

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10日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790817

研究課題名（和文） 免疫担当細胞としての糸球体上皮細胞の機能の解明

研究課題名（英文） Cellular biology of podocytes as immunocompetent cells

研究代表者

長濱 清隆 (NAGAHAMA KIYOTAKA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00336538

研究成果の概要（和文）：糸球体上皮細胞がFc受容体gamma鎖を有していることを明らかにした。また腎炎モデルマウスを用いた検討からサイトカイン受容体が糸球体上皮細胞特異的に発現し、同時にリガンドのサイトカインの発現を認めた。これらは糸球体上皮細胞が免疫応答の一部を担っている可能性を強く示唆している。腎機能障害時におけるこれら分子の役割をより明らかにするため、今後コンディショナルノックアウトマウスを用いるなどさらなる研究が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Real-time PCR and confocal microscopy revealed expression of Fc receptor gamma chain in murine podocytes. Although their role in proteinuric state should be clarified, we also found that a cytokine and its receptor expression in podocytes especially in proteinuric state, suggesting that podocytes play a certain role in the inflammatory state associated with glomerulonephritis. Further study using conditional knockout mouse is warranted to dissect certain roles of the cytokine in the pathogenesis of podocyte injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ネフリン、糸球体上皮細胞、糸球体障害、cGVHD、Fcレセプター

1. 研究開始当初の背景

腎不全患者は近年加速度的に増加し、国民健康および医療経済両方にとって大きな脅威となっていることから早急な対応策が必要とされている。近年の研究結果から腎障害の

発症および進行には糸球体上皮細胞が大きな役割を担っていることが明らかとなり、腎障害時における糸球体上皮細胞の役割を明らかにすることで、腎障害の早期発見・早期治療が可能となり腎不全患者の減少

やQOLの改善、また国民医療費の軽減などに社会全体に大いに役立つものと考えられる。

2. 研究の目的

我々はポリクローナル抗ネフリン抗体を作製し、Magnetic Cell Sorting (MACS) による糸球体上皮細胞の新しい単離法の開発に成功した。我々が開発した MACS 法は数時間で糸球体上皮細胞を単離することができるため、生体内における同細胞の挙動を従来法よりもはるかに正確に解析・評価することが可能となった。この MACS 法を用いてネフリン陽性細胞を Q-PCR にて解析を進めたところ、驚くべきことに Fc gamma receptor (FcγR) がネフリン陰性細胞に比して有意に発現していることが明らかとなった。FcγR は IgG の Fc 部に対する受容体で、リガンドである免疫複合体が結合することで種々のシグナル伝達物質のリン酸化を介して、サイトカインの産生や食能の亢進、あるいは細胞増殖の抑制やアポトーシスを誘導する。我々は糸球体上皮細胞が FcγR を有した免疫担当細胞の 1 つであるとの仮説を立て、本研究計画においてわれわれは糸球体上皮細胞における FcγR の発現意義を機能的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 糸球体上皮細胞の単離

MACS 法による糸球体上皮細胞の単離は以下の方法に従う。まず、Takemoto らの方法 [17] により腎糸球体を単離した後、酵素処理にて単細胞にする。抗ネフリン抗体を用いて糸球体由来の単細胞を標識し、磁気ビーズ標識済み 2 次抗体と反応させた後、MACS にて positive fraction を採取し、ネフリン陽性細胞を得る。

(2) 糸球体上皮細胞培養法の確立

MACS 法で精製した糸球体上皮細胞の培養法を P. Mundel らの論文等を参考に確立する。MACS による細胞の分離は免疫学の分野で広く行われており、分離した細胞を培養して ELISA にも利用でき、糸球体上皮細胞の ELISA についても予備実験を行う。

(3) 腎炎モデルマウスの作製

前述の通り腎炎のモデルには cGVHD モデルマウスを用い、脾細胞移入後 8 週にマウスを屠殺し腎臓を摘出する。また、脾細胞移入直後から第 8 週まで、2 週ごとに尿蛋白の測定および採血を行い腎機能について定量的評価を行う。我々は本モデルマウスを用いて糸球体障害には抗ネフリン自己抗体の関与が示唆されることを報告しており、本モデルマウスの取り扱いおよび解析には十分習熟している。脾細胞移入後 8 週目にマウスを屠殺し抗ネフリン抗体を用いた MACS にて糸球体上皮細胞を単離する。さらに、FcγR の欠損した BDF1 マウスを用いて野生型と同様の方法で cGVHD の誘導を行い、脾細胞移入後 8 週目に腎臓を摘出する。摘出した腎臓から MACS 法にて糸球体上皮細胞を得る。

(4) 免疫学的分子の解析

単離した細胞から mRNA や蛋白質の抽出を行い、Q-PCR および western blotting にて糸球体上皮細胞の免疫学的細胞内イベントや受容体の発現について、コントロール群との比較を行い、FcγR を始点としたシグナル伝達分子を主体に腎炎発症群において特異的に発現が増強あるいは抑制されている免疫学的分子の同定を行う。また、サイトカインについては ELISA を施行し、タンパクレベルでのさらなる解析を行う。

(5) Fc receptor 欠損マウスを用いた糸球体上皮細胞の解析

B6 background の Fc common gamma receptor 欠損マウス (FcγRKO) を既に東北大学加齢研究所 高井先生より譲渡を受けており、代表研究者の所属施設において本マウスの繁殖・維持を行っている。糸球体上皮細胞における FcγR の役割を明確にすべく、FcγRKO マウスを用いて、cGVHD モデルマウスを作製する。DBA/2 background の FcγRKO マウスが得られなかった場合、あるいは時間的に余裕がある場合は FcγRKO および野生型マウスから糸球体上皮細胞を分離・培養し、*in vitro* の系で実験をすすめる。発現が低下している分子については発現型ベクターを、また発現が増強している分子については siRNA の導入についても検討を試みる。

4. 研究成果

(1)糸球体上皮細胞の単離を確立し、査読付き英文誌に原著として投稿した。

(2)野生型マウスより糸球体上皮細胞培養株の樹立を試みたが、多くの糸球体上皮細胞は培養液中で生存することができず成功しなかった。糸球体上皮細胞は生後ほとんど分裂しない細胞と考えられており、FACSを用いた解析では生存している糸球体上皮細胞は20%程度であった。今後、培養株を得るためにSV40T抗原を導入済みのimmortomouseを購入し糸球体上皮細胞を得る必要がある。

(3)FcγR ノックアウトマウスを用いてcGVHDを誘導したところ腎機能障害の軽減を認めたが、これは糸球体上皮細胞だけでなく、FcγR ノックアウトマウスでの抗体産生の減少、免疫複合体の減少が大きく関与しているものと考えられた。今後、糸球体上皮細胞特異的にFcγRを欠損したマウスを作製する必要がある。

(4)Q-PCRを用いた解析では、IL-Xが野生型マウスを用いたcGVHDモデルにおいて上昇していることがわかった。同時にIL-X受容体も糸球体上皮細胞で発現していることが明らかとなった。今後、糸球体上皮細胞におけるIL-Xの役割について研究を進める予定である。

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)

①Furuya M, Nagahama K, Ishizu A, Otsuka N, Nagashima Y, Aoki I. Complexity of tumor vasculature and molecular targeting therapies. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011;**3**:549-61.

②Mandai S, Nagahama K, Tsuura Y, Hirai T, Yoshioka W, Takahashi D, Aki S, Aoyagi M, Tanaka H, Tamura T. Recovery of Renal Function in a Dialysis-dependent Patient with Microscopic Polyangiitis and both Myeloperoxidase Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibodies and

Anti-glomerular Basement Membrane Antibodies. *Naika* 2011;**50**(15):1599-603.

③Murakami A, Oshiro H, Kanzaki S, Yamaguchi A, Yamanaka S, Furuya M, Miura S, Kanno H, Nagashima Y, Aoki I, Nagahama K. A novel method for isolating podocytes using magnetic activated cell sorting. *Nephrol Dial Transplant* 2010;**25**(12):3884-90.

④Oshiro H, Gomi K, Nagahama K, Nagashima Y, Kanazawa M, Kato J, Hatano T, Inayama Y. Urinary cytologic features of primary large cell neuroendocrine carcinoma of the urinary bladder: a case report. *Acta Cytol* 2010;**54**(3):303-10.

⑤Shimizu H, Maegawa J, Ho T, Yamamoto Y, Mikami T, Nagahama K. Cutaneous metastasis of pancreatic carcinoma as an initial symptom in the lower extremity with obstructive lymphedema treated by physiotherapy and lymphaticovenous shunt: a case report, review, and pathophysiological implications. *Lymphology* 2010;**43**(1):19-24.

⑥Tanaka H, Fujii T, Kusaura T, Kobayashi A, Oshiro H, Sasaki T, Yamaguchi Y, Nagahama K. Quiz page July 2010: multiple lung nodules with worsening kidney function. *Am J Kidney Dis* 2010;**56**(1):A35-40.

⑦Akiyama T, Endo H, Inamori M, Iida H, Hosono K, Fujita K, Yoneda M, Takahashi H, Goto A, Abe Y, Kirikoshi H, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Nagahama K, Inayama Y, Nakajima A. Symptomatic gastric sarcoidosis with multiple antral ulcers. *Endoscopy* 2009;**41** Suppl 2:E159.

⑧Ito S, Harada T, Nakamura T, Imagawa T, Nagahama K, Sasaki T, Fujinaga S, Aihara Y, Yokota S. Mizoribine for renal sarcoidosis: effective steroid tapering and prevention of recurrence. *Pediatr Nephrol* 2009;**24**(2):411-4.

⑨Medoff BD, Sandall BP, Landry A, Nagahama K, Mizoguchi A, Luster AD, Xavier RJ. Differential requirement for CARMA1 in

agonist-selected T-cell development. *Eur J Immunol* 2009;39(1):78-84.

〔学会発表〕(計10件)

①稲山嘉明, 田栗正隆, 山中正二, 中山崇, 平沙代子, 小野響子, 海野俊徳, 矢澤卓也, 下山田博明, 奥寺康司, 長嶋洋治, 古屋充子, 長濱清隆, 村上あゆみ, 青木一郎, 森田智視. 診断病理における制度管理: 大腸癌における脈管侵襲評価における診断者間のばらつきについて. 第100回日本病理学会総会 2011.4.30 パシフィコ横浜

②古屋充子, 米山朋那, 宮城悦子, 上大介, 長濱清隆, 田中玲子, 太田一郎, 宮城洋平, 長嶋洋治, 平原史樹, 稲山嘉明, 青木一郎. 子宮内膜症性嚢胞と卵巣癌: CXC ケモカイン軸に特徴づけられる炎症性微小環境の変化. 第100回日本病理学会総会 2011.4.30 パシフィコ横浜

③長濱清隆, 村上あゆみ, 藩勤雅. A novel method for isolating podocytes using magnetic activated cell sorting. 第53回日本腎臓学会 2010.6.16 神戸国際会議場

④村上あゆみ, 藩勤雅, 大城久, 山中正二, 古屋充子, 長嶋洋治, 青木一郎, 長濱清隆. MACS を用いた糸球体上皮細胞の単離. 第99回日本病理学会総会 2010.4.28 東京京王プラザ

⑤古屋充子, 米山朋那, 宮城悦子, 田中玲子, 上大介, 長濱清隆, 長嶋洋治, 宮城洋平, 稲山嘉明, 青木一郎. 卵巣腫瘍における IFN- γ 誘導性ケモカイン受容体 CXCR3 バリアントの解析. 第99回日本病理学会総会 2010.4.28 東京京王プラザ

⑥大城久, 小野響子, 平沙代子, 海野俊徳, 渡辺眞一郎, 山中正二, 中山崇, 長嶋洋治, 長濱清隆, 村上あゆみ, 青木一郎, 稲山嘉明. 多発性骨髄腫に合併した好酸球性多発性筋炎の剖検例. 第99回日本病理学会総会 2010.4.27 東京京王プラザ

⑦稲山嘉明, 山中正二, 村上あゆみ, 中山崇, 大城久, 海野俊徳, 小野響子, 平沙代子, 矢澤卓也, 下山田博明, 奥寺康司, 長嶋洋治, 古屋充子, 長濱清隆, 北村均, 青木一郎. 横浜市立大学におけるバイオバンク室の運営と課題. 第99回日本病理学会総

会 2010.4.27 東京京王プラザ

⑧大城久, 長嶋洋治, 金澤美千代, 佐川弘美, 西尾由紀子, 長濱清隆, 小野響子, 中山崇, 山中正二, 稲山嘉明. 副鼻腔原発 lipid-rich carcinoma の細胞学的所見. 第48回日本臨床細胞学会秋季大会 2009.10.30 福岡国際会議場

⑨村上あゆみ, 長濱清隆, 小林麻裕美, 平和伸仁. 体肺動脈短絡術 20年後にチアノーゼ腎症と診断された一例. 第39回日本腎臓学会東部学術大会 2009.10.3 東京グランドプリンスホテル新高輪

⑩村上あゆみ, 長濱清隆, 原田知典, 伊藤秀一, 寺西淳一, 江中牧子, 田辺美樹子, 河内香江, 佐々木毅, 野澤明典, 古屋充子, 長嶋洋治, 青木一郎. WT1 遺伝子の exon 10 のナンセンス変異を認め腎移植に至った1例. 第98回日本病理学会総会 2009.5.3 京都国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長濱 清隆 (NAGAHAMA KIYOTAKA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 00336538

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: