

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461210

研究課題名(和文)ポドサイト障害連鎖機構の解明と阻止

研究課題名(英文)Vicious cycle toward glomerulosclerosis

研究代表者

長田 道夫(Nagata, Michio)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10192238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ポドサイト特異的にヒトCD25を発現するマウスと、培養ポドサイト細胞を使い以下の研究結果を得た。1. ポドサイト特異的障害が起きると、局所の毛細血管内にplasminogen activator inhibitor (PAI-1)が発現し、血中のuPAと結合体を作りポドサイトと基底膜を接着するbeta1インテグリンのポドサイト内エンドサイトーシスによりポドサイト剥離が加速することで硬化病変が拡大する。いわゆるvicious cycleが存在する。2. ポドサイト剥離により、毛細血管内に脂質が沈着し酸化することで、血中のマクロファージを局所にトラップし、硬化病変を形成する。

研究成果の概要(英文)：Podocyte specific CD25 expression mice causes glomerular injury by injection of its ligand immunotoxin. We found that podocyte loss caused intracapillary PAI-1 up-regulation from endothelial cells that subsequently bound with uPA leading to beta-1 integrin endocytosis. In addition endothelial adhesion molecules up-regulation is accompanied by lipid peroxidation and foam cell formation. All together may be responsible for focal segmental glomerulosclerosis.

研究分野：腎臓学

キーワード：ポドサイト 糸球体硬化

## 1. 研究開始当初の背景

ポドサイトは糸球体濾過障壁構成細胞であり、その障害は多様な腎臓病に共通する直接進展因子であることが知られている。

巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)は、進行性の糸球体疾患の典型であり、ポドサイト障害を原因として発症する、いわゆるポドサイト病と考えられている。その分節病変形成機序については不明であるが、これまでの研究から、ポドサイトの障害が「局所」の糸球体毛細血管に変化を与えることで、病変が分節性になると推察される。この局所のポドサイト障害、ひいてはポドサイト剥離が、同部位の毛細血管(係蹄)に障害を与える機序は現在のところ不明である。おそらくポドサイトと毛細血管内皮細胞の間に分子情報としてのクロストークが存在しており、ポドサイト障害により、この密接な関連が機能しなくなるために、分節性病変が上皮細胞障害とその真下にある内皮細胞障害として現れることが原因ではないかと推察される。クロストークシグナルのうちで知られているのはポドサイトから分泌される VEGF (血管内皮由来成長因子)であり、VEGF は内皮細胞にある受容体に結合することで内皮細胞の恒常性を維持している。ポドサイト障害が原因とされる FSGS においては、毛細血管内へのマクロファージの浸潤、およびその泡沫化が起きるが、この局所の病変形成にも、ポドサイトと内皮細胞のクロストークの破綻にひとつの原因があると推察される。これらのポドサイトを中心とした濾過障壁の障害とそれに対する糸球体応答が、おそらく糸球体硬化進展の内因性機転と考えられるが、これに関してもいまだ明らかにされてはいない。

## 2. 研究の目的

本研究は、糸球体上皮細胞(ポドサイト)の剥離に誘導される糸球体濾過障壁の障害の伝搬機構と糸球体局所の細胞生物学的反応

と検討し、ポドサイト剥離が糸球体硬化に進展する機序を病理学的に明らかにするものである。研究は以下の2つに分けて実施した。

(1) **ポドサイト障害による血管内凝固線溶系の変化についての研究。**ポドサイト剥離に対して局所の係蹄内の凝固反応亢進を分子の動きとして捉え、その分子の意味を明らかにすることで、ポドサイト障害による血管内凝固線溶系がどのように、分節性病変形成に関わるのかを明らかにする。

(2) FSGS **における分節性泡沫細胞浸潤機構の解明。**ポドサイト障害 + 高脂血症環境下での、糸球体内脂質沈着の量と質を分析し、ポドサイト障害が糸球体内の脂質沈着をどのように変化させるのか、脂質の種に基づく内皮細胞、メサングウム細胞、マクロファージの分子発現としての応答から、分節性の泡沫細胞浸潤機序を明らかにし、分節性病変形成機序について明らかにする。

## 3. 研究の方法

ポドサイト特異的にヒト CD25 を発現するマウスに CD25 に特異的に結合する immunotoxin を投与することで、ポドサイト特異的障害モデル (NEP25 FSGS マウス) を作成した。

(1) **ポドサイト障害による血管内凝固線溶系の変化についての研究。** NEP25 FSGS マウスにおいて、糸球体係蹄内に凝固線溶系、PAI-1(plasminogen activator inhibitor type 1)、eNOS などの発現を免疫染色、ウエスタンブロットにて検討する。この系で、早期から発現亢進を認めた PAI-1 の阻害薬を NEP25 FSGS マウスに投与し、内皮細胞障害、糸球体硬化の程度について検討する。マウス培養ポドサイトにおいて、uPA, beta1 インテグリン uPAR の複合体形成と、ビオチン標識した beta1 インテグリンが uPA/PAI1/uPAR 複合体により細胞内に取り込まれるかについて検討する。

## (2) FSGS における分節性泡沫細胞浸潤機構の解明。

高脂血症マウス (low density lipoprotein receptor deficient mice: LDLR<sup>-/-</sup>) と NEP25 FSGS マウスを交配し、高脂血症下ポドサイト障害モデルを作製する。このモデルにおいて oil red O 染色で糸球体内の脂質沈着を検討し、単離糸球体の lipid mix を行い、糸球体内に沈着した脂質の種を明らかにする。これで検出された主要な構成脂質が、培養メサンギウム細胞、内皮細胞、腹腔内マクロファージにおけるケモカイン、接着分子の発現をどのように変化させるのかについて検討する。

### 4. 研究成果

(1) ポドサイト特異的障害が起きると、極めて早期に局所の毛細血管内に PAI-1 が発現した。その発現局在は、免疫染色と血小板抑制実験から、毛細血管内皮細胞と考えられた。PAI-1 は、その後内皮細胞からポドサイト内に移動することが明らかとなったため、なんらかの複合体を形成している可能性を考え、in vitro の実験を行った。uPA, uPAR と PAI-1 は複合体を形成していること、ポドサイトと基底膜を接着する beta1 インテグリンのポドサイト内へのエンドサイトーシスが起きることが免疫電顕とビオチンラベルの実験から判明した。したがって、ポドサイト剥離が加速することで硬化病変が拡大する、いわゆる vicious cycle が存在することが明らかになった。

(2) ポドサイト剥離により、毛細血管内に脂質が沈着し、しかも酸化することが、免疫染色と lipid mix 解析から明らかになった。高脂血症マウスにアドリアマイシン投与することで、泡沫細胞を含む FSGS 病変が形成された。ポドサイト障害によって糸球体に沈着した脂質は、LPC16, LPC 18 という 2 種類の酸化脂質であることが分かったため、それぞれ

の機能を in vitro で検討した in vitro の成績では、LPC16 は、メサンギウム細胞に対して VCAM-1, MCP-1, MIF などのケモカインの発現を亢進させ、LPC16 で刺激したメサンギウム細胞の細胞上清はマクロファージに beta7 インテグリン、CXCR4、CCR2 などの細胞走化性因子の発現を刺激し、マクロファージの脂質沈着部への遊走を促すことが判明した。一方、LPC18 は、糸球体内皮細胞に対して、VCAM-1、P-セレクトリン、MCP-1 の発現を亢進した。ポドサイト剥離による脂質沈着と酸化、糸球体構成細胞とマクロファージの機能変化などが高脂血症下での泡沫細胞浸潤を形成すると考えられる。

以上の (1) (2) の成績から、ポドサイト障害に誘導される血管内皮細胞の凝固線溶系、脂質の沈着と酸化を介して、内皮細胞、メサンギウム細胞などから接着分子、ケモカインの発現を刺激し、ポドサイト剥離部局所に障害を起こすことで分節性病変を形成する可能性が考えられる。

結論：本研究の目的である、ポドサイト特異的障害に連鎖する局所反応が糸球体硬化の背景にあること、そしてその分子機構の一端を明らかにした。

### 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4件)

1. Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int.* 2016 Jun;89(6):1221-30. doi: 10.1016/j.kint.2016.01.012. Epub 2016 Mar 19. Review. PMID:27165817. (査読あり)
2. Takashima Y, Keino-Masu K, Yashiro H, Hara S, Suzuki T, van Kuppevelt TH, Masu M, Nagata M. Heparan sulfate 6-O-endosulfatases, Sulf1 and Sulf2,

regulate glomerular integrity by modulating growth factor signaling. Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Mar 1;310(5):F395-408. doi: 10.1152/ajprenal.00445.2015. Epub 2016 Jan 13. PMID:26764203. (査読あり)

- 3 . Hara S, Kobayashi N, Sakamoto K, Ueno T, Manabe S, Takashima Y, Hamada J, Pastan I, Fukamizu A, Matsusaka T, Nagata M. Podocyte injury-driven lipid peroxidation accelerates the infiltration of glomerular foam cells in focal segmental glomerulosclerosis. Am J Pathol. 2015 Aug;185(8):2118-31. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.04.007. Epub 2015 Jun 11. (査読あり)
- 4 . Kobayashi N, Ueno T, Ohashi K, Yamashita H, Takahashi Y, Sakamoto K, Manabe S, Hara S, Takashima Y, Dan T, Pastan I, Miyata T, Kurihara H, Matsusaka T, Reiser J, Nagata M. Podocyte injury-driven intracapillary plasminogen activator inhibitor type 1 accelerates podocyte loss via uPAR-mediated  $\beta$ 1-integrin endocytosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2015 Mar 15;308(6):F614-26. doi: 10.1152/ajprenal.00616.2014. Epub 2015 Jan . (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Namiko Kobayashi, Toshiharu Ueno, Satoshi Hara, Shun Manabe, Yukina Takahashi, Kazuo Sakamoto, Tomo Suzuki, Yasutoshi Takashima, Taiji Matsusaka, Toshio Miyata, Michio Nagata. Podocyte Injury-Driven Endocapillary PAI-1 Promotes a Vicious Cycle of Podocyte Loss via beta-1 Integrin Endocytosis American Society of Nephrology Annual meeting 14/NOV/2014. Atlanta, Convention Center, Atlanta, USA.
2. Podocyte Injury Promotes Glomerular Lipid Peroxidation and Foam Cell Infiltration

Under Hypercholesterolemia Satoshi Hara, Namiko Kobayashi, Shun Manabe, Tomo Suzuki, Kazuo Sakamoto, Yasutoshi Takashima, Toshiharu Ueno, Juri Hamada, Taiji Matsusaka, Michio Nagata. American Society of Nephrology Annual meeting 14/NOV/2014. Atlanta, Convention Center, Atlanta, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/pathology/rvpatho/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長田 道夫 (Nagata, Michio)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号 : 10192238

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし