

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 飯田 知子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 632 号
学位授与の日付 平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Decreased urinary calbindin 1 levels in proteinuric rats and humans with distal nephron segment injuries
(遠位尿細管傷害のラットとヒトにおける尿中 calbindin1 蛋白質排泄の減少について)
論文審査委員 主査 教授 成田 一衛
副査 教授 齋藤 昭彦
副査 講師 後藤 眞

博士論文の要旨

【目的】近年、腎傷害の新しい尿バイオマーカー候補がいくつか提唱されてきた。しかし、それらは傷害されたネフロン部位を必ずしも特定しない。申請者らは傷害されたネフロン部位をより鋭敏に特定できる尿バイオマーカーを新たに決定したいと考え検討を続けている。Calbindin-D28k (CALB1) は細胞内 Ca²⁺ 結合蛋白で脳や腎臓に発現する。正常腎臓では遠位尿細管から皮質集合管にかけてのネフロン部位に局在し、尿中へも排泄される。遠位ネフロン傷害の際に腎臓内 CALB1 発現が増加または減少し、それに伴い尿中排泄が変動すると仮定し検討した。【方法】ラットに水腎症 (UUO) と半月体形成性糸球体腎炎 (anti-GBM GN)、シスプラチン腎症 (Cis) をそれぞれ 5 匹ずつ作成、疾患ラット腎臓における CALB1 の発現を正常ラット腎臓と比較した。蛋白質レベル (腎臓の抗体染色) と遺伝子レベル (腎臓皮質 real-time PCR) で検討した。尿では、anti-GBM GN と Cis ラットと正常ラットを比較し、尿中の CALB1 蛋白質発現を Western blotting で検討した。またヒトでの検討を、血尿/蛋白尿にて腎生検を行った 10 名の小児について行った。5 名は組織学的には異常を認めず、他 5 名には IgA 腎症で、種々の程度の尿細管障害を伴っていた。CALB1 の蛋白質発現を腎生検標本 (抗体染色) と尿 (ELISA) で調べ、それぞれ正常腎組織、健常小児尿と比較した。

【成績】ラットでは、UUO 腎 (14 日目) において遠位～近位尿細管に広範な傷害を認め、CALB1 の発現は蛋白質・遺伝子とも正常腎より著明に低下していた。また、AQP1, 2, 3 の減少と比較しても、CALB1 の発現は著明に低下していた。Anti-GBM GN 腎 (14 日目) では拡張した遠位ネフロンで蛋白質発現が低下していたが、多くの尿細管では発現が保たれていた。尿 CALB1 蛋白質排泄は Anti-GBM GN の経過に伴って減少していた。また、尿中カルシウム排泄量 (Cre) は正常ラットと比較し、増加していた。尿中 CALB1/クレアチニン (Cre) の排泄減少は Anti-GBM GN の経過 4 日目から確認され、血清 Cre の上昇も同様に 4 日目から確認されており、血清 Cre 上昇に先立つ尿中 CALB1 の減少を示すことはできなかった。近位優位の尿細管傷害のモデルの Cis においても腎、尿中 CALB1 蛋白質低下が認められたが軽度であった。ヒトでの

検討では、IgAN 患児において、間質尿細管病変の明らかな腎生検組織で傷害遠位尿細管部位に CALB1 蛋白質発現が低下していた。尿 CALB1 は IgAN で健常小児と比較して低下する傾向が見られたが、有意差はなかった。

【考察】 CALB1 は遠位尿細管細胞、皮質集合管に局在し、また正常ヒトの尿中に排泄されるタンパクである。遠位尿細管細胞からビタミン D 依存性にカルシウムの再吸収を行っている。過去の文献によれば、CALB1 knockout mice では wild type mice と比較し、尿中カルシウム/Cre が 3 倍ほど増加する。また糖尿病 mice では、糖尿病に関連した高カルシウム尿症のため、遠位尿細管細胞内の CALB1 発現が増加すると報告されている。逆に、シクロスポリンや FK-506 のようなカルシニューリン阻害剤を投与された mice ではビタミン D の活性化障害のため腎 CALB1 発現が低下したと報告されている。今回の研究では、腎臓と尿中 CALB1 を調べ、尿中 CALB1 が早期の遠位尿細管障害のバイオマーカーとなるか検討した。UUO モデルでは、遠位尿細管細胞が尿圧により過剰に引き伸ばされて細胞が傷害されアポトーシスに至るために、細胞内に存在している CALB1 の発現が減少するのだろうと考えた。Anti-GBM GN では、腎 CALB1 の発現が遺伝子・蛋白質ともに減少、尿中 CALB1 排泄は 4 日目より減少を認めた。Anti-GBM GN では遠位尿細管傷害のみならず、糸球体傷害が一義的だが CALB1 は糸球体に存在せず、遠位尿細管に局在する蛋白質であるため、尿細管傷害を検討するためのモデルとして用いた。Cis、尿細管障害のモデルとして用いたが、8 日目より尿、腎どちらにおいても CALB1 蛋白質の発現低下がみられた。血清 Cre の上昇は 2 日目から見られた。Cre の上昇は近位尿細管傷害の影響と考えられるが、このモデルにおいても血清 Cre 上昇より早期の尿 CALB1 の減少を示すことはできなかった。ヒトでの検討では、腎での CALB1 タンパク発現は IgAN 患児において減少していたが、尿 CALB1 については減少する傾向がみられたが、有意差は認められなかった。今回の IgA 患児の尿細管傷害は軽度～中等度であり、高度な遠位尿細管細胞傷害には至っていなかったためと考えている。また、尿への CALB1 排出は、発病期間、年齢、性別、血清カルシウム、食事等により変化する可能性もある。今後、症例数を増やし、重度の尿細管傷害患者での検討も必要と考えられた。

【結論】 最近、NGAL, L-FABP, KIM-1, cystatinC, IL-18 などが腎傷害の早期の尿バイオマーカーとして報告されている。それらは腎傷害時に尿中排出が増加する。しかし、CALB1 は尿、腎ともに発現が減少する特徴的であった。尿細管傷害時、血清クレアチニンの上昇より早期の尿 CALB1 の減少を示すことはできなかったが、尿 CALB1 の減少は、傷害された遠位ネフロンにおける CALB1 の発現低下を反映していると考えられ、尿 CALB1 は遠位ネフロン傷害を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

申請者らは傷害されたネフロン部位をより鋭敏に特定できる尿バイオマーカーとして、Calbindin-D28k (CALB1) に注目し、遠位ネフロン傷害の際に腎臓内 CALB1 発現の変化が起こり、それに伴い尿中排泄が変動すると仮説を立てた。そして、幾つかの実験モデルを用い、その有用性について検討した。その結果、水腎症 (UUO) と半月体形成性糸球体腎炎 (anti-GBM GN)、シスプラチン腎症 (Cis) をもつラットでは、UUO 腎 (1 4 日目) において遠位～近位尿細管に広範な傷害を認め、CALB1 の発現は蛋白質・遺伝子とも正常腎より著明に低下していた。また、Anti-GBM GN 腎 (1 4 日目) では拡張した遠位ネフロンで蛋白質発現が低下していたが、多くの尿細管では発現が保たれていた。尿 CALB1 蛋白質排泄は Anti-GBM GN の経過に伴って減少していた。更には、尿中カルシウム排泄量 (/Cre) は正常ラットと比較し、増加していた。近位優位の尿細管傷害のモデルの Cis においても腎、尿中 CALB1 蛋白質低下が認められたが軽度であった。また、血尿/蛋白尿にて腎生検を行った小児の腎生検検体での検討では、IgA 腎症患児において、傷害遠位

尿細管部位に CALB1 蛋白質発現が低下していた。

以上より、尿 CALB1 は遠位ネフロン傷害を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆されたことから、学位論文の価値があると判断した。