

氏名	やま だ やまぐち み すず 山 田 (山 口) 美 鈴
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1475 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 学 専 攻
学位論文題目	The Molecular Mechanism of Anemia Associated with Chronic Renal Disorder in Hereditary Nephritic Mouse (ICGN strain) (遺伝性腎疾患 (ICGN) マウスを用いた腎性貧血発症機序の解明)
論文調査委員	(主 査) 教 授 久 米 新 一 教 授 矢 野 秀 雄 教 授 佐 々 木 義 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

腎臓は血液中の老廃物を濾過して体外に排出し、体液の恒常性を保つ働きをしている。腎臓は代償能が高いが再生能に乏しいため、ひとたび機能が破綻すると完全に回復することなく腎不全に進行する。家畜やヒトにおいて腎疾患の多くは、遺伝的素因をもつ個体が過剰なタンパク質や食塩を摂取することで発症するとされるが、この遺伝的素因の本体が未だ明らかでない。家畜の品種改良が進む近年、母体の良好な腎機能の維持が産仔数の増加と効率的な妊娠に影響すると考えられている。腎疾患においては、腎臓自体の機能低下に加えて、二次的障害として貧血（腎性貧血）が頻発し、Quality of Life (QOL) を左右する重篤な問題となっている。腎性貧血の根本的治療法はまだなく、慢性腎疾患、特に遺伝性腎疾患における腎性貧血の発症機序は有用な病態モデル動物が少ないため未解明である。遺伝性腎疾患 (ICGN) マウスは、1986年に国立感染症研究所にて確立された The institute of Cancer Research (ICR) マウスの突然変異体であり、数少ない自然発症性の腎疾患モデルである。本論文では、ICGN マウスの腎性貧血病態モデルとしての有用性並びに腎機能障害進行と腎性貧血発症の関連性および誘因を検討した。主な内容は、以下の通りである。

1. 雄性 ICGN マウス (10~30週齢) を、血清中クレアチニン値にて未発症期、発症初期と末期の3群に分類し、また健常対象として同週齢の雄性 ICR マウスを用い、血清生化学検査と病理組織化学的解析を行った。ICGN マウスでは、慢性腎疾患の進行に伴って生化学的变化 (タンパク尿、低タンパク血症、貧血) や病理学的变化 (糸球体メサンギウム領域や近位尿細管での細胞外マトリックスの異常蓄積、増殖細胞とアポトーシス細胞の増加) が観察された。
2. 腎病態の進行に伴って、ICGN マウスは貧血が顕著となった。発症初期においては、ヘマトクリット値・ヘモグロビン量・赤血球数が有意に減少し、平均赤血球容積 (MCV)・平均ヘモグロビン含有量 (MCH) が不変であることから、ICGN マウスが正球性正色素性貧血 (腎性貧血) を発症していることが確認された。
3. 赤血球産生を促進するサイトカインであるエリスロポイエチン (EPO) の不足が ICGN マウスの腎性貧血の原因か否かを検討するために、ヒト組換え型 EPO の皮下投与を行った。その結果貧血は有意に改善され、末梢血中 EPO 濃度は低下した。骨髄と腎臓においてヒト組換え型 EPO 投与による組織学的変化は認められなかったため、ICGN マウスにおける腎性貧血は EPO 受容体やその下流のシグナル伝達系に欠陥はなく、EPO の不十分な産生に起因すると考えられた。
4. ICGN マウスは発症末期において小球性貧血を示し、血清中铁濃度の低下・脾臓での溶血・鉄結合タンパク質の尿漏出を伴う鉄欠乏が ICGN マウスの貧血進行の誘因であると推察された。血清中 EPO 濃度を調べたところ、ICGN マウスでは EPO 濃度が低く、また腎病態の重篤化に伴って尿中に EPO 漏出を認めた。EPO-mRNA の発現を調べたところ、ICGN マウスでは腎障害が進行するにつれて、主たる産生場所である腎臓以外に肝臓でも EPO-mRNA の発現が起こっていた。ICGN マウスでは、腎臓の EPO 産生が不十分となり、代償的に肝臓で EPO 産生が行われていると推察された。

5. 高感度 *in situ* hybridization (ISH) 法にて、腎臓における EPO 産生細胞を検出したところ、EPO 産生細胞は腎皮質中間部尿細管の間質に分布しており、健常対象の ICR マウスと腎疾患を発症する ICGN マウス間では産生部位に違いは認められなかった。低酸素 (7%O<sub>2</sub>) による EPO 産生を誘導したところ、ICR マウス・ICGN マウスともに、EPO-mRNA 量および EPO 産生細胞数は増加したが、ICGN マウスではタンパク質レベルの EPO 増加が抑制されていた。したがって、ICGN マウスの腎性貧血は、腎臓における EPO 産生細胞のタンパク質翻訳調節機構の異常によるものと推察された。

### 論文審査の結果の要旨

家畜でもヒトにおいても腎疾患の多くは、遺伝的素因をもつ個体が過剰なタンパク質や食塩を摂取することで発症するが、未だ遺伝的素因の本体が明らかでない。慢性腎不全などの慢性腎疾患において問題となる腎性貧血は、腎障害の予後のパラメーターとして、また Quality of Life (QOL) を左右する因子として注目されているが、長年その発症機構が未解明のままであり、根本的治療法は確立されていない。特に、遺伝性腎疾患における腎性貧血の発症機序は有用な病態モデル動物が少ないため説明が遅滞している。本論文は、遺伝性腎炎症候群の病態モデルである ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) 系マウスを用いて、腎性貧血モデルとしての適合性、腎機能障害進行と腎性貧血発症の関連性および誘因について調べたものであり、評価される主な点は以下の通りである。

1. ICGN マウスは正球性正色素性貧血を発症しており、優れた腎性貧血モデルであることを確認した。また、ICGN マウスは腎病態の進行に伴ってタンパク尿や低タンパク血症などの生化学的変化や、細胞外マトリックスの異常蓄積、増殖細胞とアポトーシス細胞の特徴的な局在などの病理学的変化を観察した。
2. ICGN マウスにおける腎性貧血は、赤血球産生を促進するサイトカインであるエリスロポイエチン (EPO) の投与により有意に改善し、骨髄と腎臓における組織学的変化が認められなかったことから、EPO 受容体やその下流のシグナル伝達系に欠陥はないと考えられた。また、血清中 EPO 濃度を調べたところ、ICGN マウスでは EPO 濃度が低く、また腎病態の重篤化に伴って尿中に EPO 漏出がおこったことから、ICGN マウスの貧血は EPO の不十分な産生に起因することを示した。
3. ICGN マウスは発症末期において小球性貧血を示し、血清中鉄濃度の低下、脾臓での溶血と鉄結合タンパク質の尿漏出による鉄欠乏が ICGN マウスの貧血進行の誘因であると推察した。また EPO-mRNA の発現を調べたところ、主たる産生場所である腎臓以外に肝臓でも EPO-mRNA の発現が起こっており、ICGN マウスでは腎臓の EPO 産生が不十分となり、代償的に肝臓で EPO 産生が行われていると推察した。
4. EPO の主要な産生部位は腎であるが、腎における産生細胞は未だ確定されておらず、その産生制御機構は未知の部分が多い。本論文では、高感度 *in situ* hybridization (ISH) 法にて、放射性プローブでは同定が煩雑かつ困難であった EPO 産生細胞を再現性よく高感度に検出しており、腎臓の EPO 産生細胞が腎皮質中間部尿細管の間質に分布する線維芽様細胞であることを明らかにした。また、ICGN マウスでは EPO 産生細胞において mRNA 転写レベルでは異常がなく、タンパク質翻訳調節機構に異常があると推察した。

以上のように、本論文は ICGN マウスが腎性貧血病態モデルとして有用であることを明らかにし、腎性貧血の発症機序に関する多くの知見を示したものであり、畜産学、動物生体機構学、動物生理学に寄与する点大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。