値を示し、週齢依存的に上昇したことから、尿中Cおよびアルブミンは同程度の有用性と考える。

尿中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。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Urinary cystatin C as a biomarker for acute kidney injury and its immunohistochemical localization in kidney in the CDDP-treated rats  
著 者 名 : Togashi, Y., Sakaguchi, Y., Miyamoto, M. and Miyamoto, Y.  
学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 64 (7-8) : 797-805, 2012
- 2) 題 目 : Urinary cystatin C as a biomarker for diabetic nephropathy and its immunohistochemical localization in kidney in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats  
著 者 名 : Togashi, Y. and Miyamoto, Y.  
学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 65 (5) : 615-622, 2013
- 3) 題 目 : Urinary cystatin C as a renal biomarker and its immunohistochemical localization in anti-GBM glomerulonephritis rats  
著 者 名 : Togashi, Y., Imura, N. and Miyamoto, Y.  
学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 65 (7-8) : 1137-1143, 2013

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 in cells of the human bronchial epithelial cell line NCI-H292

- 著者名 : Togashi, Y., Yamaki, K., Sakai, T., Watanabe-Kobayashi, M., Mue, S. and Ohuchi, K.
- 学術雑誌名 : European Journal of Pharmacology
- 巻・号・頁・発行年 : 345 (2) : 199-206, 1998
- 2) 題目 : Antipruritic activity of the  $\kappa$ -opioid receptor agonist, TRK-820
- 著者名 : Togashi, Y., Umeuchi, H., Okano, K., Ando, N., Yoshizawa, Y., Honda T., Kawamura, K., Endoh, T., Utsumi, J., Kamei, J., Tanaka, T. and Nagase, H.
- 学術雑誌名 : European Journal of Pharmacology
- 巻・号・頁・発行年 : 435 (2-3) : 259-264, 2002
- 3) 題目 : Involvement of central  $\mu$ -opioid system in the scratching behavior in mice, and the suppression of it by the activation of  $\kappa$ -opioid system
- 著者名 : Umeuchi, H., Togashi, Y., Honda, T., Nakao, K., Okano, K., Tanaka, T. and Nagase, H.
- 学術雑誌名 : European Journal of Pharmacology
- 巻・号・頁・発行年 : 477 (1) : 29-35, 2003
- 4) 題目 : Effect of repeated administration of TRK-820, a  $\kappa$ -opioid receptor agonist, on tolerance to its antinociceptive and sedative actions
- 著者名 : Suzuki, T., Izumimoto, N., Takezawa, Y., Fujimura, M., Togashi, Y., Nagase, H., Tanaka, T. and Endoh, T.
- 学術雑誌名 : Brain Research
- 巻・号・頁・発行年 : 995 (2) : 167-175, 2004
- 5) 題目 : Negative regulation of the protein kinase C activator-induced ICAM-1 expression in the human bronchial epithelial cell line NCI-H292 by p44/42 mitogen-activated protein kinase
- 著者名 : Shibuya, Y., Hirasawa, N., Sakai, T., Togashi, Y., Muramatsu, R., Ishii, K., Yamashita, M., Takayanagi, M. and Ohuchi, K.
- 学術雑誌名 : Life Sciences
- 巻・号・頁・発行年 : 75 (4) : 435-446, 2004
- 6) 題目 : In vitro and in vivo pharmacological characterization of the main metabolites of nalfurafine hydrochloride
- 著者名 : Nakao, K., Togashi, Y., Honda, T., Momen, S., Umeuchi, H., Sakakibara, S., Tanaka, T., Okano, K. and Mochizuki, H.
- 学術雑誌名 : European Journal of Pharmacology
- 巻・号・頁・発行年 : 695 (1-3) : 57-61, 2012
- 7) 題目 : Immunohistochemistry of LAMP-2 and adipophilin for phospholipidosis

in liver and kidney in ketoconazole-treated mice

著者名 : Asaoka, Y., Togashi Y., Imura, N., Sai, T., Miyoshi, M. and Miyamoto, Y.

学術雑誌名 : Experimental and Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 65 (6) : 817-823, 2013

8) 題 目 : Spontaneous accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) in proximal renal tubules in an ICR mouse

著者名 : Mutsuga, M., Asaoka, Y., Togashi, Y., Imura, N., Miyoshi, T. and Miyamoto, M.

学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 26 (4) : 429-432, 2013