

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591176

研究課題名(和文)ポドサイト傷害によるボウマン嚢上皮細胞の変調作用の機構解明

研究課題名(英文)Analysis of activation of glomerular parietal epithelial cells to podocyte injury

研究代表者

佐々木 聡 (Sasaki, Satoshi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：70312345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：巣状糸球体硬化は、多くの慢性腎疾患の進行に共通な病態である。糸球体硬化の発症には、腎糸球体の毛細血管を尿腔側から覆う足細胞と糸球体を包み込むボウマン嚢内側を覆う壁細胞との間の相互作用が鍵と考えられている。最近、糸球体腎炎における壁細胞の活性化といった概念が提唱されていることから、本研究においては足細胞傷害に伴う活性化壁細胞の出現の詳細と細胞学的特徴について明らかにする事を試みた。確立された動物モデルを用いる事によって、壁細胞の活性化は硬化過程における足細胞傷害の発症と重症度を鋭敏に反映し得る事が判明した。さらに活性化の指標となる新たな蛋白発現を検討し、活性化の機構や病態への関与を探求し得た。

研究成果の概要(英文)：Recent investigations have disclosed that activation of parietal epithelial cells (PECs) plays key roles in the process of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). In this experimental project, we have tried to investigate dynamic behavior of activated PECs in the evolution of FSGS. We conducted serial assessment of activated PECs using the mouse models of lipopolysaccharide(LPS)-induced proteinuria and adriamycin (ADR) nephrosis. To further analyze the role of activated PECs, we induced rapid progressive podocytopathy using LPS-treated ADR nephrosis mice. As the cell markers for activation, we utilized two markers, CD44 and CXCR4. Using models of ADR nephrosis in mice of different ages, we found that CD44+PECs play significant roles in progressive glomerulosclerosis and the prevalence of the cells reflects different degrees of podocyte injury. In addition, analysis of two different markers for PEC activation clarified different roles of these markers during cell activation process.

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：糸球体硬化症 慢性腎疾患 糸球体上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

巣状糸球体硬化症は、ほぼ全ての慢性腎疾患 (chronic kidney disease, CKD) の進行過程において共通の病態である。糸球体構造を支える上皮細胞には、一次突起、二次突起 (足突起)、大きな細胞体から成り糸球体係蹄壁を尿腔側から覆う臓側上皮細胞 (ポドサイト、足細胞) と糸球体構造を囲むボウマン嚢を形成する単層扁平上皮である壁側上皮細胞 (ボウマン嚢上皮細胞、壁細胞) が存在する。

糸球体発生の段階でその起源を共通とする両上皮細胞は、糸球体構造の最終的な成熟の段階において、解剖学的、機能的特徴の違いを生じ、糸球体機能の完成に寄与する。一方で、様々な腎疾患に伴う巣状糸球体硬化症進展の過程においては、両上皮細胞における傷害とそれに伴う構造や機能的変化がアクティブに生じ、互いに積極的なクロストークが行われる中で、足細胞の剥離、係蹄とボウマン嚢の癒着、壁細胞の増殖、細胞外基質増生による硬化の発症といった不可逆的な糸球体硬化機転の悪循環が促進される事となる。以上の両細胞間のクロストークを解明し、糸球体硬化機転の悪循環を抑止する事は、CKD の発症、進行の防止に大きく寄与するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、糸球体硬化の発症・進行の過程における足細胞傷害による壁細胞上皮細胞の変調作用の機構を解明する事である。歴史的に巣状糸球体硬化症の病因は、糸球体係蹄軸部のメサングウム細胞の増殖を主とする傷害、細胞外基質増多が原因とされた。一方、最近では、遺伝子改変動物を含む様々な動物モデルを利用した研究等により足細胞傷害と剥離病変の先行が硬化病変発症の主因とされている。しかし一方で、ごく最近の幾つかの研究により、糸球体の硬化・再生機転においては糸球体壁細胞の役割が非常に重要である事が示唆されてきている。それらの報告の中で、足細胞傷害に伴う壁細胞の反応様式として、“壁細胞の活性化” の概念が提唱されてきている。Shankland と Moeller らによる最近の総説 (Nat Rev Nephrol 10, 158, 2014) では、活性化壁細胞の特徴として、通常の壁細胞に比較して、細胞質の腫大、密度増生、遊走性・増殖性の獲得、細胞外基質産生能増大・ボウマン嚢比較を挙げている。さらに新たなマーカー蛋白としてオステオポンチン (OPN) 受容体である CD44 分子を発現し、糸球体半月体形成や巣状分節性硬化病変の形成に積極的役割を果たすとしている。また報告によっては、活性化壁細胞が、本来再生不能とされてきた足細胞の前駆細胞としての役割を果たしている可能性も示唆されている。

一方、活性化壁細胞の病態とその役割については、解明すべき点が未だ多いとされる (Nat Rev Nephrol 10, 5, 2014)。我々は、

本研究の具体的目標を、以下の様に設定する事により、糸球体足細胞傷害に伴う壁細胞の動的変化としての活性化との関連を探る事とした。検討にあたっては、よく確立された動物モデルにおける探索を介して、足細胞、壁細胞両者のクロストークをより明確に確認していく事がまず重要と考えた。

(1) 代表的な巣状糸球体硬化症モデルであるアドリアマイシン腎症 (adriamycin nephropathy, AN) を用い、壁細胞活性化マーカー (CD44) の発現性、そのリガンドであるオステオポンチンの共発現性を評価する。

(2) AN における足細胞傷害による壁細胞活性化の関わりを硬化病変の進展過程、病変の重症度による違いの観点から明らかにする。これにより、壁細胞活性化の程度が潜在的に先行・進展する足細胞傷害を、どの程度反映し得るのか明らかにする。

(3) AN 以外のモデルにおける足細胞傷害、壁細胞活性化の関連を探る。モデルとして、微小変化ネフローゼモデルであるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) 投与モデル、AN と LPS の組合せモデル、アルブミン過剰投与モデルなどを検討比較する。足細胞の傷害・喪失機転としては、従来巣状硬化症における主な機転とされたアポトーシス現象に加えて、分裂期崩壊による喪失機転についても観察し、壁細胞活性化との関連を明らかにする。

(4) 壁細胞活性化の病態をより明らかにするため、“活性化” を示す複数のマーカー分子を見出し検討する。活性化段階によるマーカー分子発現性の違いを明らかにする事により、その病態をより明らかにする。また、チミジンアナログであるプロモデオキシウリジン (bromodeoxyuridine, BrdU) 等によるパルスラベリングにより、活性化壁細胞の増殖性、遊走性に関して追跡・検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物モデル: モデルとして、1) 巣状糸球体硬化症モデルであるアドリアマイシン腎症 (AN) モデル (週齢の異なる 6 週齢、12 週齢モデルを作成)、2) 可逆的な足細胞傷害 (細胞骨格破綻) により蛋白尿をきたし、微小変化型ネフローゼ症候群のモデルと考えられているリポポリサッカライド投与 (lipopolysaccharide, LPS) モデル (低用量、高用量)、3) 加速的な足細胞傷害と糸球体再構築過程を観察する新規モデルとして ADR 投与に低用量 LPS 投与を組み合わせた ADR-LPS モデル、4) アルブミン過剰投与 (BSA) モデルを用いた。

(2) 足細胞傷害の観察: 足細胞のマーカーとしては、Wilms' tumor-1 (WT1)、シナプ

トポディン (synaptopodin)、ポドシン (podocin)の発現性を、各蛋白に対する抗体を利用して免疫染色にて検討した。足細胞の喪失に関する検討には、TUNEL アッセイを用いたアポトーシスの観察に加えて、リン酸化ヒストン H3 (H3-P)の核における発現性の観察を行い、定量化を試みた。

(3) 壁細胞活性化の観察: 壁細胞マーカーとしては、クラウジン-1 (claudin-1)、CD10、Pax2 に対する抗体を利用して、免疫染色を行い検討した。また、活性化の指標としては、CD44、CXC ケモカイン受容体(CXC chemokine receptor4、CXCR4)、アンジオテンシンタイプ1受容体 (angiotensin II type 1 receptor、AT-1)の発現性に関する検討を、モノクローナル、ポリクローナル抗体を含む複数の抗体を利用して、免疫組織学的に検討した。CD44 のリガンドとして、オステオポンチン (OPN)、CXCR4 のリガンドとして、間質細胞由来因子 (stromal cell-derived factor-1、SDF)、CD44、CXCR4 共通の非同種リガンドとしてのマクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor、MIF)の発現性についても検討した。

(4) 活性化壁細胞の増殖性・遊走性に関するチミジンアナログを用いた検討: 複数のモデル動物において、BrdU 等のチミジンアナログのパルスラベリングを行い、陽性細胞を追跡した。解析にあたっては、足細胞、壁細胞マーカー、活性化壁細胞マーカーとの共発現性について、共焦点顕微鏡にて確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 各モデル動物における糸球体病変の違い: 各モデル、即ち、AN モデル(6 週齢、12 週齢)、LPS モデル、AN+LPS モデル、BSA モデルによる病変の違いに関して検討した。LPS、BSA 両者の単独投与モデルでは、有意な糸球体傷害が生じないのに比し、AN、AN+LPS モデルでは有意な硬化病変を生じた。一方、糸球体硬化症の代表的モデルとされる AN においては、分節性硬化病変以外の特徴的病変として、腫大した細胞質を有する壁細胞の尿腔側への萌出や管外性細胞増殖、偽半月体、半月体形成が少なからず存在する事にも着目した。この形態的变化は、壁細胞の活性化を示す指標として重要と考えられた。AN に比して、AN+LPS では壁細胞の腫大と萌出、偽半月体形成が顕著に観察され、アドリアマイシン (ADR)による足細胞傷害が進行した時点における低用量 LPS 刺激は、壁細胞の活性化をより加速させる事が示唆された。

(2) AN における CD44 発現性: ADR 投与後 1 週後から、扁平上皮を呈する壁細胞に発現し始める。その後、徐々に発現性が増強し、ポウマン囊との架橋形成する細胞や係蹄側にまで強い発現がみられてくる。細胞膜上に

CD44 陽性を示す細胞の一部は、細胞質に陽性となる OPN と共発現を示し、両分子の相互作用が示唆された。

(3) AN における足細胞傷害と壁細胞活性化との関連: 共焦点顕微鏡による観察では単分節性硬化を示す糸球体において、synaptopodin や podocin などのマーカー発現が明らかに低下している糸球体部に強度の CD44 発現が観察され、CD44 陽性活性化 PEC の足細胞喪失を生じた糸球体部への遊走・増殖を示唆する所見が得られた。また、連続切片を利用した病変糸球体の免疫染色では、足細胞マーカーである synaptopodin 発現と壁細胞活性化マーカー CD44 発現の鏡面像が頻りに観察され、CD44 発現は足細胞傷害を明確に反映する事が示唆された。

(4) CD44 陽性活性化壁細胞は、糸球体硬化症における足傷害の重症度を反映するか: AN は、週齢によって、生じる病変の程度に差がある事が知られる。本研究では、6 及び 12 週齢の Balb/c マウス (12 週齢の方が、より重症な糸球体硬化病変を発症する)を用いて、足細胞傷害の進行度 (1糸球体あたりの WT-1 陽性足細胞の密度にて評価)と CD44 発現性 (CD44 陽性壁細胞陽性糸球体数)に関して、定量的な評価を試みた。図 A に示すとおり、対照群に比し、6 週、12 週 AN 群では、ADR 静注後有意に進行性の足細胞密度減少を呈する。減少の程度は、より重症な硬化病変を来す 12 週齢 AN において高度であった。一方、CD44 陽性壁細胞の出現頻度は、図 B に示す様に、ADR 静注後から進行性に増す。また、重症で高度な足細胞喪失を示す 12 週齢 AN において、活性化壁細胞出現頻度が高度であった。

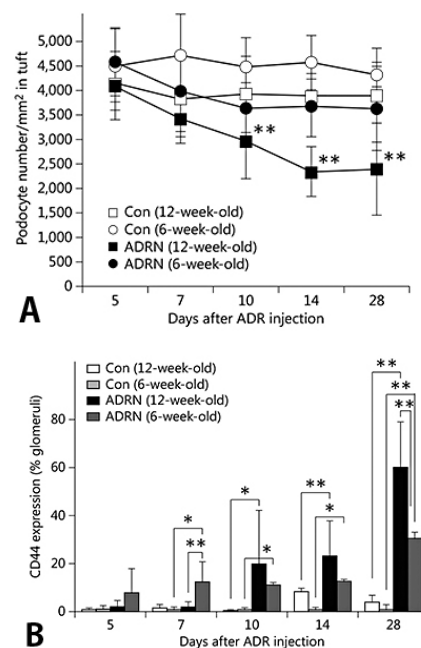


図 (A)1 糸球体あたりの WT-1 陽性足細胞の密度の経時的推移と(B) CD44 陽性壁細胞陽性糸球体の割合の経時的推移 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

以上から、腎系球体における CD44 陽性壁細胞の出現頻度は、足細胞傷害の重症度を鋭敏に示す事が示された。CD44 発現性は、OPN をはじめとする何らかの液性因子による刺激を介して、細胞の活性化に関与する事が示唆された。次に、壁細胞活性化の病態について、さらに検討を進める事にした。

(5)足細胞の傷害様式と壁細胞活性化の関連について：近年まで、巣状系球体硬化症の進行段階における足細胞喪失機転として最も重要な事象は、アポトーシスとされてきた。一方、実際にヒトや動物モデルにおける硬化症を詳細に観察してみると、TUNEL アッセイなどによる足細胞のアポトーシスを見出し得る機会は必ずしも多くない事が知られている。本研究で適用している AN モデルにおいても、TUNEL 陽性足細胞は非常に僅少であり、前頁に示す様な ADR 静注後の WT-1 陽性足細胞の経時的減少を説明できない。最近になり、足細胞喪失機転として、分裂期崩壊 (mitotic catastrophe) が主である可能性が示唆されてきた。そこで、今回の実験系においても H3-P 染色陽性により分裂期崩壊を示す足細胞数を定量化し、CD44 陽性活性化壁細胞出現頻度との関連を検討したところ相関が見出された。

(6)各種細胞マーカーの発現性による壁細胞活性化段階の違い：現在まで、壁細胞活性化の確実な指標として確認されているのは OPN 受容体である CD44 のみである。最近、ヒト及びラットモデルにおける急速進行性腎炎を対象とする実験で、管外増殖をきたした壁細胞を主な起源とする細胞群が、CXCR4、AT1 陽性を示す事が報告された。これは、CD44 以外にも、活性化壁細胞において新規に発現し、活性化に伴う機能変化に関与する複数の分子群が存在する事を示唆される。本研究において確立した 4 モデル (AN、LPS、ADR-LPS、BSA) において、壁細胞活性化を比較観察した。活性化の指標としては、CD44、CXCR4、AT1 を用いたところ、各指標間で、各々の発現のタイミングと発現強度に明らかな違いをみとめた。例えば、CD44 は、LPS モデル (一過性ネフローゼを示すが、足細胞剥離、硬化進行は来さない) において、扁平上皮を呈する壁細胞に用量依存性の発現がみられた。AN、ADR-LPS モデルでは、扁平状壁細胞、大型化し尿腔側に萌出する細胞群、管内増殖、偽半月体を形成する細胞群に、強度な CD44 陽性像が観察される。一方、CXCR4 は、LPS モデル、AN、ADR-LPS モデルの扁平状の壁細胞における発現は極めて微弱であり、後者のモデルにおける増殖上皮細胞で強度に陽性となる。CXCR4 発現は、壁細胞の活性化にとって、CD44 に比較すると、より後期に発現し、その遊走・増殖に積極的関与する可能性もある。さらに各々のマーカー分子のリガンド、非同義リガンド分子群との関連も含めて探索中で

ある。

(7)活性化による壁細胞の機能的変化としては、遊走能、増殖能の獲得が挙げられる。本研究では、各動物モデル (AN、LPS、ADR-LPS、BSA) を、BrdU 等のチミジンアナログでパルスラベリングを行うと、活性化壁細胞を、3-4 週追跡した。LPS、ADR-LPS 群において、追跡初期に、チミジンアナログ陽性活性化壁細胞が散見され、その後少数ではあるが係蹄側への遊走を示唆する所見が観察された。活性化壁細胞の遊走・増殖能獲得を直接的に示す所見と考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Takayuki Okamoto, Satoshi Sasaki, Takeshi Yamazaki, Yasuyuki Sato, Hironobu Ito, Tadashi Ariga, Prevalence of CD44-positive glomerular parietal epithelial cells reflects podocyte injury in adriamycin nephropathy, *Nephron Exp Nephrol*, Vol.124, pp.11-18, 2013, 査読有

(DOI 10.1159/000357356)

Koichi Nakanishi, Kazumoto Iijima, Kenji Ishikura, Satoshi Sasaki (8 名中 6 番目), Masataka Honda, Norio Yoshikawa, Two-year outcome of the ISKDC regimen and frequent-relapsing risk in children with idiopathic nephrotic syndrome, *Clin J Am Soc Nephrol*, Vol.8, pp.756-762, 2013, 査読有

(DOI: 10.2215/CJN.09010912)

Yuko Hamasaki, Norio Yoshikawa, Satoshi Sasaki (11 名中 4 番目), Kazumoto Iijima, Koichi Nakanishi, Shuichi Ito, Masataka Honda, Prospective 5-year follow-up of cyclosporine treatment in children with steroid-resistant nephrosis, *Pediatr Nephrol*, Vol.28, pp.765-771, 2013, 査読有

(DOI: 101007/s00467-012-2393)

Kenichiro Miura, Hidetake Kurihara, Satoshi Sasaki (13 名中 10 番目), Takashi Igarashi, Shinji Kunishima, Takashi Sekine. Podocyte expression of nonmuscle myosin heavy chain-IIA decreases in idiopathic nephrotic syndrome especially in focal segmental glomerulosclerosis, *Nephrol Dial Transplant*, Vol.28, pp.2993-3003, 2013, 査読有

(DOI: 10.1093/ndt/gft350)

Kenji Ishikura, Norio Yoshikawa, Sasaki S (11 名中 4 番目), Kazumoto

Iijima, Koichi Nakanishi, Masataka Honda, Two-year follow-up of a prospective clinical trial of cyclosporine for frequently relapsing nephrotic syndrome in children, Clin J Am Soc Nephrol, Vol.7, pp.1576-1583, 2012, 査読有 (DOI: 10.2215/CJN.00110112)

Takayuki Okamoto, Toshihiro Tajima, Hirayama T, Satoshi Sasaki, A patient with Dent disease and features of Bartter syndrome caused by a novel mutation of CLCN5, Eur J Pediatr, Vol.171, pp.401-404, 2012, 査読有 (DOI:10.1007/s00431-011-1578-3)

〔学会発表〕(計2件)

Takeshi Yamazaki, Satoshi Sasaki, Asako Hayashi, Yasuyuki Sato, Takayuki Okamoto, Tadashi Ariga. Serial assessment of activated parietal epithelial cells in the LPS-induced proteinuria and adriamycin nephrosis, World Congress of Nephrology, 2013年6月1日, Hong Kong, China

山崎健史、佐々木聡、林麻子、佐藤泰征、岡本孝之、有賀正、アドリアマイシン腎症におけるポドサイト喪失に伴う活性化壁側上皮細胞の意義、第56回日本腎臓学会学術総会、2013年5月12日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 聡 (SASAKI, Satoshi)  
北海道大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号：70312345

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし