

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590932

研究課題名（和文）糸球体の修復機構の解明と応用

研究課題名（英文）Glomerular remodeling and its application

研究代表者

長田 道夫 (NAGATA MICHIO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号 10192238

研究成果の概要：

糸球体硬化のプロトタイプである虚脱型巣状分節性糸球体硬化症 (CFSGS) をモデルとして、nephrin-promoter/LacZ 遺伝子により糸球体上皮細胞の系譜をタグ付けした p21 欠損マウスに CFSGS を惹起し、糸球体硬化の進展と修復のダイナミズムについて検討した。その結果、糸球体上皮細胞の急激な喪失に反応した壁側上皮の著しい増殖が、糸球体硬化やリモデリングの基本であることが判明した。さらに、糸球体上皮細胞の喪失は apoptosis を介さず、壁側上皮の migration や増殖に細胞周期抑制因子 p21 が大きく関与することを突き止めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：糸球体、リモデリング、糸球体上皮細胞、糸球体硬化

1. 研究開始当初の背景

糸球体上皮細胞が、脱分化やアポトーシスを起こすことが、糸球体硬化の重要な因子であることが、国際誌に次々と掲載されている。しかし、我々のこれまでの研究から、糸球体

上皮細胞は分裂増殖しない細胞であることが、いくつかの方法から考えられていた。糸球体硬化の進行を抑制するためには、この病変が生体内でどのようなプロセスで進むのかを知る必要があり、それこそが糸球体のリモ

デリングであろうと考えた。

2. 研究の目的

糸球体硬化病変の進展において、糸球体上皮細胞が脱分化や増殖をするのか、そうであるならそのメカニズムは何であるのか、について CFSGS マウスモデルを用いた解析と、妊娠高血圧症候群における一過性多量蛋白尿の機序についての2つの面から検討する。

3. 研究の方法

1) マウスモデルによる検討。Shankland らの方法に準じ、CFSGS モデルを、p21 欠損マウスに惹起した。このマウスは、nephrin-promoter と LacZ で糸球体上皮細胞に遺伝子工学を用いてタグ付けしているため、上皮細胞の系譜が判定可能である。このマウスでは、糸球体上皮細胞が一旦分化すると増殖しても、脱分化しても青い色素を発現する。糸球体上皮細胞の系譜が確認できる遺伝子改変マウスに CFSGS を惹起した実験はない。慎重な予備実験の後に、再現性の高い腎障害が発症した。腎炎惹起後5日と14日後に、蛋白尿や細胞死指数、免疫組織化学的、電子顕微鏡的検討を行った。

2) ヒト妊娠高血圧症候群での検討。

筑波大学病院において管理中の45名の通常産婦と10名の妊娠高血圧症候群の患者の尿中ポドサイト数と蛋白尿、血圧値などの相関について、経時的に測定した。

4. 研究成果

1) 糸球体上皮細胞タグ付けマウスにおける CFSGS の検討

腎障害惹起後5日目では、多量の蛋白尿を呈し、組織学的には特徴的な CFSGS であった。蛋白尿と糸球体の増殖性病変は、以下の図-1に示すごとく、CFSGS 発症後5日目には P21

欠損マウスで、顕著になり、同時に糸球体内に増殖する上皮細胞の頻度が増加した(図-1)。

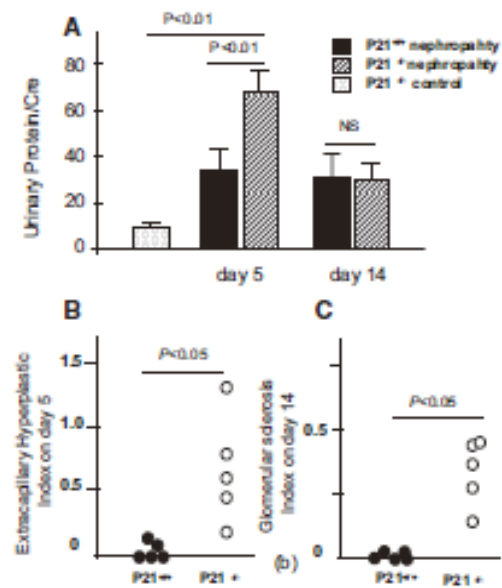


図-1 CFSGS モデルにおける蛋白尿と管外増殖病変

光学的顕微鏡による観察では、糸球体内には上皮細胞が著しく増殖し、係蹄は虚脱していた。また、尿細管の微小嚢胞化も認めた(図-2)。

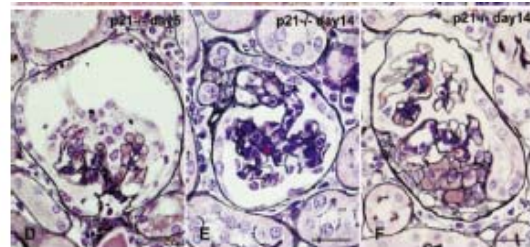
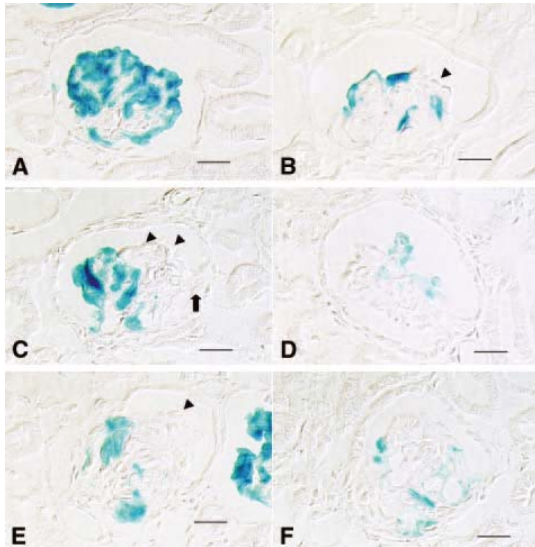


図-2 本モデルにおける CFSGS 糸球体像

さらに、CFSGS 病変を呈する糸球体内の増殖細胞の系譜を調べたところ、増殖細胞はほぼすべて上皮細胞であり、同時に X-gal 陰性であることから、増殖細胞は糸球体上皮細胞の系譜細胞ではないことが判明した(図-3)。



(図-3) LacZ 染色による糸球体上皮細胞のモニタリング。

加えて、シナプトポディン、ネフリン、ネスチンなどの糸球体上皮細胞マーカーとケラチン、クロロディン 2 を用いた組織化学との二重染色では、共染細胞は見いだせなかったこと、また X-gal 陽性細胞には壁側上皮細胞のマーカーの発現がみられなかったことから、CFSGS モデルにおいて糸球体上皮細胞に脱分化が起こっていることを証明することは出来なかった。電子顕微鏡による観察では、虚脱した糸球体係蹄に向かって、壁側の上皮細胞が伸展し直接接着する像があり、その下には上皮細胞は存在しなかった。

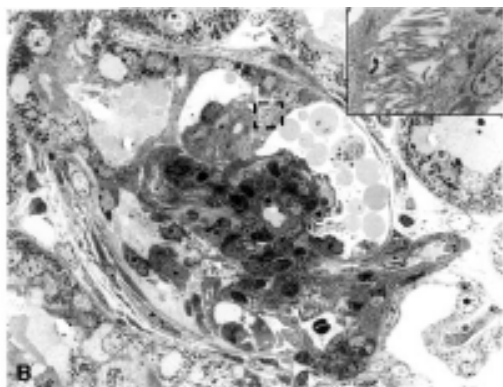


図-4 電顕による、壁側細胞の伸展と係蹄への接着。

すなわち、本疾患では急激な糸球体上皮細胞の喪失と同時に、壁側上皮細胞が増殖、糸球体に移動することが判明した。この、糸球体上皮細胞の喪失はおそらく細胞死に基づくものではないことも分かった(図-4)。

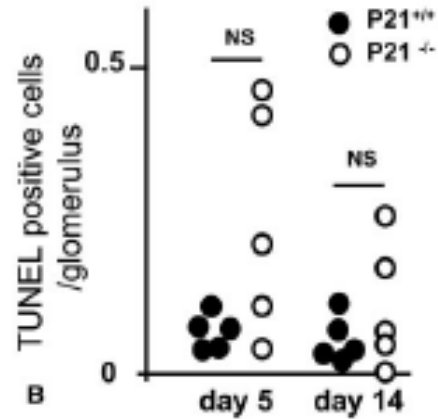


図-4 CFSGS における糸球体内アポトーシス

当初の目的では、脱分化細胞を認めるという既報の仮説から、脱分化した上皮細胞を培養し、細胞特性を有する分化細胞に再分化を誘導することを計画していたが、上皮細胞に脱分化が示唆できなかつた、今回のこの結果はその方向に研究を広げることには意義は少ないことを明らかに出来た。おそらく、糸球体のリモデリングは、糸球体上皮細胞の喪失に惹起された壁側上皮細胞の糸球体への移動によると考えられ、これまで筆者らが考えてきたことを、生体内の現象として初めて確証を持たせた。研究目的を満足した結果を得ることが出来た。

2) 妊娠高血圧症候群における一過性高度尿蛋白についての検討

妊娠高血圧症候群例では、蛋白尿の発生とともに、尿中ポドサイト数が増加し、産後に蛋白尿が消失すると尿中ポドサイト数も消失した。正常妊婦では、蛋白尿はほとんど認め

られなく、尿中には 45 例中 9 例に僅かなポドサイトを認めるに過ぎなかった。妊娠高血圧症候群患者においては、尿中ポドサイト数は、蛋白尿の値および血圧と相関を認めた。この成績は、これまで示されていた、妊娠高血圧症候群の患者における蛋白尿の原因として、内皮細胞障害に加えて、糸球体上皮細胞の障害と喪失が考えられること、さらに糸球体からポドサイトが失われても、糸球体硬化には必ずしも進展せず、何らかの修復機序が働くものと想定される。

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 2 件)

1. Suzuki T, Matsusaka T, Nakayama M, Asano T, Watanabe T, Ichikawa I, Nagata M. Genetic podocyte lineage reveals progressive podocytopenia with parietal cell hyperplasia in a murine model of focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 174:1675-82, 2009 (査読有り)
2. Aita K, Etoh M, Hamada H, Yokoyama C, Takahashi A, Suzuki T, Hara M, Nagata M. Acute and transient podocyte loss and proteinuria in preeclampsia. *Nephron Clin Pract.* 112:c65-70, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

1. 鈴木大成、松阪泰二、浅野貴子、市川家國、長田道夫 ポドサイトにタグ付けした p21 遺伝子欠損マウスにおける CFSGS での糸球体上皮細胞の動態 日本小児腎臓病学会 2008, 6 月 28 日

2. 鈴木大成、松阪泰二、浅野貴子、市川家國、長田道夫 ポドサイトにタグ付けした p21 遺伝子欠損マウスにおける CFSGS での糸球体上皮細胞の動態 日本腎臓学会 2008, 5 月 30 日
3. Suzuki T, Matsusaka T, Asano T, Ichikawa I, Nagata M. *Nphs1*-Cre/ROSA26-loxP genetic podocyte tagging revealed parietal cell proliferation in p21 deficient mice with experimental glomerulonephritis. *American Society of Nephrology*, 2007.11.04

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田道夫 (NAGATA MICHIO)
筑波大学. 大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号 : 10192238

(2) 研究分担者

相田久美 (AITA KUMI)
筑波大学. 大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号 : 40400684