

機関番号：32644

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790822

研究課題名 (和文) ヒト糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞減少のメカニズムの検討

研究課題名 (英文) The study for mechanism of glomerular epithelial cell decrease in human diabetic nephropathy.

研究代表者

豊田 雅夫 (TOYODA MASAO)

東海大学 医学部 講師

研究者番号：00349383

研究成果の概要 (和文)：

糖尿病性腎症腎組織における上皮細胞スリット領域の各種蛋白の発現を検討することを目的に、抗 podocin 抗体、抗 ZO-1 抗体、抗 CD2-AP 抗体を用い免疫組織染色法による蛋白発現変化における検討を行った。抗 podocin 抗体陽性面積率と一日尿蛋白排泄量とは負の相関関係を認め、さらにクレアチンクリアランスとは正の相関関係が認められた。抗 ZO-1 抗体、抗 CD2-AP 抗体についても同様の傾向であった。これらのスリット膜関連蛋白の発現変化が、糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞障害に密接に関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Proteinuria is an important risk factor for the progression of diabetic nephropathy (DN). The podocyte foot processes are connected just above the glomerular basement membrane (GBM) by a special structure known as the slit diaphragm. This structure and the slit diaphragm are important for the maintenance of the glomerular filter. Podocin, ZO-1 and CD2-AP are major protein in the podocyte slit diaphragm. The expression of these proteins has been studied in kidney tissues of DN.

These proteins were quantitated by immunohistochemistry. The relationships between protein expression and clinical parameters were examined. There was an inverse correlation between the percentage of cells positive for podocin protein and extent of proteinuria when all subjects were analyzed. There was a significant correlation between podocin protein expression and urine protein. ZO-1 and CD2-AP proteins were also decreased in DN tissues. Our results suggest that decrease of these podocyte proteins expression might be closely linked to the development and/or progression of human DN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
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： 腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症、 $\alpha 3 \beta 1$ 、podocin、ZO-1、上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在、透析中の患者は全国で約 30 万人におよび、その多くが糖尿病性腎症によるもので、最新の年間新規透析導入患者数では約 5 割が糖尿病性腎症を原因とするものである。医療費面での圧迫に加え糖尿病の透析患者の予後は、他の腎疾患で透析を受けている患者に比べ 5 年生存率は約 50%と悪性腫瘍と同程度以上に不良であるのが現実である。したがって糖尿病性腎症の発症・進展機序を解明することは社会的重要な課題である。

糖尿病性腎症は、病理組織学的にはメサンギウム基質の拡大と基底膜の肥厚から始まり、最終的には糸球体硬化から高度な腎機能障害を呈するという病理学的進行過程の考え方が長年にわたり主流であったため、特にメサンギウム細胞を主軸としたメサンギウム基質拡大のメカニズムの解明に関する研究が盛んに行なわれてきた。しかしながら近年、電子顕微鏡を用いた詳細な検討から糖尿病性腎症腎組織の特徴的組織学的変化として糸球体基底膜からの糸球体上皮細胞の剥離脱落が確認された。さらに、米国ではピマインディアンの研究により、糸球体上皮細胞の剥離脱落による細胞数減少が腎機能低下に密接に関連している事や糖尿病性腎症患者尿中に脱落した糸球体上皮細胞が検出された事などから、糖尿病性腎症の発症進展機序に糸球体上皮細胞の剥離脱落が重要であり、糖尿病性腎症の糸球体上皮細胞剥離のメカニズムを解明することは最も重要な課題であることは疑いが無いものと考えられる。残念ながらこれらの研

究は動物モデルでの検討が主であり、ヒト糖尿病性腎症腎組織を用いた組織学的検討は詳細に行われていないのが現実である。

## 2. 研究の目的

本研究では腎生検組織を用いた免疫組織染色法を用いて、糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞接着に関連すると考えられる蛋白の局在および発現の程度の差異を比較検討する。具体的には免疫組織染色法にて各種蛋白の発現を確認し、これらの発現と腎機能低下や蛋白尿に上皮細胞障害がどのように関与しているのかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腎生検腎組織のメサンギウム基質領域の定量化

当院で腎生検を施行された糖尿病性腎症患者の腎組織をパラフィン包埋、薄切し PAS 染色をおこない糸球体内のメサンギウム基質領域拡大を自動画像解析装置 (WINROOF) を用いて定量化し、客観的に腎組織の形態変化を評価。

### (2) 光学顕微鏡レベルでの免疫組織染色法

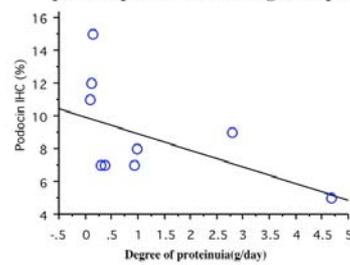
上皮細胞マーカーである抗 podocin 抗体、抗 ZO-1 抗体、抗 CD2-AP 抗体を用い、上皮細胞スリット領域における発現の差異を病期別に比較検討。4  $\mu$ m に薄切されたパラフィン包埋腎組織をキシレン、エタノールにて脱パラフィン操作をおこなった後メタノール+0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液にて内因性ペルオキシダーゼのブロッキング。続いてマ

イクロウエーブにて抗原の賦活化をおこなった後 5%正常ヤギ血清またはウサギ血清にてブロッキング。各種一次抗体を反応させたのち、ペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼ標識二次抗体を反応させ発色。

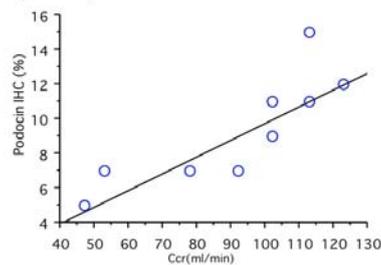
#### 4. 研究成果

腎生検腎組織のメサンギウム基質領域の定量化および光学顕微鏡レベルでの免疫組織染色法による蛋白発現変化における検討として、当院で腎生検を実施した糖尿病性腎症腎組織を用い、糸球体内のメサンギウム基質領域拡大の自動画像解析装置における定量化の解析データを、先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子 (NPHS2) の遺伝子産物である podocin に対する特異抗体および抗 ZO-1 抗体、抗 CD2-AP 抗体を用い、上皮細胞スリット領域における各種蛋白の発現の定量化データおよび蛋白尿や腎機能などの臨床データなどとの相関などについて統計学的に検討した。抗 podocin 抗体陽性面積率と一日尿蛋白排泄量およびクレアチニンクリアランスとの相関を検討したところ、一日尿蛋白排泄量とは負の相関関係 ( $r=-0.774$ ,  $p<0.05$ ) を認め、さらにクレアチニンクリアランスとは正の相関関係 ( $r=0.695$ ,  $p<0.05$ ) と統計学的有意に糸球体内の抗 podocin 抗体陽性面積率と相関が認められたことから、スリット膜関連蛋白の発現変化と、一日尿蛋白排泄量および腎機能は密接に関連していることが確認された。

《Correlation between the percentage of IHC positive for podocin protein and the degree of proteinuria》



《Correlation between the percentage of IHC positive for podocin proteins and the creatinine clearance (Ccr)》



次に、メサンギウム基質領域拡大の程度と抗 podocin 抗体陽性面積率についての検討では、メサンギウム基質領域拡大の程度弱いながらも負の相関関係が認められ、結節性病変や糸球体硬化に至る過程にある糸球体でのスリット膜関連蛋白の発現変化は糸球体病変の進行と密接に関連していることが実際のヒトの腎組織で確認された。同様に抗 CD2-AP 抗体、ZO-1 抗体なども同じような傾向がみとめられた。このことからスリット膜関連蛋白の発現変化が、糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞障害に密接に関連している可能性が示唆された。今後は特に基底膜とポドサイトの細胞質との接着に関するインテグリンなどの研究が糸球体上皮細胞減少のメカニズムを解明する上で重要であると考えられ、現在、細胞接着に関連すると考えられるインテグリン関連蛋白の腎組織内での発現変化の検討に着手し、現在までの研究成果と合わせて発表する予定である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 豊田雅夫 (他6名、3 番目) ヒト糖尿病性腎症におけるalpha-actinin-4ならびにCD2AP発現についての検討 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010年5月27日～29日 岡山
- ② 豊田雅夫 (他9名、2番目) ヒト糖尿病性腎症糸球体病変の進行とCP2AP、ZO-1の発現変化についての検討 第52回日本腎臓学会学術総会 2009年6月3日～5日 横浜

[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]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊田 雅夫 (TOYODA MASAO)  
東海大学 医学部 講師  
研究者番号 : 00349383

### (2) 研究分担者

なし