

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590960

研究課題名（和文） 腎疾患進展における FSP1 陽性ポドサイトの意義

研究課題名（英文） Role of podocyte expression of FSP1 in the progression of kidney disease

研究代表者

岩野 正之 (IWANO MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20275324

研究成果の概要：ポドサイトにおける fibroblast-specific protein 1 (FSP1) の発現が糸球体硬化の進展に関与するか否かを検討した。腎生検組織では、FSP1 陽性ポドサイト数と糸球体硬化病変の有無に関連が認められた。腎生検で結節性病変を呈する進行した糖尿病性腎症患者の尿中では、FSP1 陽性ポドサイト数が有意に上昇していた。FSP1 陽性ポドサイトが糸球体基底膜から剥離脱落することが、糸球体硬化病変（糖尿病性腎症では結節性病変）の出現に関与することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、EMT、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、微小変化型ネフローゼ症候群

1. 研究開始当初の背景

Fibroblast specific protein 1 (FSP1) は線維芽細胞特異的に発現する分子であり、線維芽細胞の形態維持や運動能に関与している。われわれは、腎間質線維化の進展に尿細管上皮細胞の fibroblast specific protein 1 (FSP1) 陽性線維芽細胞への形質変異 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、われわれは IgA 腎症患者の腎生検を用いた組織学的検討から、FSP1 陽性線維芽細胞数が IgA 腎症患者の予後を決定する最も

重要な因子であることを明らかにしている。これらの検討は間質領域を中心に実施しており、糸球体内の FSP1 発現については検討されていなかった。最近われわれは、1)糖尿病性腎症では、腎症の進展とともに FSP1 陽性ポドサイト数が増加する、2)糖尿病性腎症で、糸球体基底膜から剥離したポドサイトは FSP1 陽性である、3)巣状糸球体硬化症では、微小変化型ネフローゼ症候群に比して、FSP1 陽性ポドサイト数が有意に多い、4)インサイトハイブリダイゼーション法で、ポドサイトにおける FSP1 mRNA の発現が認め

られる、5)糖尿病性腎症患者の尿中には FSP1 陽性ポドサイトが検出され、尿中ポドサイトの 80%以上が FSP1 を発現している、6)FSP1 陽性ポドサイトは、EMT に重要な役割を果たす integrin-linked kinase (ILK) を発現している、ことを報告した。ポドサイトの基底膜からの剥離が糸球体硬化の進展に重要であることは、多くの臨床的および実験的検討から証明されている。また、ポドサイトにおける EMT が、ポドサイトの剥離を誘導することを示唆する報告も散見される。さらに、剥離した尿中ポドサイトはアポトーシスに陥ったのではなく、培養可能であることも示されている。これらの既報をわれわれの検討結果とあわせて考察すると、1)ポドサイトにおける FSP1 の発現がポドサイトにおける EMT を誘導する、2)EMT により線維芽細胞様に変異したポドサイトは運動能を獲得し、基底膜から剥離する、3)ポドサイトが一定数以上剥離した糸球体では、不可逆的に糸球体硬化が進展するという仮説が、すべての糸球体疾患に共通した進展機序として考えられる。

2. 研究の目的

EMT は腎間質線維化の進展機序に深く関与する現象として、われわれの研究を中心に多くの研究が行われてきた。EMT のマーカーである FSP1 は、間質線維化領域では尿細管上皮細胞や間質線維芽細胞に発現が認められるが、糸球体内での局在については未だ詳細な検討は行われていない。われわれは、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、および IgA 腎症における FSP1 の糸球体内局在を検討し、FSP1 の発現はメサンギウム細胞や糸球体内皮細胞には認められず、ポドサイトに限局していることを確認した。糸球体病変の進展における EMT の関与についての臨床的検討は極めて少なく、実験的に証明した報告は皆無である。そこで本研究では、糸球体病変における EMT の関与を明確にするために、原発性糸球体疾患患者および糖尿病性腎症患者の腎生検組織における FSP1 陽性ポドサイト数を検討し、糸球体病変、蛋白尿などの臨床指標および腎機能予後との関連について明らかにする。また同様に、尿中 FSP1 陽性ポドサイト数と糸球体病変、蛋白尿などの臨床指標および腎機能予後との関連についても検討する。さらに、ポドサイトにおける FSP1 の発現が、基底膜からのポドサイトの剥離やポドサイトにおける EMT の誘導に関与しているか否かを実験的に証明するために、ポドサイト特異的に FSP1 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、本マウスにおける組織学的な検討を経時的に実施する。

3. 研究の方法

(1)FSP1 陽性ポドサイト数の臨床的意義

奈良県立医科大学第1内科に腎生検目的で入院し、糖尿病性腎症あるいは原発性糸球体疾患(微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症)と診断された患者のうち、本研究への参加を文書により同意した症例を対象とする。腎生検組織(ホルマリン固定、パラフィン切片)を用いて、FSP1 の糸球体内局在を酵素抗体法で検討する。さらに、FSP1 陽性ポドサイト数と糸球体病変、蛋白尿などの臨床指標、および腎機能予後との関連を検討する。

また、腎生検時に研究参加の同意が得られた患者から随時尿を採取し、尿沈渣をサイトスピンドスライドグラスに固定後、抗 FSP1 抗体と抗ポドカリキシン抗体を用いた蛍光2重染色を実施する。FSP1 陽性・ポドカリキシン陽性細胞を尿中 FSP1 陽性ポドサイトと判定し、尿検体 10 ml 中の FSP1 陽性ポドサイト数をカウントする。尿中 FSP1 陽性ポドサイト数と糸球体病変、蛋白尿などの臨床指標、および腎機能予後との関連を検討する。

(2)ポドサイト特異的に FSP1 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製

ポドサイト特異的に FSP1 の発現を誘導するために、ポドサイト特異的に遺伝子発現を誘導する nephrin promoter あるいは podocin promoter (東海大学 松阪泰二助教授より供与)に FSP1 と human growth hormone の poly A site を繋いだトランスジーンを構築後、トランスジーンを受精卵に導入し、FSP1 トランスジェニックマウスを作製する。経時的に1日尿蛋白量をメタボリックケージを用いて測定後、sacrifice して腎病変を組織学的に検討する。

(3)マウスポドサイト細胞株を用いた検討

マウスポドサイト細胞株(Peter Mundel 教授より供与)に EMT 誘導因子である transforming growth factor-beta (TGF-β1) を添加し、EMT 関連因子の発現誘導を検討する。

4. 研究成果

(1)FSP1 陽性ポドサイト数の臨床的意義

微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)38例、巣状糸球体硬化症(FSGS)31例、糖尿病性腎症(DMN)109例を対象とした。糸球体内 FSP1 および尿細胞中 FSP1 の発現を免疫染色法で検討した。FSP1 mRNA の局在および糸球体内発現量も検討した。FSP1 陽性ポドサイトは、MCNS に比し FSGS および DMN で有意に増加していた。分節状硬化病変や結節性病変を呈する糸球体では、FSP1 陽性ポドサイト数が増加したが、全節性硬化病変では FSP1 陽性ポドサイトは認められなかった。結節性病変を呈

する糸球体では、FSP1 陽性ポドサイトの基底膜からの剥離が認められた (図 1)。

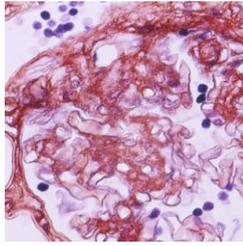


図 1 基底膜から剥離した FSP1 陽性ポドサイト

また、尿中 FSP1 陽性細胞数は糖尿病性腎症の臨床病期の進展とともに増加したが、腎機能が低下した症例では逆に減少していた。さらに、尿中ポドサイトの 80%以上が FSP1 陽性であり、FSP1 陽性細胞ではアポトーシスが認められなかった。DMN では、メサンギウム増殖の程度および結節性病変の出現に伴い、FSP1 陽性ポドサイト数が増加し、臨床病期の進展とともに尿中 FSP1 陽性細胞数が増加した。また、DMN のポドサイトには EMT 誘導因子である Snail1 および Integrin-linked kinase (ILK) の発現が認められ、逆に上皮細胞マーカーである ZO-1 の発現が低下していた。これらの結果から、ポドサイトにおける FSP1 の発現が EMT を惹起し、基底膜からのポドサイト剥離を誘導し、糸球体硬化の進展に関与することが示唆された。

(2)ポドサイト特異的に FSP1 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製

ポドサイト特異的に FSP1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し腎病変を解析したが、ポドサイトの剥離は誘導されなかった (図 2)。また、経時的に 96 週齢まで尿蛋白量と腎組織を検討したが、wild type と差を認めなかった。したがって、FSP1 は EMT マーカーとしては有用であるものの、FSP1 単独では *in vivo* で、ポドサイトの剥離を誘導しないことが明確となった。

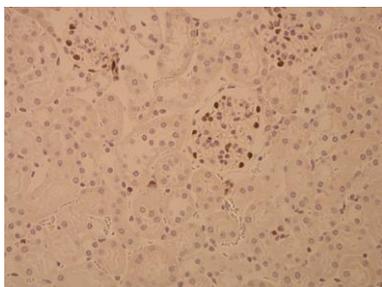


図 2 FSP1 トランスジェニックマウスの腎病変

(3)マウスポドサイト細胞株を用いた検討

ポドサイト細胞株を用いた *in vitro* の実験系では、EMT 誘導因子である TGF- β 1 の添加により、ポドサイトで Snail1, lysyl oxidase 1, fibronectin, および collagen type 1 などの間葉系マーカーの発現が有意に増加した。

(4)考察

以上の研究成果から 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。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可能性も考えられ、今後の詳細な検討が必要である。

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 7 件)

- (1) Yoshimoto S, Nakatani K and Iwano M (11 人中 3 番目) Elevated levels of fractalkine expression and accumulation of CD 16+ monocytes in glomeruli of active lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 50:47-58, 2007 査読有
- (2) Higgins DF, Kimura K and Iwano M (13 人中 12 番目) Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial to mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117:3810-3820, 2007 査読有
- (3) Nakatani K, Qu WM and Iwano M (10 人中 7 番目) A genetic locus controlling aging sensitive regression of B lymphopoiesis in an autoimmune-prone MRL/lpr strain of mice. *Scan J Immunol* 66:654-661, 2007 査読有
- (4) Harada K, Akai Y and Iwano M (8 人中 7 番目) Prediction of corticosteroid responsiveness based on fibroblast specific protein 1 (FSP1) in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 23:3152-3159, 2008 査読有

- (5) Kimura K and Iwano M (12人中2番目) Stable expression of HIF-1 α in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. Am J Physiol Renal Physiol 295:F1023-F1029, 2008 査読有
- (6) Higgins DF, Kimura K and Iwano M (4人中3番目) Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. Cell Cycle 7:1128-1132, 2008 査読有
- (7) Yamaguchi Y and Iwano M (12人中2番目) Epithelial-mesenchymal transition as an explanation for podocyte depletion in diabetic nephropathy. Am J Kidney Dis, in press. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 岩野正之ら、糖尿病性腎症の進展におけるポドサイトの epithelial-mesenchymal transition (EMT)の関与について、第72回日本腎臓学会学術総会、平成19年5月25日、浜松

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 正之 (IWANO MASAYUKI)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：20275324

(2) 研究分担者

齋藤 能彦 (SAITO YOSHIHIKO)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：30250260
森 俊雄 (MORI TOSHIO)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10115280

(3) 連携研究者