

アルポート症候群モデルマウスの尿細管間質における慢性病変と三次リンパ組織形成に関する解析

無断転載禁止

Tubulointerstitial chronic lesions and tertiary lymphoid tissue in a mouse model of Alport Syndrome

○小林 亮介、堀 遼太郎、階上 健太郎、中村 小百合、神鳥 仁志、竹山 道康、横山 孝太郎

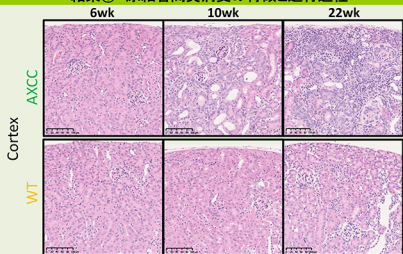
Axcelead Drug Discovery Partners株式会社, Integrated and Translational Science



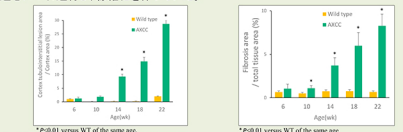
背景と目的

我々は以前、自社で作製したアルポート症候群モデルマウス (AXCCマウス、以下AXCC) が、6週齢からアルブミン尿と電顕的な糸球体基底膜異常を呈し、26-30週齢で死亡することを報告した。本マウスはヒトのX染色体連鎖型Alport症候群のCol4A5変異を導入したモデルマウスであり、wild typeマウス (WT) では糸球体および腎乳頭部に発現するcollagen type IV α 3鎖が発現消失していることを確認している。現在AXCCは、核酸医薬を用いたエグゾススキッピング療法の薬効評価²⁾やバイオマーカー評価、薬物動態研究などの医薬品開発研究に用いられており、その糸球体病変の進行過程や半月体構成細胞³⁾のような病態進行の詳細も徐々に明らかになっている。今回の研究では、AXCCの慢性病態進行に関連すると考えられる尿細管間質の病理変化およびヒト腎障害モデルマウスで障害後の修復不全の一因として知られる三次リンパ組織 (TLT) 形成に関する解析を行った。

結果① 尿細管間質病変の特徴と進行過程

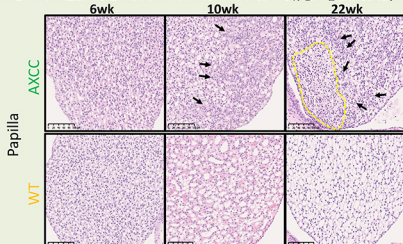


皮質尿細管間質病変: 10週齢以降のAXCCにおいて皮質～髓質浅層における再生性尿細管が観察され、リンパ球を主体とする炎症性細胞浸潤を伴っていた。本病変は週齢が進むにつれ進行し、線維化を伴っていた。



皮質尿細管間質病変面積 / 皮質面積
14週齢以降のAXCCで同週齢のWTに比べて有意に増加し、10週齢でも増加傾向がみられた。

線維化面積 / 総組織面積
10週齢以降のAXCCで同週齢のWTに比べて有意に増加していた。

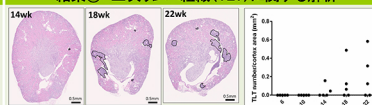


乳頭部病変: 10週齢以降のAXCCの腎乳頭部において、集合管上皮の単細胞壊死・脱落、再生性変化、管腔の拡張など (矢印) が観察された。細胞成分の乏しい線維化巣 (黄点部) として観察される場合もあった。皮質病変との連続性は観察されなかった。

【今回の解析結果を含めたAXCCマウスの病態進行過程】

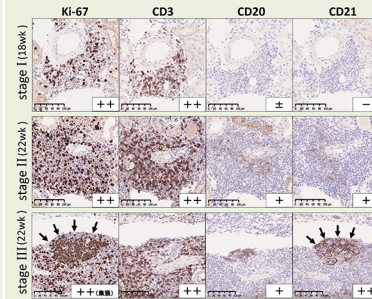
	Age(weeks)	6	10	14	18	22
遺伝子変異に起因	糸球体病変 (TEM観察)	○	○	○	○	○
	糸球体病変 (光顕観察)	—	○	○	○	○
二次的な慢性病変	乳頭部病変	—	○	○	○	○
	皮質尿細管間質病変	—	○	○	○	○
	TLT形成	—	—	○	○	○

結果② 三次リンパ組織 (TLT) に関する解析



AXCCにおいてTLT (黒線内) が14週齢から観察され、週齢が進むにつれTLT面積/皮質面積割合が増加していた。WTではTLTは観察されなかった。

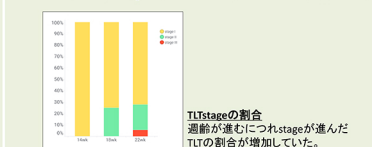
TLT数値 / 皮質面積 (mm²)
面積割合と同様、14週齢以降徐々に増加していた。



AXCCにおけるTLTの代表的なIHC結果とstage分類 (文献4)

stage I: Follicular dendritic cell (CD21陽性) 浸潤なし
stage II: Follicular dendritic cell (CD21陽性) 浸潤あり
stage III: Ki-67陽性細胞集簇、CD21強陽性の胚中心形成

- TLTは主にリンパ球から構成されていた。
- Bリンパ球の一部はstage IIあるいはIIIの成熟したTLT内に浸潤していた。



考察

AXCCにおける皮質尿細管間質病変は、糸球体からのタンパク漏出に起因する二次的な病変と推察された。乳頭部病変についてはその発生機序は明らかではないが、遺伝子変異に直接的に関連している可能性が考えられた。これらは10週齢と早期から発現しており、比較的短期間でその薬効評価が可能であることが示唆された。またAXCCでは、高齢者や移植腎での予後不良因子や新規治療標的と考えられているTLTが14週齢から発現していた。AXCCにおけるTLTは、発現無に個体差が大きいものの、その特徴はヒトや他の腎障害モデルマウスと同様であった。以上より、本マウスがアルポート症候群あるいは糸球体からのタンパク漏出に起因する慢性腎臓病のcommon pathway、特に慢性炎症や線維化を標的とした医薬品の創薬研究に有用であることが示唆された。

材料と方法

6, 10, 14, 18, 22週齢、各5例の無胎盤雄性AXCC及びwild type(WT)マウスから腎組織を採材し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定、FFPEブロックを作製し、HE, Sirius red染色を実施した。さらにCD3 (Tリンパ球マーカー)、CD20 (Bリンパ球マーカー)、CD21 (Follicular dendritic cellマーカー)、Ki-67 (抗核 (増殖細胞マーカー) を用いた免疫染色を実施した。

解析①: 尿細管間質病変を病理組織学的に評価し、さらに皮質尿細管間質病変および線維化を画像解析ソフトHALO (Indica Labs) を用いて定量化し、統計解析を実施した。

解析②: CD3、CD20、CD21、Ki-67染色結果を病理組織学的に評価し、TLT (免疫動脈周囲の高密度なリンパ球集簇) の個数、面積の計測、stage分類 (Yanagitaの文献8) を実施した。

【参考文献】
1. Hashikuni A, Asahina M, Nishi K, Ijima K, Nagata M, Takayama M. Establishment of X-linked Alport syndrome model mice with a Col4A5 mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; Dec 12:1781-86.
2. Yamamura T, Nishi K et al. Development of an exon skipping therapy for X-linked Alport syndrome with truncating variants in COL4A5. *Nat Commun*. 2020; Jan 31:13277.
3. Song JY, Nagata M et al. Bidirectional, non-normalizing glomerular oncogenesis are the critical pathophysiology in X-linked Alport syndrome mouse model harboring nonsevere mutation in human COL4A5. *Sci Rep*. 2020; Nov 3:10131:18991.
4. Sato Y, Yanagita M et al. Developmental stages of tertiary lymphoid tissue reflect local injury and inflammation in mouse and human kidneys. *Kidney Int*. 2020; Aug 9:922:448-463.

本誌製版協力: COE 編集
発行者名: 小林 亮介、堀 遼太郎、階上 健太郎、中村 小百合、神鳥 仁志、竹山 道康、横山 孝太郎 (本誌専科)
□ 研究開発-医薬品開発に関する情報提供を承知し、
過剰な情報提供に際しては、貴社からご返信するご返信にはご留意ください。