

研究種目：基盤研究A
研究期間：2006年度～2009年度
課題番号：18209030
研究課題名（和文）ポドサイトの傷害機序

研究課題名（英文）Mechanism of podocyte injury

研究代表者

松阪 泰二 (MATSUSAKA TAIJI)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：50317749

研究分野：腎臓病学、内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糸球体硬化症、ポドサイト、蛋白尿、キメラマウス、SV40、HIV-1、トランスジェニックマウス、慢性腎不全

1. 研究計画の概要

(1) **ポドサイト傷害がポドサイト傷害をもたらす機序の解明**：一部のポドサイトだけが傷害されるキメラマウスを作成し、糸球体の一部のポドサイトにはじまった傷害が、いかに拡大するかを明らかにする。具体的には、イムノトキシン (LMB2) の注射により podocyte 傷害の誘発可能なマウス (*NEP25*) と、全身の細胞がアルカリホスファターゼ (PLAP) で標識される *ROSA-PLAP* マウスから構成される *NEP25* ↔ *ROSA-PLAP* キメラマウスを作製し、LMB2 投与後に PLAP 陽性 (hCD25⁻) ポドサイトがどのような運命をたどるかを観察する。

(2) **ポドサイトの増殖と傷害の関係を解明する**：一般に生後に正常ポドサイトは増殖せず、ポドサイトの欠失は不可逆的な腎不全の要因である。我々は、ポドサイト特異的に SV40 ウイルスの T 抗原の発現を誘導可能なトランスジェニックマウス (*SV40T/rtTA*) を開発した。そのマウスに、ドキシサイクリン (DOX) を投与すると、ポドサイトは増殖したが、長期間の DOX 投与によりかえってポドサイトは傷害された。が不可分なものか否かを検討する。によりポドサイト特異的に SV40T を発現するトランスジェニックマウス () を解析した。

(3) **HIV-1 遺伝子によるポドサイト傷害の機序を解明する**：我々は先に HIV-1 感染者の一部に発症する HIV-1 関連腎症 (HIVAN) は、HIV-1 の vpr と nef の 2 つの遺伝子が原因である事を示し、特に前者が重要である事を示

した。また、HIVAN 発症には、ポドサイトの増殖が関与すると信じられているが、そうではなくて形態異常が重要であるという data を得ていた。そこで本計画では、培養ポドサイトを用いて、HIV-1 遺伝子の vpr と nef の細胞傷害機序、特に細胞形態への影響に関して研究する。

2. 研究の進捗状況

(1) LMB2 投与 4 日後では、ほぼすべての PLAP 陰性 (hCD25⁺) のポドサイトは、著しく傷害されていた。PLAP 陽性 (hCD25⁻) のポドサイトにおいても nephrin の発現が減弱していた。したがって podocyte 傷害の拡大は、極めて早期から起こっている事がわかった。

上記現象は、LMB2 投与前の hCD25 の陽性率が高いマウス程、高頻度に認められた。すなわち、一次的に傷害されるポドサイトが多い程、二次的に傷害を起こすポドサイトが多い事がわかった。

hCD25 の陽性率が低いキメラマウスに、LMB2 を投与して、42 日後に解析した。PLAP 陰性 (hCD25⁺) のポドサイトは、LMB2 投与後にはすべて消失した。一部の糸球体は硬化に陥っていたが、その割合は LMB2 前に hCD25⁺ ポドサイトを含む糸球体の率より低かった。すなわち、一部の糸球体は完全に回復したと考えられた。

以上の事から、①一部のポドサイトの傷害により、二次的に他のポドサイトの傷害をもたらす、②上記二次的傷害は、一次的傷害の度合いにより、その程度と可逆性が決定される事が示された。

(2) DOX 投与7日以内では、BrdU でラベルされた増殖ポドサイトは電顕で正常であった。従って、細胞周期の再入と脱分化は不可分ではない事が示された。しかし、有糸分裂像を示すポドサイトでは著しい傷害を示した。また BrdU(+)ポドサイトには特異的に血漿蛋白質の蓄積が認められた。2週以上の DOX 投与により、*SV40T/rtTA* マウスは糸球体硬化症を示した。以上の事から、ポドサイトは、細胞周期への再入だけでは傷害されず、分裂期に傷害される事が示され、また血漿蛋白成分の蓄積が傷害を助長する事が示唆された。

またこれらは、Angiotensin II の阻害により軽減した。

関連研究として、collapsing nephropathy モデルの糸球体で増殖する細胞は、ポドサイトではない事を証明した。また、当初ポドサイト増殖に関与すると予想した Bmp4 は糸球体毛細血管の構築に関与する事を示した。

3) DOX により vpr の発現するラットポドサイトを樹立した。DOX 投与により一定の形態変化を認めなかった。Cre により vpr を発現するような安定細胞株を樹立したが、Cre(-)コントロールによっても形態変化が起こった。さらに別の方法として、大腸菌で vpr タンパク質を作成すべく多大な努力をしたが、十分な量を得られなかった。一つの困難な原因は、使用しているラット培養ポドサイトの形質が不安定な点である。そのため、*SV40T/rtTA* マウスから、培養ポドサイト細胞株を樹立した。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

(1)および(2)のテーマの実験はおおむね順調に進んでいるものの、テーマ(3)に関しては、技術上の問題があり遅れている。

4. 今後の研究の推進方策

計画(1)に関しては、キメラの数量解析がほぼ終了したので、今後論文化をすすめていく。二次的ポドサイト傷害の機序に関連して、培養ポドサイトの実験から、アルブミンが LMB2 による細胞死(または剥離)を助長するという preliminary な結果を得たので、それをさらに進めていく。また、ポドサイトからメサンジウム細胞への病変の波及に関しては、その現象を分子的に把握するために、NEP25 マウスの糸球体を採取して micro Array を行い、ポドサイト傷害に続発して変化するメサンジウムの RNA 発現変化を網羅的に解析する予定である。計画(2)に関しても論文化を進める。(3)に関しては、残された時間と他グループの動向などから、当初計画を見直し、vpr 遺伝子産物に結合するタンパク質の同定を的をしぼって進めていく予定である。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Ueda H, Miyazaki Y, Matsusaka T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T, Ichikawa I. Bmp in podocytes is essential for normal glomerular capillary formation. J Am Soc Nephrol. 19: 685-94, 2008
2. Suzuki S, Matsusaka T, Asano T, Ichikawa I, Nagata M. Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of focal segmental glomerulosclerosis. Am J Pathology (in press)

[学会発表] (計 25 件)

1. Matsusaka T, Ichikawa I, Kopp JB. Experimental attempt to increase podocyte number in vivo. JASN. 17: 542A, 2006 (ASN meeting)
2. Matsusaka T, Fogo AB, Ichikawa I. Podocyte damage damages podocytes: evidence from a study on chimeric glomeruli. JASN. 18: 18A, 2007 (ASN)
3. Matsusaka T, Niimura F, Asano T, Fogo AB, Ichikawa I. Angiotensin II receptor (AT1) antagonist protects podocytes through mechanism(s) independent of AT1 on podocytes. JASN. 19: 12A, 2008 (ASN)
4. 松阪泰二, 市川家國 正常なポドサイト数を増加させる事が可能である. 日腎会誌 49, 238, 2007 (日本腎臓学会)