

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591036

研究課題名（和文） FSP1 陽性ポドサイトによる糸球体保護作用に関する検討

研究課題名（英文） Protective role of FSP1-positive podocytes in the glomerular injury

研究代表者

岩野 正之（IWANO MASAYUKI）

福井大学・医学部・教授

研究者番号：20275324

研究成果の概要（和文）：FSP1 陽性ポドサイトは、活動性糸球体病変の出現に伴い増加した。半月体形成性糸球体腎炎では、細胞性あるいは線維細胞性半月体に FSP1 の過剰発現が認められた。また、尿中 FSP1 の高感度測定系を開発して各種腎疾患の尿中 FSP1 を測定した結果、尿中 FSP1 は半月体形成性腎炎の鑑別に有用であることが明らかになった。さらに、ポドサイト特異的 FSP1 過剰発現マウスおよび FSP1 ノックアウトマウスを用いて、FSP1 陽性ポドサイトによる糸球体保護作用について検討したが、今回の検討では有意な結果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：The number of FSP1-positive podocytes was elevated in active glomerular damage, especially in crescentic glomerulonephritis (GN). Patients with crescentic GN exhibited elevated levels of urinary FSP1, suggesting the potential use of urinary FSP1 to screen for active and ongoing glomerular damage, such as the formation of cellular crescents. To investigate the role of FSP1-positive podocytes, we generated various kinds of experimental nephritis using FSP1 transgenic mice and FSP1 knockout mice. However, we cannot confirm the protective role of FSP1-positive podocytes in these models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

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：ポドサイト・FSP1・糸球体保護・アポトーシス・バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子としてネフリンが同定されて以来、podocytopathy は腎臓病学の中心的テーマ

である。ポドサイトにアポトーシスを誘導すると糸球体硬化が生じることが証明されていることから、ポドサイトにおけるアポトーシスのメカニズムを検討した基礎的研究は多い。しかし、臨床検体を用いてポドサイト

のアポトーシスについて検討した報告は極めて少ない。

われわれは、腎生検組織および尿細胞における FSP1 の局在を免疫蛍光抗体法で検討しており、1)糸球体における FSP1 の発現はポドサイトに限局している、2)糖尿病性腎症、IgA 腎症、およびループス腎炎では、糸球体病変の進展に伴い FSP1 陽性ポドサイト数が増加する、3)糸球体病変の進展に伴い尿中 FSP1 陽性ポドサイト数も増加することを明らかにした。これらの成績に、FSP1 が EMT のマーカーであることを合わせて考察すると、EMT を介したポドサイトの剥離が糸球体病変の進展に関与することが示唆された。

つぎに、われわれは、ネフリン(*NPHS1*) promoter に FSP1 遺伝子を繋いだトランスジェンをマウス受精卵に導入して、トランスジェニックマウス (FSP1.TG マウス) を作製した。本マウスでは、ポドサイトにおける FSP1 の過剰発現が確認された。FSP1.TG マウスに実験腎炎を誘導して腎病変を検討したところ、予想外にも FSP1.TG マウスにおける糸球体病変はコントロールマウスに比して軽度であった。ポドサイトにおけるアポトーシスが糸球体硬化を進展させることが知られているが、1)FSP1 には、BNIP3 の発現抑制を介した抗アポトーシス作用があること、2)われわれの検討で、FSP1 陽性尿中ポドサイトにはアポトーシスが認められないこと、3)腎生検組織における FSP1 陽性ポドサイトにはアポトーシスが検出されず、多くは基底膜に接着していることから、FSP1 陽性ポドサイトの一部は EMT などのメカニズムを介して基底膜から剥離し尿中に検出されるものの、多くの FSP1 陽性ポドサイトはアポトーシス耐性を獲得することで糸球体保護に働くという仮説を設定し、本研究を展開することにした。

加えて、FSP1 陽性ポドサイトから分泌された細胞外 FSP1 は尿中にも検出されることから、尿中 FSP1 値はポドサイトの新規ストレスマーカーとなる可能性がある。われわれは FSP1 に対するモノクローナル抗体を 5 種類作製した。その中でエピトープの異なる 2 種類のモノクローナル抗体を組み合わせ、サンドイッチ ELISA を構築し、FSP1 の測定法を確立した。本研究では、尿中 FSP1 値の臨床的意義についても明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FSP1 陽性ポドサイトが、*in vivo* で糸球体保護作用を有するか否かを明らかにすることと、尿中 FSP1 値の臨床的意義を明確にすることである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスにおける検討

① 基礎的検討

糸球体硬化病変の進展における FSP1 の関与を検討する目的で、アドリアマイシン投与モデルを作製した。FSP1 ノックアウトマウス (FSP1.KO) マウスおよびポドサイト特異的 FSP1 トランスジェニックマウス (FSP1.TG) を 8 回 BALB/c にバッククロス後、実験腎炎を作製した。アドリアマイシン 10mg/kg を FSP1.KO マウス、FSP1.TG マウス、およびコントロールマウス (BALB/c マウス) に静脈内投与し、投与後 8 週間目の腎組織を検討した。

次に、糸球体腎炎モデルにおける検討目的で、ループス腎炎マウス (MRL/lpr マウス) へのバッククロスを行った。MRL/lpr マウスと 10 回バッククロスすることでループス腎炎自然発症モデルを作製し、FSP1 の糸球体保護作用の有無について検討した。

②臨床的検討

尿中FSP1の臨床的意義を検討するために、奈良県立医科大学腎臓内科で腎生検を実施した患者の中でインフォームド・コンセントを取得しえた全例(147例)の尿中FSP1値を測定した。尿中FSP1の測定には、われわれが開発したサンドイッチELISAを用いた。患者内訳は、微小変化群(MCD) 29例、膜性腎症(MN) 20例、IgA腎症(IgAN) 56例、ANCA関連腎炎(CrGN) 19例などである。尿検体には、治療開始前、腎生検実施日の早朝第1尿を用い、測定値はクレアチニン値で補正した。

4. 研究成果

(1)基礎的検討

FSP1発現の有無によりアドリアマイシン腎症およびループス腎炎モデルの腎病変に有意な差は認められなかった。この原因の1つはアドリアマイシン腎症モデルおよびMRL/lprマウスにおける腎病変の出現は個体差が非常に大きいことにあると考えられた。今後はモノクローナル抗体惹起性ループス腎炎およびNephrotoxic serum 投与による半月体形成性腎炎モデルなど、安定的に糸球体障害が見られるモデルで再検討することが必要である。

(2)臨床的検討

腎生検が実施された147例を対象とし、尿中分泌型FSP1値を測定した。FSP1高値を示した10症例では、治療後にもFSP1値を測定した。また、パラフィン切片を用いて酵素抗体法を実施し、1糸球体断面あたりのFSP1陽性細胞数をカウントした。ANCA関連腎炎およびループス腎炎患者において、尿中FSP1値は有意に上昇していた。細胞性あるいは線維細胞性半

月体の出現率が糸球体の20%以上を疾患有り、ROC曲線から求めたFSP1 $>$ 1.75 μ g/g Crを検査陽性とした場合、尿中FSP1値は、感度91.7%、特異度90.2%、陽性適中率64.7%、陰性適中率98.2%であった(図1)。

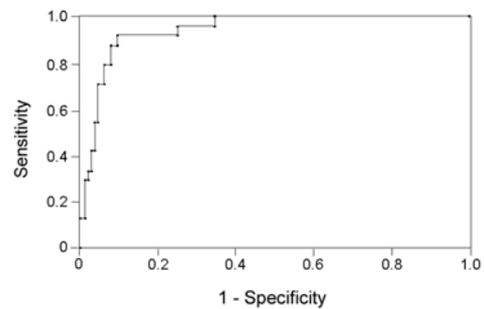


図1. ROC曲線

尿中FSP1値は治療後に測定感度以下に低下した。FSP1陽性細胞は半月体内に多数出現し、糸球体内FSP1陽性細胞数は尿中FSP1値と高い正相関を示した($r=0.71$, $p<0.0001$)(図2、図3)。

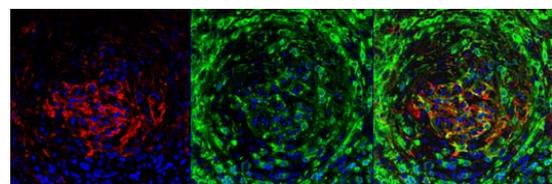


図2. 半月体におけるFSP1発現

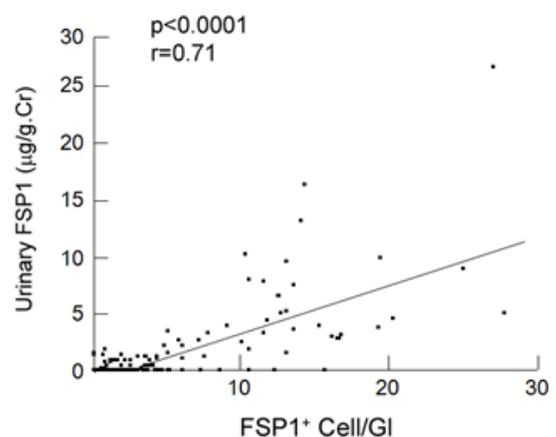


図3. 糸球体内FSP1陽性細胞数と尿中FSP1

さらに、半月体の性状により、細胞性半月体、線維細胞性半月体、線維性半月体に分類し、尿中FSP1値を検討したところ、線維性半月体を主に呈する症例では、尿中FSP1は検出されなかった（図4）。

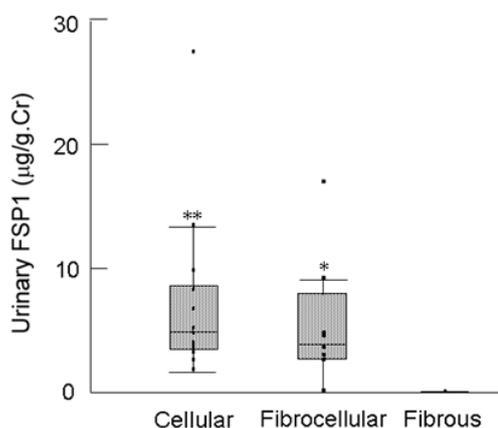


図4. 半月体の種類と尿中FSP1

以上の結果から、尿中分泌型FSP1値は感度および陰性適中率が高く、半月体病変のスクリーニング検査として有用と考えられた。また、半月体から分泌されたFSP1が尿中に検出されることが示唆された。さらに、産学連携で尿中FSP1の高感度、短時間測定系を開発中であり、現在のところ測定時間を2時間に短縮し、測定感度を10倍に上げることに成功している。臨床応用が可能となるように、さらに症例数を増やして検討予定である。

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)

[雑誌論文] (計9件)

① Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima K, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y, Saito Y. Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int.* 2012 Mar;81(6):539-47. DOI: 10.1038/ki.2011.423 査読有り.

② Samejima K, Nakatani K, Suzuki D, Asai O, Sakan H, Yoshimoto S, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Toyoda M, Iwano M, Saito Y. Clinical significance of fibroblast-specific protein-1 expression on podocytes in patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract.* 2012;120(1):c1-7. DOI: 10.1159/000334184 査読有り.

③ Iwano M, Yamaguchi Y, Iwamoto T, Nakatani K, Matsui M, Kubo A, Akai Y, Mori T, Saito Y. Urinary FSP1 is a biomarker of crescentic GN. *J Am Soc Nephrol.* 2012 Feb;23(2):209-14. DOI: 10.1681/ASN.2011030229 査読有り.

④ Kubo A, Stull R, Takeuchi M, Bonham K, Gouon-Evans V, Sho M, Iwano M, Saito Y, Keller G, Snodgrass R. Pdx1 and Ngn3 overexpression enhances pancreatic differentiation of mouse ES cell-derived endoderm population. *PLoS One.* 2011;6(9):e24058.

DOI: 10.1371/journal.pone.0024058

査読有り.

⑤ Nakatani K, Yoshimoto S, Iwano M, Asai O, Samejima K, Sakan H, Terada M, Hasegawa H, Nose M, Saito Y. Fractalkine expression and CD16+ monocyte accumulation in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jul;299(1):F207-16

DOI:10.1152/ajprenal.00482.2009

査読有り.

⑥ Kubo A, Kim YH, Irion S, Kasuda S, Takeuchi M, Ohashi K, Iwano M, Dohi Y, Saito Y, Snodgrass R, Keller G. The homeobox gene Hex regulates hepatocyte differentiation from embryonic stem cell-derived endoderm. *Hepatology*. 2010 Feb;51(2):633-41.

DOI: 10.1002/hep.23293 査読有り.

⑦ Iwano M. EMT and TGF-beta in renal fibrosis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010 Jan 1;2:229-38. 査読有り.

⑧ Onoue K, Uemura S, Takeda Y, Somekawa S, Iwama H, Imagawa K, Nishida T, Morikawa Y, Takemoto Y, Asai O, Soeda T, Okayama S, Ishigami K, Nakatani K, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Akai Y, Iwano M, Saito Y. Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis. *Circulation*. 2009 Dec 15;120(24):2470-7. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.867929 査読有り.

⑨ Yamaguchi Y, Iwano M, Suzuki D, Nakatani K, Kimura K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Toyoda M, Kanauchi M, Neilson EG, Saito Y. Epithelial-mesenchymal transition as a potential explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2009 Oct;54(4):653-64.

DOI:10.1053/j.ajkd.2009.05.009 査読有り.

[学会発表] (計 8 件)

①岩野正之、他. 半月体病変判定における尿中 FSP1 の臨床的意義. 第 54 回日本腎臓学会学術総会 平成 23 年 6 月 15 日 横浜

②岩野正之、他. 尿中 FSP1 測定法の確立と臨床的意義. 第 52 回日本腎臓学会学術総会 平成 21 年 6 月 5 日 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 正之 (IWANO MASAYUKI)

福井大学・医学部・教授

研究者番号: 20275324

(2) 研究分担者

久保 篤史 (KUBO ATSUSHI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30316062

(3) 連携研究者

なし