

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790858

研究課題名(和文)新規ポドサイト発現蛋白・デンドリンを用いたIgA腎症進行度診断法の確立

研究課題名(英文)Dendrin is an indication of disease activity and progression in IgA nephropathy

研究代表者

児玉 史子(Kodama, Fumiko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60599893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症は、末期腎不全に至り、最終的には透析療法が必要になる可能性がある。IgA腎症の悪化には、糸球体上皮細胞(ポドサイト)障害が関与し、ポドサイト障害は蛋白尿の原因ともなる。IgA腎症、微小変化型ネフローゼ症候群等の腎組織を用いた検討から、ポドサイトでのCathepsin Lの増加がdendrinの核移行を促進し、アポトーシスを増加させた結果を得られた。

研究成果の概要(英文)：IgA nephropathy (IgAN) is associated with a substantial risk of progression to end-stage renal failure. The progression of IgAN is associated with podocyte injury and that podocyte injury is related to proteinuria. The translocation of dendrin to the podocyte nucleus as well as strong cathepsin L staining were detected in the glomeruli of IgAN. The translocation of dendrin to the podocyte nuclei enhances podocyte apoptosis.

研究分野：腎臓内科

キーワード：dendrin ポドサイト IgA腎症 慢性腎不全 慢性糸球体腎炎

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は、我が国において患者数が最も多い慢性糸球体腎炎である。IgA 腎症は 1968 年に Berger らが報告したが、発表当初は IgA 腎症の予後は良好とされた。しかし、IgA 腎症は糸球体硬化への進展に伴い、その約 25-40% は末期腎不全に至り、最終的には透析療法が必要になる可能性が高い。

糸球体硬化へ至る過程には糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 障害が関与していると考えられ、さらにポドサイト障害は蛋白尿を引き起こす原因ともなる。ポドサイトの足突起の間に張ったスリット膜は血液濾過の最終バリアとして働くため、このスリット膜の破綻が蛋白尿をきたす。障害を受けたポドサイトは糸球体基底膜より脱落する。糸球体からのポドサイトの脱落は、IgA 腎症の病期の進行と糸球体硬化の形成に関連すると報告されている。

2. 研究の目的

ヒト腎疾患や実験腎炎の検討から、糸球体硬化の進展にはポドサイト数の減少が関係していることが明らかになっている。ポドサイト数の減少する原因として、ポドサイトのアポトーシス、ポドサイトの糸球体基底膜からの脱落、ポドサイトの増殖能の欠落があげられる。そして、ポドサイト障害の一つの要因として、スリット膜構成蛋白の障害がある。

スリット膜を構成する蛋白として dendrin が同定されており、スリット膜を構成する主要な蛋白である nephrin や CD2AP と結合する。スリット膜を構成する nephrin 等の蛋白の変異は、ネフローゼ症候群や巣状糸球体硬化症の原因となる。我々の研究グループでは実験腎炎モデルマウスにおいて、dendrin のスリット膜から核への移行が糸球体硬化と関係することを明らかにした。

本研究は、ヒトの IgA 腎症症例において、スリット膜からポドサイト核内への dendrin の移行を確認し、さらにポドサイト障害により基底膜から尿中へ脱落したポドサイトを確認することで、dendrin の核内移動と IgA 腎症の病期進展との関係を明らかにすることを目的とする。この解析により、糸球体硬化進展メカニズムを解明する一助とし、さらにより簡便な低侵襲の病期診断方法を確立し、腎保護さらには生命予後の改善につながる治療へ発展させることが期待できる。実際に临床上において腎生検を経時的に実施することは、患者に対する侵襲性や医療経済的な負荷を鑑みると、より簡便で確実に病気や病勢を診断できる方法が確立されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 腎組織におけるポドサイト核内 dendrin 陽性数と臨床経過の評価

腎生検組織におけるポドサイト核内の dendrin 数から IgA 腎症の病期やポドサイト障害の程度を予測できる可能性がある。核 dendrin の存在は、ポドサイト障害におけるアポトーシスの存在を示唆するが、特に陽性数の高い症例において、組織診断時から臨床経過を追うことで、PAS 染色の組織診断のみでは明らかにされなかった、将来の腎予後の指標となり得るかを評価した。IgA 腎症の組織評価は、Oxford 分類と重松分類の 2 種類の組織評価ガイドラインを利用した。

(2) 尿中ポドサイトの核 dendrin の検討

障害を受けたポドサイトは、糸球体基底膜より脱落し尿中に排出される。抗 podocaryxin 抗体を用いて尿沈渣を染色することで、尿中ポドサイトを検出できる。また、アポトーシスを検出できるマーカーである annexin を使用して、IgA 腎症の尿中ポドサイトを染色した。この方法を利用して、尿中ポドサイトの dendrin の局在やポドサイトのアポトーシスに関する検討を行った。

ポドサイト障害から cathepsin L の活性化が生じると、ポドサイトの形態異常 (足突起消失) が起こり、スリット膜の破綻につながる。膜性腎症や糖尿病性腎症は MCNS や健常者と比較すると、cathepsin L の発現が上昇していると報告されている。IgA 腎症、MCNS、minor glomerular injury の腎組織を抗 cathepsin L 抗体で染色し、染色性を比較した。

4. 研究成果

(1) 対象患者の背景

順天堂大学で腎生検を施行した 14 人の成人 IgA 腎症患者での検討を行った。対象の IgA 腎症患者は未治療であり、男性 7 名・女性 7 名であった。臨床的パラメーターは、s-Cr 0.85 ± 0.29 mg/dl, eGFR 78.06 ± 23.10 mL/min/1.73m², 蛋白尿 0.76 ± 0.78 g/日であった。

(2) IgA 腎症における dendrin の発現とその局在

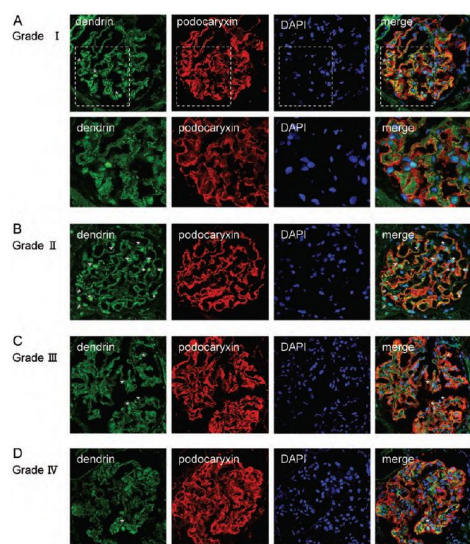
IgA 腎症ガイドライン (第 2 版) では、「IgA 腎症予後判定基準」を基に、IgA 腎症患者を 4 群 (Grade : 予後良好群、Grade : 予後比較的良好群、Grade : 予後比較的不良群、Grade : 予後不良群) に分類する。各グレー

ドの IgA 腎症患者の腎生検組織を抗 dendrin 抗体で染色し、dendrin の発現とその局在を観察した(図 1)。

全てのグレードにおいて、dendrin(緑)はポドサイトのマーカーである podocaryxin (赤)と共染色した。さらに、核のマーカーである DAPI(青)との共染色像もみられたため、IgA 腎症でも dendrin が核内に移行していた。

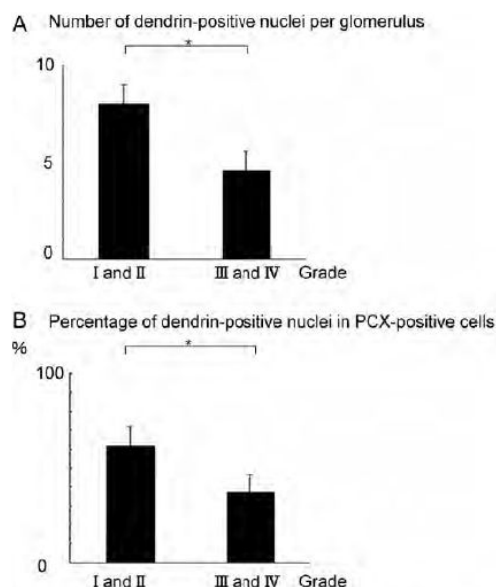
Dendrin が核に移行した細胞数を比較すると、予後の不良な群(Grade +)は良好な群(Grade -)に比べて有意に核に移行した細胞数・割合が少なかった(図 2)。

< 図 1 > IgA 腎症腎組織の dendrin の局在



(Kodama F, et.al. *Nephrol Dial Transplant*. 28. 2013)

< 図 2 > IgA 腎症の予後の違いによる dendrin が核内に移行した細胞数の比較

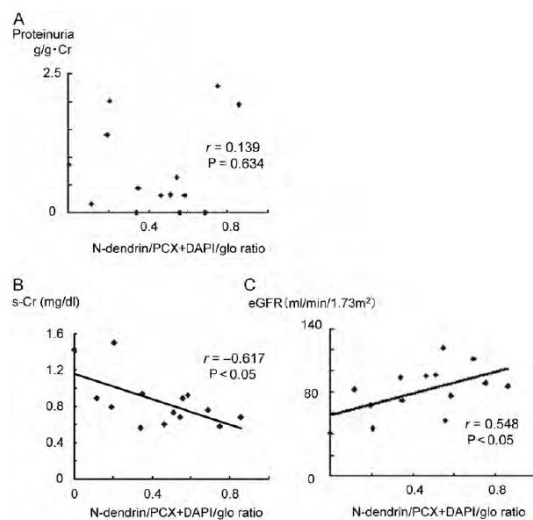


(Kodama F, et.al. *Nephrol Dial Transplant*. 28. 2013)

(3) 臨床的パラメーターと dendrin が核に移行したポドサイト数との関係

Dendrin が核内に移行した細胞数と IgA 腎症の臨床的パラメーターである蛋白尿や血清クレアチニンとの相関を検討した(図 3)。蛋白尿と dendrin 陽性ポドサイト数には相関がみられなかった。血清クレアチニンと dendrin 陽性ポドサイト数には有意な相関($r=-0.617, P<0.05$)があり、eGFR とも有意な相関($r=0.548, P<0.05$)があった。

< 図 3 > 臨床的パラメーターと dendrin が核に移行したポドサイト数との関係



(Kodama F, et.al. *Nephrol Dial Transplant*. 28. 2013)

(4) dendrin の核移行と腎組織病変との関連

I g A 腎症の国際的な組織評価のガイドラインである Oxford 分類での組織評価と dendrin の核移行に関連があるか評価した。Oxford 分類は、メサンギウム病変・分節性硬化病変・管内細胞増殖・尿細管間質性病変という 4 つの組織病変をスコア化できる。しかし、dendrin の核移行とこれらの病変のスコアに有意な相関はみられなかった。

次に、急性病変と慢性病変を区別して評価できる重松分類を利用した。重松分類は、急性管内性病変、急性管外性病変、慢性管内性病変、慢性管外性病変、急性尿細管間質性病変、慢性尿細管間質性病変の 6 つの組織病変をスコア化できる。

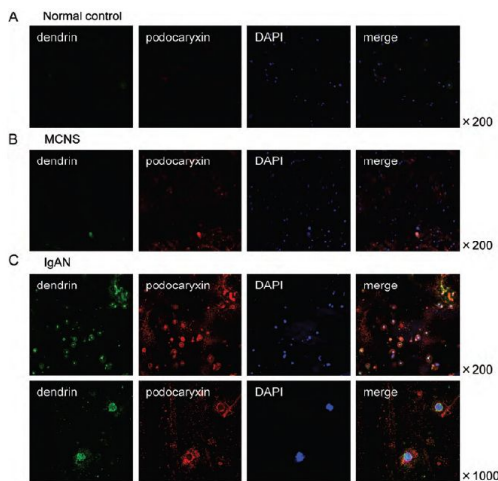
重松分類では、dendrin の核移行数と急性管内性病変に相関があり($r=0.432, P<0.05$)、急性管外性病変との相関もみられた($r=0.728, P<0.05$)。また、dendrin の核移行数と慢性病変は逆相関がみられた。重松分類でも、dendrin の核移行数と尿細管間質性病変には相関はみとめなかった。

(5) 尿中に脱落したポドサイトでの dendrin の発現

糸球体基底膜より脱落したポドサイトは尿から検出することができる。正常人では podocaryxin(赤)陽性細胞や dendrin(緑)陽性細胞は検出できなかった(図4)。微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)では、podocaryxinと dendrinの両者が陽性の細胞がわずかにみられた。IgA腎症患者では多数の podocaryxinと dendrinの陽性細胞がみられ、さらに dendrinが核に移行した細胞もみられた。IgA腎症はMCNSに比べ、尿中ポドサイト数が有意に多く、さらに dendrinが核に移行した尿中ポドサイト数も有意に多かった(図4)。

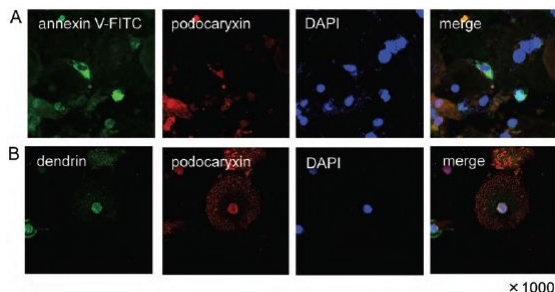
次に、アポトーシスのマーカーである annexin を用いて IgA腎症患者の尿中ポドサイトを染色した(図5)。尿中ポドサイトの細胞質に annexin(緑)の染色像がみられ、同じサンプルで dendrinが核移行した尿中ポドサイトがみられた。これらの結果から、IgA腎症の急性炎症はポドサイト障害を生じ、障害を受けたポドサイトの dendrinが核に移行するとアポトーシスにつながる変化が起き、尿中に脱落するものと予想される。

<図4>尿中ポドサイトにおける dendrin の発現



(Kodama F, et.al. *Nephrol Dial Transplant*. 28. 2013)

<図5> IgA腎症患者の尿中ポドサイトとアポトーシス



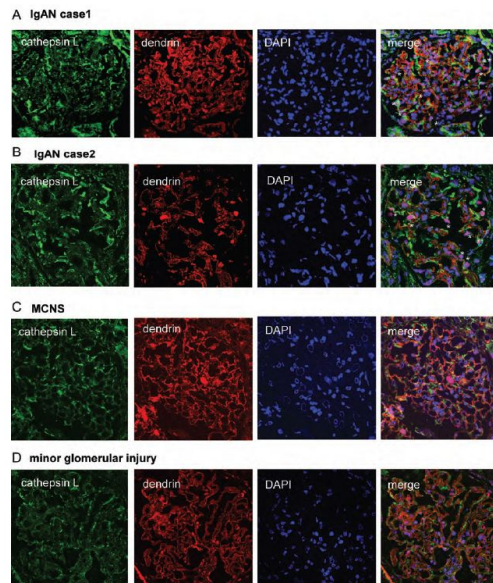
(Kodama F, et.al. *Nephrol Dial Transplant*. 28. 2013)

(6) IgA腎症における cathepsin L

ポドサイト障害から cathepsin Lの活性化が生じると、足突起消失が起こり、スリット膜の破綻につながる。膜性腎症や糖尿病性腎症はMCNSや健常者と比較すると、cathepsin Lの発現が上昇していると報告されている。

IgA腎症、MCNS、minor glomerular injuryの腎組織を抗 cathepsin L抗体で染色し、染色性を比較した。IgA腎症の腎組織では dendrinが核に移行した細胞があり、さらに cathepsin Lの発現が上昇していた。しかし、この現象はMCNSと minor glomerular injuryの腎組織ではみられなかった。これらの結果から、障害ポドサイトでの cathepsin Lの上昇が dendrinの核移行を促進し、アポトーシスへつながると予想される。

<図6> IgA腎症における cathepsin Lの発現



(Kodama F, et.al. *Nephrol Dial Transplant*. 28. 2013)

(7) 考察

我々の研究グループでは糸球体疾患モデルマウスにおいて、dendrinのスリット膜から核への移行が糸球体硬化と関係することを明らかにして来た。本研究により、IgA腎症のヒト腎組織においても、ポドサイトの核内に dendrinが移行していた。また、腎予後の不良な群よりも良好な群で、dendrinが核内移行したポドサイトの数が優位に少なかった。腎予後の不良な群では、dendrinが核内に移行したポドサイトは尿中に脱落し、そのために dendrinが核内移行したポドサイト数が減少したと考えた。

IgA腎症の病期の進行や糸球体硬化の進行には、急性炎症の繰り返す再発が関与すると報告されている。今回の結果では、重松分類

の急性管外性病変と dendrin の核移行数に有意な相関がみられた。この結果は、糸球体での急性炎症がポドサイトでの dendrin の核移行を生じると示唆される。

尿中ポドサイト数と小児の IgA 腎症における急性管外性病変には相関があると報告されている。我々は糸球体疾患モデルマウスにおいて、dendrin の核移行が生じ、dendrin の核移行が TGF- β 誘発性のポドサイトのアポトーシスを促進することを報告している。これらの結果から、ポドサイト障害での dendrin の核移行が、ポドサイトのアポトーシスや糸球体基底膜からのポドサイトの脱落と関連していると予想できる。IgA 腎症の腎組織では、アポトーシスを生じたポドサイトを通常検出できない。しかし、尿中に脱落したポドサイトではアポトーシスを認めた。ポドサイトが糸球体基底膜上でアポトーシスが起きて脱落するのか、何らかの理由により脱落した後にアポトーシスを生じるのかは結論が出ていない。Annexin は早期アポトーシスを検出できるマーカーであり、尿中ポドサイトで annexin が陽性であったことから、ポドサイトはおそらくアポトーシス早期に糸球体基底膜上から脱落すると考えられた。

本研究ではポドサイトのマーカーとして、抗 podocaryxin 抗体を使用したが、別のポドサイトのマーカーである抗 WT-1 抗体は使用しなかった。抗 WT-1 抗体はポドサイトの核を染色するが、他の糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞や内皮細胞の核は染色されないことから、ポドサイトの核のマーカーとして有用である。しかし、我々の使用した抗 WT-1 抗体でヒトの腎組織を染色すると、ポドサイトの核とさらに細胞質も染色された。そのため、本研究では dendrin の核移行を示すために、抗 podocaryxin 抗体、抗 dendrin 抗体、DAPI の共染色を行った。

Dendrin が核内に移行したポドサイト数と臨床的パラメーター(eGFR)に相関がみられたが、eGFR とポドサイト数の減少が相関するという過去の報告を支持するデータである。また、我々に検討から、腎組織での dendrin が核移行したポドサイト数は、ポドサイトの障害度や尿中への脱落を推定できる指標となり得る可能性が示唆された。

(8) 結論

ポドサイトでの dendrin の核移行数が IgA 腎症患者の急性炎症と関連する。ポドサイトのアポトーシスを IgA 腎症患者の尿中ポドサイトから検出することができた。Dendrin の核移行数が IgA 腎症の病期の進行や炎症の指標として使用できる可能性がある。

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6件)

Jeong KH, Asanuma K, Lydia A, Takagi M, Asao R, Kodama F, Asanuma E, Tomino Y. Combination therapy with telmisartan and oxacalcitriol suppresses the progression of murine adriamycin nephropathy. *Nephron*. 2015;129(2):143-54. doi:10.1159/000369346.

Kodama F, Asanuma K, Takagi M, Hidaka T, Asanuma E, Fukuda H, Seki T, Takeda Y, Hosoe-Nagai Y, Asao R, Horikoshi S, Tomino Y. Translocation of dendrin to the podocyte nucleus in acute glomerular injury in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 ; 28 (7):1762-72. doi:10.1093/ndt/gfs500.

Asao R, Asanuma K, Kodama F, Akiba-Takagi M, Nagai-Hosoe Y, Seki T, Takeda Y, Ohsawa I, Mano S, Matsuoka K, Kurosawa H, Ogasawara S, Hirayama Y, Sekine S, Horikoshi S, Hara M, Tomino Y. Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Sep;7(9):1385-93. doi:10.2215/CJN.08110811.

Suzuki H, Ohsawa I, Kodama F, Nakayama K, Ohtani A, Onda K, Nagamachi S, Kurusu A, Suzuki Y, Ohi H, Horikoshi S, Tomino Y. Fluctuation of serum C3 levels reflects disease activity and metabolic background in patients with IgA nephropathy. *J Nephrol*.2013;26(4): 708-15. doi: 10.5301/jn.5000278.

Masuda A, Hagiwara S, Tanimoto M, Kodama F, Okumura K, Nohara N, Matsumoto M, Maiguma M, Omote K, Io H, Kurusu A, Ohsawa I, Shimizu Y, Hamada C, Horikoshi S, Tomino Y. Effects of acetate-free citrate dialysate on glycoxidation and lipid peroxidation products in hemodialysis patients. *Nephron Extra*. 2012 27;2(1):256-68. doi: 10.1159/000342258.

Lydia A, Asanuma K, Nonaka K, Takagi M, Jeong KH, Kodama F, Asao R, Asanuma E, Prodjosudjadi W, Tomino Y. Effects of 22-oxa-calcitriol on podocyte injury in adriamycin-induced nephrosis. *Am J Nephrol*. 2012;35(1):58-68. doi:

10.1159/000334626.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

児玉 史子(Fumiko, Kodama)

順天堂大学 医学部 助教

研究者番号 : 60599893