



MESANGIAL MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHANGE IN THE EARLY STAGE OF MURINE DAUNOMYCIN-INDUCED NEPHROSIS

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山下, 冬樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1052

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 199号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏 名	山 下 冬 樹		
論文題目	MESANGIAL MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHANGE IN THE EARLY STAGE OF MURINE DAUNOMYCIN-INDUCED NEPHROSIS (マウス・ダウノマイシン腎症発症早期におけるメサングイウムの形態的及び機能的変化について)		

博士(医学) 山下 冬 樹

論文題目

MESANGIAL MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHANGE IN THE EARLY STAGE OF MURINE DAUNOMYCIN-INDUCED NEPHROSIS

(マウス・ダウノマイシン腎症発症早期におけるメサンギウムの形態的及び機能的変化について)

論文の内容の要旨

【目的】

アントラサイクリン系抗悪性腫瘍抗生物質であるダウノマイシン (DM) やアドリアマイシンは、ラットやマウスにネフローゼ症候群と進行性の腎機能低下を引き起こす。特徴的な病理形態学的変化として、腎症早期には糸球体上皮細胞の空胞化、足突起の癒合を、後期には糸球体に巣状の硬化性病変や尿細管間質の線維化、細胞浸潤を呈する。蛋白尿の発症の原因としては、糸球体上皮細胞障害が考えられ、糸球体硬化の原因としては糸球体の過剰濾過やメサンギウムの機能異常が提唱されているが、その機序は現在のところなお明らかでない。我々は、A/Jマウスに腎症を惹起すると、糸球体上皮細胞の変化に並行して早期よりメサンギウムに形態学的な変化が生じることを認めたため、糸球体硬化進展機序解明の一助として、発症早期の糸球体メサンギウムの組織学的および機能的変化を検討した。

【方法】

実験には、当大学動物実験施設で飼育繁殖したA/Jマウスの雄を用いた。

12週齢のA/Jマウス5匹に、DM20mg/kgを尾静脈より注射し、DM投与前及び投与後1週、2週、3週にて以下の検討を行った。コントロール群 (N=5) には、同量の生理食塩水を静注した。

- (1) 代謝ケージにて24時間蓄尿し、免疫拡散法にて一日尿中アルブミン排泄量を測定した。
- (2) 屠殺後両腎を摘出し、光顕および透過電顕用検体を作製した。光顕写真よりPAS染色陽性メサンギウム領域の面積を画像解析装置を用いて測定し、透過電顕写真より足突起の癒合度を計測した。
- (3) 凍結切片にてIV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンの量的変化とIgG, IgM, C3の沈着を蛍光抗体法を用い半定量的に検討した (0; no staining, 0.5; trace, 1; slight staining, 2; moderate staining, 3; intensive staining)。
- (4) 新鮮凍結した検体の腎皮質より poly (A)+RNA を抽出し、IV型コラーゲンとフィブロネクチンの mRNA の発現量を Northern Hybridization 法にて検討した。
- (5) 屠殺時心腔より採血し、血漿中フィブロネクチン濃度を EIA にて測定した。
- (6) メサンギウムの macromolecules 処理能を検討する目的で、デキストラン鉄 (分子量200 kDa) 20mg/kgを静注し、3日目の糸球体内及び糸球体外メサンギウム領域の鉄の沈着程度を半定量的に測定した (0; no staining, 1; mild staining, 3; intensive staining)。

【結果】

尿中アルブミン排泄量は、DM投与群で1週後より増加し始め、3週で5 mg/dayに達した。足突起の癒合度、メサンギウム基質領域面積もこれと平行して1週間後より有意に増加した。

DM投与後3週ではメサンギウム基質を構成する細胞外基質蛋白の中で、IV型コラーゲン、ラミニンには変化がみられず、フィブロネクチンのみ有意に増加がみられた (DM群 vs コントロール群、IV型コラーゲン; 2.01 ± 0.12 vs 1.8 ± 0.35 、ラミニン; 1.83 ± 0.09 vs 1.61 ± 0.14 、フィブロネクチン; 2.79 ± 0.04 vs 2.15 ± 0.08)。

IgG、IgM の有意な沈着を認めたが、C 3 の沈着には変化がみられなかった (DM 群 vs コントロール群; IgG ; 1.84 ± 0.12 vs 0.21 ± 0.08 , IgM ; 1.96 ± 0.19 vs 0.77 ± 0.14 , C 3 ; 0.33 ± 0.15 vs 0.4 ± 0.12)。

血漿フィブロネクチンは、DM 投与後 3 週にて上昇が認められた。

また、DM 投与 3 週後で腎組織内の mRNA の発現量は、IV型コラーゲン、フィブロネクチンともに投与前と比較して増加を認めなかった (DM 群 vs 投与前群、IV型コラーゲン/GAPDH; 0.61 ± 0.06 vs 0.48 ± 0.11 、フィブロネクチン/GAPDH ; 0.78 ± 0.29 vs 0.6 ± 0.05)。

DM 腎症発症後のデキストラン鉄の沈着様式は、コントロール群が糸球体血管極付近の糸球体傍装置近傍に集積するのに対して、メサンギウム領域に長期にとどまる傾向がみられた。

【考案及び結論】

マウス・ダウノマイシン腎症モデルでのメサンギウムの変化は尿蛋白の増加や上皮細胞の変化とほぼ同時に、腎炎発症早期から進行する。このことから、上皮細胞の変性や高度の蛋白尿に伴う二次的な変化とは考えにくい。

メサンギウム細胞基質蛋白では、IV型コラーゲン、ラミニンには量的な変化がなく、フィブロネクチンのみが著明に増加した。一方、mRNA の発現量においては、IV型コラーゲン、フィブロネクチンともに増加を認めなかった。さらに血中蛋白質である IgG、IgM がメサンギウムに大量に沈着し、デキストラン鉄を用いたトレーサー実験においても、糸球体よりの除去が低下している可能性が示されたことにより、流血中の macromolecules の沈着がメサンギウムの拡大の主体と考えられる。

フィブロネクチンは、440Kd の糖蛋白で広く細胞外基質に分布し、創傷治癒などにおいて細胞外基質蛋白の構成に重要な役割を演じていると考えられる。フィブロネクチンの沈着に関しては、メサンギウムの異物処理能の低下とともに、流血中フィブロネクチンのメサンギウムへの流入量の増加が関与している可能性も考えられるが、種々の機能を持つフィブロネクチンが、腎症初期にメサンギウムに沈着することは、ダウノマイシン腎症後期の糸球体硬化の発症、進展に関与する可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

Daunomycin (DM) はアントラサイクリン系の抗悪性腫瘍薬である。アドリアマイシン (ADM) を代表とするこの系統の物質は進行性の腎障害を来すことで知られており、実験的な腎症のモデルとしてよく利用されている。申請者はA/JマウスがDMに対する感受性の高いことを知り、A/JマウスにDMを投与して、その発症早期の糸球体メサンギウム細胞の変化を追求した。

【方法】12週齢のA/JマウスにDM20mg/kgを尾静脈より注射し、DM投与前及び投与後1週、2週、3週にて以下の検討を行った。コントロール群には、同僚の生理食塩水を静注した。(1)代謝ケージにて24時間蓄尿し、免疫拡散法にて一日尿中アルブミン排泄量を測定した。(2)屠殺後両腎を摘出し、光顕および透過電顕用検体を作製した。光顕写真よりPAS染色陽性メサンギウム領域の面積を画像解析装置を用いて測定し、透過電顕写真より足突起の癒合度を計測した。(3)凍結切片にてIV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンの量的変化とIgG、IgM、C 3沈着を蛍光抗体法を用い半定量的に検討した。(4)新鮮凍結した検体の腎皮質よりpoly (A) +RNAを抽出し、IV型コラーゲンとフィブロネクチンのmRNAの発現量をnorthern hybridization法にて検討した。(5)屠殺時心腔より採血し、血漿中フィブロネクチン濃度をEIAにて測定した。(6)メサンギウムのmacromolecules処理能を検討する目的で、デキストラン鉄(分子量200kDa)20mg/kgを静注し、3日目の糸球体内及び糸球体外メサンギウム領域の鉄の沈着程度を半定量的に測定した。

【結果】(1)(2)尿中アルブミン排泄量は、DM 投与群で1 週後より増加し始め、3 週で5 mg / dayに達した。足突起の癒合度、メサングウム基質領域面積もこれと平行して1 週後より有意に増加した。(3)DM 投与後3 週ではメサングウム基質を構成する細胞外基質蛋白の中で、IV型コラーゲン、ラミニンには変化がみられず、フィブロネクチンのみ有意に増加がみられた。また、IgG、IgM の有意な沈着を認めたが、C3 の沈着は増加しなかった。(4)DM 投与3 週後で腎組織内のIV型コラーゲン、フィブロネクチン mRNA の発現量は、ともに投与前と比較して増加を認めなかった。(5)血漿フィブロネクチンは、DM 投与後3 週にて上昇が認められた。(6)腎症発症後のデキストラン鉄の沈着様式は、コントロール群が糸球体血管極付近の糸球体傍装置近傍に集積するのに対して、メサングウム領域にとどまる傾向がみられた。

【考案及び結論】マウスにおけるダウノマイシン腎症でのメサングウムの変化は尿蛋白の増加や上皮細胞の変化とほぼ同時に、腎炎発症早期から進行することから、上皮細胞の変性や高度の蛋白尿に伴う二次的な変化とは考えにくい。メサングウム細胞基質蛋白では、IV型コラーゲン、ラミニンには量的な変化がなく、フィブロネクチンのみが著明に増加した。一方、mRNA の発現量においては、IV型コラーゲン、フィブロネクチンともに増加を認めなかった。

さらに血中蛋白質である IgG、IgM がメサングウムに大量に沈着し、デキストラン鉄を用いたトレーサー実験においても、糸球体よりの除去能が低下している可能性が示されたことにより、流血中の macromolecules 沈着がメサングウムの拡大の主体と考えられる。フィブロネクチンは440kD の糖蛋白で、広く細胞外基質に分布し、創傷治癒などにおいて細胞外基質蛋白の構成に重要な役割を演じていると考えられる。フィブロネクチンの沈着に関しては、メサングウムの異物処理能の低下とともに、流血中フィブロネクチンのメサングウムへの流入量の増加が関与している可能性も考えられるが、種々の機能を持つフィブロネクチンが、腎症初期にメサングウムに沈着することは、DM 腎症後期の糸球体硬化の発症、進展に関与する可能性が示唆され、DM 早期の腎障害発症の機序を解明する上で異議ある所見であると評価された。

以上の発表に対して、この論文の内容について次のような質問が出された。

- 1) アントラサイクリンによる腎症の特徴
- 2) 早期の変化を見るために、感受性の高いA/Jマウスを用いた理由
- 3) 年齢による感受性の差
- 4) DM 投与量の20mg/kgは大量ではないか
- 5) ADM と DM の比較、DM の LD50
- 6) 3 週で観察を中止した理由
- 7) mesangial thickening、expansion、sclerosis の定義
- 8) mesangial area の測定法
- 9) 投与したデキストラン鉄の経路
- 10) 血中フィブロネクチンの上昇が1～2 週で見られない理由
- 11) 3 週目に見られる血中フィブロネクチン上昇の機序
- 12) フィブロネクチンの mRNA は増加しないのか
- 13) マクロファージは関与しないのか
- 14) 活性酸素は関係しないか

これらの質問に対して申請者の回答は適切であり、この論文の問題点を十分理解しており、博士（医学）の学位を与えるのにふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	藤	田	公	生					
	副査	教授	中	島	光	好	副査	教授	山	下	昭
	副査	助教授	三	浦	克	敏	副査	講師	山	本	龍