

## 学位論文題名

## Prevalence of CD44-positive glomerular parietal epithelial cells reflects podocyte injuries in adriamycin associated nephropathy

(CD44陽性糸球体壁側上皮細胞の出現は、アドリアマイシン腎症-巣状分節性糸球体硬化症マウスモデル-におけるポドサイト障害を反映する)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 巣状糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis、FSGS)は、臓側糸球体上皮細胞 (visceral glomerular epithelial cell、別名、podocyte と呼称される) の傷害による糸球体濾過機能減少および進行性糸球体硬化をきたす代表的疾患である。先天的あるいは後天的な原因により podocyte 障害が生じることにより、podocyte が糸球体基底膜 (glomerular basement membrane、GBM) の尿腔側から剥離し、GBM が露出する。やがて、糸球体を囲む嚢状構造を支えるボウマン嚢上皮細胞 (parietal epithelial cell、PEC) と GBM 間の癒着や、PEC の浸潤、増殖といった一連の病理学的変化が生じ、最終的に硬化病変が形成される。このように、糸球体硬化病変形成においては、糸球体構成細胞を含む細胞の増殖や遊走、癒着、炎症細胞浸潤などの事象が関与していることが特徴である。

CD44 分子は、細胞-細胞間及び細胞-基質間接着に関連した細胞接着分子の一つであり、細胞骨格維持、遊走や接着などの事象に関与していることが知られ、近年は癌細胞の増殖浸潤や転移、アポトーシスなどにも関連深い分子として注目されている。これまで CD44 の腎疾患の発症・進展における関与に関しては、炎症性腎疾患や尿細管間質障害における役割を検討するものが多く見られた。以前から FSGS における硬化病変の形成においては、ボウマン嚢を支える PEC が重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。最近、ヒト腎炎や動物モデルの腎組織において、PEC の一部が CD44 陽性を示す“活性化” PEC が出現することが見出され、CD44 陽性 PEC 細胞の硬化病変の発症や進展過程における積極的関与が示唆されている。また、CD44 の代表的リガンドの一つとして、osteopontin (OPN) が知られる。OPN は、腎炎・腎症の発症や進展に関与するサイトカインとして知られており、半月体形成細胞や PEC における発現も報告されている。CD44 陽性細胞における OPN 発現性は、細胞遊走、接着を積極的に促し得ることも知られる。これまでに糸球体硬化機転のプライマリーな要因であるポドサイト障害と糸球体における CD44 分子発現の関連について、具体的に検討した報告は見られない。そこで我々は、FSGS 病変形成過程におけるポドサイト障害と糸球体における CD44 分子発現の関連性について明らかにすることを試みた。FSGS の動物モデルとして知られるアドリアマイシン(ADR)関連腎症(AAN)マウスモデルを用いた。また、本マウスモデルにおいては、週齢によりアドリアマイシンによって惹起されるポドサイト障害に関する感受性が異なることが知られる。我々は、異なる週齢における AAN マウスモデルを確立することにより、ポドサイト障害度と糸球体 CD44 発現の関連について探求することとした。

【材料と方法】 BALB/c 系マウス (雄、6 週齢あるいは 12 週齢) に対して、1) 12 週齢正常対照群 (生理食塩水を尾静脈から静注) (n=17)、2) 12 週齢 AAN 群 (ADR 12mg/kg を尾静脈から静注) (n=30)、3) 6 週齢正常対照群 (生食投与) (n=10)、4) 6 週齢 AAN 群 (n=15)、の 4 群に分けて検討した。生理食塩水または ADR 静注(day 0)の後、day 5、day 7、day 10、day 14、day 28 において屠殺し、採血 (血清クレアチニン、総蛋白)、採尿 (蛋白、尿クレアチニン)、腎組織の採取を行い解析した。腎組織における CD44、OPN、

podocyte マーカー (synaptopodin、podocin、WT1)、PEC マーカー (claudin-1) の発現や病理組織学的変化の解析を行った。

【結果】正常対照群(生食投与)では day 28 までの間、体重減少や尿所見、腎組織学的変化を認めなかったが、12 週齢 AAN 群では体重減少、day 10 から尿蛋白出現を認めた。day 28 には血清クレアチニンの上昇を認めた。腎病理組織学的解析では、day 14 から分節性(一部全節性)糸球体硬化、偽半月体~半月体の散在、尿細管萎縮、間質細胞浸潤~線維化が出現し、day 28 においては著明な糸球体硬化、尿細管間質傷害を認めた。また、6 週齢 AAN 群では、12 週齢 AAN 群と比して体重減少、尿蛋白、腎機能低下や、腎病理組織学的変化はより軽度だった。12 週齢 AAN を用いた糸球体における CD44 発現に関しての検討では、尿蛋白出現前である day 7 から一部の糸球体に CD44 発現が出現し、その後 CD44 陽性糸球体数の増加を認めた。共焦点顕微鏡による解析では、CD44 陽性細胞は、podocyte marker である synaptopodin、podocin とは共発現を認めず、PEC マーカーである claudin-1 と共発現を示した。また AAN における糸球体 CD44 発現部位は、発現早期にはボウマン嚢側に留まるが、糸球体係蹄上皮側や、半月体・偽半月体構成細胞における発現を認めた。さらに、共焦点顕微鏡による三重蛍光染色 (CD44、podocyte マーカー、PEC マーカー) の解析結果では、podocyte マーカー発現の低下した血管係蹄部位に一致して、CD44 陽性 PEC の出現を認め、一部の糸球体では、CD44 陽性 PEC は podocyte マーカー発現の低下した血管係蹄へ向けて陥入、架橋形成を示した。6 週齢 AAN を用いた解析では、12 週齢 AAN と比してより早期に podocyte マーカーの発現低下(day 7-10)と、CD44 発現が出現(day5)することが分かった。更に、podocyte マーカー発現の減少傾向は緩やかであり、結果として day 28 の時点では 12 週齢 AAN と比して有意に発現が保たれていた。また、糸球体内 CD44 発現も day28 の時点で有意に発現が低値だった。OPN は、ADR 静注 day 14 から糸球体内での有意な発現を認めた。発現部位は、ボウマン嚢上皮側に出現し、共焦点顕微鏡による免疫蛍光染色による解析では、PEC 細胞の核周囲細胞質への発現を認めた。また、podocyte マーカー発現低下を認める血管係蹄への陥入像を示す PEC 先端部位において、細胞膜下に CD44 と OPN の共発現を示した。

【考察】本研究では、FSGS の代表的な実験動物モデルである AAN マウスを用いて、CD44 分子が PEC へ発現することを見出した。CD44 発現は、本モデルにおける分節性糸球体硬化病変の出現時期よりも有意に先行しており、糸球体硬化病変形成の引き金的要因である podocyte 障害を反映していることが推察された。共焦点顕微鏡による解析からは、AAN マウスモデルにおいて出現する CD44 陽性糸球体細胞は、ボウマン嚢尿腔側に位置する PEC の一部であることが示された。以上から、CD44 の新規発現を示す糸球体構成細胞は、PEC が主であり、その出現時期を考え合わせると、近年文献上報告が見られる活性化 PEC であることが示唆された。また、CD44 陽性 PEC の局在変化についての解析からは、ADR が惹起した podocyte の障害性変化と CD44 陽性 PEC の出現には深い関連性があることが示唆された。さらに OPN の CD44 陽性 PEC における発現は、同細胞の podocyte 障害部位への遊走、増殖への関与の可能性を示唆していた。また、週齢の異なる AAN マウスを用いて、CD44 陽性 PEC と podocyte 障害度の違いとの関係性を検討したところ、糸球体 CD44 陽性 PEC の出現率は、podocyte マーカー発現低下と反比例して上昇を示した。これらの結果は、糸球体 CD44 陽性 PEC の出現が podocyte 障害の進行度の違いを鋭敏に反映することを示唆していた。

【結論】FSGS の進展過程において、係蹄上皮側に位置する podocyte の障害によって引き起こされる PEC の形質変化 (CD44 の新規発現) を明らかにすることが出来た。本知見は FSGS の硬化病変形成における PEC の早期からの関与の可能性を支持するものと考えられ、潜在性のポドサイト障害の早期診断や重症度判定に応用できる可能性があるものと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也  
副 査 教 授 岩 永 敏 彦  
副 査 教 授 有 賀 正  
副 査 教 授 三 輪 聡 一

## 学位論文題名

### Prevalence of CD44-positive glomerular parietal epithelial cells reflects podocyte injuries in adriamycin associated nephropathy

(CD44陽性糸球体壁側上皮細胞の出現は、アドリアマイシン腎症－巣状分節性糸球体硬化症マウスモデルにおけるポドサイト障害を反映する)

巣状分節性糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis、FSGS)は、臓側糸球体上皮細胞 (visceral glomerular epithelial cell、別名、podocyte と呼称される)の傷害による糸球体濾過機能減少および進行性糸球体硬化をきたす代表的疾患である。FSGS 病変形成においては、podocyte 傷害と、それに引き続く壁側上皮細胞 (parietal epithelial cell、PEC)の動態変化が鍵となる因子として知られている。我々は、FSGS の代表的動物モデルであるアドリアマイシン (ADR) 関連腎症 (AAN) マウスを用いて、細胞骨格維持、遊走、接着などの事象に積極的に関わる細胞接着分子である CD44 の糸球体発現について検討し、さらに podocyte 障害と CD44 陽性 PEC 出現との関連を免疫組織学的解析にて明らかにする事を試みた。

まず異なる重症度の FSGS モデルを作成するため、対象マウス週齢の差異 (6 週齢、12 週齢)を用いる事とした。12 週齢 AAN モデルが、より重症な FSGS 病理像による腎機能低下、高度蛋白尿を呈するのに対し、6 週齢 AAN は、より軽症な病理、腎機能・尿所見を示した。podocyte マーカー (synaptopodin、WT-1、podocin) の発現性や電子顕微鏡による検討から、以上の FSGS 重症度の違いは、podocyte 傷害の重症度の違いによるものと考えられた。12 週齢 AAN 腎組織では、ADR 静注 7 日目に、CD44 の糸球体発現が新規に観察され、またその発現のタイミングは、podocyte 傷害による FSGS 病変が現れる時期に有意に先行していた。糸球体における CD44 の発現はボウマン嚢、糸球体係蹄上皮側、半月体・偽半月体構成細胞に観察された。二重免疫染色では、PEC マーカー (claudin-1) との共発現を認める一方、podocyte マーカー (synaptopodin、podocin) との共発現は認めず、これらの CD44 陽性細胞は PEC 起源であると考えられた。以上から、CD44 陽性 PEC の出現は、糸球体硬化病変形成の引き金的要因である podocyte 傷害を反映している事が推察された。また、多重免疫染色では、CD44 陽性 PEC は、podocyte マーカー発現低下を伴う血管係蹄部位に一致して出現し、一部では CD44 陽性 PEC が podocyte マーカー発現低下部位へ陥入、架橋形成を示す像も観察された。さらに血管係蹄への陥入所見を示す CD44 陽性 PEC の一部では、CD44 の代表的リガンドである OPN との細胞膜下での共発現を認め、本細胞の遊走、増殖などの事象における関与が示唆された。FSGS 重症度の異なる 12 週齢および 6 週齢 AAN モデルを用いた解析では、6 週齢 AAN が、ADR 投与早期に 12 週齢に比較して podocyte

マーカーの発現性の高度な喪失を認める一方で、ADR 投与 4 週後ではマーカー発現が回復、保持されている傾向を認めた。一方、CD44 陽性 PEC 出現は、各々のモデルにおける podocyte マーカー発現性と相反する動態を呈し、podocyte 傷害の進行度の違いを鋭敏に反映している事が示された。

最終審査において、副査の岩永敏彦教授から、WT-1 蛋白の発現箇所、アドリアマイシンの作用機序、若齢マウスで腎症が軽度である原因、さらに CD44 陽性 PEC が podocyte 傷害を補完する可能性に関する質問があった。次いで副査の三輪聡一教授から、細胞レベルでのアドリアマイシン作用機序について明らかにする必要性、週齢によって腎症の重症度が生じる原因、podocyte マーカー発現低下の意義に関して質問があった。さらに、副査の有賀正教授から、CD44 陽性 PEC における OPN 発現の意義について質問があった。最後に主査の野々村克也教授から、今後の研究として特に 6 週齢 AAN における CD44 発現のより長期的な発現推移の解析や、マウス週齢や性による差にはエストロゲンが関与している可能性などの提起がなされた。いずれの質問に対しても申請者は妥当な回答をした。

本研究は、糸球体硬化病変の形成過程において、新規に PEC を起源とする CD44 陽性細胞が出現する事、糸球体 CD44 陽性 PEC の発現は podocyte 傷害を鋭敏に反映する事を示した点で高く評価され、今後、潜在的な podocyte 傷害の早期診断や重症度判定に応用できる可能性があると考えられた。また、PEC の形質を何らかの手法で制御することにより、CKD 発症、進展の抑制のための治療応用につながる可能性がある。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。