

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790599
 研究課題名（和文） 各種進行性腎疾患における上皮-間葉転換の分子生物学的解析
 研究課題名（英文） Molecular biological analysis of the epithelial-mesenchymal transition in various human renal diseases
 研究代表者
 梅園 朋也（UMEZONO TOMOYA）
 東海大学・医学部・講師
 研究者番号：40349345

研究成果の概要（和文）：各種ヒト進行性腎疾患の腎組織を用い、上皮-間葉転換に重要な役割を果たしているといわれている転写因子 Snail(Snai1)の発現を免疫組織学的に検討した所、障害を受けた尿細管上皮細胞の核を中心にその発現が認められ、さらに代表的な間葉系マーカーである Vimentin との2重染色において、Snail/Vimentin double positive の尿細管上皮細胞数が腎予後に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：we performed immunohistochemistry with an anti-Snai1 antibody and quantitative analysis in various renal disease. We performed double staining with vimentin antibody to assess its expression in the tubulointerstitial region. Furthermore, we examined the relationship between the number of Snail- and/or vimentin-positive cells and various clinical and histopathological parameters at the renal biopsy by linear regression analysis. Snail protein was observed in the nuclei of damaged tubular epithelial cells with a flattened appearance. Double staining with vimentin showed that several vimentin-positive tubular epithelial cells had Snail positive nuclei. On quantitative analysis, the number of Snail/vimentin double positive cells in the tubulointerstitial region was increased in DN and IgAN specimens, whereas expression was limited in control specimens. In DN specimens, the number of Snail/vimentin double positive cells was significantly higher when the disease showed rapid progression than when it showed slow progression. These study showed that Snail may contribute to the development of tubulointerstitial fibrosis in DN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：腎臓病学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：上皮-間葉転換、insitu ybridization,腎繊維化、免疫組織染色

1. 研究開始当初の背景

原疾患の如何を問わず慢性進行性の腎疾患における腎尿細管間質の繊維化は共通の組織像であり、この腎尿細管間質の繊維化の程度と腎機能予後は非常に強い相関を示す事から末期腎不全への進展防止の為に腎尿細管間質繊維化の機序解明は非常に重要な問題である。繊維芽細胞または筋繊維芽細胞は尿細管間質繊維化を引き起こす中心的な細胞であり、事実障害された尿細管間質部位にはこれらの細胞が多数存在し細胞外基質の産生等に関与していると考えられている。これら繊維芽細胞および筋繊維芽細胞の産生源を突き止める事は腎繊維化の発症進展をコントロールする意味においても非常に重要であり今まで多数の研究がされてきた。近年この繊維芽細胞が腎尿細管上皮細胞から形質転換を起こし多数産生されている可能性が示され注目を集めている。この現象は上皮-間葉変換 (epithelial-mesenchymal transition:EMT) と呼ばれており、尿細管間質繊維化の重要な発症機序の一つとして認知されつつある。EMT 発生には Snail, Slug と呼ばれる転写因子が関与しており、何らかの刺激によりこれらの転写因子が上皮細胞内で活性化され核内に移行し、E-Cadherin などの上皮マーカーの産生抑制や Vimentin などの間葉系マーカーの産生亢進に働き上皮細胞を間葉系細胞に変換させる重要な働きをしているといわれている。しかしながら腎臓における EMT とこれらの転写因子の関係は全く解っていない。

2. 研究の目的

本研究では腎生検組織を用いた免疫組織染色法を用いて、各種腎疾患における転写因子 Snail の局在および発現の程度の差異を比較検討する。また同時に上皮細胞マーカー、間葉系マーカーの発現を測定しこれらの発現の相関を検討することで腎繊維化形成に EMT がどのように関与しているのかを解明できる可能性がある。また非放射性標識法による in situ hybridization 法を用いることにより、ヒト腎臓において蛋白レベルだけではなく mRNA レベルでのこれらの物質の発現を観察することができ、より詳細な機序が解明できる。また他の腎炎にも同方法が応用できることでさまざまな慢性進行性腎疾患の治療法開発の手助けとなる可能性も考えられる。

3. 研究の方法

(1)：各種腎疾患腎生検腎組織の尿細管関質線維化領域の定量化

当院で開放性腎生検を施行された慢性進行性腎疾患を対象とする。具体的には IgA 腎症ならびに糖尿病性腎症を中心に検討をおこなう。腎生検によって得られた組織をパラフィン包埋、薄切し PAS 染色をおこない尿細管関質領域の線維化拡大を自動画像解析装置 (WINROOF) を用いて定量化する。この方法を用いることにより、より客観的に腎組織の形態を評価することができる。

(2)：光学顕微鏡レベルでの免疫組織染色法
抗 snail 抗体を用い、対象となった症例のパラフィン腎組織に免疫染色をおこない尿細管関質線維化領域における snail 蛋白の発現

および局在、また疾患別、病期別による発現の差異を比較検討する。さらに間葉系マーカーとして抗ビメンチン抗体を用い、線維化領域における発現の差異、特に尿細管上皮細胞におけるこれらの発現の差異を疾患別、病期別に比較検討をおこなう。具体的な免疫組織染色法は以下の様におこなう。4 μ mに薄切されたパラフィン包埋腎組織をキシレン、エタノールにて脱パラフィン操作をおこなった後メタノール+0.3%H₂O₂ 溶液にて内因性ペルオキシダーゼのブロッキングをおこなう。続いてマイクロウェーブにて抗原の賦活化をおこなった後 5%正常ヤギ血清またはウサギ血清にてブロッキングをおこなう。各種一次抗体を反応させたのち、ペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼ標識二次抗体を反応させ発色をおこなう。

(3) : 光学顕微鏡レベルでの in situ hybridization 法

digoxigenine で標識した snail mRNA ならびに slug mRNA に対する RNA プローブをそれぞれ作成し、対象となった症例のパラフィン組織に in situ hybridization 法を施行し各 mRNA の発現の相違を検討する。さらに対照として正常腎組織に対しても同様の検討をおこなう。

非放射性標識法を用いた in situ hybridization 法は以下のように行う。パラフィン切片をキシレンにて脱パラフィン操作おこなった後 proteinase K 溶液で15分間処理し、除蛋白を行う。2% paraformaldehyde (PFA) で15分間固定し、20倍希釈の sodium saline citrate (SSC)、100倍希釈の Denhart's 液、salmon testis DNA、yeast tRNA 及び 50 mM sodium phosphate (pH 8.0) にてプレハイブリダイゼーションを行い、その後 digoxigenin (DIG) で標識した 350塩基前後の RNA probe を用

いてハイブリダイゼーションを行う (70 度 over night)。なお probe の標識には DIG oligonucleotide tailing kit を用いて行う。ハイブリダイゼーション後、以下のごとく免疫酵素抗体法を行い観察する。2倍希釈の SSC, 各15分間2回づつ洗浄を行った後、20% normal swine serum (NNS), 5% fetal calf serum (FCS), 5% bovine serum albumin (BSA) にてブロッキングし、その後アルカリフォスファターゼ標識マウス抗 digoxigenin 抗体と反応させ (over night) 翌日洗浄後脱水、マウントし光学顕微鏡にて観察を行う。

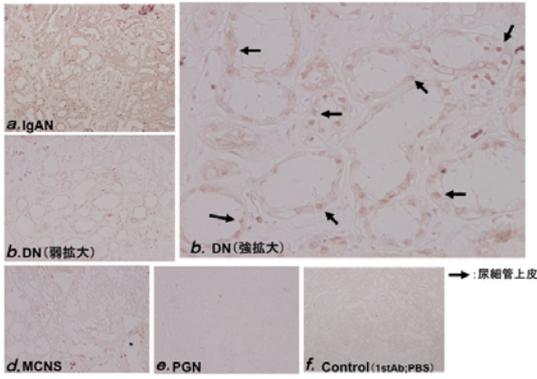
(4) : 光学顕微鏡レベルでの免疫染色法による各種抗体発現の評価

各種抗体の発現の程度を定量化するため、自動画像解析装置 (WINROOF) に画像を取り込む。Snail 抗体の評価に関しては染色された腎組織はまず 200 倍の倍率にて光学顕微鏡観察のもと全領域の画像を分割し、コンピューターに取り込んだのち無作為に抽出し陽性細胞数をカウントする。また同様の操作で各種マーカーの陽性面積を計測し疾患別、病期別に比較検討する。

4. 研究成果

(1) Snail (Snail) 蛋白の局在ならびに各種腎疾患における発現の程度の差異についての検討。: Snail は障害された尿細管上皮細胞の核を中心に発現が認められた。尿細管間質領域における Snail 発現の程度を比較した結果、DN ならびに IgAN では PGN に比較して有意な snail 陽性細胞数の増加を認めていた。

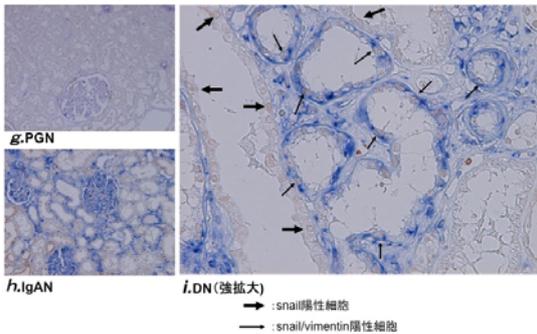
【Snail 単染色】



(figure1)

(2) Snail および代表的な間葉系マーカーである vimentin の発現についての検討。: IgAN において snail/vimentin の二重染色陽性細胞数は有意に増加しており、DN において有意差はなかったものの、PGN (対照となる障害がきわめて軽微な増殖性糸球体腎炎) に比較して増加を認めていた。MCNS (微小変化型) においては snail 陽性細胞数ならびに snail/vimentin 二重染色陽性細胞数において、PGN と比較して有意差は認められなかった。

【Snail/Vimentin 二重染色】



(figure2)

(3) Snail および Snail/vimntin 2 重染色陽性細胞数と各種臨床指標の比較。: DN、IgAN とともに snail 陽性細胞数との相関は認められなかったが、DN において、二重染色陽性細胞数と生検時 Cre 値、1 日尿蛋白量と正の相関が認められた。IgAN においては生検時 Cre 値と正の相関を認めた。MCNS においてはいずれ

も有意な相関を認めなかった。

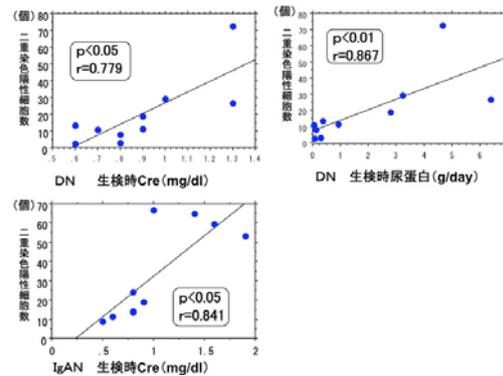
	DN (n=10)	IgAN (n=10)	MCNS (n=5)	PGN (n=4)
Snail 陽性細胞数	25.6 ± 13.5 ^{a)}	41.7 ± 16.5 ^{b,c)}	7.7 ± 5.2	4.1 ± 2.8
Snail/Vimentin 二重染色陽性細胞数	19.6 ± 20.6	33.5 ± 24.3 ^{d)}	5.0 ± 4.5	4.6 ± 2.7

Mean ± SD

- a) p < 0.05 vs PGN, MCNS
- b) p < 0.05 vs DN
- c) p < 0.01 vs PGN, MCNS
- d) p < 0.05 vs PGN, MCNS

(figure3)

【相関グラフ】



(figure4)

(4) DN における Snail/vimentin 2 重染色陽性細胞と腎予後の関係についての検討。: DN 群においてはさらに臨床経過が追跡しえた 15 例を対象に、腎生検後血清 Cr 値が倍加した群 (以下 DNfast) と悪化しなかった群 (以下 DNslow) に分類し比較検討をおこなったところ、腎機能悪化群で有意に Snail/vimentin 2 重染色陽性細胞数が増加していた

	DN fast (n=5)	DN slow (n=10)
Total capture	18.2±5.0	18.1±9.8
Snai1-positive cell	27.4±7.9	24.7±14.2
Snai1/Vim pos cell	21.9±8.8*	8.0±3.9

*p<0.01 vs DN slow

(figure5)

(5) 光学顕微鏡レベルでの in situ hybridization 法: digoxigenine で標識した snail mRNA ならびに slug mRNA に対する RNA プローブをそれぞれ作成し、対象となった症例のパラフィン組織に in situ hybridization をおこなったが、安定した結果が得られておらず、現在予備実験を行なっている状態である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計4件)

- ① 梅園朋也、糖尿病性腎症の尿細管間質繊維化における Snail (Snail) / Vimentin の発現と臨床指標および組織障害度との関係についての検討。日本糖尿病合併症学会、2009年10月9日、岡山
- ② 梅園朋也、糖尿病性腎症をはじめとした各種腎疾患における尿細管間質線維化と転写因子 snail の発現についての検討。糖尿病性腎症研究会、2008年12月6日、東京
- ③ 梅園朋也、Relationship between expression of the transcription factor Snail (Snail) during the renal epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and clinical parameters. アメリカ腎臓学会、2008年11月2日、フィラデルフィア

- ④ 梅園朋也、Immunohistochemical analysis of the zinc-finger type transcription factor Snail (snail) in various human renal diseases. アメリカ腎臓学会、2008年11月5日、サンディエゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅園 朋也 (UMEZONO TOMOYA)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：40349345

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：