

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591191

研究課題名(和文)腎系球体上皮細胞におけるプロラクチン受容体の腎疾患における役割の解明

研究課題名(英文)Role of prolactin receptor in kidney glomerular podocyte

研究代表者

金子 佳賢 (Kaneko, Yoshikatsu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80444157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでプロラクチン受容体は尿細管に発現し、ナトリウム利尿に関与していることは報告されていたが、腎系球体上皮細胞の発現は報告されていなかった。そこで本研究は腎系球体上皮細胞におけるプロラクチン受容体の役割を明らかにすることを目的とし、マウス腎系球体上皮細胞特異的にヒトプロラクチン受容体を発現するトランスジェニックマウスを作成した。同マウスは免疫染色法にて系球体上皮細胞にヒトプロラクチン受容体が発現していることが明らかとなったが、高ヒトプロラクチン血症の状態では野生型マウスとの違いは明らかではなく、今後の研究課題である。

研究成果の概要(英文)：Prolactin receptor has been reported to be expressed in kidney tubular cells and to be associated with natriuresis, but its expression in kidney glomerular podocyte was not known. In order to clarify the role of prolactin receptor in glomerular podocyte, we generated transgenic mice in which human prolactin receptor was expressed in glomerular podocyte specifically. We verified that human prolactin receptor was expressed in glomerular podocyte in transgenic mice, but the phenotypic difference with wild type mice was not observed in the condition of hyperprolactinemia, and further investigation should be continued.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：プロラクチン プロラクチン受容体 系球体上皮細胞

### 1. 研究開始当初の背景

これまでプロラクチン受容体は心機能低下モデルマウスにおいて腎尿細管に発現が誘導され、ナトリウム利尿に作用することを我々の研究グループが報告してきた (Tsuchida, Kaneko et al. *Clin Exp Nephrol* 2014)が、腎系球体においては既報の論文では免疫染色にてマウスボーマン嚢上皮細胞にプロラクチン受容体の局在が明らかとなっているのみであり (Sakai Y et al. *Kidney Int* 1999)、系球体上皮細胞の発現は報告されていなかった。しかし我々研究グループが予備実験として、抗ヒトプロラクチン受容体特異抗体を用いた免疫染色にてヒト腎組織でのプロラクチン受容体の発現を検証する過程において、ヒトではプロラクチン受容体はマウス同様に近位尿細管および系球体ボーマン嚢上皮に発現が認められるのみならず、系球体上皮細胞にも発現していることが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

上記予備実験の結果を踏まえ、(1)まずは系球体上皮細胞のプロラクチン受容体発現がヒト腎臓病患者において疾患特異性を持つのか、またどのような病態に關与しているのかを検証することを第一の研究目的とし、(2)さらに生体内での実際の役割を解明するために、マウス腎系球体上皮細胞特異的にヒトプロラクチン受容体を発現するトランスジェニックマウスを作成し、系球体上皮細胞の形態学的変化ならびに蛋白尿や血尿などの臨床像との関連を検討することを第二の目的とした。一般に、下等動物の情報分子は、高等動物の受容体に結合できないか、結合しても親和性が低いと考えられており、マウスプロラクチンはヒトプロラクチン受容体には反応しないことが報告されている (Utama et al. *J Endocrinol* 2006)ことを踏まえ、内因性のマウスプロラクチンの影響を避けるため、強制発現させる受容体としてヒトプロラクチン受容体を選択した。

### 3. 研究の方法

(1)ヒト腎臓病患者におけるプロラクチン受容体の発現と疾患特異性との関連の検証については、腎生検の適応となった患者にインフォームドコンセントを得た後、腎生検組織を凍結またはホルマリン固定し、組織を薄切した後、必要に応じて抗原の賦活化を行い、抗ヒトプロラクチン受容体抗体を用いて免疫染色を行い、同じく系球体上皮細胞に特異的に発現するマウス抗ヒトポドカリキシン抗体と二重染色を行うことによって、プロラクチン受容体の発現部位を同定した。正常腎組織には、生体移植腎のスクリーニング検査で得られた生検組織を用いた。

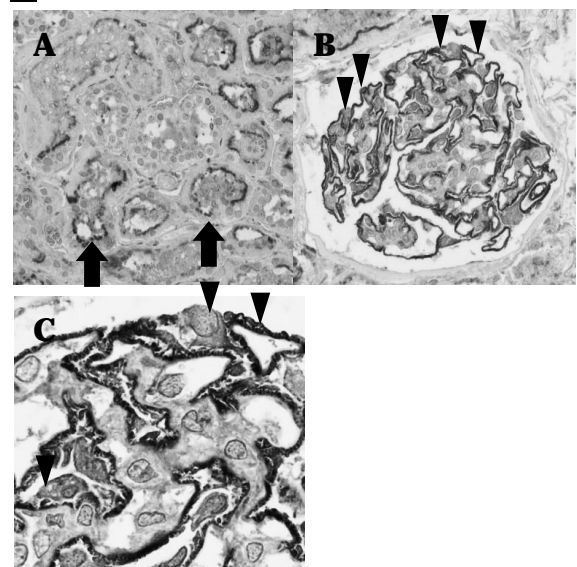
(2)また、マウス腎系球体上皮細胞特異的にヒトプロラクチン受容体を強制発現させるため、導入遺伝子のプロモーターには、系球体上皮細胞特異的に発現するヒトポドシン遺伝子 5' 上流 2.5kb DNA 断片を用い (Moeller

et al. *J Am Soc Nephrol* 2002)、下流にヒトプロラクチン受容体全長鎖 cDNA を配置し、さらに下流に SV40 由来 poly A 配列を有した直鎖状 DNA を、B6C3F1 マウス細胞受精卵にマイクロインジェクションにて遺伝子導入した。この一細胞受精卵を、偽妊娠雌マウス卵管内に戻し、トランスジェニックマウスを作成した。トランスジェニックマウスのスクリーニングとしては、生後 4 週の仔マウスの尾から採取したゲノム遺伝子を、PCR 法にて同定し、さらに腎組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成して、抗ヒトプロラクチン受容体抗体にてマウス系球体上皮細胞への特異的発現を検証した。また、同マウスに対するプロラクチンの効果を検証するために、C57BL/6J マウスに 4 回交配して遺伝的背景を揃えた後、CAG プロモーターを有する CAGGS プラスミドベクターにヒトプロラクチン遺伝子を組み込み、マウス尾静脈を介し静水圧を利用してマウス肝細胞内にベクターを注入し (Higuchi et al. *Gene Ther* 2003)、プロラクチンを強制的に発現させて高プロラクチン血症の状態となったマウスを作成した。対照には CAGGS の mock ベクターを用いて同様の処置を行った。

### 4. 研究成果

(1)ヒト腎臓病患者におけるプロラクチン受容体の発現と疾患特異性との関連を検証するため、正常腎組織の他、IgA 腎症、ループス腎炎、半月体形成性腎炎、顕微鏡的多発血管炎、微小変化型ネフローゼ症候群、膜性腎症、糖尿病性腎症患者の腎生検凍結組織切片を用いてヒトプロラクチン受容体抗体と反応させ、発現の有無を確認したが、上記疾患でヒトプロラクチン受容体の発現量に明らかな差はみられなかった。

図 1 ヒト腎組織におけるプロラクチン受容体



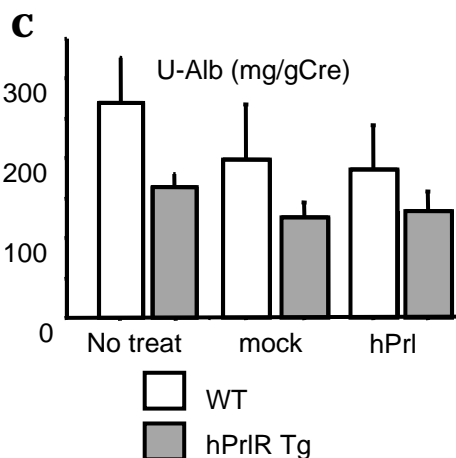
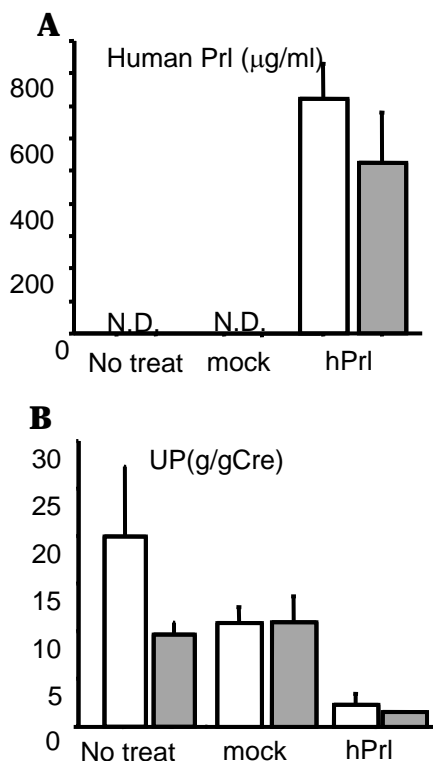
ヒト腎生検組織を用いた検証では、プロラクチン受容体は近位尿細管細胞 (A, 矢印) ならびに系球体上皮細胞 (B, C 矢頭) に発現

している。血管内皮細胞やメサンギウム細胞、遠位尿細管細胞にはプロラクチン受容体の発現は認めない。

(2)上記方法にて腎系球体上皮細胞特異的ヒトプロラクチン受容体発現トランスジェニックマウスを作成し、免疫染色法にて系球体上皮細胞にヒトプロラクチン受容体が発現していることを検証した。CAGGSベクターを用いて高ヒトプロラクチン血症の状態を作成し、野生型マウスとの発現型の違いを形態組織学的ならびに24時間蓄尿における蛋白尿で評価を行った。形態組織学的には糸球体、尿細管ともトランスジェニックマウスと野生型マウスとで明らかな違いは認められなかった。また尿蛋白の定量的評価では、高ヒトプロラクチン血症の状態ではトランスジェニックマウスおよび野生型マウスの両方で蛋白尿の減少効果が認められた。ヒトプロラクチンがマウス尿細管上皮のプロラクチン受容体に作用して尿蛋白を再吸収している可能性も考えられたが、糸球体上皮細胞における作用の違いは明らかではなく、今後は病的な状態を作り出した疾患モデルにおいて高ヒトプロラクチン血症の状態を作り出し、トランスジェニックマウスと野生型マウスとで違いが生じるかを検証し、糸球体上皮細胞におけるプロラクチン受容体の役割を解明することが研究課題である。

図2 高ヒトプロラクチン血症における蛋白尿減少作用

WT, ヒトプロラクチン受容体(hPrIR) Tg マウス各々に、無処置または、pCAGGS-mock, pCAGGS-ヒトプロラクチン(hPrI)を投与し、2日後に尿中蛋白、アルブミンを測定。



pCAGGS-hPrI の静注により、2日目には WT, Tg とも血中ヒトプロラクチン濃度は 600~800ng/ml に達する(A)。高ヒトプロラクチン血症の状態では蛋白尿の減少効果がみられるが、Tg 特異的ではなく、WT にも認められる(B)。ヒトプロラクチンによる尿中アルブミンの減少作用は明らかではない(C)。

#### 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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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 0 件)

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

〔その他〕  
ホームページ等：該当事項なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 佳賢 (KANEKO YOSHIKATSU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80444157

(2)研究分担者

成田 一衛 (NARITA ICHIEI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20272817

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：