



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CD74 expression is increased with amplified activation of parietal epithelial cells by lipopolysaccharide treatment in the mouse model of focal segmental glomerulosclerosis [an abstract of entire text]
Author(s)	山崎, 健史
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2173 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11691号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58774
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Yamazaki_summary.pdf



学 位 論 文 （要 約）

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）

2015 年 3 月

北海道大学

山 崎 健 史

腎糸球体の構成において、ボウマン嚢壁側上皮細胞（壁細胞、parietal epithelial cell、PEC）は、尿腔をはさ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。正常糸球体における壁細胞は、扁平な細胞質と小さな核を有し目立たない細胞形態を呈するが、他の糸球体構成細胞である足細胞やメサングウム細胞に比較すると、壁細胞の腎糸球体病変における役割に関する研究は近年まで進んでいるとはいえなかった。ところが、最近のいくつかの研究によって、壁細胞は数多くの腎疾患において、その形質と機能を大きく変化させながら積極的に病変形成に関与する事が明らかになってきている。こうした現象は、“壁細胞の活性化”と称され、ヒト糸球体腎疾患、腎疾患動物モデルにおける活性化壁細胞（activated PECs、aPECs）の動態や病態形成における役割が着目され精力的に研究されている。

形態的に、活性化した壁細胞は、核の腫大化と円形化を示すようになり、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、壁細胞の活性化は、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、糸球体硬化をはじめとする不可逆性の糸球体病変の形成に寄与する事が示唆されている。

壁細胞の活性化がもたらす代表的な糸球体疾患のタイプとして、急速進行性糸球体腎炎と、巣状分節性糸球体硬化症（focal segmental glomerulosclerosis、FSGS）が挙げられる。急速進行性糸球体腎炎は、糸球体係蹄尿腔側の細胞増殖性病変によりもたらされる半月体形成を特徴として、近位尿細管への濾過尿流出の阻害により急速かつ不可逆性の腎機能低下をきたす疾患である。最近の研究により活性化壁細胞は、本疾患の半月体形成において中心的な役割を果たしていることが明らかとなってきた。また、FSGSは、何らかの遺伝的、後天的素因による足細胞の傷害や喪失が生じることにより糸球体濾過機能が障害され多量の蛋白尿が生じる腎疾患である。FSGSにおいても、活性化壁細胞は、足細胞喪失により露出した糸球体基底膜側へと遊走し細胞外基質を産生することなどにより硬化病変の形成に寄与することが明らかとされてきている。さらに最近になって、様々な糸球体腎疾患の進展過程における足細胞傷害や近位尿細管細胞傷害の再生機転に積極的に関与し得る内在性前駆細胞（progenitor cell）としての壁細胞活性化の役割の可能性を指摘する報告も散見されるようになってきている。

Smeets らは、腎疾患動物モデルにおける壁細胞活性化を観察し、活性化の特異的マーカーとして CD44 の新規発現を認めることを報告した。CD44 は、ヒアルロン酸やオステオポンチンの代表的な受容体であると共に、多様なサイトカイン・ケモカインのシグナル伝達に関わる糖蛋白であり、細胞-細胞間の接着、癒着、遊走などに積極的に関与し得る分子である。その後もいくつかの腎疾患

モデル動物における活性化壁細胞の CD44 発現が確認され、その役割の重要性が示唆されている。最近我々のグループも、FSGS の代表的動物モデルであるアドリアマイシン腎症マウスモデル(adriamycin-induced nephropathy mouse、ADR マウス)を用いて、FSGS 病変形成過程における CD44 陽性活性化壁細胞の出現頻度と糸球体硬化の進展度の間に有意な相関がみられる事を報告した。最近では、ヒト腎疾患診断への応用の可能性が検討され、壁細胞による CD44 発現が、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が報告されている。

CD44 以外に、壁細胞活性化にともないその発現を認める他の分子に関する報告もみられる。ヒト糸球体腎炎、動物腎炎モデルを対象とするいくつかの研究では、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可能性が示唆されている。一方、活性化壁細胞の役割や、活性化に至る機序などについては、その解析が進みつつあるものの、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。

本研究では、FSGS モデルである 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既知の活性化マーカー群 (CD44、p-ERK、CXCR4、AT-1)、および、CD44 との相互作用がよく知られる CD74 の発現と活性化との関連を免疫組織学的に探る事にした。新たに解析の対象とした CD74 は、これまでに、腎疾患モデル動物における腎尿細管上皮細胞や足細胞への発現が報告されている分子である。今回は、解析の初期段階において、アドリアマイシン (adriamycin、ADR)投与後 3 週の傷害糸球体においては、尿細管上皮細胞のみならず、活性化壁細胞と思われる細胞にも CD74 の発現が認められる事を初めて見出したため、CD74 発現が壁細胞の活性化に関与する新たな因子である可能性を検証していく事とした。

今回我々は、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、以下の 4 種を準備した。(1) ADR マウス、(2) リポポリサッカライド (lipopolysaccharide、LPS)の腹腔内投与により可逆性の足細胞傷害による蛋白尿が惹起される、微小変化型ネフローゼ症候群のマウスモデル (LPS マウス)、(3) ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA)を腹腔内投与することにより蛋白尿が惹起される、アルブミン過剰負荷蛋白尿モデルマウス (BSA マウス)、(4) さらに今回、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。

まず我々は、ADR マウスの FSGS 病変形成過程における病理所見を、壁細胞

の変化に焦点をあてて詳細に検討した。ADR 投与 3 週の時点では、対照群に比し有意な蛋白尿、腎機能低下を示した。糸球体病変に着目すると、散在する一部虚脱した係蹄壁、分節性硬化病変の発生にともなう、ボウマン嚢壁と係蹄間の癒着病変、偽半月体形成など壁細胞を起源とする病理変化が顕著になり始めた。免疫染色にて、活性化壁細胞マーカーである CD44 の発現を検討したところ、数多くの壁細胞病変部において CD44 の新規発現をびまん性に認めた。また、他のモデルでその発現が確認されている幾つか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発現強度の点では CD44 には劣るものの、ADR マウス糸球体の壁細胞において発現している事が確認された。一方、CD44 との相互作用が知られる CD74 発現を検討したところ、尿細管上皮細胞における発現に加えて、係蹄ボウマン嚢癒着形成細胞、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(ADR-LPS マウス)作成を試みた。ADR-LPS マウスでは、同週齢の ADR マウスに比し、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すようになり投与後 1 週間まで継続した。壁細胞の変化に着目すると、LPS 投与後 12 時間から著しく一様な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、ボウマン嚢係蹄癒着病変が、同週齢 ADR マウスに比して有意に増加していた。免疫染色にて、LPS 投与 12 時間後から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も認められ、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、代表的活性化マーカー CD44 は、既に LPS 投与前 ADR マウスにおいて、多くの壁細胞に膜性の陽性像を示していた。一方、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、その後 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 (PAX2、PAX8、*Lotus tetragonolobus* レクチン) との共発現を確認した。他方、壁細胞活性化マーカーで細胞増殖などに積極的に関与する因子でもある pERK の高発現も CD74 の発現性と同様の变化に変化しているのが観察され、壁細胞による CD74 発現は、ADR マウスにおける 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。

以上、我々は、FSGS 病変における壁細胞の活性化を新たな視点から検討し、活性化に関わる新規因子 CD74 を見出し得た。また FSGS モデルの LPS 少量投

与による壁細胞活性化の増幅は、活性化のメカニズム解明に有用であることが示された。壁細胞の活性化は、慢性腎疾患全般に関わる糸球体硬化の機転の解明において、最も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の機転の解明に寄与することが示唆される。