

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010年度～2011年度

課題番号：22790779

研究課題名（和文）半月体形成性腎炎における糸球体壁細胞の増殖機序の解明とその治療

研究課題名（英文）Exploring the mechanism of the glomerular parietal epithelial cell proliferation in crescentic glomerulonephritis and its treatment

研究代表者 大瀬 貴元（OHSE TAKAMOTO）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10568447

研究成果の概要（和文）：糸球体壁細胞増殖がコラーゲンにより誘導されることが培養細胞系で示された。現在培養細胞を用いてその機序の解明を行い、また抗 GBM 抗体腎炎モデルマウスを用い、培養細胞で得られた知見を動物でも認めるか、その機序を検証・解析している。

研究成果の概要（英文）：It was revealed that the proliferation of glomerular parietal epithelial cells was induced by collagen. The mechanistic study for this collagen induced proliferation is now being investigated with in vitro and in vivo (anti-GBM nephritis mouse model) models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：糸球体壁細胞、半月体形成性腎炎、細胞増殖

## 1. 研究開始当初の背景

糸球体壁細胞は抗 GBM 抗体腎炎において頻繁に形成される半月体の主要構成細胞と考え

られており、半月体形成が糸球体の尿路・血流を傷害し、腎機能の悪化につながると考えられている。しかし半月体形成機序について

は詳細は知られていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまでに申請者が得た PEC に関する知見・予備研究結果を元に、上皮間葉系細胞形質転換(EMT)・低酸素刺激によるコラーゲン産生、そしてコラーゲンによる Bowman 嚢上皮細胞(PEC)の増殖機転に注目し、申請者が確立した PEC 培養細胞、およびマウスを用いた動物実験にて半月体形成の機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) PEC によるコラーゲン産生機序の解明

上皮間葉細胞形質転換(EMT)による糸球体壁細胞のコラーゲン産生の亢進

-1 TGF $\beta$ 1 による PEC 培養細胞での EMT およびコラーゲン産生の評価 PEC 培養細胞に対して TGF $\beta$ 1 刺激を行うことで EMT が引き起こされることを確認し、Snail, Slug, FSP1 の定量 PCR, ウェスタンブロットで評価を行う。EMT の評価は、線維芽細胞マーカーの発現 (alpha-smooth muscle actin)、上皮細胞マーカーの喪失(E-cadherin)、遊走能の獲得などによって行う。またこの刺激によりコラーゲンの産生が亢進するか検討をする。この際にコラーゲン I, IV, 成長因子 CTGF, 分子シャペロン HSP47, MMP, hydroxyproline, 前出の C-P4H の評価を定量 PCR, 細胞のウェスタンブロット、培養上清の ELISA などの手法を用いて評価する。

-2 TGF $\beta$ 1 トランスジェニックマウスでの PEC におけるコラーゲン産生の評価培養細胞系と同様に、TGF $\beta$ 1Tg マウスで PEC および半月体で産生が亢進しているコラーゲンの型を評価し、また CTGF, HSP47, C-P4H, MMP などを免疫染色で評価する。

### (2) 低酸素刺激による糸球体壁細胞のコラーゲン産生の亢進

低酸素による PEC 培養細胞でのコラーゲン産生の評価ほかの細胞で報告されたような低酸素による C-P4H の産生亢進とそれに続くコラーゲンの産生亢進が PEC でも見られるかどうか評価する。1%、0.1%の低酸素刺激により C-P4H の発現の亢進、およびコラーゲンの産生亢進が見られるか、またその場合の時間経過について PEC 培養細胞を用いて評価する。これらの発現は定量 PCR, ウェスタンブロット、ELISA などの手法を適切に用いて評価する。

慢性虚血動物モデルにおける PEC でのコラーゲン産生の評価南学の研究室にて作られた慢性虚血モデルラットを用いて(Kojima

I, et. al: Kidney Int 75: 268-77, 2009)PEC でのコラーゲン、C-P4H の発現の変化を組織免疫染色で評価する。

## 4. 研究成果

I 型コラーゲンをコートした培養プレート上で PEC を培養し、コラーゲンの有無、濃度の違いによる細胞数の変化を MTS アッセイで検証したところ、コラーゲン濃度依存性に細胞数の増加を認めた。この結果からはコラーゲンが PEC 細胞増殖を誘導していると考えられ、同様の現象が動物実験モデルでも観察されるか検証を進めた。

半月体形成性腎炎モデルマウスを作成し、増殖マーカーである Ki67 の免疫染色で糸球体壁細胞での細胞増殖亢進を確認できた。これまでの培養細胞を用いた実験などから、半月体でも産生が増加しているコラーゲンが糸球体壁細胞の増殖を促進し、その背景に組織低酸素から P4HA1 が誘導され、コラーゲン産生が促されているという機序を検証した。

組織での sirius red を用いた非特異的コラーゲンの染色では増殖細胞とコラーゲン染色の間に相関関係は見られなかった。コラーゲンの型による細胞増殖の違いを検証するために I 型および IV 型コラーゲンの組織染色を行った。糸球体壁細胞周囲にコラーゲンの増殖は認めしたが、この回で作成した動物は組織の線維化はごく軽度であった。疾患惹起 7 日目および 28 日目でも同様の結果であり、疾患を惹起する際に使用する血清量を増量する事で期待する程度の線維化を得られるようにした。この結果 28 日目にと殺した群で十分な線維化を伴う腎炎を惹起することに成功し、I 型および IV 型のコラーゲン増殖と糸球体壁細胞の細胞増殖を認めた。このモデルを使用してコラーゲンの産生経路として働くと期待した P4HA1 の PCR を行ったが、P4HA1 の増加は認めなかった。P4HA1 が mRNA レベルでの変化が無くとも蛋白質レベルでの変化が起きている可能性も考慮して免疫染色も施行したがこちらでも P4HA1 タンパクの増加は確認できなかった。糸球体壁細胞の増殖に低酸素に基づく P4HA1 の増加と引き続いて起こるコラーゲンの影響しているという仮説を考えていたが、P4HA1 の産生は更新していなかった為、現在コラーゲンの産生刺激として別の経路の検討を行っている。

## 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(査読あり)〕(計 1 件)

Chang AM, Ohse T, Krofft RD, Wu JS, Eddy AA, Pippin JW, Shankland SJ.

Albumin-induced apoptosis of glomerular parietal epithelial cells is modulated by extracellular signal-regulated kinase 1/2.

Nephrol Dial Transplant. 2012 Apr;27(4):1330-43. Epub 2011 Sep 5.

doi: 10.1093/ndt/gfr483

〔学会発表〕(計 2 件)

**(1) 第54回日本腎臓学会学術総会** 横浜

2011/06/17 14:00~15:00 腎炎・ネフローゼ(基礎)(4)

糸球体壁細胞(PEC)に発現する遺伝子のマイクロアレイ法による同定

大瀬 貴元

**(2) 第54回日本腎臓学会学術総会** 横浜

2011/06/16 14:30~16:30 シンポジウム  
3 FSGSを上皮細胞のバイオロジーから考える

糸球体壁細胞(PEC)から見たFSGS

大瀬 貴元

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大瀬 貴元(OHSE TAKAMOTO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10568447

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：