

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860666

研究課題名(和文)腎糸球体上皮細胞におけるCD80発現の制御機構についての研究

研究課題名(英文)The regulatory mechanisms of the CD80 expression in the podocytes.

研究代表者

島田 美智子(Shimada, Michiko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40463765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：微小変化型ネフローゼ症候群は、これまでにT細胞障害説が示されているものの証明されていない。CD80はTリンパ球を活性化する因子の一つであるが、近年、糸球体上皮細胞におけるCD80の発現および尿中CD80の増加が本症でみられることが示唆された。本研究では、本症においてCD80の発現の収束機構に障害があるとの仮説のもと、培養糸球体上皮細胞において、通常CD80の発現を制御するとされるInterleukin-10やcytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4の発現について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In minimal change disease (MCD), T cell-disorder hypothesis has been proposed, but has not been proved. CD80 is one of the co-stimulatory molecules which helps T cell activation. Recently, the increased expression of CD80 in the podocytes and in the urine was demonstrated in MCD. We hypothesized that the disorder of the regulatory mechanism of CD80 could be the cause of MCD. Therefore, we used cultured podocytes and investigated the expressions of the interleukin-10 and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 which usually regulate CD80.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糸球体上皮細胞 CD80

1. 研究開始当初の背景

(1) CD80 は本来、抗原提示細胞に発現する T リンパ球活性化の副経路を担う因子であるが CD80 の腎系球体上皮細胞 (ポドサイト) における発現増強、および尿中 CD80 の増加が微小変化型ネフローゼ症候群における尿蛋白と関連することが報告されている。これまでに、ポドサイトにおける CD80 の発現は感染やポドサイトの遺伝子異常などの刺激によって誘導されると考えられているが、正常の動物モデルや培養細胞においてもエンドトキシンであり Toll-like receptor (TLR) 4 のリガンドでもある Lipopolysaccharides (LPS) などにより、ポドサイトにおいて一時的に CD80 発現を誘導することができる。

(2) 微小変化型ネフローゼ症候群においては、制御性 T 細胞の機能不全が指摘されている。また、通常 CD80 の制御に関わる因子として、制御性 T 細胞が豊富に発現する cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) や抑制性サイトカインの Interleukin-10 (IL-10) などが知られている。本研究では、微小変化型ネフローゼ症候群において CD80 発現の収束に問題があるという仮説のもとに、主に、これらの抑制性因子についてポドサイトにおける発現、およびその役割について検討を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、微小変化型ネフローゼ症候群における尿蛋白の発症機序を解明することである。本症では CD80 の発現増強とともに細胞骨格の変化が生じ尿蛋白の原因となることが示唆されている。ポドサイトにおける CD80 の発現はウイルス感染などの刺激によって誘導されると考えられているが、本研究では、CD80 の発現の収束に関わる因子が病態に大きく関与するという仮説のもとに、CD80 の制御に関わるとされる抑制性サイトカインのポドサイトにおける発現、およ

びその役割について検討を行う。

本研究では微小変化型ネフローゼ症候群において、軽微な上気道感染などのウイルス感染がしばしばネフローゼ再発の契機となることを参考に、LPS ではなく、ウイルス感染を模倣する TLR3 のリガンドであり 2 重鎖 RNA よりなる polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC) の添加によって刺激実験を行う。なお、過去の報告より polyIC がポドサイトにおいて CD80 を誘導し細胞骨格変化を誘導することが示されている。

ポドサイト障害には様々な機序が報告されているが、Dynamin1 はポドサイトにおける細胞骨格の維持に関わる重要な因子である。そして、Cathepsin1 は、Dynamin1 やシナプトボジンの分解によりポドサイト障害に関わると考えられている。よって、polyIC による刺激により、これらの因子に変化が見られるかどうか確認を行う。このほか、微小変化型ネフローゼ症候群において、アレルギーと関係の深いサイトカインである IL-13 の役割が示唆されている。よって polyIC による刺激よって、IL-13、および受容体の発現に変化が見られるか検討する。

2. 研究の方法

(1) ヒト由来の腎臓臓側系球体上皮細胞 (ポドサイト) を使用する。培養液は、RPMI-1640 に 10% ウシ胎児血清 (FBS)、1% インスリン-トランスフェリン-セレンウム サプリメント (Invitrogen)、ペニシリン (100U/ml)、ストレプトマイシン (100ug/ml) を添加して使用する。この細胞は 33 度にて増殖させ、その後 37 度にて 10 日間培養することによって分化させる。刺激実験は、1% FBS を含む低血清培地で 24 時間前処置を行なったのち polyIC (500ng/ml) を添加して行う。3, 6, 12, 24, 48 時間培養後に RNA を抽出し、cDNA を作成、Applied Biosystems 社から購入した Taqman Probe を使用し、Applied Biosystems

社の ABI 7700 を用いて定量 RT-PCR を行う。また、同様に刺激実験を行い培養上清中の CTLA-4、IL-10、TGF - beta を ELISA キットを用いて定量を行い、細胞の総蛋白量を用いてデータの補正を行い、蛋白の発現量の推移についても検討を行う。

4 . 研究成果

(1) ポドサイトにおける Dynamin1 および Cathepsin1 の発現についての検討

ポドサイトにおける polyIC 添加(500ng/ml)により Dynamin1 の mRNA 発現は経時的に減少した。

Control 1.0 ± 0.17 (相対値)、
polyIC 48 時間 0.25 ± 0.09 (p<0.01)。

ポドサイトにおける polyIC 添加(500ng/ml)により Cathepsin1 の mRNA 発現は経時的に増加した。

Control 1.0 ± 0.13 (相対値)、
polyIC 48 時間 1.72 ± 0.27 (p<0.01)。

以上より、polyIC 添加によってポドサイトの細胞骨格の維持に関わる重要な因子である Dynamin1 が減少し、Dynamin1 やシナプトポジンの分解によりポドサイト障害に関わると考えられている Cathepsin1 の発現が増強した。よって polyIC 添加によるポドサイト障害モデルは、ポドサイトの細胞骨格変化に関わる適切なモデルであることが示唆された。

(2) ポドサイトにおける抑制性サイトカインの発現についての検討

ポドサイトにおける polyIC 添加(500ng/ml)により IL-10 の mRNA 発現は経時的に増加傾向であったが有意差は得られなかった。

Control 1.0 ± 0.57 (相対値)、
polyIC 48 時間 14.0 ± 10 (有意差なし)。

ポドサイトにおける polyIC 添加(500ng/ml)により CTLA-4 の mRNA 発現は 6 時間で有意に減少の後に経時的に増加の傾向であったが有意差は得られなかった。

Control 1.0 ± 0.06 (相対値)、

polyIC 6 時間 0.51 ± 0.05 (p<0.01)。

ポドサイトにおける polyIC 添加(500ng/ml)により TGF 1 の mRNA 発現には有意な変化はみられなかった。

IL-10 について ELISA による蛋白量測定を行ったが、本実験条件下においては感度以下であった。

以上より、ポドサイトにおける抑制性サイトカインの発現レベルは概して限られたものであった。一方、その発現パターンは、抗原提示細胞などの免疫系の細胞に類似しており、炎症反応ののちに収束に向かって増強していき、遅延性に発現増強することが示唆された。また、ポドサイトにおける CD80 の制御においては、全身レベルの抑制性サイトカインレベルが重要なのかも知れないことが示唆される。

(3) ポドサイトにおける IL-13 および受容体の発現についての検討

ポドサイトにおける polyIC 添加(500ng/ml)により IL-13 の mRNA 発現は経時的に増加した。

Control 1.0 ± 0.47 (相対値)、
polyIC 48 時間 3.3 ± 0.62 (p<0.05)。

ポドサイトにおける polyIC 添加(500ng/ml)により IL-13 受容体の mRNA 発現は有意な変化を示さなかった。

以上より、ポドサイトにおける polyIC 添加により、IL-13 産生の増加することが示された。微小変化型ネフローゼ症候群においては、感染やアレルゲンへの暴露は、発症や再発の契機としてしばしばみられるが、これら二つの現象が、ポドサイトにおいて相互作用を持つ可能性が示唆された。

<引用文献>

Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi MP, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H,

Kalluri R, Sharpe AH, Kreidberg JA, Mundel P. J Clin Invest. 2004 May;113(10):1390-7.

Urinary CD80 excretion increases in idiopathic minimal-change disease. Garin EH, Diaz LN, Mu W, Wasserfall C, Araya C, Segal M, Johnson RJ. J Am Soc Nephrol. 2009 Feb;20(2):260-6.

Toll-like receptor 3 ligands induce CD80 expression in human podocytes via an NF- κ B-dependent pathway. Shimada M, Ishimoto T, Lee PY, Lanasp MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Wymer DT, Yamabe H, Mathieson PW, Saleem MA, Garin EH, Johnson RJ. Nephrol Dial Transplant. 2012 Jan;27(1):81-9.

Minimal change disease: a "two-hit" podocyte immune disorder? Shimada M, Araya C, Rivard C, Ishimoto T, Johnson RJ, Garin EH. Pediatr Nephrol. 2011 Apr;26(4):645-9.

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 0 件)

〔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

島田 美智子 (SHIMADA, Michiko)

弘前大学医学部附属病院・助教

研究者番号: 40463765

(3) 連携研究者

今泉 忠淳 (IMAIZUMI, Tadaatsu)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 90232602

(4) 研究協力者

成田 育代 (NARITA, Ikuyo)

福士 泰世 (FUKUSHI, Yasuyo)