

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 山崎 健史

学位論文題名

CD74 expression is increased with amplified activation of parietal epithelial cells by lipopolysaccharide treatment in the mouse model of focal segmental glomerulosclerosis (巣状分節性糸球体硬化症マウスモデルにおいて、リポポリサッカライド刺激によりボウマン嚢壁側上皮細胞の活性化が増幅され、CD74 発現が増強する)

【背景と目的】ボウマン嚢壁側上皮細胞 (parietal epithelial cell、壁細胞)は、尿腔を挟んで糸球体臓側上皮細胞 (足細胞)と対向する細胞層である。壁細胞の病変形成における役割に関する研究はこれまで進んでいなかったが、壁細胞は数多くの腎疾患において積極的に病変形成に関与する事が明らかとなった。こうした現象は、“壁細胞の活性化”と称され、活性化壁細胞 (activated PECs, aPECs)の動態や病変形成における役割が着目されている。活性化壁細胞は、形態的に、核の腫大化と細胞質の腫脹を伴って球状の形態を呈する。また機能的に、増殖能や遊走能の獲得をもたらし、さらに細胞外基質の産生が誘導され、糸球体病変形成に寄与する。活性化壁細胞は、半月体形成において中心的な役割を果たすと共に、足細胞喪失した糸球体基底膜側で細胞外基質を産生することにより硬化病変形成に寄与する。腎疾患動物モデルにおける解析から、活性化壁細胞の特異的マーカーとして CD44 の新規発現が報告された。CD44 は、ヒアルロン酸などの受容体で、細胞-細胞間の接着、癒着、遊走などに関与する分子である。壁細胞における CD44 発現は、FSGS の移植後再発の早期マーカーや FSGS と微小変化群ネフローゼ症候群の病理学的な鑑別マーカーとして有用である事も報告されている。また、CD44 以外に、壁細胞活性化に伴いその発現を認める分子に関する報告もみられ、p-ERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1 and 2)、CXCR4 (CXC chemokine receptor 4)、AT-1 (type 1 angiotensin II receptor)が、活性化マーカーとして有用である事が示唆されている。一方で、現在までに活性化を惹起する直接的因子や、活性化の具体的な制御因子に関して不明な点も多い。また、CD44 は CD74 と受容体複合体形成し、CD74 は MIF (macrophage inhibitory factor)の受容体として働き、シグナル伝達において p-ERK を誘導し、細胞増殖などに関与する事も知られている。本研究では、FSGS モデルであるアドリアマイシン (adriamycin、ADR)マウスを中心とする複数の動物モデルを作製し、糸球体硬化の進展過程の壁細胞に発現する活性化マーカー群 (CD44、p-ERK、CXCR4、AT-1)、および、CD44 との相互作用が知られる CD74 の発現と活性化との関連を免疫組織学的に検討した。

【材料と方法】壁細胞活性化を引き起こし得る腎症モデルマウスとして、(1) ADR マウス、(2) リポポリサッカライド (lipopolysaccharide、LPS)の腹腔内投与による可逆性の足細胞

傷害によって一過性蛋白尿が惹起される、LPS モデル、(3) ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)の腹腔内投与による蛋白過剰負荷モデル、(4) さらにADR マウスにLPS 腹腔内投与を組み合わせ、壁細胞傷害増幅を惹起し活性化を観察するモデル(ADR-LPS マウス)を新たに作製した。各マウスにおいて、採血(BUN、血清クレアチニン)、採尿(尿蛋白、尿クレアチニン)、腎組織の採取を行った。病変評価にあたり光学顕微鏡及び電子顕微鏡による構造的変化を解析すると共に、免疫組織学的に関連分子の解析を行った。

【結果】ADR マウスの FSGS 病変形成過程における病理所見の検討から、散在する虚脱した係蹄壁、分節性硬化病変の発生に伴い、ボウマン囊壁と係蹄間の癒着、偽半月体形成など壁細胞を起源とする病理変化の出現を認めた。免疫染色による CD44 の発現性の検討から、壁細胞病変部における CD44 の新規発現を認めた。他の壁細胞活性化のマーカー分子(p-ERK、CXCR4、AT-1)についても検討したところ、発現部位の限局性や強度では CD44 には劣るものの、壁細胞において発現している事が確認された。一方、CD44 との相互作用のある CD74 発現を検討したところ、尿管上皮細胞に加え、係蹄ボウマン囊癒着形成細胞、偽半月体形成細胞など壁細胞の活性化が起源と考えられる病変部に明らかに発現している事が見出された。そこで我々は、ADR マウスに比較的少量の LPS 腹腔内投与を行うことにより、壁細胞傷害の増幅を惹起して傷害による壁細胞活性化の解析を可能とするモデルの作成を試みた。ADR-LPS マウスでは、LPS 投与 12 時間後から有意な蛋白尿増加と腎機能低下を示した。壁細胞の変化に着目すると、LPS 投与後 12 時間から著しい腫大が目立つ様になり、その後時間が経つにつれ偽半月体形成、ボウマン囊係蹄癒着病変が有意に増加した。免疫染色にて、細胞増殖マーカーである Ki67 の壁細胞における発現数増多を LPS 投与 12 時間後から認めており、ADR マウスへの LPS 投与は、細胞質腫脹と核の腫大性変化、係蹄側への遊走、増殖などを急速に惹起し壁細胞の活性化をもたらすことが示された。壁細胞活性化マーカーの検討において、CD44 は、既に ADR マウスにおいて、多くの壁細胞に陽性像を示していたが、CD74 は、LPS 投与 12 時間後から、腫脹した細胞質に強度に発現しはじめ、投与後 48 時間まで継続的に発現、7 日目までに ADR マウスにおける発現のベースラインにまで下降した。壁細胞における CD74 発現の報告は本報告が初めてであり、複数の壁細胞マーカーとの共発現を確認している。他方、壁細胞活性化マーカーで細胞増殖などに関与する因子でもある p-ERK の高発現も CD74 の発現性と同様に変化しているのが観察され、壁細胞における CD74 発現は、ADR マウスへの LPS 投与による壁細胞活性化の増幅、それによる形質変化を鋭敏に捕らえている可能性が示唆された。

【考察】我々は FSGS 病変における壁細胞の活性化を検討し、活性化に関わる新規因子として CD74 を見出した。また、FSGS モデルへの LPS 少量投与による壁細胞活性化の増幅は、活性化機序の解明に有用であることが示された。

【結語】壁細胞の活性化は慢性腎疾患全般に関わる糸球体硬化機転の解明において、重要な因子の一つである。本研究成果は、壁細胞活性化の原因解明とその制御を通して慢性腎疾患全般に関わる糸球体硬化機転の解明に寄与する事が示唆される。