

令和 3 年 2 月 23 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19084

研究課題名(和文)ネフローゼ症候群ポドサイトにおけるタイト結合新生の意義

研究課題名(英文)The analysis of newly formation of tight junction in nephrotic podocyte

研究代表者

田中 瑞子(Tanaka, Mizuko)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40583638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ネフローゼ症候群ポドサイトにおいて、タイト結合分子の発現が認められた。また、疾患対照群であるIgA腎症の一部症例においても若干のタイト結合分子の発現が確認され、タイト結合分子はポドサイト傷害によって発現が誘導されることが示唆された。さらに、ラットモノクローナル抗体を作製したところ、タイト結合分子特異的な抗体作製に成功した。また、このタイト結合分子を恒常発現するラットポドサイト培養細胞株を樹立し解析した結果、ポドサイトにおいて分子発現の変動を引き起こし、機能性に影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネフローゼ症候群は血中タンパク質が尿中に排泄される病態の総称であり、治療手段が限られる難治性疾患である。腎糸球体のポドサイトはスリット膜という細胞間接着装置を形成することで、糸球体濾過機能を担っている。ネフローゼ症候群では、このスリット膜の喪失によって血中タンパク質が尿中に漏出すると考えられている。一方ネフローゼ症候群では、スリット膜とは別の細胞間接着装置タイト結合が新生することが知られているが、その詳細や病理学的意義については不明である。そこで代表者らは、ネフローゼ症候群ポドサイトに異所性発現するタイト結合分子を新たに同定し、新規診断マーカーとしての有用性を検証した。

研究成果の概要(英文)：We found ectopic expression of tight junction molecule X in nephrotic syndrome and the expression was confirmed in some cases of the IgA nephropathy as a disease control group. This result indicates the expression of tight junction molecule X is induced by certain injury in podocyte. In addition, we developed rat anti-human X monoclonal antibody, which is specifically reactive with X. Moreover, we established the rat podocyte cell line, which was constitutively expressed X, and X induced the change of expression and localization of some molecules in podocyte. These results suggest that the ectopic expression of X affects the function of podocyte.

研究分野：腎病理学

キーワード：ネフローゼ症候群病態解析

### 1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群は血中タンパク質が尿中に排泄される病態の総称であり、治療手段が限られる難治性疾患である。足細胞(以下、ポドサイト)は足突起と呼ばれる特殊な構造を有し、隣接するポドサイトの足突起間にスリット膜という細胞間接着装置を形成することで、糸球体濾過機能を担っている。ネフローゼ症候群では、このスリット膜の喪失によって血中タンパク質が尿中に漏出すると考えられている。

一方ネフローゼ症候群では、スリット膜とは別の細胞間接着装置であるタイト結合が新生することが知られている。糖尿病性腎症では、タイト結合膜貫通分子であるクローデイン (CLDN)ファミリーのうちCLDN1がポドサイトに異所性発現することが報告されている (Gong et al., *JASN*, 2017)。しかしながら、新生タイト結合が原発性ネフローゼ症候群の病態にどのように関わっているかは不明である。そこで代表者らは、ボウマン嚢上皮や近位尿細管上皮に発現するCLDN2に着目して研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト及び動物モデルの腎組織を用いてCLDN2がネフローゼ症候群ポドサイトに異所性発現するかを検証し、新規診断マーカーとして有用性を検討した。またネフローゼ症候群ポドサイトに新生するタイト結合の病理学的意義を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

ヒト正常腎、原発性ネフローゼ症候群生検腎(微小変化群、膜性腎症、巣状糸球体硬化症)およびIgA腎症(疾患対照群)を用いて、我々が以前作製した抗CLDN2ポリクローナル抗体による免疫染色を行った。

ネフローゼ症候群モデル動物(ピューロマイシンアミノヌクレオシド [PAN]投与ラット及びアドリアマイシン投与マウス)の腎組織を用いて、抗CLDN2ポリクローナル抗体による免疫染色やqPCRによるCLDN2 mRNA発現解析を行った。

マウスポドサイト培養細胞株を親株としてCLDN2恒常発現株を樹立し、その正常を比較検討した。

ラット腸骨リンパ節法を用いて、抗CLDN2モノクローナル抗体を新たに開発した。

と同様のヒト及び動物モデルの腎組織を用いて、抗CLDN2モノクローナル抗体による免疫染色を行った。また本モノクローナル抗体を用いて、ラットPAN腎症ネフローゼ症候群モデルの単離糸球体のWestern blotを行った。

### 4. 研究成果

CLDN2異所性発現は原発性ネフローゼ症候群生検腎ポドサイト(微小変化群、膜性腎症、巣状糸球体硬化症)で認められたが、ヒト正常腎でみられなかった。定量解析の結果、両群間におけるCLDN2発現量には有意差が認められた。疾患対照群であるIgA腎症においても軽度CLDN2発現がみられ、ポドサイト傷害によってCLDN2発現が誘導されることが示唆された。

ネフローゼ症候群モデル動物の腎組織ではCLDN2 mRNA発現亢進はみられなかった。またモデル動物腎ポドサイトでは、CLDN2異所性発現は認められず、ヒト検体を用いた検討とは異なる結果が得られた。

マウスポドサイト培養細胞株にCLDN2を恒常発現させると突起形成を伴った著しい形態変化が観察され、CLDN2異所性発現がポドサイトの性状を変化させることが示された。

抗CLDN2モノクローナル抗体の候補となるハイブリドーマ104クローンをELISA法で一次スクリーニングした結果、12の陽性クローンを得た。Western blotによる二次スクリーニングでは12クローン中3クローンが陽性であり、更に免疫染色の結果3クローン中2クローンが陽性であった。

で得られた抗CLDN2モノクローナル抗体を用いて、ヒト原発性ネフローゼ症候群やネフローゼ症候群モデル動物の腎

組織を免疫染色した。しかしながら、傷害ポドサイトにおける CLDN2 異所性発現は全く認められなかった。一方内部陽性コントロールとなるボウマン嚢上皮や近位尿細管における CLDN2 シグナルは、抗 CLDN2 ポリクローナル抗体および抗 CLDN2 モノクローナル抗体いずれを用いた免疫染色でも検出された。さらに抗 CLDN2 モノクローナル抗体を用いてラット PAN 腎症ネフローゼ症候群モデルの単離系球体の Western blot を行ったところ、CLDN2 発現亢進が認められないことが判明した。以上の結果から、抗 CLDN2 ポリクローナル抗体を用いて得られた「傷害ポドサイトにおける CLDN2 陽生シグナル」は、ポリクローナル抗体 Fc 領域がポドサイトに発現している FcRn (neonatal Fc receptor) と反応した結果であることが示唆された。

これらの結果を受け、ネフローゼ症候群ポドサイトに異所性発現するタイト結合分子を新たに同定し、更なる検討を進めている。

#### 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 3件)

1. Expression of liver X receptors in normal and refractory carcinoma tissues of the human lung and pancreas.

Kashiwagi K, Yanagida M, Matsui D, Tanaka M, Sugimoto K, Chen H, Ichikawa-Tomikawa N, Marubashi S, Suzuki H, Chiba H.

*Histol Histopathol.* 2018 May;33(5):497-505.

2. PKA activation and endothelial claudin-5 breakdown in the schizophrenic prefrontal cortex.

Nishiura K, Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Kunii Y, Kashiwagi K, Tanaka M, Yokoyama Y, Hino M, Sugino T, Yabe H, Takahashi H, Kakita A, Imura T, Chiba H

*Oncotarget.* 2017 Oct 16;8(55):93382-93391

3. Hypoglycemia Associated with a Gastrointestinal Stromal Tumor Producing

High-molecular-weight Insulin Growth Factor II: A Case Report and Literature Review.

Hirai H, Ogata E, Ohki S, Fukuda I, Tanaka M, Watanabe T, Satoh H.

*Intern Med.* 2016;55(10):1309-14.

[学会発表](計 1件)

田中瑞子

疾患概念の整理と鑑別疾患の病理」C3 腎症の病態と鑑別疾患

日本腎臓学会東部学術集会、横浜、10月28日、2017年、シンポジウム

[図書](計 2件)

1、腎生検病理アトラス改訂版 東京医学社 2017.08; 1-384;235-239,

2、腎と透析2017年82巻増刊号 腎生検・病理診断 臨床と病理の架け橋

2017.05:1-448;156-161

[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 件)

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

[その他]

ホームページ

<http://www.fmu.ac.jp/home/p2/sub3.html>

Facebook

<https://www.facebook.com/pages/福島県立医科大学-基礎病理学講座/212109418952102>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中瑞子 (Tanaka, Mizuko)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40583638

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )