

牛の腎異形成の細胞接着関連タンパク質の発現に 注目した病理学的検討

古 田 信 道^{1)†} 須 藤 庸 子²⁾

1) 山形県中央家畜保健衛生所 (〒990-2161 山形市漆山 736)

2) 山形県最上家畜保健衛生所 (〒996-0002 新庄市金沢大道上 2034)

(2018年5月14日受付・2018年12月6日受理)

要 約

2例の子牛の腎異形成について、それらの病理組織学的特徴と、細胞接着関連タンパク質の免疫組織化学的局在を解析した。両症例の左右の腎臓は退色し、表面には凹凸が生じ、組織学的には症例1で間質の広範囲な線維化、症例2で巣状線維化を認めた。密着結合、接着結合及びヘミデスモゾームそれぞれの構成タンパク質であるクローディン16、Kカドヘリン及びインテグリン $\alpha 6$ の免疫組織化学的染色を実施したところ、両症例においてクローディン16及びKカドヘリンの異常局在を認めた。以上の結果から、密着及び接着結合に関連したタンパク質の異常局在は、牛の腎異形成の発生に関連している可能性が示唆された。——キーワード：牛、クローディン16、Kカドヘリン、腎異形成。

-----日獣会誌 72, 279~284 (2019)

腎異形成は腎組織の分化異常に起因する疾患で、年齢とマッチしない未分化・未熟、または原始尿細管等の異常な組織構造を有するものと定義されている [1]。牛では、クローディン16欠損症における腎異形成が知られている。これは、細胞接着装置のうち、密着結合の一構成因子であるクローディン16遺伝子の欠失に起因する常染色体劣性の遺伝性疾患であり [2-4]、タンパク質の欠損により腎尿細管あるいは腎単位の形成異常を呈する [5, 6]。

人における腎異形成の代表例である常染色体優性多発性嚢胞腎では、正常では尿細管上皮細胞の側方面にのみ局在するデスモゾームが管腔側にも局在する局在異常によって、細胞が管腔方向に積み重なり、最終的に嚢胞化する [7]。細胞接着装置は細胞同士の連結や固定を担うタンパク質複合体であり、密着、接着、デスモゾーム、ギャップ、そして細胞と基底膜をつなぐヘミデスモゾーム結合から成る [8]。

牛においては、クローディン16欠損に起因する腎異形成が報告されている一方で、クローディン16欠損がみられない腎異形成も報告されており、その原因解明の糸口はほとんど見つかっていない。

そこで、本論文においては腎異形成を呈した子牛2症

例について、尿細管上皮における細胞接着関連タンパク質の局在性を免疫組織化学的に解析して、腎異形成へのこれらのタンパク質の関与を検討した。

材料及び方法

供試動物：両症例の4代祖以前は共通で、それぞれクローディン16欠損症保因牛ではなく、症例2については家畜改良事業団による遺伝子検査の結果、クローディン16遺伝子に異常は認めなかった。また、両症例は同一農場で飼育されていた。

症例1は雄、2カ月齢の黒毛和種、平成28年4月3日に腹痛により初診。その後、粘液を混じた便を排泄し、さらにBUN及び血中クレアチニン濃度の上昇が認められ、加療するも4月11日に死亡した。死亡直後に、病性鑑定のために、剖検を行った。症例2は雌、2カ月齢の黒毛和種、平成28年5月14日に、下痢、発咳にて初診。腸炎及び肺炎と診断されたのち、加療により一時回復するも6月3日に死亡し、死亡直後に、病性鑑定のために、剖検を行った。

病理組織検査：両症例とも、剖検したのち、両側の腎臓を含む主要臓器を20%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋して薄切後、常法どおりにヘマトキシリ

† 連絡責任者：古田信道 (山形県中央家畜保健衛生所)

〒990-2161 山形市漆山 736 ☎ 023-686-4410 FAX 023-686-5715 E-mail : furutan@pref.yamagata.jp

ン・エオジン (HE) 染色を行った。腎臓に関しては、特殊染色としてPAS染色を、免疫組織化学的染色として、抗ヒトクローディン16ウサギ抗体 (50倍希釈 CLD16 antibody (AP10435A), ABGENT, U.S.A.), 抗ヒトKカドヘリンウサギ抗体 (50倍希釈 CDH6 antibody (AP1415b), ABGENT, U.S.A.), 及び抗ヒトインテグリン α 6マウス抗体 (500倍希釈 Integrin alpha 6 antibody (EPR18124), abcam, U.K.) を用い、抗原活化処理として、脱パラフィン組織をクエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸漬後、121°C, 15分、オートクレーブにて処理した。その後、Envision法 (Dako, Denmark) を用い、発色にはDAB法 (Dako, Denmark) を用いた。病理組織学的検査及び免疫組織化学的染色の対照として、2カ月齢の雄の黒毛和種牛の20%中性緩衝ホルマリン固定パラフィン切片を用いた。

本論文で使用した抗体の特異性については、既報で示されているそれぞれのタンパク質の陽性像と上記対照例の陽性像を比較検証し、既報との一致を確認したことから、特異性は担保されたと判断した [5, 9, 10]。

成 績

剖検所見及び病理組織学的検査：剖検において、両症例の腎臓は全体的に退色し、表面には凹凸を生じていたが、大きさについては異常を認めなかった (図1)。剖面は、液体の貯留により一様に光沢を帯び、皮質において腎乳頭から連続するように放射状に延び、幅が大小の索状の灰白色部位を認めた。

組織学的には、症例1で皮質から髄質外層にかけて間質が広範囲に線維化しており、症例2で巣状の線維化を認めた (図2)。病巣領域においては、両症例ともに直径が小さく管腔をほとんど認めない小型尿細管の集簇を認めた。

また、症例1では軽度に拡張した尿細管が散見され、少数の拡張した尿細管には細胞円柱の貯留を認めた。症例2では、皮質表層において巣状に線維芽細胞の高度増生を認め、線維化部位においては小型尿細管が集簇し、やや小さい糸球体が散見された。線維化部位以外では軽度に拡張し蛇行した尿細管を少数認めた。

また、PAS染色では、対照例の腎臓においては、尿細管の外側周囲に、連続的に赤紫色に染まる一重の細い線状基底膜が観察されたが、両症例ではほとんどの尿細管において多重化あるいは消失を、加えて症例2の少数の小型尿細管では肥厚するものもみられた (図3)。

その他の臓器では、両症例の胃固有層において、菌糸状の真菌の増殖とそれに対する好中球、マクロファージなどの炎症細胞の高度な浸潤からなる真菌性化膿性第二及び第三胃炎を、症例2において肺細気管支周囲にリンパ濾胞の形成と肺胞壁の軽度肥厚を認めた。

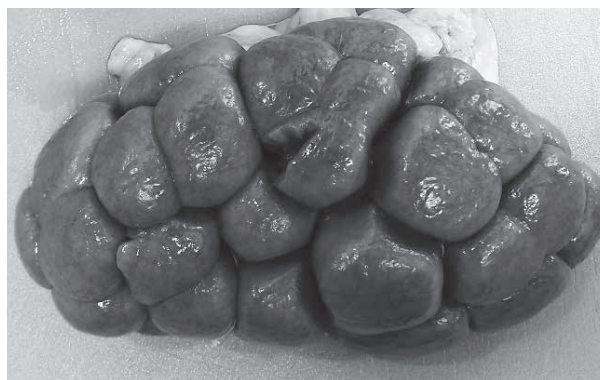


図1 右腎臓の剖検所見 (症例2)
腎臓は退色し表面には凹凸を多数認めた。

上記以外には所見は認めなかった。

細胞接着関連タンパク質の免疫組織化学的染色：密着結合の一構成タンパク質であるクローディン16の陽性像は、対照例の腎臓においては近位及び遠位尿細管上皮の頂端側のみが線状に強陽性を示し、細胞質はそれに比べ弱い陽性を示した (図4)。それに対し、症例1ではほとんどの尿細管上皮細胞の細胞質が陽性を示した。症例2でも症例1と同様の局在を示した。

接着結合の構成タンパク質であるKカドヘリンでは、対照において近位及び遠位尿細管上皮の基底側が陽性を示すのに対し、症例1, 2ともに尿細管上皮の頂端側のみが細胞質全体と比較して強い陽性を示した (図5)。ヘミデスモゾーム構成タンパク質であるインテグリン α 6は、対照において尿細管上皮の基底側のみが線状に強染し、細胞質は淡く染まる程度でその境界は明瞭であった (図6)。

一方、症例1, 2では細胞質が中度に染まる尿細管とほとんど染まらない尿細管とに二極化し、中度に染まるもしくは染まらない尿細管について大小の関連性は認めなかった。

考 察

本研究における両症例においてクローディン16は細胞質が陽性を示し、Kカドヘリンは頂端側への局在を認め、両タンパク質ともに大部分の尿細管において対照とは明らかに異なる局在を示した。クローディン16については、対照例で認めた線状配列が観察されず細胞質への局在異常を示したことから、密着結合への局在を制御する機構の異常、もしくはクローディン16のアミノ酸配列の異常により密着結合に固定されない可能性が考えられた。Kカドヘリンについては対照例では認めない頂端側への線状配列を示したことから、接着結合への局在を制御する機構の異常、Kカドヘリン自身の異常により接着結合に固定されないために、通常では関係しない密着結合装置側に存在する異常局在、といった可能性が

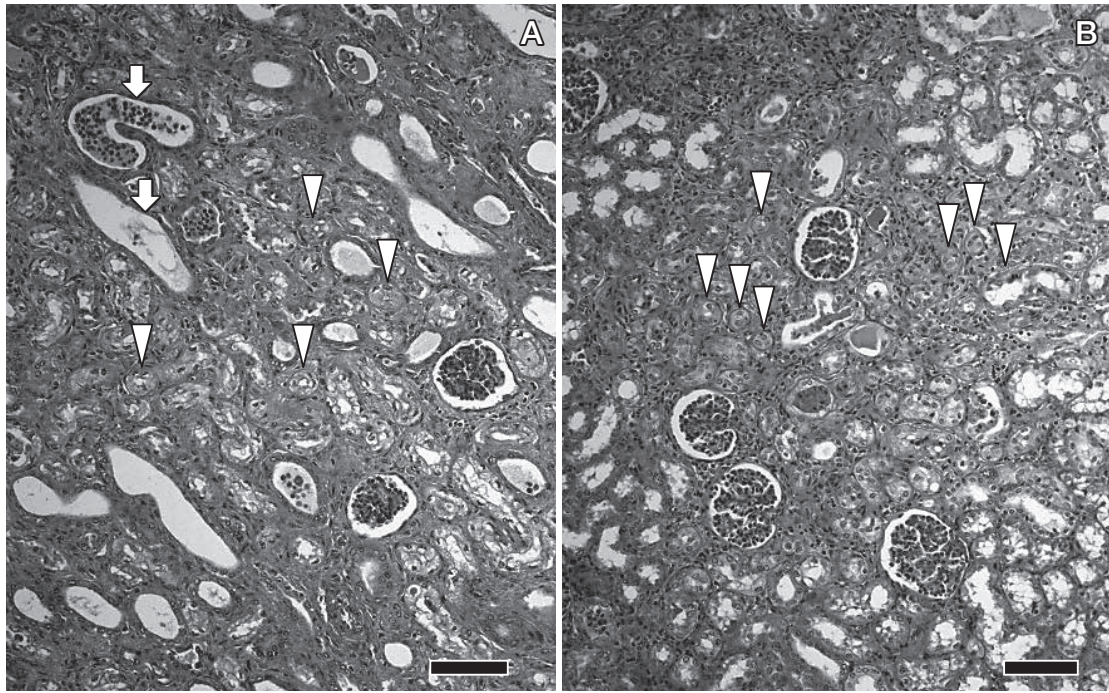


図2 腎の組織像 (HE 染色 Bar=100 μ m)

A: 症例1 B: 症例2

症例1では尿細管は軽度に拡張し蛇行, また内部に細胞円柱が貯留 (矢印), また直径が小さく管腔をほとんど認めない小型尿細管 (矢頭) を認める. 症例2では, 特に表層で島状に線維化を認める. また, 線維化部位では症例1同様に直径が著しく小さく, 管腔をほとんど認めない小型尿細管 (矢頭) が存在し, 糸球体はやや小さい. 線維化部位以外の尿細管は軽度に拡張し蛇行している.

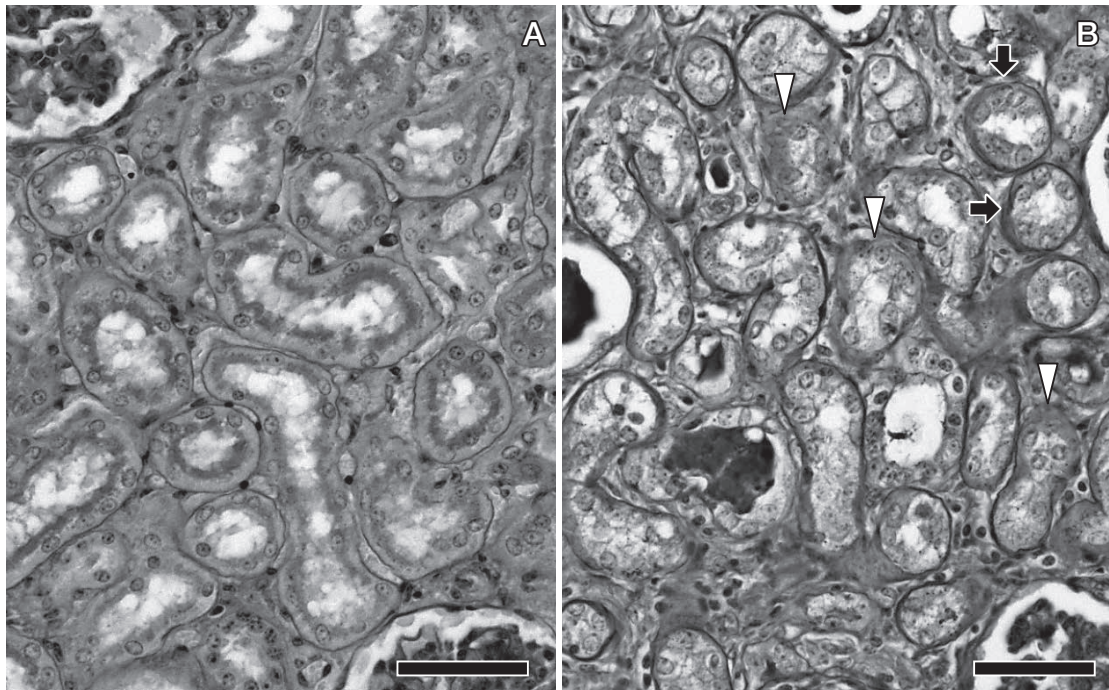


図3 腎の組織像 (PAS 染色 Bar=50 μ m)

A: 対照例 B: 症例2

対照例では, 基底膜は均質な線状に認められる. 症例2では基底膜の肥厚 (矢印), 不整及び消失 (矢頭) が認められる. 肥厚は直径の小さい小型尿細管で顕著.

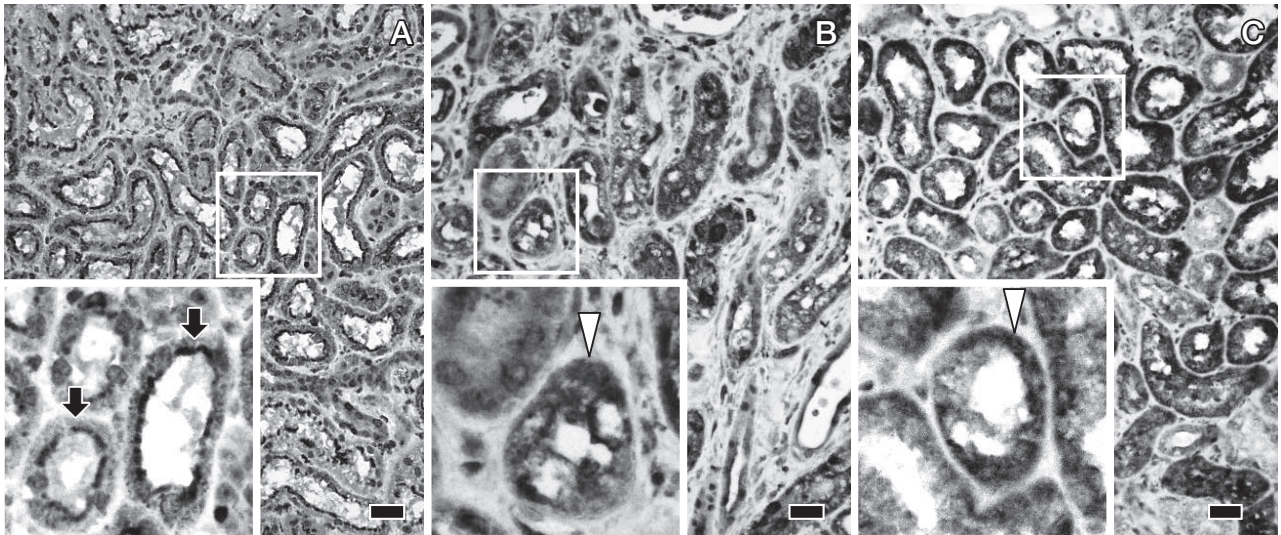


図4 クローディン16の免疫組織化学的染色 (Bar=50 μ m)

A: 対照例 B: 症例1 C: 症例2

対照においては尿細管上皮の頂端側が線状に強く染まり (矢印), 細胞質は弱く染色された。症例1及び2では線状ではなく細胞質が強く染色された (矢頭)。

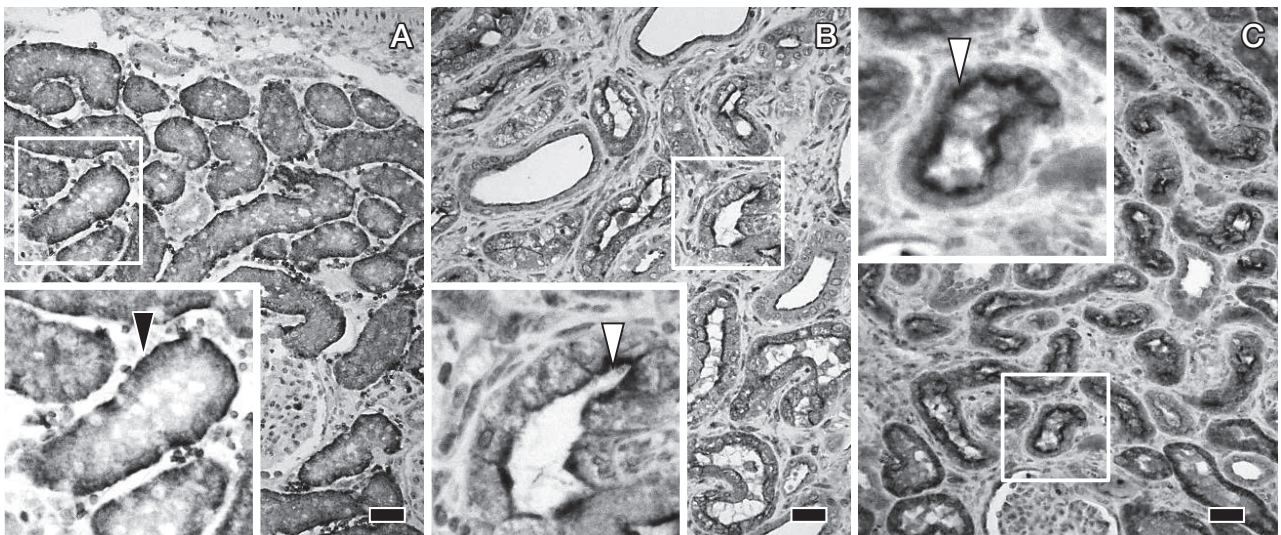


図5 Kカドヘリンの免疫組織化学的染色 (Bar=50 μ m)

A: 対照例 B: 症例1 C: 症例2

対照においては尿細管上皮の基底側のみが線状に強く (矢頭: 黒) 染色され, 細胞質は淡く染まり境界は明瞭であった。症例1, 2ともに上皮の頂端側が線状に強く (矢頭: 白抜き) 染色された。

考えられた。

また, 両構成タンパク質の局在異常による密着及び接着結合装置の機能不全が疑われ, 今回の2症例においては密着及び接着結合異常と腎異形成との関連性が示唆された。細胞接着装置を制御する機構として現在, ガン制御等のさまざまな観点から研究が進められており, 多数の因子の関与が示唆されている [11-13]。

たとえば, 密着結合の構成タンパク質であるZO1及びZO2は, クローディンの局在を制御するとされており, ZO1やZO2を欠く上皮細胞においてはクローディ

ンは正常な局在を示さず, 密着結合は形成されない [14]。

今回の2症例においては密着及び接着結合の異常, もしくは両方の細胞内局在を制御している上流遺伝子の異常, さらには上記にあげたような細胞接着装置の構成因子の異常についても可能性としてあげられる。ヘミデスマゾームに存在するインテグリン α 6は基底膜と結合し尿細管上皮細胞を支えていることから, 尿細管基底膜の不整 [15]と本タンパク質の局在異常は関連する可能性が考えられたが, 証明には至らず推定の域を出ない。

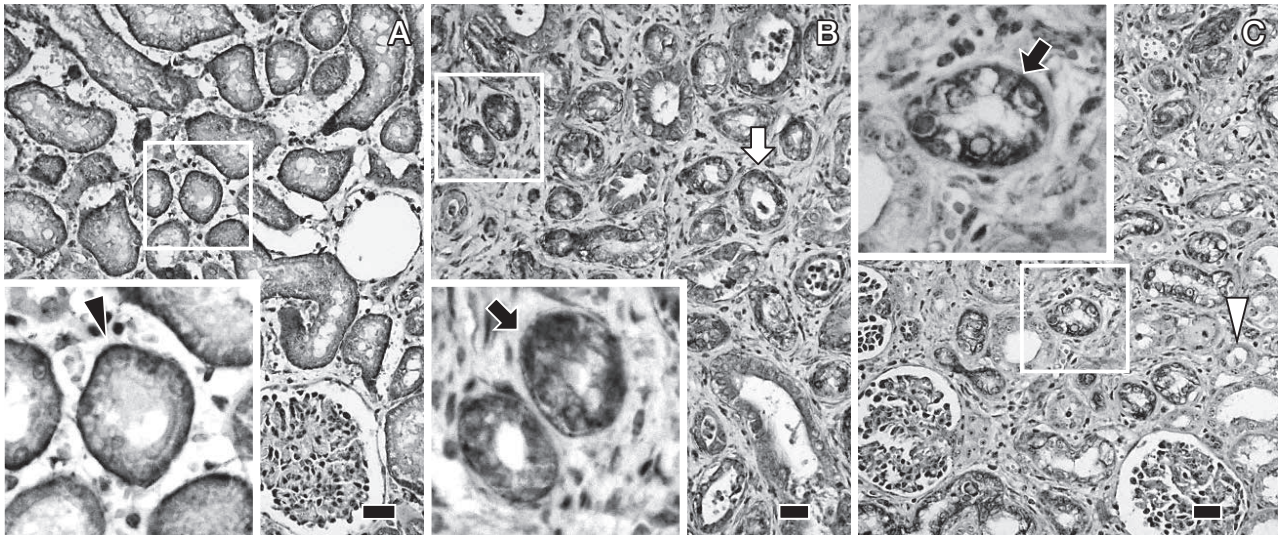


図6 インテグリン $\alpha 6$ の免疫組織化学的染色 (Bar=50 μ m)

A: 対照例 B: 症例1 C: 症例2

対照において尿細管上皮の基底側のみが線状に強く(矢頭:黒)染色され,細胞質は淡く染まり境界は明瞭であった。症例1,2では上皮細胞の細胞質が染色された(矢印:黒)とほとんど染まらない尿細管(矢頭:白抜き)とが存在。

牛の腎異形成については,数々の症例が報告されているにもかかわらず,その原因遺伝子として特定されているのはクローディン16のみで,本遺伝子が関与しない症例も報告されている[16,17]。

腎臓の発生には,さまざまな遺伝子が複合的に関与するため[18-20],ゲノム解析のみでは腎異形成の解明は困難であり,本論文のように特定のタンパク質の局在部位の検討を加えることは,原因解明の一助となると考察する。今回の2症例において4代祖以前が共通であり,細胞接着装置についても同様の異常局在を認めたことから,同一遺伝子の異常に起因する可能性が高い。

今後,病理発生を考えるうえでは,ステージの異なる異形成腎や,牛の腎発生での細胞接着関連タンパク質の発現などの解析や,症例を増やし検討を重ねることが重要である。

引用文献

- [1] 代田欣二, 林 俊春, 森本将弘, 斑目広郎: 泌尿器, 動物病理学各論, 日本獣医病理学専門家協会, 第2版, 260-294, 文永堂出版, 東京 (2015)
- [2] Kobayashi N, Hirano T, Maruyama S, Matsuno H, Mukoujima K, Morimoto H, Noike H, Tomimatsu H, Hara K, Itoh T, Imakawa K, Nakayama H, Nakamatsu T, Sugimoto Y: Genetic mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1, *Anim Genet*, 31, 91-95 (2000)
- [3] Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Oikawa T, Sasaki Y: Inheritance of renal tubular dysplasia in Japanese Black cattle, *Vet Rec*, 149, 153-154 (2001)
- [4] Ohba Y, Kitagawa H, Kitoh K, Sasaki Y, Takami M, Shinkai Y, Kunieda T: A deletion of the paracellin-1

gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle, *Genomics*, 68, 229-236 (2000)

- [5] Okada K, Ishikawa N, Fujimori K, Goryo M, Ikeda M, Sasaki J, Watanabe D, Takasuga A, Hirano T, Sugimoto Y: Abnormal development of nephrons in claudin-16-defective Japanese black cattle, *J Vet Med Sci*, 67, 171-178 (2005)
- [6] Sasaki Y, Kitagawa H, Kitoh K, Okura Y, Mizukoshi M, Ohba Y, Suzuki K, Masegi T: Pathological changes of renal tubular dysplasia in Japanese black cattle, *Vet Rec*, 150, 628-632 (2002)
- [7] Silberberg M, Charron AJ, Bacallao R, Wandinger-Ness A: Mispolarization of desmosomal proteins and altered intercellular adhesion in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Am J Physiol-Renal*, 288, F1153-1163 (2005)
- [8] Alberts B, Johnson A, Lewis J: *Cell Junctions, Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, 1131-1240, Garland Science, New York (2002)
- [9] Shimazui T, Oosterwijk E, Akaza H, Bringuier P, Ruijter E, van Berkel H, Wakka JO, van Bokhoven A, Debruyne FM, Schalken JA: Expression of cadherin-6 as a novel diagnostic tool to predict prognosis of patients with E-cadherin-absent renal cell carcinoma, *Clin Cancer Res*, 4, 2419-2424 (1998)
- [10] Piepenhagen PA, Nelson WJ: Differential expression of cell-cell and cell-substratum adhesion proteins along the kidney nephron, *Am J Physiol*, 269, C1433-1449 (1995)
- [11] Fukuhara A, Irie K, Yamada A, Katata T, Honda T, Shimizu K, Nakanishi H, Takai Y: Role of nectin in organization of tight junctions in epithelial cells, *Genes Cells*, 7, 1059-1072 (2002)
- [12] Fukuhara A, Irie K, Nakanishi H, Takekuni K, Kawakatsu T, Ikeda W, Yamada A, Katata T, Honda T,

- Sato T, Shimizu K, Ozaki H, Horiuchi H, Kita T, Takai Y : Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions, *Oncogene*, 21, 7642-7655 (2002)
- [13] Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG, D'Souza-Schorey C : An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration, *Embo J*, 20, 4973-4986 (2001)
- [14] Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S : ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation, *Cell*, 126, 741-754 (2006)
- [15] Walko G, Castañón MJ, Wiche G : Molecular architecture and function of the hemidesmosome, *Cell Tissue Res*, 360, 529-544 (2015)
- [16] 杉山昌彦 : 59 カ月齢の黒毛和種牛に認められた腎異形成症の1例, *日獣会誌*, 57, 813-816 (2004)
- [17] 杉山昌彦 : クローディン16欠損遺伝子保因ヘテロの黒毛和種牛に認められた腎尿細管形成不全症の1例, *日獣会誌*, 59, 57-60 (2006)
- [18] Cheng HT, Kim M, Valerius MT, Surendran K, Schuster-Gossler K, Gossler A, McMahon AP, Kopan R : Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron, *Development*, 134, 801-811 (2007)
- [19] Nakai S, Sugitani Y, Sato H, Ito S, Miura Y, Ogawa M, Nishi M, Jishage K, Minowa O, Noda T : Crucial roles of Brn1 in distal tubule formation and function in mouse kidney, *Development*, 130, 4751-4759 (2003)
- [20] Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE : Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases, *J Clin Invest*, 111, 707-716 (2003)

Pathological Analysis of Renal Dysplasia Focusing on Intercellular Junction Expression in Calves

Nobumichi FURUTA^{1)†} and Yoko SUTO²⁾

1) *Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan*

2) *Yamagata Prefecture Mogami Livestock Hygiene Service Center, 2034 Omichigami, Kanazawa, Shinjo, 996-0002, Japan*

SUMMARY

In this study, we report on two cases of renal dysplasia in calves and analyze the pathological examination focusing on intercellular junctions. Findings in the two autopsies included discolored kidneys and rugged surface. Histopathologically, extensive and focal interstitial fibrosis was observed in case 1 and case 2, respectively. In order to observe the localization of the intercellular junctions, we analyzed the affected kidneys by immunohistochemistry using claudin-16, K-cadherin and integrin $\alpha 6$ antibodies for the tight junction, adhesive junction and hemidesmosome, respectively. Abnormal localizations of claudin-16 and K-cadherin were observed in both cases, which were not observed in control. These results suggested that the abnormal localization of intercellular junctions plays a role in the pathogenesis of renal dysplasia. Pathological studies focusing on the intercellular junctions would help to elucidate the renal dysplasia.

— Key words : calve, claudin-16, K-cadherin, renal dysplasia.

† *Correspondence to : Nobumichi FURUTA (Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center)*

736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan

TEL 023-686-4410 FAX 023-686-5715 E-mail : furutan@pref.yamagata.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 279 ~ 284 (2019)