

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790423

研究課題名(和文)腎臓におけるカベオリン1の意義に関する検討

研究課題名(英文)The significance of Caveolin-1 in experimental kidney disease

研究代表者

山本 泉 (Yamamoto, Izumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60600468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓におけるCaveolin-1発現の意義について、Caveolin-1遺伝子改変マウスを用いて、各種実験腎炎モデルを検討した。虚血再灌流、尿細管結紮、eNOS阻害剤投与、抗VEGF抗体投与の各モデルで、ワイルドタイプの腎内微小血管内皮細胞のカベオラおよびCaveolin-1発現量に変化を認めなかった。一方、間質線維化を評価したところ、尿細管結紮モデルおよびeNOS阻害剤投与モデルで、Caveolin-1ノックアウトマウスにおける間質線維化増加を確認した。間質線維化を促進するマクロファージ浸潤は、尿細管結紮モデルにのみ生じ、Caveolin-1ノックアウトマウスにおいて強く認められた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the significance of Caveolin-1 in kidney disease, we investigated several experimental kidney disease model using Caveolin-1 knockout, transgenic and wild type mouse. Ischemia reperfusion injury model, unilateral ureteral obstruction (UUO) model, eNOS inhibitor infusion model and anti-VEGF antibody infusion model were applied for this purpose. We found that each model showed no remarkable change regarding Caveolin-1 expression and Caveolae formation on endothelial cells. Only UUO model and eNOS inhibitor infusion model showed increased tubulointerstitial fibrosis in Caveolin-1 knockout mouse compared with wild type mouse. Further examination revealed that only UUO model showed increased macrophage infiltration compared with wild type mouse.

研究分野：腎移植

キーワード：実験腎炎 カベオリン Caveolin-1

## 1. 研究開始当初の背景

(1)腎移植患者における移植腎生着率は、近年の免疫抑制剤の進歩により大きく改善した。しかし、さらなる生着率向上のためには、移植腎長期生着率に最も影響する慢性拒絶反応の病態の理解が重要である。我々はこれまでに、慢腎移植で生じる慢性拒絶反応のターゲットが血管内皮細胞であることに着目し、電子顕微鏡レベルでの内皮細胞の形質変化について観察した。その結果、内皮細胞におけるカベオラ形成が増加していることを見出した。この変化を生検材料全体で広く観察するために、カベオラ関連蛋白で免疫染色を施行し、正常例における糸球体内皮細胞 (GC : glomerular capillary) は、PV-1 : plasmalemmal-vesicle associated protein-1 が欠如し、傍尿細管毛細血管 (PC : peritubular capillary) では、Cav-1 : Caveolin-1 が欠如しているにもかかわらず、慢性拒絶反応症例においては、重症例ほど GC に PV-1 が、PC には Cav-1 が高発現していることを示し、この現象が、血管腔減少および基底膜多層化と相関し、形態学的に内皮細胞のリモデリング様変化を随伴することを示してきた。

**(Yamamoto I et al. Am J Transplant 2007;7:1954, Yamamoto I et al. Am J Transplant 2008;8:2627)** カベオラ関連蛋白である Cav-1 や PV-1 は、apoptosis (**J Cell Sci; 2006:119:1812**)、基底膜産生障害 (**MBC 2004:15:678**)、リモデリング (**JASN 2008; K Ichimura et al**) に関与することが知られている。これらの事実は、慢性拒絶反応で特徴的な、血管数の減少、基底膜肥厚、内皮細胞のリモデリングなどが、内皮細胞のカベオラ及びカベオラ関連蛋白に関連して生じる可能性がある。

(2)我々は、腎臓における Caveolin-1 発現の重要性について、Caveolin-1 ノックア

ウトマウス、トランスジェニックマウス、ワイルドタイプマウスの3群を用いて、尿細管結紮モデルについて、間質線維化進展の程度を検討し、Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、他の2群に比べて、有意に線維化領域が広がることを示してきた。( *Am J Physiol Renal Physiol 2010;358(2) 357-64*) この事実は、Caveolin-1 が間質線維化に対して抑制的に働くことが示唆された興味深い結果であった。

## 2. 研究の目的

(1)以上の研究結果を背景とし、本研究では GC と PC を正常形質に保っていると考えられる VEGF のシグナルの変化が生じる既知のマウスモデルを中心として、虚血再灌流モデル、尿細管結紮モデル、eNOS 阻害剤投与モデル、抗 VEGF 抗体投与モデルにおいて、GC ならびに PC における内皮細胞におけるカベオラ形成およびカベオラ関連蛋白である Cav-1 および PV-1 発現の誘導と線維化の関連性を検討することを目的とした。これにより、内皮細胞のカベオラ形成が持つ意義に対する基礎知識の集積が可能になる。

(2)我々のこれまでの先行研究で、尿細管結紮モデルにおいて、間質線維化進展の程度を検討し、Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、他の2群に比べて、有意に線維化領域が広がることを示した。このことは、Caveolin-1 が抗線維化に働いていることを示唆し、広く腎疾患における慢性腎不全への進展抑制につながる知見となる可能性があり、他の腎障害モデルにおいても、同様の検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 腎臓における Caveolin-1 の意義について、Caveolin-1 ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、ワイルドタイプ

マウスの3群を用いて、移植腎病理に重要である実験腎炎モデルである虚血再灌流モデル、尿細管結紮モデル、eNOS阻害剤投与モデル、抗VEGF抗体投与モデルについて、腎臓内の毛細血管である、糸球体毛細血管及び傍尿細管毛細血管の内皮細胞におけるカベオラ形成が生じるかの検討を行った。

(2) 腎臓におけるCaveolin-1の意義について、Caveolin-1ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、ワイルドタイプマウスの3群を用いて、虚血再灌流モデル、尿細管結紮モデル、eNOS阻害剤投与モデル、抗VEGF抗体投与モデルについて、シリウスレッド、マッソン染色、抗SM抗体を間質線維化マーカーとして用いて線維化の進展について検討する。また、線維化に必要な役割を果たすマクロファージの浸潤についても検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Caveolin-1の正常腎での発現

Caveolin-1の正常腎での発現について、ヒト及びマウスにおけるCaveolin-1発現をCaveolin-1ノックアウトマウスを陰性コントロールとして決定した。Caveolin-1は腎動脈から小葉間動脈、輸入細動脈にかけて内皮細胞および中膜平滑筋細胞で発現が亢進し、糸球体内皮細胞でほぼ消失したのち、輸出細動脈から傍尿細管毛細血管、下行直細血管の内皮細胞に発現の亢進が認められた。また、糸球体においては、メサンギウム領域にも発現の亢進が認められた。ヒトでは、傍尿細管毛細血管では発現はほぼ消失しており、ヒトとマウスにおけるCaveolin-1の発現が異なっていた。

##### (2)カベオラの正常腎での分布

電子顕微鏡を用いて、内皮細胞のカベオラ形態について検討を行い、先行研究結果で

あるCaveolin-1分子の正常発現分布との比較を行った。カベオラは、小葉間動脈レベルから、輸入細動脈まで分布し、糸球体の入り口から内皮細胞のfenestrationに随伴して消失が認められた。その後輸出細動脈から再びカベオラ形態が確認されたが、傍尿細管毛細血管では、再度fenestrationに随伴してカベオラ形態の消失が認められた。その後Descending vasa rectaから、再びカベオラ形態が確認されたが、Ascending vasa rectaには認められなかった。

##### (3)正常腎におけるCaveolin-1発現とカベオラ形成の比較

傍尿細管毛細血管においては、Caveolin-1は陽性であるにもかかわらず、カベオラ形態は失われていることが証明された。共焦点顕微鏡を用いた検討では、傍尿細管毛細血管内皮細胞では、カベオラ形成がないにも関わらず、Caveolin-1の発現量は小葉間動脈、輸入輸出細動脈、Descending vasa rectaとほぼ同等であった。(図1)

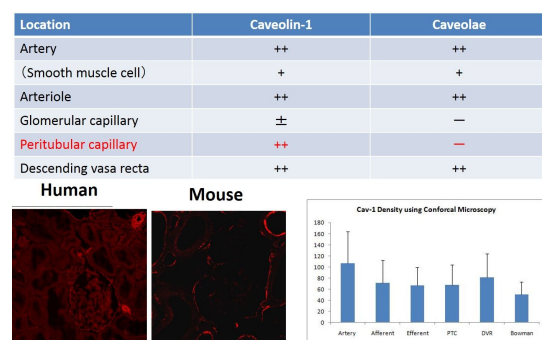


図1 正常マウスにおけるCaveolin-1およびカベオラの分布とCaveolin-1発現量

##### (4)実験腎炎モデルにおける内皮細胞のカベオラおよびCaveolin-1発現

虚血再灌流モデル、尿細管結紮モデル、eNOS阻害剤投与モデル、抗VEGF抗体投与モデルにおいて先行研究で確立した正常腎におけるCaveolin-1発現およびカ

ベオラ形成の分布に変化を認めるかどうか検討を行ったが、内皮細胞における Caveolin-1 の発現量およびカベオラ形成に変化は認められなかった。

(5)実験腎炎における Caveolin-1 の役割

虚血再灌流モデル、尿細管結紮モデル、eNOS 阻害剤投与モデル、抗 VEGF 抗体投与モデルを対象として、腎臓における間質線維化の検討を行った。虚血再灌流モデルおよび抗 VEGF 抗体投与モデルは、それぞれ、24 時間および 48 時間目と早期の検討であったことから、尿細管間質における浮腫状変化は認めたものの、間質線維化はいずれの群においても生じておらず、Caveolin-1 の遺伝子改変の有無で変化を認めなかった。eNOS 阻害剤投与モデルで、シリウスレッドによる染色性の評価を行ったところ、Caveolin-1 ノックアウトマウスでは、ワイルドタイプに対して約 3 倍の間質線維化が認められ、統計学的に有意差を認めた。一方、Caveolin-1 トランスジェニックマウスでは、間質線維化はワイルドタイプと統計学的に有意差を認めなかった。(図 2) この結果は、我々の先行研究の結果である尿細管結紮モデルと類似した所見であつた。

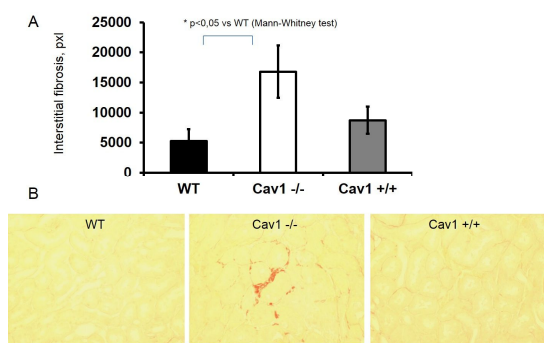


図 2 eNOS 阻害剤投与モデルにおける間質線維化

(6)尿細管結紮モデルにおけるマクロファージ浸潤

Caveolin-1 ノックアウトマウスでより尿細管間質線維化が増加することから、Caveolin-1 には抗線維化作用が存在することが示唆された。そのため、尿細管結紮モデルおよび eNOS 阻害剤投与モデルにおいてマクロファージの間質への細胞浸潤の評価を行った。尿細管結紮モデルにおいて、単位面積  $10^4 \mu m^2$  あたりの F4/80 陽性細胞の割合は、Caveolin-1 ノックアウトマウスにおいては  $7.3 \pm 1.96$  であり、トランスジェニックマウスで  $6.5 \pm 1.63$ 、ワイルドタイプで  $4.5 \pm 1.07$  であり、統計学的に、Caveolin-1 ノックアウトマウスは、ワイルドタイプに比べて、有意にマクロファージの浸潤が強いことが判明した。(p=0.032)

(7)eNOS 阻害剤投与モデルにおけるマクロファージ浸潤

LNMMMA を用いた eNOS 阻害剤投与モデルにおいても同様の検討を行ったが、このモデルでは、尿細管間質線維化が進展するものの、マクロファージの浸潤は認められなかった。したがって、尿細管結紮モデルと eNOS 阻害剤投与モデルでは、間質線維化のメカニズムがことなると考えられた。なお、各モデルのコントロールとして、Caveolin-1 ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、ワイルドタイプマウスについて各々 F4/80 によるマクロファージの浸潤を評価したが、いずれの群においても、マクロファージの浸潤は認められなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

中田泰之、山本泉、小林賛光、山川貴史、勝俣陽貴、丹野有道、山本裕康 移植腎病理研究会 2014 年 7 月 19 日コクヨホール(東京都品川区) 慢性抗体関連型拒絶反応症例に

おける PTC の C4d および Caveolin-1 染色性と移植腎予後の検討

中田泰之、山本泉、小林賛光、山川貴史、勝俣陽貴、丹野有道、山本裕康 日本臨床腎移植学会 2015 年 2 月 6 日 名古屋ウエスティンキャッスル(愛知県名古屋市)慢性抗体関連型拒絶反応の Caveolin-1 と C4d 染色性と移植腎予後

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 泉 (YAMAMOTO, Izumi)  
東京慈恵会医科大学・腎臓高血圧内科・助教

研究者番号：60600468

### (2) 研究分担者

研究者番号：

### (3) 連携研究者

研究者番号：