



Title	CD74 expression is increased with amplified activation of parietal epithelial cells by lipopolysaccharide treatment in the mouse model of focal segmental glomerulosclerosis
Author(s)	山崎, 健史
Description	配架番号 : 2173
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11691号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11691
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64240
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Yamazaki.pdf



学 位 論 文

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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	6 頁
実験方法	7 頁
実験結果	17 頁
考察	34 頁
総括及び総論	39 頁
謝辞	40 頁
引用文献	41 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文で発表した。

1. 山崎健史、佐々木聡、林麻子、佐藤泰征、岡本孝之、有賀正
CD74 expression is increased with amplified activation of parietal epithelial cells by lipopolysaccharide treatment in adriamycin-induced nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology (投稿中) (2014)

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 山崎健史、佐々木聡、林麻子、佐藤泰征、岡本孝之、有賀正
アドリマイシン腎症におけるポドサイト喪失に伴う活性化壁側上皮細胞の動態
第 56 回日本腎臓学会学術集会、2013 年 5 月 12 日、東京
2. 山崎健史、佐々木聡、林麻子、佐藤泰征、岡本孝之、有賀正
Serial assement of activated parietal epithelial cells in the mouse model of LPS-induced proteinuria and adriamycin nephrosis.
国際腎臓学会議 (WCN2013)、2013 年 6 月 1 日、香港 (中国)

緒 言

慢性腎臓病 (chronic kidney disease、CKD)の疾患概念が 2002 年に提唱¹されて以来、CKD は末期腎不全への進行の危険因子であるだけでなく、脳卒中や心筋梗塞をはじめとする心血管イベントの主な危険因子²でもあることが認識されてきた。CKD を構成するほとんどの疾患において、末期腎不全に移行するカスケードにおける共通の病理学的事象として、糸球体硬化病変が挙げられる³。これまで糸球体硬化病変形成の病態解明に関する研究が多く、側面から試みられてきているものの、その発症進展をモニタリングするための新規マーカーや新規治療の開発が未だ強く望まれている⁴。

巣状分節性糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis、FSGS)は、CKD のなかでも特に末期腎不全に進行する可能性の高い原発性糸球体疾患である^{4,5}。FSGS は、ステロイド薬や免疫抑制薬治療に抵抗性のネフローゼ症候群を発症し徐々に末期腎不全に至るなど、きわめて難治性の経過をとる⁴。近年、様々な原因による糸球体臓側上皮細胞 (足細胞)の傷害が FSGS の一次的要因であることが明らかとなり、糸球体硬化機転における足細胞の役割にスポットを当てた研究が劇的に進むこととなった。最近の遺伝子改変 FSGS モデルを用いた研究によっても、足細胞の喪失自身が、他の足細胞の傷害と糸球体壁からの剥離を二次的に惹起し得る事が示され、糸球体硬化進展における足細胞傷害 (podocytopathy)の一次的要因としての重要性が一層明らかになってきている⁵⁻⁷。さらに加えて、podocytopathy は FSGS に限らず、数多くの腎糸球体疾患の病態に関わる事が知られてきており、足細胞の傷害は CKD において蛋白尿の発症を端緒とする糸球体硬化の発症と末期腎不全への移行のカスケードに直接的、間接的に関与するといえる^{3,8-10}。

一方、ボウマン嚢壁側上皮細胞 (壁細胞、parietal epithelial cell、PEC)は、糸球体を構成する細胞成分のうち、糸球体糸球体壁を支える足細胞とは尿腔を挟んで対向してボウマン嚢を裏打ちしながら存在する扁平な細胞群である。正常糸球体における壁細胞は、 $0.1-0.3\mu\text{m}$ 厚の著しく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¹²。研究的側面においては、糸球体硬化症を中心とした領域における足細胞に関する研究や、IgA 腎症をはじめ増殖性腎炎におけるメサングウム細胞に関する研究の飛躍的な進歩と比較すると、糸球体疾患における壁細胞の役割に関する解明は、近年まであまり進んでいないといえなかった^{11,12}。ところが最近のいくつかの研究によって、数多くの腎疾患において、壁細胞はその形態と機能をダイナミックに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¹¹⁻¹⁹。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、腎疾患動物モデルを対象に、その特徴的病理学

的变化（半月体形成、癒着、硬化）形成過程における活性化壁細胞（activated PECs, aPECs）の動態の解明が試みられている^{11,13,14}。

様々な糸球体傷害を契機とする壁細胞活性化が生ずると、壁細胞に特徴的な形態的、機能的変化をきたし得る。形態的には、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ようになる¹¹。また機能的には、細胞増殖能や遊走能が新たに獲得され、制御不能な激しい増殖性病変やボウマン嚢癒着の様な糸球体構造内における病変形成に関与する。さらに硬化病変を促進する細胞外基質の増生が誘導されることにより、不可逆性の糸球体硬化病変形成に積極的に関与するようになる^{13,14}。

壁細胞活性化が積極的に関与する代表的な糸球体疾患としては、急速進行性糸球体腎炎（rapidly progressive glomerulonephritis, RPGN）¹⁵と、FSGS¹³が挙げられる。RPGNは、糸球体係蹄の尿腔側における細胞増殖性病変である半月体形成を特徴とする疾患群で、近位尿細管への濾過尿流出の阻害、急速かつ不可逆性の腎機能低下をきたす腎炎である。これまで半月体病変形成細胞の起源の候補としては、制御不能となった増殖足細胞、単球マクロファージを中心とする炎症細胞、および増殖した壁細胞などが挙げられてきた。最近の研究では、RPGN発症機転のなかで炎症性メディエーターによる糸球体係蹄壁破綻が生じることにより活性化された壁細胞が、破綻した係蹄壁に遊走、癒着形成、増殖、細胞外基質産生増多などの半月体形成病変、硬化進展過程における中心的な役割を果たすことが明らかとなってきた^{15,16}。一方FSGSは、遺伝的、後天的要因による足細胞の傷害と喪失が生じることにより、ネフローゼレベルの多量の蛋白尿や一部の糸球体に分節性の糸球体硬化を生じる⁴。病変の進行につれ分節性硬化病変は、全節性硬化へと進展し、全糸球体のうち硬化病変が一定の割合に達すると糸球体濾過機能が障害され末期腎不全に至るようになる⁴。活性化壁細胞は、足細胞喪失により露出した糸球体係蹄側へと遊走し細胞外基質を産生することなどによりFSGSの硬化病変の形成に積極的に寄与することが明らかとされてきている^{13,17-19}。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）としての壁細胞の活性化の役割を示唆する報告が散見されるようになってきている²⁰⁻²²。

Smeetsらは、半月体形成性腎炎と虚脱性腎糸球体症のモデル動物における壁細胞の動態を免疫組織学的に観察し、壁細胞の活性化を示す特異的なマーカー蛋白としてCD44の新規発現が認められる事を初めて報告した¹⁴。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²³。その後も他の腎疾患

モデル動物やヒト糸球体腎疾患において、活性化壁細胞のマーカー蛋白として CD44 が有用であることが確認され、壁細胞活性化機転における同分子の役割の重要性も示唆されている¹¹。最近我々のグループも、代表的な FSGS の動物モデルであるアドリマイシン腎症マウス (adriamycin-induced nephropathy mouse、ADR マウス)を用いて、糸球体硬化病変形成過程においては、CD44 陽性活性化壁細胞の出現頻度と糸球体硬化の重症度に相関がみられる事を報告した²⁷。さらに最近になって、ヒト腎疾患診断における病理マーカーとしての有用性も検討され、壁細胞による CD44 発現が、FSGS の移植後再発の早期マーカーである事²⁴や、FSGS と微小変化型ネフローゼ症候群を鑑別するための病理学的マーカーとして有用である事⁴⁸が報告されている。

最近になり、壁細胞の活性化にともなって新規に発現するマーカーとして、CD44 以外の分子もいくつか見出されてきている^{25,26}。Chang らは、複数の腎炎動物モデルにより、p-ERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1 and 2)²⁵が、活性化マーカーとして有用な事を見出した。また Rizzo らは、管外増殖性腎炎や IgA 腎症を含む腎生検検体を用いた研究により、CXCR4 (CXC chemokine receptor 4)²⁶や AT-1 受容体 (type 1 angiotensin II receptor)²⁶の発現が、壁細胞の活性化マーカーとして有用な事を見出し、足細胞傷害を伴う糸球体における細胞増殖、遊走の機転には、stromal cell-derived factor 1/CXCR4 システムやアンジオテンシン II/AT-1 受容体の経路が関与することを示唆した。しかしながら、壁細胞活性化の機転には複数の要因の調節経路が絡んでいる可能性が強い事から、さらに新規の壁細胞活性化のマーカー因子が見出され、活性化とその制御の機構が解明されることが望まれている⁴⁷。

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こととした。

CD74 は II 型膜貫通蛋白で、MHC クラス II 不変鎖分子であり、これまでその主たる機能は MHC class II の分子シャペロンとしての作用であるとされてきた。その後 CD74 が MIF (マクロファージ遊走阻止因子、macrophage migration inhibitory factor)の細胞膜受容体であることが判明し、シグナル伝達分子としても働く事が明らかとなった⁴⁰。CD74 に MIF が結合すると、急速な CD74 の内在化に引き続き、ERK 活性化、細胞増殖、アポトーシス抑制、プロスタグランジン E2 産生といった事象が誘導される⁴²。しかし、MIF による ERK のリン酸化において、CD74 にはそのシグナル伝達を誘導する細胞質ドメインは存在せず、CD74 は CD44 と受容体複合体を形成する事によって、MIF からのシグナル伝達を可能とする⁴¹。また、CD74 は B 細胞成熟や樹状細胞の運動性を調節して

おり、B 細胞系腫瘍の進展や転移などにも関与する事が知られている⁴²。B 細胞系腫瘍を含めた悪性腫瘍以外に、ヘリコバクター・ピロリ感染における胃上皮細胞や、アルツハイマー病における神経細胞にも CD74 発現が増強している事が明らかとされているが、腎構成細胞における CD74 発現に関してはいまだ不明な点が多い⁴²。現在まで、正常ヒト腎組織において CD74 発現は尿細管上皮細胞に軽度認められる事、培養ヒト足細胞において CD74 発現は軽度認められる一方で、高濃度の糖刺激や炎症性サイトカイン刺激によって、その発現が増強する事などが示されている^{42,45}。

今回、我々は足細胞傷害と壁細胞活性化に関する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、CD74 の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こととした。

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、壁細胞活性化を観察するモデル (ADR-LPS マウス)を新たに作製して解析を進めていくこととした。

壁細胞の活性化の機序を明らかにする事は、CKD 全般に関わる糸球体硬化機転の解明において、重要な命題の一つである。本研究は、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を解明することを目的とした。その中で、今回我々が新規に見出した CD74 の壁細胞における発現が、壁細胞活性化にどのように関与するのか、さらに、壁細胞活性化が関与しているとされる病理学的事象との関連性を解明することとした。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は、以下の通りである。

ABC	avidin-biotinylated enzyme complex
ADR	adriamycin
ANOVA	analysis of variance
AT-1	type 1 angiotensin II receptor
BBM	Bowman's basement membrane
BSA	bovine serum albumin
BUN	blood urea nitrogen
CKD	chronic kidney disease
CXCR4	CXC chemokine receptor 4
Cy3	cyanine 3
EMT	epithelial mesenchymal transition
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSGS	focal segmental glomerulosclerosis
GBM	glomerular basement membrane
GSI	glomerular sclerosis index
HE	hematoxylin-eosin
LPS	lipopolysaccharide
MHC	major histocompatibility complex
MIF	macrophage migration inhibitory factor
PAS	periodic acid-schiff
PEC	parietal epithelial cell
p-ERK	phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
RAAS	renin-angiotensin-aldosterone system
RPGN	rapidly progressive glomerulonephritis
sCr	serum creatinine
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
TLR	toll-like receptor
Up/Ucr	urinary protein/urinary creatine ratio
WT-1	Wilms' tumor -1

実験方法

1. 腎疾患マウスモデル作製のための条件設定

今回の実験においては、FSGSをはじめとする蛋白尿漏出性腎疾患群における壁細胞の活性化を解析するために、4種の腎疾患動物モデル（ADR マウス、LPS マウス、BSA マウス、ADR-LPS マウス）を用いた。それらのうち、ADR マウス、LPS マウス、BSA マウスの作製に際しては、マウスの系統や薬剤などに関する諸因子の設定が必要となる。以下の様に諸条件を設定した。

今回の実験系において解析の中心となる FSGS のモデルである ADR マウスの作製については、マウスの系統、性別、週齢、ADR の投与量が腎症の重症度に影響し得ることが知られている^{29,31}。本実験では、他の報告でも使用頻度が高く、かつ ADR に対する感受性の高い BALB/c ByJJcl 雄性マウス（日本クレア社、東京、日本）を用いた^{29,31}。ADR の投与量に関しては、過去の報告^{27,30}を参考にしながら、予めいくつかの実験を行いながら決定した。準備実験では、8 週齢のマウスに、9 mg/kg から 15 mg/kg の ADR（ファイザー社、東京、日本）を各々 1 回、尾静脈から静注して検討したが、静注 3 週後に、最も安定して巣状分節性硬化の病理像が観察される投与量である 13 mg/kg を採用することとした。

また、一過性蛋白尿を呈し微小変化群ネフローゼ症候群のモデルである LPS マウス^{32,33}の作製にあたっては、過去の報告を参考に、ADR マウスの場合と同様に BALB/c 系雄性マウスを用いることとした。LPS の投与量についてもこれまでの報告^{32,33}を鑑み調整した結果、11 週齢の雄性マウスに 7.5 µg/g・体重の LPS (E coli O55:B5 由来) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)を腹腔内投与することとした。さらに、アルブミン過剰負荷蛋白尿モデルである BSA マウス²⁵の作製に際しても、BALB/c 系雄性マウスを用いた。BSA 投与量についても過去の報告²⁵を参考として決定し、7 週齢 (0d)の時点から、BSA (A9430、Sigma-Aldrich)の腹腔内投与を開始、その後漸増とした (0d から 2 mg/g・体重の投与で開始し、4d まで、1 日ごとに 2 mg/g・体重ずつ増量、5-6d は非投与、7d に 10 mg/kg・体重を投与)。

ADR マウスに LPS 腹腔内投与を組み合わせた新規モデルである ADR-LPS マウスについては、まず前述のプロトコールに従い ADR マウスを作製、ADR 静注後 3 w (11 週齢)の時点で、LPS を 7.5 µg/g・体重を腹腔内投与し作製した。

何れの実験系においても用いられた BALB/c 系雄性マウスは、光、温度環境を調整した飼育室のケージにて飼育され、必要期間、適切なプレコンディショニングを施行してから実験を開始した。本実験で行われた全ての動物実験に関しては、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する委員会規定」に基づいて施

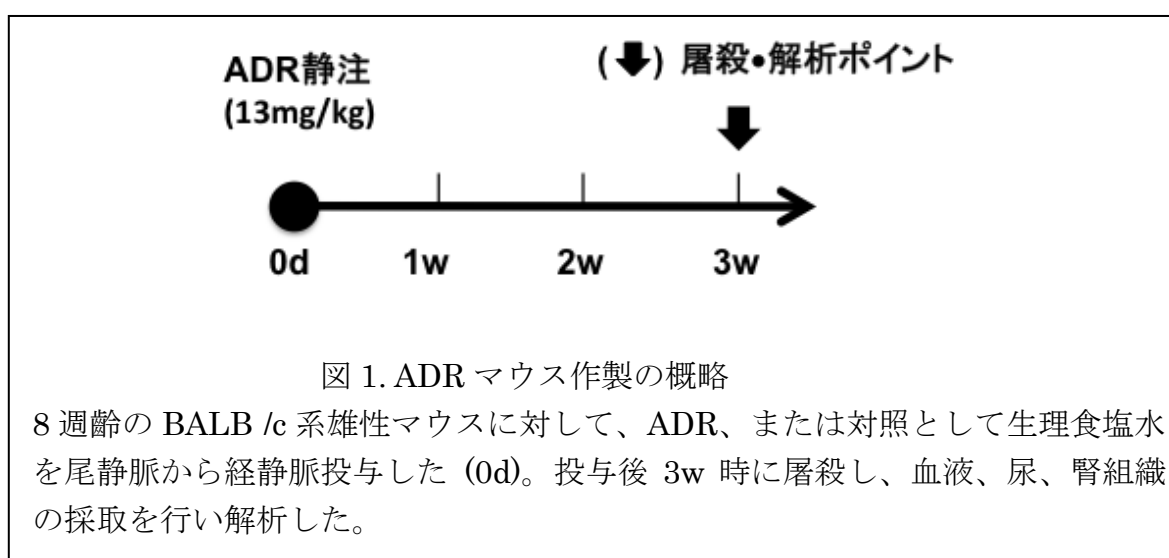
行された。

2. 腎疾患マウスモデル作製プロトコルの詳細

4種の腎疾患マウスモデル (ADR マウス、LPS マウス、BSA マウス、ADR-LPS マウス)の作製プロトコルの詳細は以下の通りである。

[1] ADR マウス (巣状分節性糸球体硬化症 FSGS モデル)

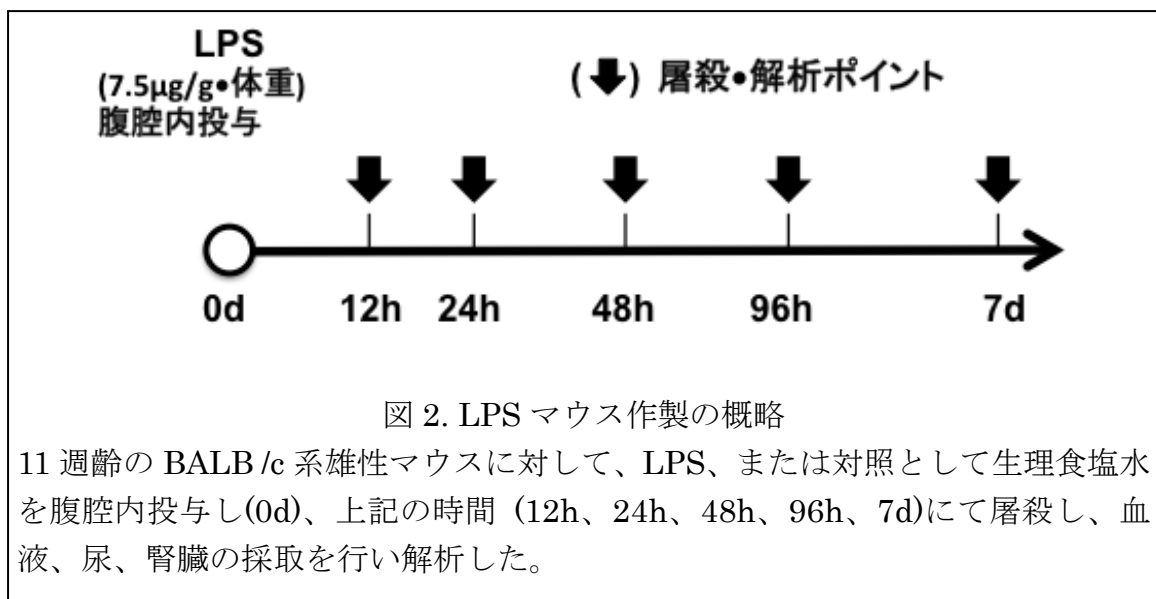
8週齢の BALB /c 系雄性マウスに対し、ADR 13 mg/kg (生理食塩水により 1 mg/ml に希釈)を尾静脈から経静脈投与した (ADR 群、n=5)。他方、対照群として生理食塩水 6 ml/kg を同様に経静脈投与した (Control 群、n=5)。静注後、体重測定や外観検査を行い記録した。ADR 投与後、3w 時に屠殺し採血、採尿、腎組織の採取を行い解析した。



[2] LPS マウス (一過性蛋白尿、微小変化群ネフローゼ症候群モデル)

11週齢の BALB /c 系雄性マウスに対し、LPS 7.5 μ g/g・体重 (生理食塩水にて 1 mg/ml に希釈)を腹腔内投与した (LPS 群)。他方、対照群として生理食塩水を腹腔内投与した (Control 群)。両群について、投与後、体重、外観を含むマウスの消耗度について観察し記録した。

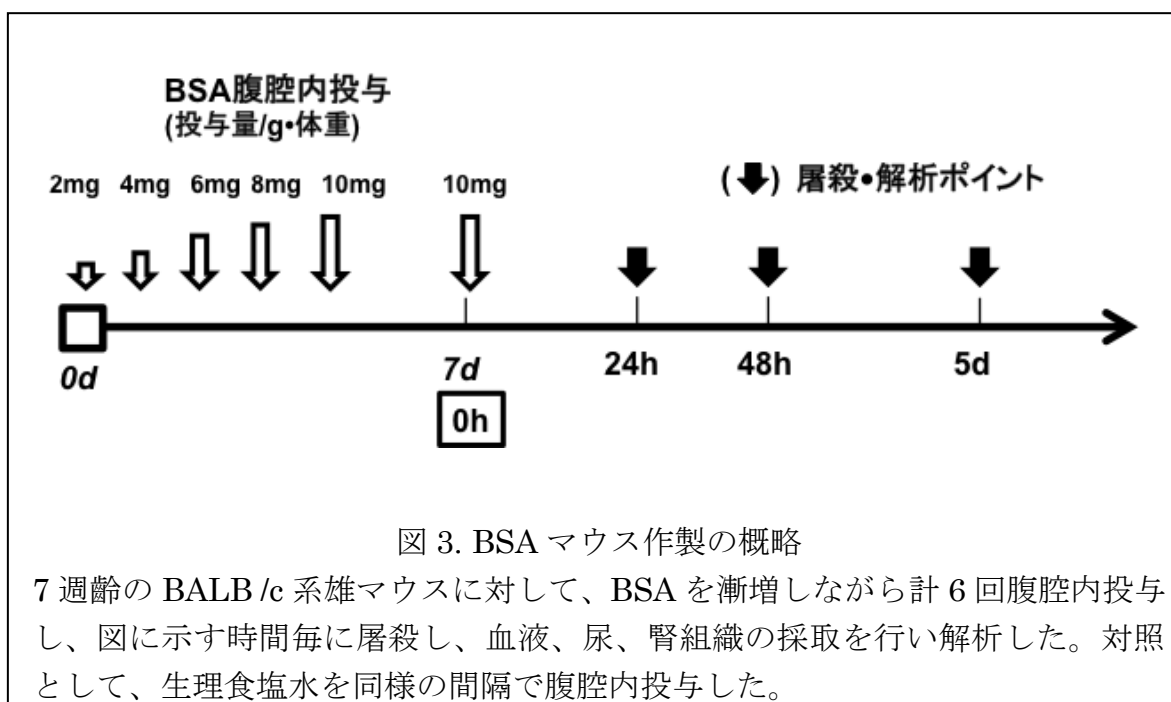
LPS を腹腔内投与した後、12h、24h、48h、96h、7d に屠殺し (各群、n=4)、採血、採尿、腎組織の採取を行い解析した。



[3] BSA マウス (アルブミン過剰負荷蛋白尿モデル)

7 週齢の BALB/c 系雄性マウスに対し、BSA を 2 mg/g・体重の投与量で開始(0d)、1 日毎に 2 mg/g・体重ずつ BSA 投与量を漸増した。5d と 6d は非投与日として、7d に 10 mg/kg・体重を最終投与した (BSA 群)。対照として、BSA に替え生理食塩水を同様に投与した (Control 群)。

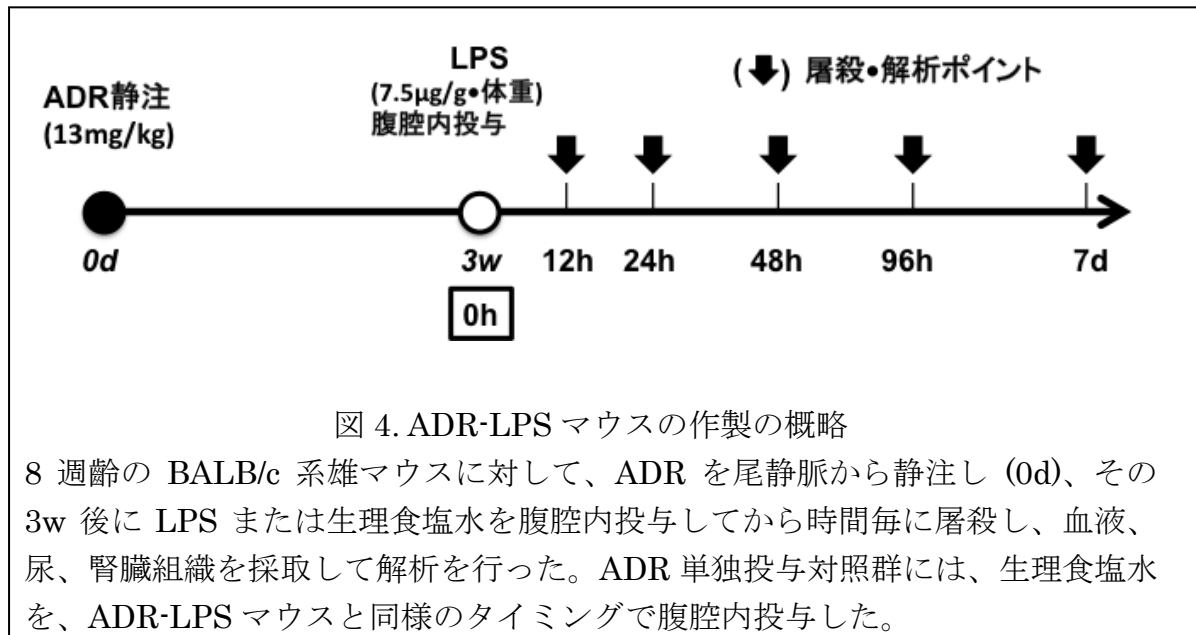
BSA を腹腔内投与した後、24h、48h、5d に屠殺し (各群、n=4)し、採血、採尿、腎組織の採取を行い解析した。



[4] ADR-LPS マウス (ADR マウスに LPS 腹腔内投与を組み合わせたモデル)

新規モデルとして ADRN に LPS を組み合わせた動物モデル (ADR-LPS マウス) を作製した。まず、ADR マウス作製プロトコールにしたがって、8 週齢雄性 BALB/c 系マウスに対し、ADR 13 mg/kg (生理食塩水にて 1 mg/ml に希釈) を尾静脈から経静脈投与した。ADR 投与後 3w の時点で、ADR-LPS 群には 7.5 μ g/g (生理食塩水にて 1 mg/ml に希釈) を腹腔内に投与した。一方、ADR 単独投与対照群として、ADR マウスに、生理食塩水 7.5 ml/kg を ADR-LPS 同様のタイミングで投与する群を設けた。

LPS 投与後、12h、24h、48h、96h、7d にマウスを屠殺し (各群、n=5)、採血、採尿、腎組織の採取を行い解析した。



3. 腎機能、尿蛋白の測定

屠殺時に採取した血液、尿により、腎機能および蛋白尿レベルを評価した。測定項目は、血中尿素窒素 (Blood Urea Nitrogen、BUN)、血清クレアチニン (Serum Creatinine、sCr)、尿蛋白 (Urinary Protein、Up)、尿中クレアチニン (Urinary Creatinine、Ucr) 濃度とした (BUN と血清・尿中クレアチニンは酵素法、尿蛋白はピロガロールレッド法にて測定)。測定は、株式会社エスアールエル (東京) に依頼した。

4. 腎病理組織学的解析

光学顕微鏡的検討には、採取した腎組織を、10%ホルマリンにより固定、パラフィン包埋したブロックを、ミクロトームを用いて 3 μ m の薄切切片を作製した。薄切切片に対し、ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin; HE)染色、またはペリオディック・アシッド・シッフ (Periodic acid-Schiff; PAS)染色を行い、光学顕微鏡 (システム生物顕微鏡 CX41、OLYMPUS、東京)にて観察した。光学顕微鏡的所見に関する定量的、半定量的評価の目的には、顕微鏡デジタルカメラ (DXM-1200C、Nikon、東京)にて撮影した画像を用いた。

糸球体硬化、偽半月体形成 (pseudocrescent formation)、細胞性癒着 (cytoplasmic synechiae)に関しては、以下の様に、定量的、半定量的検討を施行した。糸球体硬化度 (glomerular sclerosis index, GSI)に関しては、過去の報告³⁵に基づき、硬化病変の割合が糸球体全体において占める割合に応じてスコア化した。スコア 0 : なし、スコア 1 : 0~25 %、スコア 2 : 25~50 %、スコア 3 : 50~75%、スコア 4 : 75~100%。計 50 ケの糸球体を観察、スコア値と各々の該当糸球体数の積和を算出した後、1 ケの糸球体あたりの平均 GSI を求めた。

また、本研究においては、通常の紡錘状細胞群の集積、基質増生や係蹄の破綻に伴うフィブリン析出を伴う炎症性の半月体形成病変とは違って、係蹄、ボウマン腔に広がる大型の菅外性細胞群による増殖性病変¹⁴を偽半月体 (pseudocrescent)と定義した。全糸球体数において偽半月体を伴う糸球体の割合を算出した。

細胞性癒着に関しては、過去の報告³⁶を参考とし、GSIと同様に癒着病変の割合が糸球体全体において占める割合に応じてスコア化した。スコア 0 : なし、スコア 1 : 0~25 %、スコア 2 : 25~50 %、スコア 3 : 50~75%、スコア 4 : 75~100%。50 ケ以上の糸球体を観察して、平均を算出した。

電子顕微鏡的検討には、腎組織を 3%グルタルアルデハイドにより固定後、1%オスミウムによる後固定を行い、さらに、エタノールによる脱水処理、エポック樹脂 (Epok 812、応研、東京)への包埋を行った。超薄切ミクロトーム (Leica Reichert, Bensheim, Germany)により 70~80 nm の超薄切切片を作製し、ウラン、鉛染色後に透過型電子顕微鏡 (JEM-1400Plus、日本電子、東京)による観察を行った。

5. 免疫組織学的検討において用いた一次抗体

本研究の免疫組織学的検討においては、各腎疾患モデルにおける糸球体足細胞、壁細胞のマーカー蛋白の発現性変化や壁細胞活性化に関わるマーカー蛋白

群の発現性、細胞シグナル伝達、増殖性の変化を検討するため複数の一次抗体を用いている。以下に、それらをまとめて記す。

各種一次抗体としては以下のものを用いた。ウサギ抗マウス Wilms' tumor-1 (WT-1)抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、ウサギ抗マウス Synaptopodin 抗体 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)、ウサギ抗マウス claudin-1 抗体 (Abcam, Cambridge, MA, USA)、ウサギ抗マウス PAX2 抗体 (Invitrogen 社, Carlsbad, CA, USA)、ウサギ抗マウス PAX8 抗体 (Proteintech 社, Chicago, IL, USA)、ラット抗マウス CD44 抗体 (Bio Legend, San Diego, CA, USA)、ウサギ抗マウス Phospho-Erk1/2 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、ウサギ抗マウス CXCR4 抗体 (eBioscience 社, San Diego, CA, USA)、ウサギ抗マウス AT-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ビオチン化抗 *Lotus tetragonolobus* lectin 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)、ウサギ抗マウス Ki67 抗体 (Novus Biological 社, Lyttelton, CO, USA)、ラット抗マウス CD74 抗体 (BD Bioscience 社, Franklin Lakes, NJ, USA)、ヤギ抗マウス CD74 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を使用した。また近位尿細管のマーカーとして、*Lotus tetragonolobus* レクチン (Vector Laboratories)を用いた。

表 1 に、本研究において使用した一次抗体を、使用目的別にまとめた。

表 1. 本研究で用いた一次抗体リスト

一次抗体	免疫動物 (植物)	交差 性	希釈 倍率	メーカー	コード番号
足細胞マーカー					
WT-1	Rbt pAb	m,r,h	1:25	Santa Cruz	sc-192
synaptopodin	Rbt pAb	m,r,h	1:50	Sigma-Aldrich	S9567
壁細胞マーカー					
claudin-1	Rbt pAb	m,r,h	1:100	Abcam	ab15098
PAX-2	Rbt pAb	m,r,h	1:100	invitogen	71-6000
PAX-8	Rbt pAb	m,r,h	1:100	proteintech	10336-1-AP
活性化壁細胞マーカー					
CD44/IM7	Rat mAb	m,h	1:200	Bio Legend	103013
Phospho-ERK1/2	Rbt pAb	m,r,h	1:100	cell signaling	#9101
CXCR4	Rbt pAb	m,r,h	1:50	abcam	ab2074

CXCR4/2B11	Rat mAb	m	1:50	eBioscience	14-9991
CXCR4	Rbt pAb	m,h	1:50	eBioscience	14-6009
AT-1	Rbt pAb	m,r,h	1:50	Santa Cruz	sc-1173
近位尿細管マーカー					
Lotus tetragonolobus lectin (biotinylated)	(winged pea)	-	1:50	Vector laboratories	B-1325
細胞増殖マーカー					
Ki67	Rbt pAb	m,h	1:50	Novus	NB110-89719
CD74 関連					
CD74/In-1	rat mAb	m	1:100	BD Bioscience	555317
CD74	goat pAb	m,r,h	1:50	Santa Cruz	sc-5438

* Rbt (rabbit)、m (mouse)、r (rat)、h (human)

6. 免疫組織学的検討

蛍光抗体による免疫組織学的染色は、過去の報告に従って新鮮凍結腎組織をクリオスタットにより厚さ 4 μ m の薄切切片を作製し、間接蛍光抗体法にて検討した^{27,28}。切片を、PBS にて洗浄後、二次抗体血清にてブロッキング処理を行った後、一次抗体と一晚 (4°C) 反応させた。その後、二次抗体として、Fluorescein isothiocyanate (FITC) または Cyanine-3 (Cy-3) 標識抗ウサギ、または、抗ラット抗体 (Jackson ImmunoResearch 社、West Grove, PA, USA) を反応させ、封入後観察した。二重染色は、単染色と同様にブロッキング処理を行った後、異なる動物種由来の一次抗体を使用してそれぞれの一次抗体の混合希釈液を作成し、一晚 (4°C) で反応させ、それぞれの一次抗体を蛍光標識するための二次抗体反応を行った。また、核染色には Hoechst 33342 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を使用した。標本は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000i、OLYMPUS 社、東京、日本) にて撮像し、評価した。

免疫ペルオキシダーゼ染色も過去の報告に従って施行した^{27,28}。4 μ m に薄切したパラフィン切片を用いて、脱パラフィン、脱水を施行した後、組織内内因性ペルオキシダーゼ不活化を 0.3% 過酸化水素水にて行った。抗原賦活化には、10mM クエン酸ナトリウム溶液 (PAX-2、CD44、p-ERK、Lotus tetragonolobus lectin、Ki67、CD74)、1mM EDTA (pH6.0) 溶液 (PAX-8)、1mM EDTA (pH8.0)

溶液 (WT-1)を用いた microwave 法と、抗原賦活化液 である HistoVT one (ナカライテスク社、京都、日本) (CXCR4、AT-1)を使用した温浴槽での加熱処理によって行った。

染色においては avidin-biotinylated enzyme complex (ABC)法を用いて行い、VECTASTAIN® Elite ABC キット (Vector Laboratories)を使用した。また ABC 法による二重染色を行う際には、ペルオキシダーゼ以外の酵素としてアルカリホスファターゼを選択した。ペルオキシダーゼの基質には DAB (Merck Millipore、Darmstadt、Germany)を選択し、アルカリホスファターゼの基質には VECTOR Blue (Vector Laboratories)を選択した。核染色にはメチルグリーン (Vector Laboratories)、もしくはヘマトキシリン (ニチレイバイオサイエンス、東京、日本)を使用した。

7. 免疫組織染色の定量的評価

WT-1 の発現については、糸球体における WT-1 陽性細胞数を測定し、50 個以上の糸球体を評価し、糸球体における陽性細胞数を平均化して算出した。CD44 の発現については、ボウマン嚢周囲に CD44 が発現している糸球体を陽性として測定し、50 個以上の糸球体を評価し、全糸球体数において CD44 を発現している糸球体の割合として算出した。

CD74、p-ERK の発現については、以下の図の様なスコア化の方法を行い、半定量的評価を行った。半定量解析においては各群において、各々30 個以上の糸球体をランダムにデジタル撮影して評価し、2 名以上の研究者により半定量的評価を行った。

スコア 0 ; 発現なし、スコア 1 ; 25%以下の壁細胞に発現、スコア 2 ; 25～50%の壁細胞に発現、スコア 3 ; 50%以上の壁細胞に発現し、染色程度は弱～中程度、スコア 4 ; 50%以上の壁細胞に発現し、発現程度が強度

semi-quantitative scoring system

- 0 : no staining
- 1 : positive PEC staining of <25%
- 2 : positive PEC staining of 25-50%
- 3 : positive PEC staining of >50% with weak to moderate staining
- 4 : positive PEC staining of >50% with intense staining

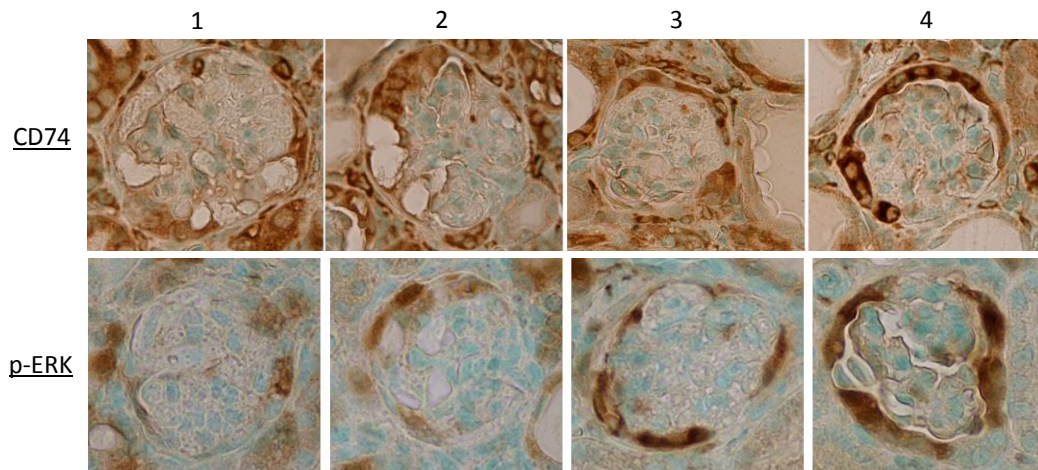


図 5. 壁細胞における CD74、p-ERK 発現の半定量的評価
半定量評価に用いた代表的写真を示す (ADR マウスおよび ADR-LPS マウス)。

8. 活性化壁細胞の増殖性に関する検討

糸球体病変形成における活性化壁細胞の増殖性を検討するため、細胞増殖マーカーである Ki67 抗体を用いた免疫組織学的染色にて検討した (図 6)。定量的解析のために、50 個以上の糸球体をランダムにデジタル撮影して、評価に用いた。糸球体内 Ki67 陽性細胞のうち、ボウマン嚢壁を形成する細胞、もしくはボウマン嚢と係蹄の癒着形成部にかけて存在する細胞を Ki67 陽性壁細胞と定義して、カウントした。最終的結果は、1 個の糸球体あたりの平均 Ki67 陽性壁細胞数として表した。

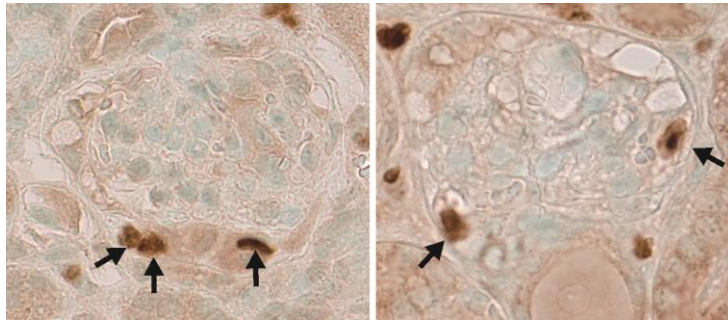


図 6.Ki67 陽性壁細胞

矢印で示すように、糸球体内 Ki67 陽性細胞のうち、ボウマン囊壁を形成する細胞、もしくはボウマン囊と係蹄の癒着形成部にかけて存在する細胞を Ki67 陽性壁細胞と定義して、カウントした。

9. 統計学的解析

データは、平均±標準誤差 (Standard error of the mean、SEM)にて標記した。2 群間の比較には Unpaired t test もしくは Mann Whitney U-test を、グループ間の比較には、Non-repeated measures ANOVA を用いた。 $P<0.05$ を統計学的に有意とみなした。

実験結果

1. ADR マウスの体重・腎機能・尿蛋白の推移と腎病理所見

8週齢の雄性 BALB/c マウスに、ADR 投与(0d)後、第3週 (ADR 3W)時の体重の変化、腎機能 (BUN、sCr)の推移、尿蛋白 (Up/Ucr)の推移を表2に示す。対照 (PBS 静注)に比し ADR 3W では、有意な体重減少 (-25%)、腎機能の悪化 (BUN、sCr 上昇)が認められた。

一方、病理学的には、ADR 3W では、顕著な糸球体における増殖性変化、硬化性病変の存在、尿細管拡張、円柱形成の出現が認められた。糸球体病変に着目し、硬化病変の度合い (glomerular sclerosis index、GSI)、偽半月体を認める糸球体の出現頻度を定量化し検討したところ、ADR 3W では、明らかな硬化糸球体、偽半月体形成細胞の増加が認められた。次に、ADR 3W における足細胞傷害、壁細胞活性化を確認するために免疫染色により、1糸球体あたりの WT-1 陽性足細胞数と CD44 陽性を示す糸球体の割合 (表2、図7a)を、それぞれ対照群と比較検討した。CD44 陽性細胞の局在性の確認には、二重蛍光染色を用いた (図7b)。結果、ADR マウスでは、硬化、偽半月体を有する糸球体数の著増、CD44 陽性を示す活性化壁細胞の出現、著増が確認された。

以上から、本実験系において確立された ADR マウスは、有意な蛋白尿、腎機能低下をとめない、病理学的にも FSGS に典型的な病理学的所見を示すことが確認された。また、最近の我々の報告²⁷と一致して、足細胞傷害の進行にともなう CD44 陽性壁細胞の増多が明らかに認められた。

表2. ADR 3W と対照群の各パラメータの比較

	Control	ADR 3W
体重 (g)	25.1±1.6	18.6±2.2*
BUN (mg/dl)	24.7±3.6	66.7±12.4*
sCr (mg/dl)	0.10±0.02	0.21±0.03*
Up/Ucr (g/g・Cr)	9.8±0.7	35.9±5.0*
mean GSI	0.08±0.01	0.95±0.2*
%pseudocrescent	0	20.0±3.1*
WT-1+足細胞 (/1 糸球体)	10.8±0.7	4.8±0.2*
%CD44+糸球体	4.8±1.0	87.4±4.8*

データは、平均値±SEM、*は、P<0.05 を示す (n=5)

図 7

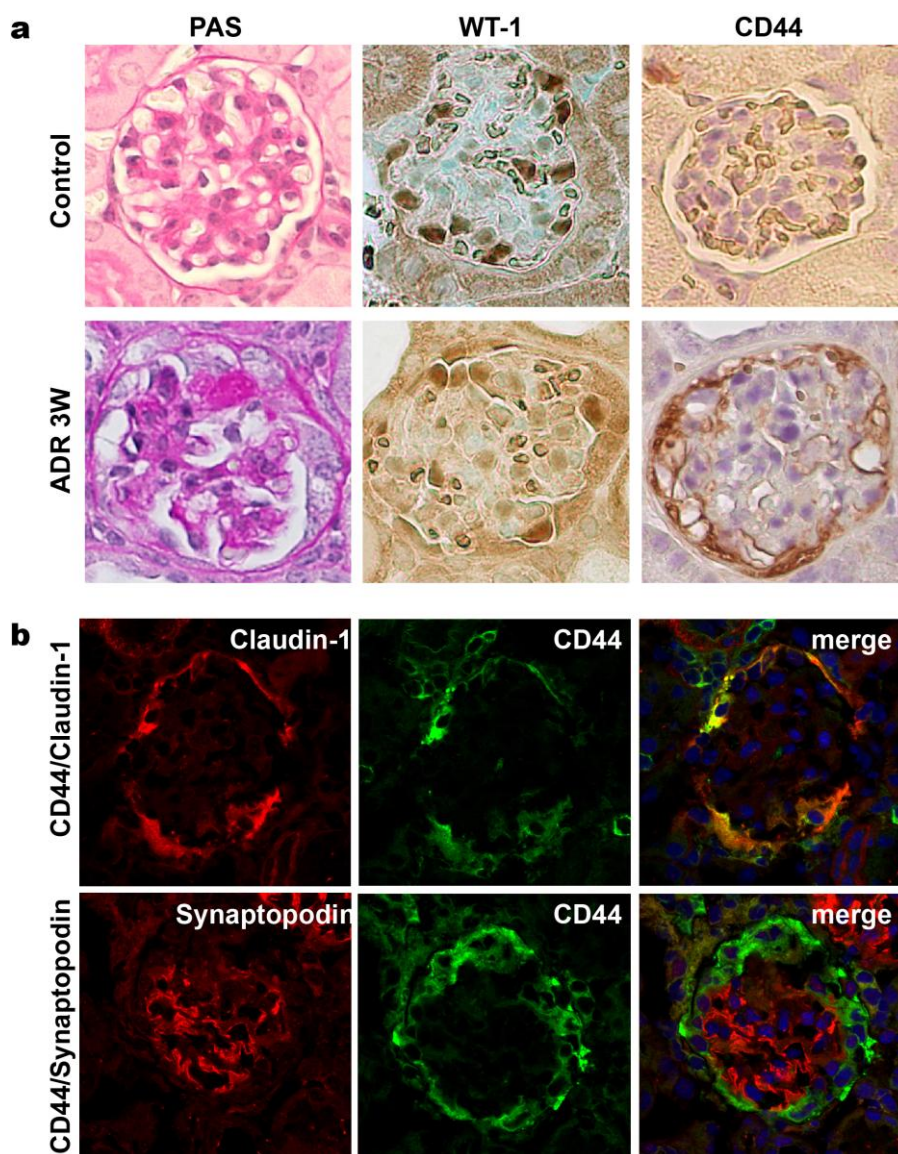


図 7. ADR マウスの腎病理所見と CD44、壁細胞、足細胞マーカー発現
 (a) ADR 3W、対照 (PBS 静注)の光顕所見と WT-1、CD44 免疫染色
 ADR 3W と対照群での PAS 染色、免疫染色 (WT-1、CD44)。ADR マウスの糸球体において、偽半月体形成、ボウマン囊癒着病変が認められる。また、同マウスにおいて、WT1+足細胞 (茶)減少、CD44+壁細胞 (茶)出現を認める。
 (b) ADR 3W における CD44、synaptopodin、claudin-1 染色 (蛍光抗体法)
 ADR マウスにおける免疫染色 (蛍光抗体による二重染色)。上段では、CD44 (緑)発現と壁細胞マーカーclaudin-1 (赤)との共発現 (橙)がみられる。下段では足細胞マーカーsynaptopodin (赤)との共発現は認めず、CD44 陽性細胞は、主に壁細胞起源である事が示唆される。

2. ADR マウスにおける壁細胞活性化にともなう各種マーカー (CD44、CXCR4、AT-1、p-ERK)の発現と新規マーカーとして CD74 の発現

これまで、壁細胞活性化に伴い新規に発現する代表的マーカーとして、CD44 が知られてきた¹⁴。最近になり、ヒト腎炎、動物腎疾患モデルを用いたいくつかの研究により、壁細胞活性化を示す他のいくつかのマーカーが見出されてきた^{25,26}。我々は、FSGS モデルである ADR マウスにおける壁細胞活性化をさらに確認するため、CD44 に加えて、CXCR4、AT-1、および p-ERK の発現性を免疫染色により検討した (図 8a)。その結果、ADR マウスでは、CD44 についてはボウマン囊側にきわめて限局した強度の発現を認めた。p-ERK についても同様に、壁細胞に比較的限局した明瞭な発現が確認できた (図 5)。CXCR4、AT-1 に関しては、一部の尿細管上皮細胞にも陽性所見をとめないながら、ボウマン囊に沿った細胞群、または、ボウマン囊癒着形成部から係蹄にかけての細胞群にその発現が認められた。以上から、本モデルにおいても CD44、CXCR4、AT-1、p-ERK は、壁細胞活性化を示すマーカー蛋白として有用である事が確認された。

II 型膜貫通蛋白で、MHC クラス II 不変鎖分子である CD74 は⁴⁴、CD44 と MIF 受容体複合体を形成⁴¹することが知られる。我々は、FSGS モデルにおける新たな壁細胞の活性化マーカーを探るなかで、2 種の抗 CD74 抗体 (ラット抗マウス CD74 モノクローナル抗体、および、ヤギ抗マウス CD74 ポリクローナル抗体)を用いて免疫染色にて、その発現性を確認した (図 8b)。ADR 3W において、CD74 は、尿細管上皮細胞に加えて、一部の糸球体において、壁細胞と考えられるボウマン囊側の上皮細胞の細胞質における発現が明瞭に認められた。CD74 は、ボウマン囊に沿った細胞群、または、ボウマン囊癒着形成部から係蹄にかけての細胞群に発現が認められ、これまで見出されている壁細胞活性化を示すマーカー蛋白群と同様の局在を示した。さらに、連続切片、CD44 と CD74 のペルオキシダーゼ法による二重染色を施行したところ、連続切片上両分子の局在性の一致、二重染色による共発現が観察され、CD74 は FSGS における壁細胞活性化に関与している可能性、新規の活性化マーカーであることが示唆された (図 8c)。

一方で、糸球体におけるその発現の頻度に関しては、CD44 と CD74 の間で違いを認めた。ADR 3W において、CD44 は、約 90%の糸球体 (87.4%、表 2) の壁細胞において発現が認められるのに対し、CD74 を発現している糸球体は、より少数(60.8%)であった。以上から、我々は、壁細胞における CD74 発現は、壁細胞の活性化段階の限られた時期に現れる可能性を考えた。

8

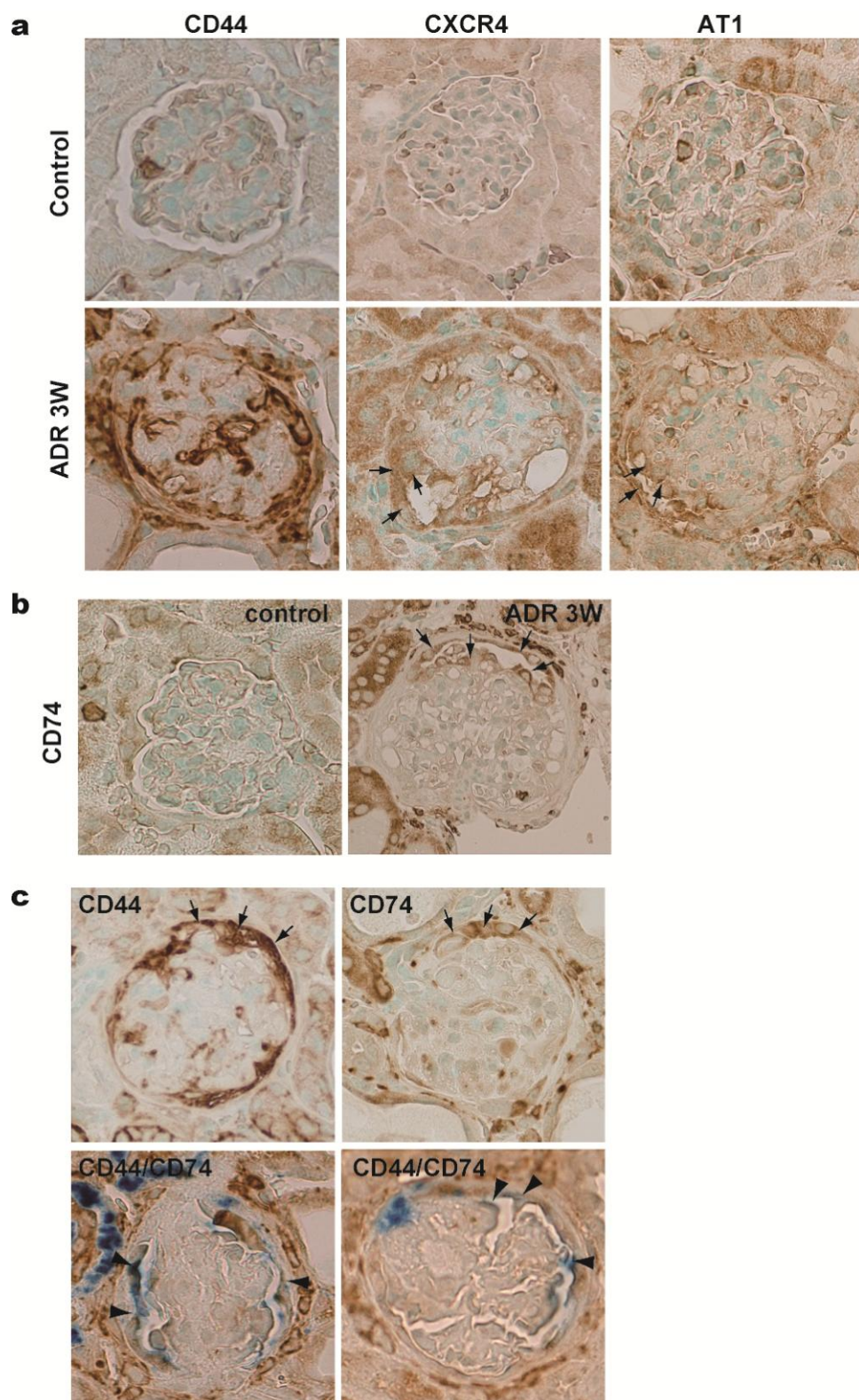


図 8. ADR マウスにおける壁細胞活性化マーカーの発現と新規マーカーとして CD74 の発現

(a)対照（上段）と ADR 3W（下段）における壁細胞活性化マーカー（CD44、CXCR4、AT-1）の発現を示す。ADR3W マウスでは、壁細胞における CD44 の強度発現がみられる。CXCR4、AT-1 も、傷害糸球体におけるボウマン壁に沿う壁細胞と係蹄と癒着形成細胞に明瞭な陽性所見を認める（矢印）。(b) 対照（左）と ADR 3W（右）における新規マーカーCD74 の発現を示す。ADR 3W の糸球体においてボウマン壁に沿った、又は癒着形成部の細胞群に、明らかな陽性所見がみられる（矢印）。(c) 連続切片（上段）、二重染色(下段)による CD44、CD74 の局在の検討。連続切片では、CD44、CD74 の局在箇所的一致（矢印）、二重染色でも、CD44(青)、CD74(茶)の共発現が認められた（矢頭）。

3. ADR マウスに LPS 投与を組み合わせることによる壁細胞活性化増幅モデル (ADR-LPS マウス)の作製

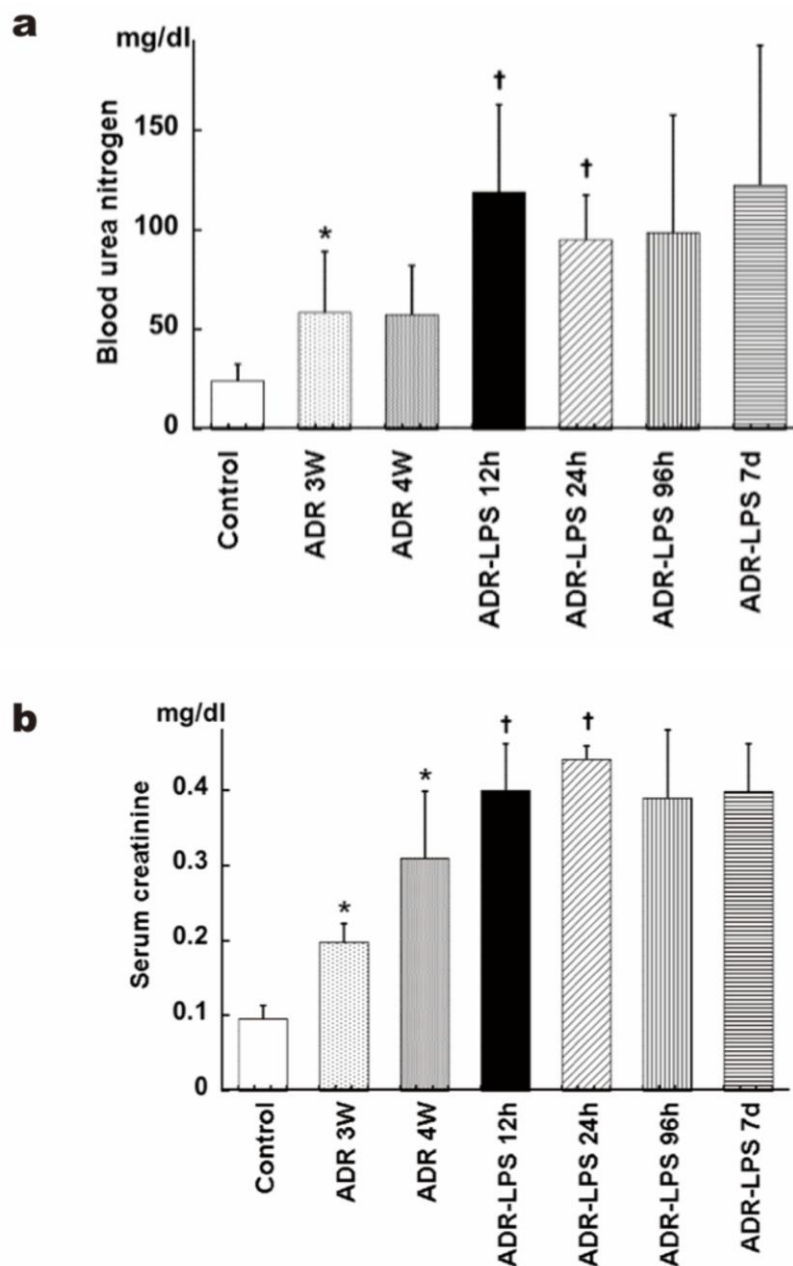
前述のように、FSGS のモデルである ADR マウスにおいて、CD44 とサイトカイン受容体複合体として相互作用し得る分子である CD74 が一部の糸球体において同時発現し、壁細胞の活性化に強く関与している可能性が示唆された。ADR マウスは、FSGS（病理学的に巣状・分節性の硬化病変を特徴とする疾患）のモデルとして確立され、複数の糸球体間において傷害の進行度が異なるのが特徴の一つである³¹。すなわち、糸球体傷害、足細胞傷害にともなう壁細胞の活性化のレベルが各糸球体によって異なることが考えられる。そこで、通常一過性蛋白尿の惹起に使用される LPS 投与を、その投与量を調整しながら組合せ、糸球体傷害にともなう壁細胞の活性化レベルを一様に増幅することができないか、新たなモデルを作製することとした。

これまで、LPS 腎症マウスは、LPS (10～15 $\mu\text{g/g} \cdot \text{体重}$)を腹腔内投与することにより、一過性の可逆性蛋白尿を誘導し、微小変化群ネフローゼ症候群のモデルとされるマウスモデル (LPS マウス)である^{32,33}。我々は、これまでの報告を参考にしながら、LPS マウスの惹起に一般的に使用される LPS (15 $\mu\text{g} \cdot \text{g}$ 体重)投与量の半量 (7.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}$ 体重)を、ADR マウス (ADR 3W)に加えることによって、糸球体、特に壁細胞の活性化を増幅し、傷害による壁細胞活性化の解析が可能となるか試みた (ADR-LPS マウス)。

図 9 に、ADR-LPS マウスにおける LPS 投与後の腎機能 (BUN、sCr)、尿蛋白 (Up/Ucr)の時間的推移 (LPS 腹腔内投与後、12h、96h、7d)を、対照群と ADR マウス (ADR 3W、ADR 4W)で比較検討したものを示す。ADR-LPS マウスは、LPS 投与前 (ADR 3W)に比し、投与後 12h の時点から有意に腎機能悪化

(BUN、sCrの上昇)を示し、その後も持続性に同様の腎機能低下を示した(投与後12hにおいて、BUN; 119.4 ± 43.4 vs. 58.9 ± 30.2 , sCr; 0.40 ± 0.06 vs. 0.19 ± 0.02 , $P < 0.05$)。一方、LPS投与後24hの時点で、ADR 3Wに比し有意に高度尿蛋白(99.2 ± 8.4 vs. 35.8 ± 4.0 g/g・Cr、 $P < 0.05$)を示し、7dにはさらなる悪化を呈し、ADR 4Wに比べて極めて高度蛋白尿を呈した(163.9 ± 35.4 vs. 50.3 ± 21.7 g/g・Cr、 $P < 0.05$)。

図 9



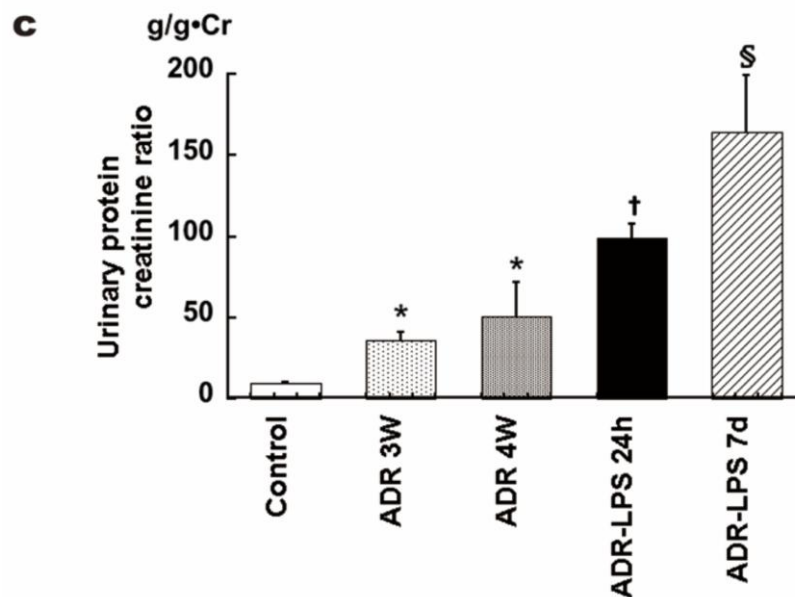
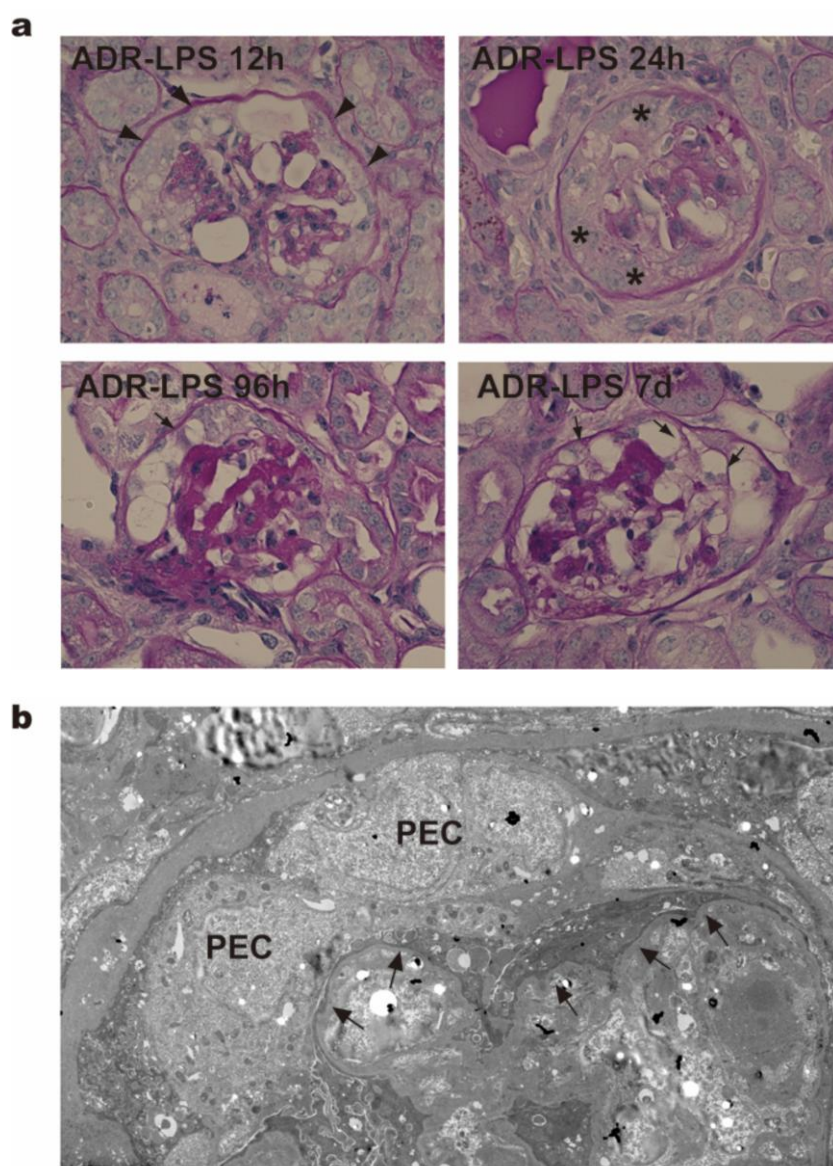


図 9. ADR-LPS マウスにおける腎機能 (BUN、sCr)と尿蛋白 (Up/Ucr)の推移
 ADR-LPS マウスにおける LPS 投与後 12h-7d までの BUN、sCr、Up/Ucr の推移を示す。(a)、(b) ADR-LPS マウスでは、LPS 投与後 12h、24h の時点で、ADR マウスに比し、BUN (a)、sCr (b)の有意な上昇が認められた。(c) ADR-LPS マウスでは、対照群、ADR マウス(3w、4w)に比較して、明らかな蛋白尿の悪化がみられ、7d まで進行した。値は、平均±SEM (n=5)。*は対照群に比し、 $P<0.01$ 、†は ADR 3W に比し、 $P<0.05$ 、‡は ADR 3W に比し、 $P<0.01$ を示す。§は ADR 4W に対し、 $P<0.05$ を示す。

さらに腎病理所見に関して、光顕、電顕にて検討した (図 10)。光顕上、ADR-LPS マウスの多くの糸球体においては、LPS 投与後 12h から腫大した核と細胞質を有する壁細胞と考えられる細胞が目立ち始める。24h からは、係蹄から尿腔側にわたって大型の細胞群が多くなり、いわゆる偽半月体形成が顕著となる。以降、同様の病変を有しながら、96h 以降 7d にかけては細胞性癒着が多くなる (図 10a)。また、電顕による観察によっても、係蹄尿腔側に、大型の核を有し、細胞質内に多くのミトコンドリアを有する細胞群が認められた (図 10b)。LPS 投与 24h 後の偽半月体形成を有する糸球体の割合、LPS 投与後 7d の細胞性癒着を有する糸球体の割合に関する定量的な解析を行い、ADR 3W (偽半月体形成)、ADR 4W (細胞性癒着)と比較検討した (図 10c、d)。その結果、ADR-LPS マウスでは、ADR マウスに比較して、有意に偽半月体形成 (33.2 ± 1.31 vs. $19.8\pm3.1\%$, $P<0.05$)、引き続き細胞性癒着 (1.46 ± 0.13 vs. $0.53\pm0.15\%$, $P<0.05$)形成の増加が見られた。以上から、ADR-LPS マウスでは、ADR マウス

に LPS 投与を組み合わせることにより、壁細胞活性化の形態的特徴（核腫大をともなう細胞質腫大、管外増殖病変・偽半月体形成、癒着病変形成）が有意にもたらされることが示された。したがって、ADR マウスに少量 LPS を投与することで、ADR-LPS マウスでは、壁細胞活性化が一様に賦活化されていることが示唆された。我々は、壁細胞活性化の賦活機転を解析するのに適したモデルであると考え、活性化マーカーである CD44、および、新規マーカーの可能性のある CD74 の発現に関する検討をさらに探求していくこととした。

図 10



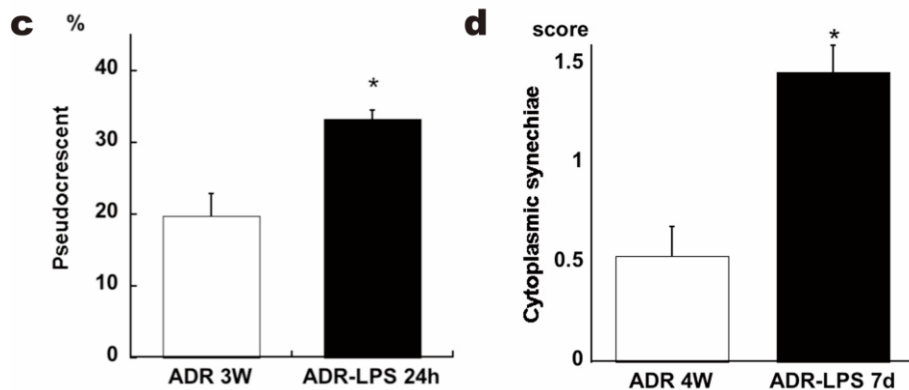


図 10. ADR-LPS マウスの腎病理所見（光顕および電顕的観察）

(a) ADR-LPS マウスの光顕所見（PAS 染色、対物 x40）の時間的推移。LPS 投与後 12h 後から大型の核を持ち腫大した細胞質を有する壁細胞が数多く出現（矢頭）、24h 後から同様の細胞が偽半月体（星印）を形成しているのが目立つようになる。その後、96h、7d と、係蹄とボウマン嚢間における細胞性癒着（矢印）形成が顕著となる。(b) LPS 投与後 12h の糸球体の電顕所見（対物 x3000）。びまん性に癒合した足細胞足突起に覆われた糸球体基底膜（矢印）とボウマン嚢の間に、大型の核、ミトコンドリアが増生し腫大した細胞質を有する大型の壁細胞（PEC）が観察される。(c) 偽半月体を形成する糸球体の割合（ADR-LPS 24h vs. ADR 3W）、および、(d) 細胞性癒着に関する半定量スコア（ADR-LPS 7d vs. ADR 4W）を示す。値は、平均±SEM（n=5）*は、 $P<0.01$ 。ADR マウスと比較して、ADR-LPS マウスでは、偽半月体形成、細胞性癒着の明らかな増加が認められる。

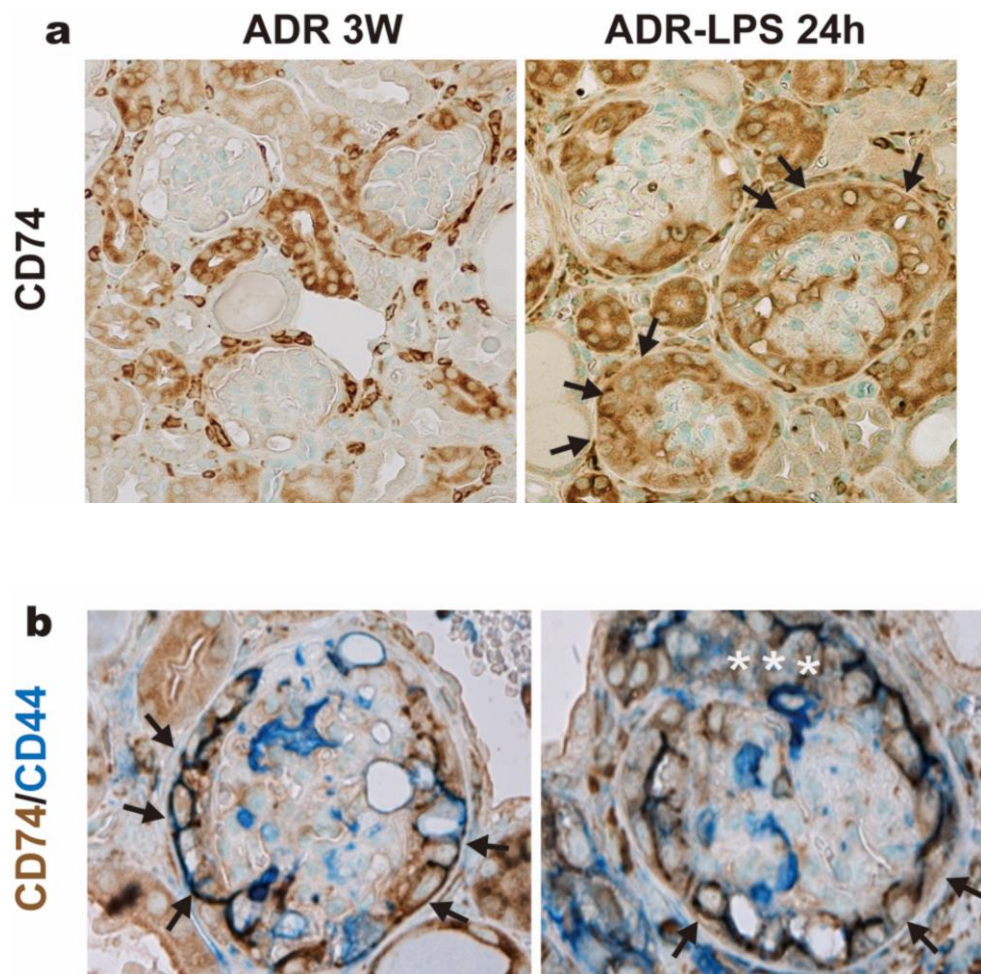
4. ADR-LPS マウスにおける CD74 の発現

モデルとして確立した ADR-LPS マウスを用いて、糸球体における CD74 の発現に関する免疫組織学的検討を進めた（図 11）。その結果、ADR-LPS マウスにおいて顕著となる腫大した核を有する壁細胞由来と考えられる細胞群において、明瞭な CD74 の発現が認められた（図 11a）。その発現は、ボウマン嚢に沿った単層の細胞群、管外増殖・偽半月体を形成する細胞群においても同様に観察された（図 11a）。CD74 と代表的壁細胞マーカーである CD44 との共発現性を二重染色にて確認したところ前述の腫大した管外の細胞群において明らかに共発現を示した（図 11b）。一方、正常ボウマン嚢壁細胞の核において発現し、壁細胞マーカーとされる PAX2、PAX8 との二重染色では、CD74 陽性細胞群の核に PAX2、PAX8 両者が共発現しているのが認められた（図 11c）。他方、腎組織

においては、一部尿細管上皮細胞にも PAX2³⁷、PAX8³⁸ が発現することが知られている。そこで、近位尿細管上皮細胞に結合するマーカーとして利用されるレクチンである *Lotus tetragonolobus* lectin の結合性を、ADR-LPS マウス腎組織において検討した。結果、正常腎組織（対照群）では、これまでの報告³⁴にもあるように尿管極近傍の背の高い壁細胞に局限した結合性が認められた（図 11d）。一方、ADR-LPS マウスモデルでは尿管極近傍でのレクチン結合性が消退する（矢印）。また、本マウスで顕著に認められるボウマン嚢に沿った腫大した細胞群では全周性に CD74（青）のみが発現し、同部位において両者の共発現は認められない。

以上の結果から、ADR-LPS マウスにおいて、LPS 投与後早期から著しい増加を示す CD74 陽性をともなう大型の管外細胞群は、CD44 陽性活性化壁細胞である事が示された。

図 11



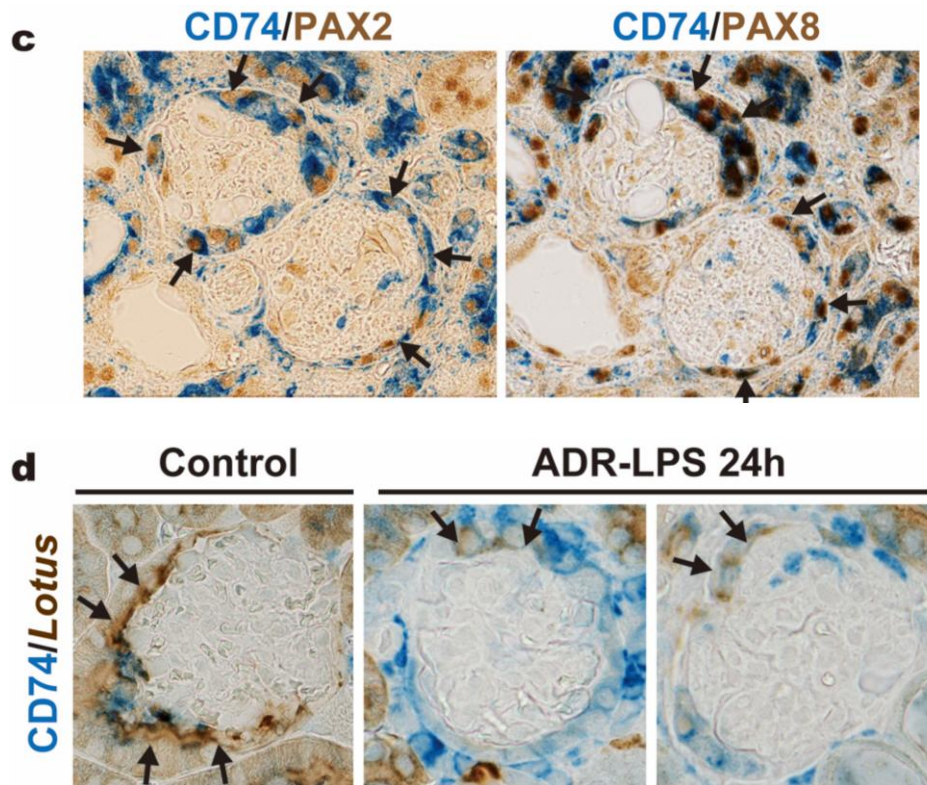


図 11. ADR-LPS マウス腎組織における CD74 の発現性 (免疫染色)

(a) ADR 3W、ADR-LPS 24h マウス腎における CD74 の発現。ADR マウス (左) においては、一部の扁平な壁細胞に比較的弱い CD74 の発現が認められる。一方、LPS 投与 24h 後の ADR-LPS マウス (右) では、腫大した壁細胞と考えられる細胞群において、一様により強度な CD74 の発現が観察される(矢印)。(b) ADR-LPS 24h における CD74 (茶)と CD44 (青)の二重染色所見。ADR-LPS マウスにおいて観察される腫大した核を有する壁細胞群に、CD74(茶)と CD44(青)の共発現 (左、矢印)が観察される。また、管外増殖を示す細胞群 (右、星印)においても共発現が観察される。(c) ADR-LPS 24h における CD74 と壁細胞マーカー PAX2、PAX8 の二重染色。細胞質に CD74(青)を発現している細胞群は、核蛋白である PAX2 (茶) (左)、PAX8 (茶) (右)を共発現 (矢印)しているのが観察される。(d) 対照群と ADR-LPS 24h における CD74 とレクチン(*Lotus tetragonolobus*)の発現の局在性の検討。対照群(正常マウス)において、*Lotus tetragonolobus* (茶)は、尿細管上皮に加え糸球体尿管極近傍に位置する背の高い壁細胞に陽性(矢印)を示した。ADR-LPS マウスモデルでは尿管極近傍でのレクチン結合性が消退する(矢印)。一方、腫大した壁細胞では全周性に CD74 (青)のみが発現し、同部位において両者の共発現は認められない。

5. LPS マウス、BSA マウスにおける壁細胞活性化と CD74 の発現

これまでの実験では、ADR マウスと新たに確立した ADR-LPS マウスを対象に、糸球体傷害にともなうボウマン嚢壁細胞の活性化を探索し、新規活性化マーカーとして壁細胞に CD74 が発現することを見出した。対象とした 2 種のモデルマウス (ADR マウス、ADR-LPS マウス) 共に、高度蛋白尿と腎機能低下を呈する。しかし一方で、アルブミン過剰負荷蛋白尿モデルである BSA マウスや一過性蛋白尿・微小変化群ネフローゼ症候群モデルである LPS マウスなど、一過性の大量蛋白尿を呈する病態において壁細胞活性化、CD74 発現を認めるかは定かでない。よって、われわれは、LPS マウス、および BSA マウスを対象に、壁細胞活性化 (CD44 発現)、および CD74 の発現を、免疫染色にて検討することにした (図 12)。

まず LPS マウスにおいて、LPS 腹腔内投与後の各解析ポイント (12h、24h、48h、96h、7d) における腎機能は、BUN、sCr 共に、対照群に比して有意な悪化を認めなかった (BUN、 23.7 ± 2.1 mg/dl; sCr、 0.10 ± 0.01 mg/dl)。一方蛋白尿は対照群に比し有意な上昇を認めた (Up/Ucr、 14.7 ± 1.7 vs. 9.8 ± 0.7 g/g·Cr、 $P < 0.01$)。また、BSA モデルも同様に、BSA 投与後各解析ポイント (24h、48h、5d) における腎機能については悪化を認めなかった (BUN、 17.1 ± 0.7 mg/dl; sCr、 0.04 ± 0.003 mg/dl)。他方、蛋白尿に関しては、対照群に比して有意な増加を認めた (Up/Ucr、 16.1 ± 1.3 vs. 9.8 ± 0.7 g/g·Cr、 $P < 0.01$)。両モデル腎組織の光顕所見に関しては、尿細管における円柱形成を認めるものの、有意な糸球体傷害を示す所見は存在せず、壁細胞に関しても細胞の腫大、偽半月体形成、癒着は明らかでなかった。

LPS マウス (図 12a)、BSA マウス (図 12b) において CD44 および CD74 の発現を、免疫組織学的に検討した。両モデルにおいて、尿細管間質領域における CD44、CD74 の弱い発現とともに、ボウマン嚢壁細胞における両者の発現を僅かに認めた。しかしながら、その発現強度は、ADR マウスや ADR-LPS マウスにおける発現性と比較するときわめて僅少といえた。

以上から、ADR-LPS マウスにおいて、糸球体傷害にともなってみられる壁細胞活性化を示唆する所見 (細胞腫大・偽半月体形成・細胞性癒着をはじめとする形態学的変化、CD44、CD74 の強発現) は、本モデルに特異的な徴候であると考えられた。

図 12

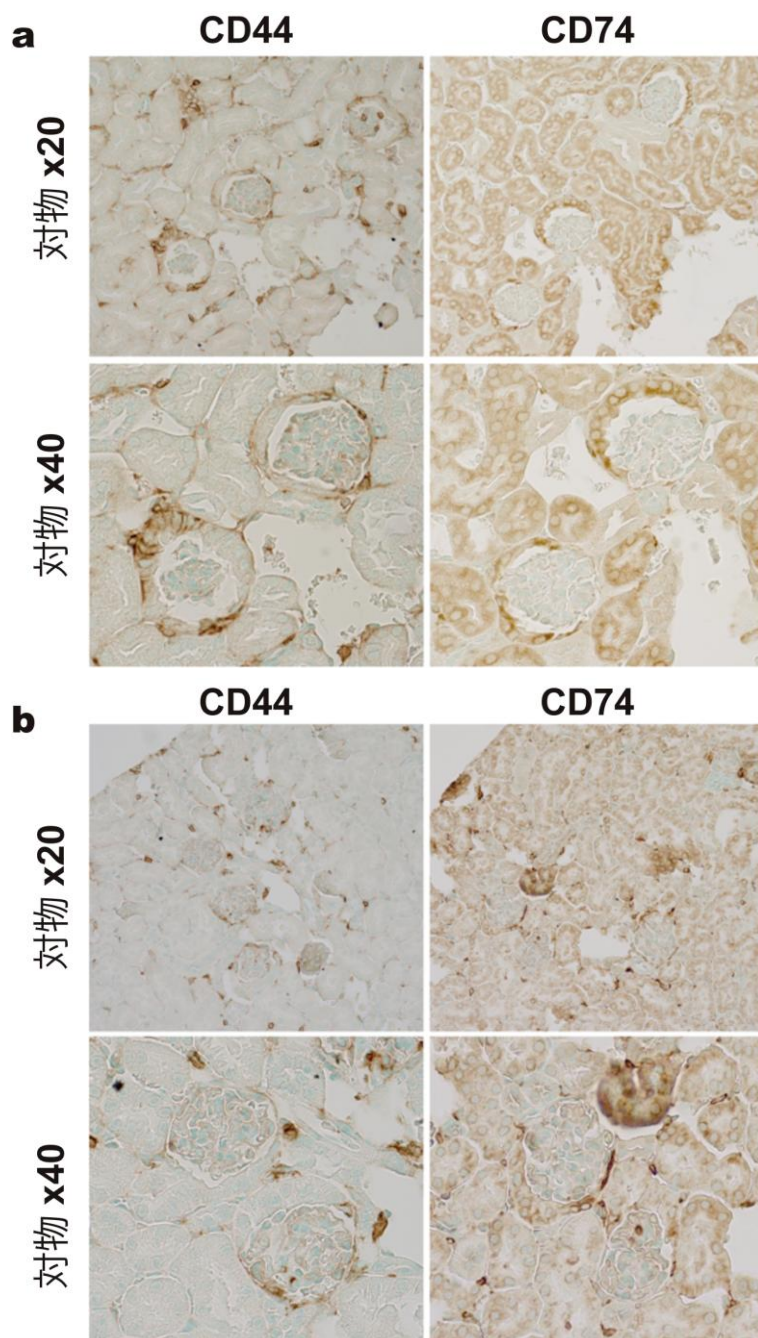


図 12. LPS マウスと BSA マウスにおける CD44、CD74 発現 (免疫染色)
 (a) LPS マウス (24h)、(b) BSA マウス (24h)における CD44 と CD74 の免疫染色を示す。CD44 は、両モデルにおいて尿細管間質領域、および壁細胞に僅かな発現を示す。CD74 も、両モデルにおいて尿細管上皮細胞、壁細胞に弱い発現を示す。

6. ADR-LPS マウスにおける壁細胞の活性化増幅時の CD74 発現性の経時的変動

LPS 投与後、ADR-LPS マウスの糸球体では、順に壁細胞の腫大、増殖・偽半月体形成、細胞性癒着形成など壁細胞活性化を基盤としたダイナミックな形態変化を生じる。我々は、LPS 投与による壁細胞の活性化増幅時の CD74 発現性に関する経時的変動を検討した (図 13)。検討に際しては、各解析ポイント (LPS 投与後 12h、24h、48h、96h、7d)における腎組織の連続切片を作成し、壁細胞における CD44 の発現性と比較検討した (図 13a)。

CD44 は、LPS 投与後 12h から 7d まで、壁細胞において明瞭な発現性が継続した (図 13a 下段)。それに対し、CD74 の壁細胞における発現性は、投与後 12h から 48h まで有意に高度となり、その後 96h 以降はベースラインまで低下した (図 13a 上段、図 13b)。以上から、活性化壁細胞による CD74 発現は、LPS による壁細胞活性化の一過性の増幅を良く反映している事が考えられた。

図 13

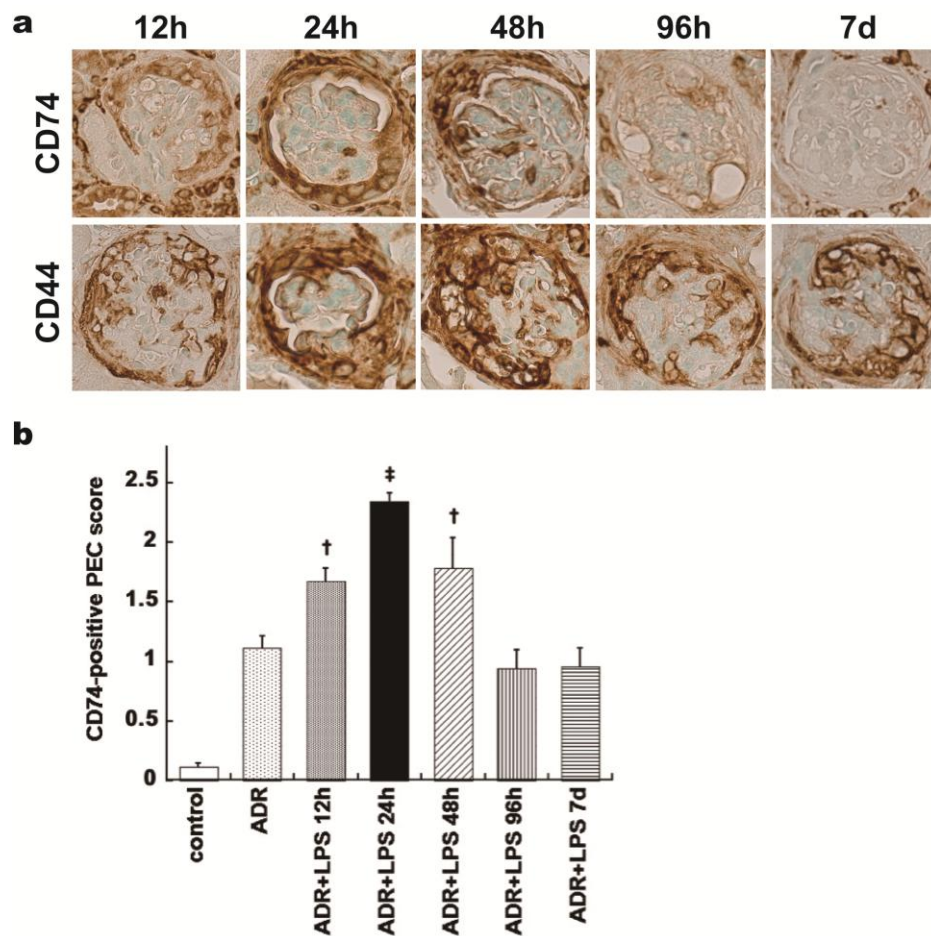


図 13. ADR-LPS マウス糸球体における CD74、CD44 発現の LPS 投与後の経時的変化 (連続切片による免疫染色)

(a) LPS 投与後 12h-7d までの CD74 (上)、CD74 (下)発現の経時的変化を示す。それぞれの糸球体は連続切片での評価である。CD44 は、各解析ポイントで壁細胞に一貫して明瞭に発現している。一方、CD74 は LPS 投与後 12h から 48h のポイントで強い発現を認める。(b)壁細胞における CD74 の発現性をスコア化し、半定量的解析した。本解析においても、LPS 投与後 12h から 48h にかけて CD74 の有意な発現増強を認め、その後ベースラインまで低下している。値は、平均±SEM (n=5)。*は対照群に比し、 $P<0.01$ 、†は ADR マウスに比し、 $P<0.05$ 、‡は ADR マウスに比し、 $P<0.01$ を示す。

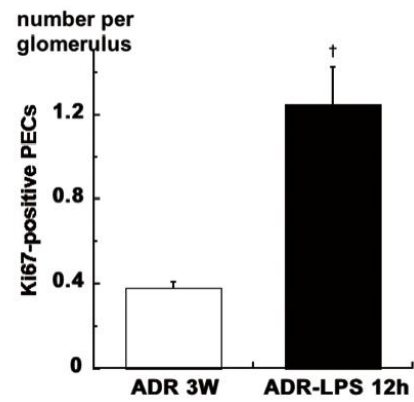
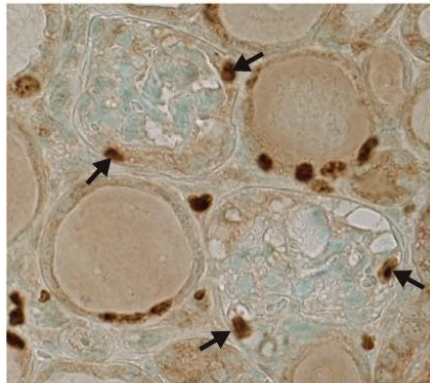
7. ADR-LPS マウスでは LPS 投与後に、壁細胞の細胞増殖を認めるとともに、p-ERK の発現が増強する

ADR-LPS マウスにおける LPS 投与後の活性化増幅にともなう壁細胞の増殖性について、増殖細胞マーカーである Ki67 発現を免疫染色にて検討した (図 14a)。Ki67 陽性細胞の定量的評価の結果、本モデルでは、LPS を投与 12h の時点で、ADR 3W に比較して壁細胞における有意な Ki67 陽性細胞の増加 (1.25 ± 0.17 vs. 0.37 ± 0.03 /1 糸球体, $P<0.05$)を認め、活性化増幅された壁細胞が増殖性を獲得していることが示唆された。

一方これまでに、壁細胞活性化は、細胞の生存性、増殖性、分化誘導に強く関与する ERK 経路の活性化を伴う事が知られている^{25,39}。我々は、ADR-LPS マウスの糸球体における p-ERK の発現性について、免疫染色にて検討し、LPS 投与後の発現強度を経時的に解析した。その結果、ADR-LPS マウスにおける p-ERK 発現強度の時間的推移のパターンは、CD74 発現性の推移 (図 13b)と類似し、CD74 発現と p-ERK 発現性の関連が示唆された (図 14b)。

14

a



b

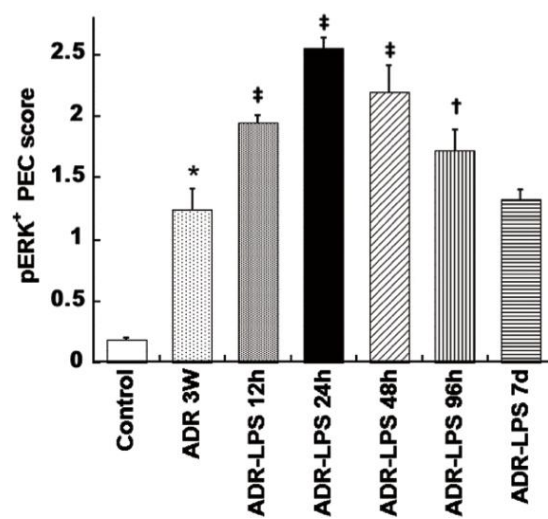
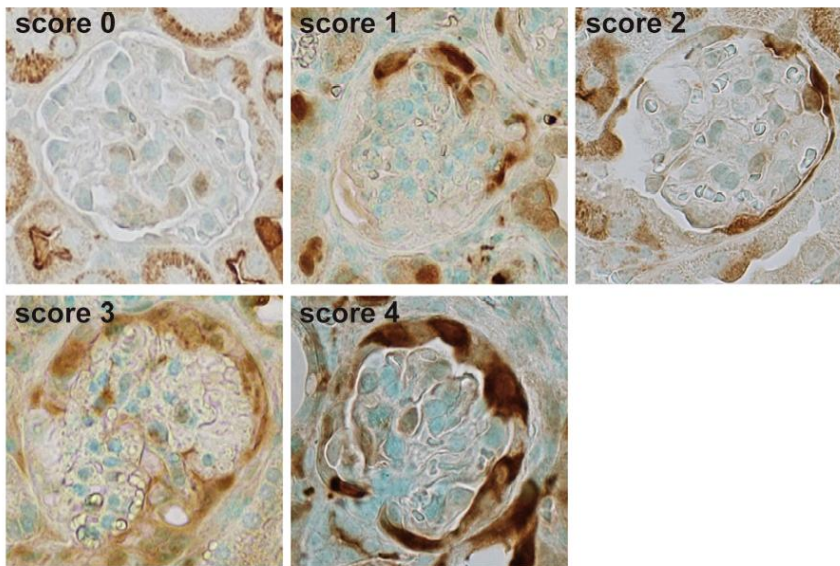


図 14. ADR-LPS マウスにおける Ki67 発現と p-ERK 発現の検討 (免疫染色)
(a) Ki67 の免疫染色 (左)。Ki67 陽性壁細胞(矢印)が散見される。定量解析の結果、ADR 3W に比し、ADR-LPS マウス (LPS 投与後 12h)では Ki67 陽性細胞の有意な増加がみられた。値は、平均±SEM (n=5)。*は $P<0.001$ を示す。(b) p-ERK の壁細胞における発現性をスコア化 (上)し、半定量的解析 (b)を行った。解析では、LPS 投与後 12h から 96h にかけて有意な p-ERK 発現増強がみられた。値は、平均±SEM (n=5)。*は Control 群に比し、 $P<0.01$ 、†は ADR マウスに比し、 $P<0.05$ 、‡は ADR マウスに比し、 $P<0.01$ を示す。

考 察

本研究において我々は、4種の動物モデルを作成し病理学的手法を用いる事で、FSGS 進展過程において壁細胞の活性化に関わる因子について検討した。その結果、活性化壁細胞の代表的マーカーである CD44 とサイトカイン受容体複合体として相互作用し得る CD74 は壁細胞活性化に関わり、その発現は壁細胞活性化の増幅により一時的に亢進することを見出した。さらに、今回新たに確立した ADR-LPS マウスは、ADR マウスに少量の LPS 投与を組み合わせることによって、壁細胞活性化の増幅を一様に誘導できる事から、壁細胞活性化の機転をさらに解明するために有用な動物モデルと考えられた。

近年、ボウマン嚢壁側上皮細胞(壁細胞)が、FSGS や増殖性腎炎の発症・進展を促す鍵となる細胞として着目されている^{11,49}。着目される新たな役割としては、1) RPGN、FSGS 病変における分節性糸球体病変形成への関与、および、2) 傷害により喪失した足細胞・近位尿細管細胞の補填への関与、などがあげられる⁴⁷。さらに、壁細胞活性化のメカニズムには、複数のシグナル経路が関与し、未知の活性化マーカーの存在の可能性も示唆され、現在も複数の研究グループにより精力的に研究が進んでいる⁴⁹。

本研究では、FSGS の代表的モデルである ADR マウスをはじめとする腎疾患マウスモデルを用いて、FSGS の発症進展における壁細胞の活性化を新たな側面から検討した。実験では、ADR マウス²⁹⁻³¹ (FSGS モデル)、LPS マウス^{32,33} (一過性蛋白尿、微小変化群ネフローゼ症候群モデル)、BSA マウス²⁵ (アルブミン過剰負荷蛋白尿モデル)、ADR-LPS マウス (ADR マウスに LPS 投与を組み合わせた新規モデル)の4種の腎疾患モデルを用いた (表 3)。FSGS モデルである ADR マウスは、正常マウスに比べ有意な蛋白尿と緩徐に進行する腎機能低下を示した。FSGS に特徴的な糸球体病理所見 (硬化、偽半月体、癒着形成)の分布は、基本的に巣状、分節性であり、活性化壁細胞に特徴的とされる形態変化 (細胞腫大、増生、癒着形成)に関しても同様な分布様式を呈した。一方、ADR-LPS マウスにおいては、LPS 投与後 12h・24h の時点でびまん性に壁細胞が腫大化し、24h 以降激しい増生による偽半月体形成、さらに 7d まで細胞性癒着病変の形成が多くを占めるようになった。一方これまでに、LPS マウスや BSA マウスなど蛋白尿を主体としたモデルにおける壁細胞の活性化を認めるかは定かでなかった。LPS マウスは、足細胞に発現する Toll like receptor 4 (TLR4)とその共受容体である CD14 を介するシグナル経路により足細胞のアクチン骨格の変化が生じ、一過性蛋白尿を呈する実験動物モデルである^{32,33}。他方、BSA マウスは、アルブミン過剰負荷による非免疫学的な機序によって蛋白尿を生ずるモデルである²⁵。本実験では、LPS マウス、BSA マウス両者において、壁細胞活性化に

伴う特徴的な形態変化は認められなかった。以上から、ADR-LPS マウスにおいて、光顕、電顕にて観察された壁細胞の形態学的変化のびまん性の広がり、本モデルに特異的な事象と考えられた。ADR-LPS マウスでは、足細胞毒性のある ADR の投与により進行性の足細胞傷害をきたし脆弱化した糸球体に、LPS 投与による直接的、あるいは LPS により増悪した蛋白尿による間接的なストレスが加わった結果、急速な壁細胞の活性化がびまん性に賦活化されたものと考えられた。

表 3. 本実験で用いたマウスモデルの蛋白尿、腎機能、糸球体病理像の比較

マウスモデル	蛋白尿	腎機能	糸球体 硬化	壁細胞 腫大	偽半月体	細胞性 癒着
LPS マウス	++	→	-	-	-	-
BSA マウス	++	→	-	-	-	-
ADR マウス	++	↓	+	+	+	+
ADR-LPS マウス	+++	↓↓	++	++	++	++

壁細胞が活性化すると、通常ボウマン嚢内側を裏打ちしている扁平な上皮細胞の集団である壁細胞群が、新たに遊走能、増殖能、細胞外基質産生能など細胞活動性の亢進を獲得し特異な形質を呈するようになる¹¹。活性化壁細胞の新たな形質としては、前述の特徴的な形態学的変化に加えて、特異的なマーカー蛋白が新規に発現することが知られている。Smeets らにより、CD44 が壁細胞活性化の特異的マーカーとして報告¹⁴されて以来、その発現性は他の腎疾患モデルやヒト腎疾患においても検討が重ねられてきた^{11,13,16}。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、細胞-細胞間の接着、癒着、遊走などに関与する²³。最近我々は、ADR マウスを用いて、FSGS 病変形成過程における活性化壁細胞における CD44 発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²⁷。臨床への応用的側面では、壁細胞の CD44 発現が、FSGS の移植後再発の早期マーカーや FSGS と微小変化型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な事も報告されている^{24,44}。一方、最近になり、CD44 以外の活性化マーカーに関する報告もみられてきた^{25,26,45}。ヒト糸球体腎炎、動物腎炎モデルを用いた最近の研究では、CXCR4²⁶、AT-1²⁶、p-ERK²⁵が、活性化にともない壁細胞において新規に発現する蛋白として報告され、活性化マーカーの候補として挙げられている^{11,47}。

本研究では、まず ADR マウスを対象に、FSGS 病変形成過程における壁細胞

マーカー蛋白群の発現に焦点をあて、免疫組織学的に検討した。免疫染色にて、代表的な活性化壁細胞マーカーである CD44 の発現性を検討したところ、ADR マウス腎組織の壁細胞において CD44 の発現が、極めて高頻度にびまん性に認められた。また、他の壁細胞活性化のマーカー蛋白 (CXCR4、AT-1、p-ERK) についても検討したところ、壁細胞への特異的な発現性や発現強度の点では CD44 に劣るものの、ADR マウス糸球体の壁細胞において 3 種全ての蛋白の発現が認められた。一方、CD44 と相互作用しサイトカイン受容体複合体を形成する CD74 の発現を 2 種の抗体 (モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体) を用いて慎重に検討したところ、尿細管上皮細胞における発現に加えて、ボウマン嚢癒着形成部、偽半月体形成部など壁細胞の活性化が起源と考えられる箇所において、一部明瞭に発現しているのが見出された。

次に我々は、新たに確立した ADR-LPS マウスにおいて、壁細胞活性化と CD74 発現の関連について検討を進めた。ADR-LPS マウスでは、LPS 投与後経時的に、細胞腫大、偽半月体形成、癒着をはじめとする活性化壁細胞の形態学的変化のびまん性の広がりを示す。本マウスにおいて CD74 の発現性を検討したところ、LPS 投与後 12h-24h の時点で顕著となる著しく腫大した核を有する大型の細胞群において、CD74 が強度に発現している事が観察された。二重染色では、活性化壁細胞マーカー CD44 と共発現を示し、さらに、壁細胞マーカーである PAX2³⁷、PAX8³⁸ と共発現する事から、CD74 は、CD44 陽性活性化壁細胞において新たに発現するマーカー蛋白であることが示唆された。一方、マウスの腎糸球体においては、近位尿細管から糸球体構造への移行部である尿管極近傍に背の高い壁細胞 (tall parietal epithelial cell、tall PEC) といった尿細管上皮細胞に形質の類似した細胞群が存在³⁴する事が知られる。ADR-LPS マウスで認められたボウマン嚢に沿った大型の CD74 陽性細胞群と、近位尿細管上皮細胞や tall PEC との異同を明らかにするため、近位尿細管上皮細胞、tall PEC のマーカーとして利用される *Lotus tetragonolobus* lectin との結合性を確認した。その結果、ADR-LPS マウスの糸球体では、CD74 陽性の大型の細胞群は、*Lotus tetragonolobus* lectin との結合性を示さず、その起源は通常のボウマン嚢壁側上皮細胞であると考えられた。

ADR-LPS マウスの糸球体では、LPS 投与後、経時的に、壁細胞の著しい腫大、増生・偽半月体形成、細胞性癒着形成といった壁細胞活性化を基盤としたダイナミックな形態変化が観察される。そこで、新たに見出した活性化マーカーである CD74 と古典的マーカー CD44 の発現性を経時的に比較検討したところ、両者の発現性の推移に明らかな差異が認められた。壁細胞の CD44 発現性は、形態学的にはダイナミックな変化をとまなう経過中においても、持続的にほぼ一定の強度で継続した。それに対し、CD74 は、LPS 投与後 12h から 48h にお

いて、その著しい発現増強が認められ、形態学的特徴の時間的推移とともに、LPS 投与後の壁細胞の活性化増幅を反映していた。このように壁細胞活性化に関する形態学的特徴やマーカー蛋白の発現性に関して、それらの経時的な変化を観察し得た報告はこれまでには存在せず、ADR-LPS マウスの新規モデルとしての有用性が示された。

活性化壁細胞が獲得する新たな形質として、増殖能の獲得が挙げられる。我々は、ADR-LPS マウスの LPS 投与後に激しい増殖性変化を背景とする偽半月体病変の増加が生ずることに着目し、細胞増殖マーカー Ki67⁵⁰ の発現性を経時的に検討した。その結果、LPS 投与後 12h の時点において、Ki67 陽性壁細胞の有意な増加が認められ、壁細胞の増殖能獲得を反映する所見と考えられた。さらに、壁細胞における p-ERK の発現性に関しても、LPS 投与後の経時的变化を検討した。壁細胞における p-ERK の発現性は、LPS 投与後 12h から 96h に一時的に増幅し、CD74 の経時的な発現性の変化と類似点がみられた。ERK 経路の活性化は、細胞の生存性、増殖性、分化誘導に深く関与し^{39,51}、さらにアポトーシスの抑制にも働くと考えられる²⁵。以上から、ADR-LPS マウスにおける LPS 投与後の CD74 の一時的な発現上昇は、増殖能獲得をはじめとする活性化壁細胞の活動性亢進に関与している事が示唆された。

MHC class II 不変鎖分子である CD74 は、MIF の細胞膜受容体であることが見出されて以来、その発現が様々な疾患に関与していることが指摘されている⁴⁴。リガンドである MIF が CD74 に結合すると、急速な CD74 の内在化に引き続き、ERK 活性化、細胞増殖、アポトーシス抑制をはじめとする事象が誘導されるが⁴²、そのシグナル経路では、CD44 との受容体複合体の形成が必須となる⁴¹。CD74 の発現性が深く関与する病態としては、B 細胞系腫瘍、ヘリコバクター・ピロリ感染症、全身性エリテマトーデスなどの膠原病、アルツハイマー病などの神経疾患などがあげられる⁴²。腎疾患領域においては、正常ヒト腎組織における CD74 発現は尿細管上皮細胞に軽度認められること、培養ヒト足細胞と近位尿細管細胞における CD74 発現は軽度で認められる一方で、高濃度の糖刺激や炎症性サイトカイン刺激によって、その発現が増強することなどが示されてきた⁴⁵。最近、糖尿病性腎症の糸球体において足細胞に CD74 が新規発現し病態に関与することなども報告されている⁴⁶。しかしながら、我々が調べた範囲では、壁細胞の活性化における CD74 発現の関与についての報告はこれまでに見当たらず、本報告が初めての報告と考えられた。現在まで CD74 の腎病変形成における役割については、未だ不明な点も多い。リガンドである MIF は、積極的に足細胞傷害や FSGS における硬化形成に関与することを、我々も報告²⁸しており、CD74 と MIF の壁細胞の活性化への関わりについて、今後さらなる検討を要する。

壁細胞の活性化には、複数のシグナル経路の関与が示唆されている^{25,26,50}。これまでの報告では、活性化壁細胞において CD44、CXCR4、AT-1 などの発現がみられることから、シグナル経路として、オステオポンチン、SDF-1/CXCR4 システムやレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (RAAS、renin-angiotensin-aldosterone system) などの関与が示唆されてきた⁴⁷。本研究により我々は、CD74 が壁細胞活性化に関わる因子として重要であることを新たに見出し、壁細胞活性化を促す新たな具体的経路の存在の可能性を見出した。

本研究の限界としては、CD74 発現を誘導・増幅する因子の特定やその制御に関する探求にまで至らなかった点が挙げられる。また、新規動物モデルは、壁細胞活性化の経時的变化を探求するために適したモデルと考えられるが、CD44、CD74 をはじめとする分子間の相互作用の研究には、培養細胞など異なる手法を用いた実験系が必須であり今後の重要な課題である。また、遺伝子改変動物モデル、ヒト腎疾患組織などを対象として、活性化壁細胞における CD74 発現の重要性を検証する事も課題と考えられる。

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 を見出した。また FSGS モデルに LPS 投与を組み合わせる事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事が示された。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、最も重要な要因の一つである。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事が示唆される。

総括および結論

本研究全体より得られた新たな知見を以下にまとめる。

1. ADR マウスの FSGS 病変形成過程における腎病理所見を壁細胞の活性化に伴う形質変化に着目して研究を進める中で、CD44 との相互作用が知られる CD74 が、ボウマン囊癒着、偽半月体など壁細胞活性化が起源と考えられる病変部に発現している事を見出した。また、CD74 が、CD44 陽性活性化壁細胞に発現している事を、免疫組織学的手法にて確認した。
2. ADR マウスに LPS の腹腔内投与を組み合わせる事により、壁細胞傷害の増幅を惹起し壁細胞活性化の経時的解析を可能とするモデル (ADR-LPS マウス) を確立できた。光顕、電顕にて、LPS 投与後早期 (12h) から、壁細胞活性化の形態的特徴である核の腫大をともなう細胞の腫脹、偽半月体形成、癒着形成が、経時的に出現する事を見出した。
3. ADR-LPS マウスを用い、経時的に CD74 の発現性を検討したところ、LPS 投与後 12h~48h に有意に発現強度が亢進していた。CD74 の発現性亢進は、形態的变化とともに一時的な壁細胞活性化の増幅を反映している可能性が示唆された。
4. ADR-LPS マウスにおいては、LPS 投与後早期から壁細胞による細胞増殖マーカーの発現性が高まり、ERK 経路の活性化を示す p-ERK の発現性も亢進を示した。さらに、壁細胞による p-ERK 発現の経時的变化は、CD74 の発現性変化と類似するパターンを呈し、LPS 投与後の CD74 の一時的な発現亢進は、増殖能獲得などの壁細胞の活性化の活動性亢進を反映している事が示唆された。

本研究は、壁細胞の活性化機転を経時的に観察し得る動物モデルを新たに確立し、壁細胞の活性化における CD74 の関与を見出した点で大いに意義がある。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と治療法の開発に寄与すると考えられる。

今後の課題として、様々な手法を用いて今回の知見をさらに確認しながら、MIF をはじめとする CD74 と関わる分子群と壁細胞活性化との関連を探索していく事が挙げられる。

謝 辞

本研究を行う機会を与えていただくと共に、大学院での研究期間中多大なるご支援とご指導をいただいた、有賀正教授（北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野・教授）、岡本孝之先生（北海道大学病院小児科・助教）、多くの助言をいただいた、佐々木聡先生（医療法人菊郷会愛育病院医師）、に心より謝辞を述べさせていただきます。

引 用 文 献

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. *Am. J. Kidney Dis.* **39**, S1-S266 (2002).
2. Weiner, D.E. *et al.* Cardiovascular outcomes and all-cause mortality: exploring the interaction between CKD and cardiovascular disease. *Am. J. Kidney Dis.* **48**, 392-401 (2006).
3. Wiggins, R.C. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* **71**, 1205-1214 (2007).
4. D'Agati, V.D., Kaskel, F.J. & Falk, R.J. Focal segmental glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2398-2411 (2011).
5. Berger, K. & Moeller, M. J. Podocytopenia, parietal epithelial cells and glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 948-950 (2014).
6. Wharram, B.L. *et al.* Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2941-2952 (2005).
7. Matsusaka, T. *et al.* Podocyte injury damages other podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1275-1285 (2011).
8. Shankland, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **69**, 2131-2147 (2006).
9. Mundel, P. & Reiser, J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int.* **77**, 571-580 (2010).

10. Mundel, P. & Shankland, S. J. Podocyte biology and response to injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 3005-3015 (2002).
11. Shankland, S. J. *et al.* The emergence of the glomerular parietal epithelial cell. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 158-173 (2014).
12. Ohse, T. *et al.* The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney Int.* **76**, 1225-1238 (2009).
13. Smeets, B. *et al.* Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1262-1274 (2011).
14. Smeets, B. *et al.* Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2604-2615 (2009).
15. Moeller, M. J. & Smeets, B. Novel target in the treatment of RPGN: the activated parietal cell. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28**, 489-492 (2013).
16. Sicking, E. M. *et al.* Subtotal ablation of parietal epithelial cells induces crescent formation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 629-640 (2012).
17. Smeets, B. *et al.* The parietal epithelial cell: a key player in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 928-939 (2004).
18. Dijkman, H. *et al.* The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **68**, 1562-1572 (2005).
19. Hakrrouch S. *et al.* Extensive podocyte loss triggers a rapid parietal epithelial cell response. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 927-938 (2014).
20. Appel, D. *et al.* Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 333-343 (2009).

21. Lasagni, L. & Romagnani, P. Glomerular epithelial stem cells: the good, the bad, and the ugly. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1612-1619 (2010).
22. Smeets, B. *et al.* Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 2593-2603 (2009).
23. Ponta H, Sherman L. & Herrlich P. A. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 33-45 (2003).
24. Fatima, H. *et al.* Parietal epithelial cell activation marker in early recurrence of FSGS in the transplant. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 1852-1858 (2012).
25. Chang, A. M. *et al.* Albumin-induced apoptosis of glomerular parietal epithelial cells is modulated by extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 1330-1343 (2012).
26. Rizzo, P. *et al.* Nature and mediators of parietal epithelial cell activation in glomerulonephritides of human and rat. *Am. J. Pathol.* **183**, 1769-1778 (2013).
27. Okamoto T. *et al.* Prevalence of CD44-positive glomerular parietal epithelial cells reflects podocyte injury in adriamycin nephropathy. *Nephron Exp. Nephrol.* **124**, 11-18 (2013).
28. Sasaki S. *et al.* Transgene of MIF induces podocyte injury and progressive mesangial sclerosis in the mouse kidney. *Kidney Int.* **65**, 469-481 (2004).
29. Wang, Y., Wang, Y.P., Tay, Y.C. & Harris, D.C. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.* **58**, 1797-1804 (2000).
30. Pippin, J. W. *et al.* Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**, F213-F219 (2009).

31. Lee, V. W. & Harris, D. C. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*. **16**, 30-38 (2011).
32. Reiser, J. *et al.* Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephritic syndrome. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J. Clin. Invest.* **113**, 1390-1397 (2004).
33. Comper, D. C. Is the LPS-mediated proteinuria mouse model relevant to human kidney disease? *Nat. Med.* **15**, 133 (2009).
34. Forbes, M. S., Thornhill, B. A. & Chevalier, R.L. Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **301**, F110-F117 (2011).
35. Marshall, C. B., Krofft, R. D., Pippin, J. W. & Shankland, S. J. CDK inhibitor p21 is prosurvival in adriamycin-induced podocyte injury, in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **298**, F1140-F1151 (2010).
36. Ueno, T. *et al.* Aberrant Notch1-dependent effects on glomerular parietal epithelial cells promotes collapsing focal segmental glomerulosclerosis with progressive podocyte loss. *Kidney Int.* **83**, 1065-1075 (2013).
37. Zhai, Q. J. *et al.* PAX-2 expression in non-neoplastic, primary neoplastic, and metastatic neoplastic tissue: A comprehensive immunohistochemical study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **18**, 323-332 (2010).
38. Ozcan, A. *et al.* PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. *Mod. Pathol.* **24**, 751-764 (2011).
39. Zhang, J. *et al.* Podocyte repopulation by renal progenitor cells following glucocorticoids treatment in experimental FSGS. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **304**, F1375-F1389 (2013).

40. Leng, L. *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* **197**, 1467-1476 (2003).
41. Shi X. *et al.* CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* **25**, 595-606 (2006).
42. Sanchez-Niño MD. *et al.* MIF, CD74 and other partners in kidney disease: tales of a promiscuous couple. *Cytokine & Growth Factor Rev.* **24**, 23-40 (2013)
43. Lan HY. *et al.* Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* **57**, 499-509 (2000).
44. Bucala, R. & Donnelly, S.C. Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. *Immunity* **26**, 281-285 (2007).
45. Sanchez-Niño MD. *et al.* The MIF receptor CD74 in diabetic podocyte injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 353-362 (2009).
46. Sanchez-Niño MD., Benito-Martin, A. & Ortiz, A. New paradigms in cell death in human diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **78**, 737-744 (2010).
47. Moeller, M. J. & Kuppe, C. Glomerular disease: the role of parietal epithelial cells in hyperplastic lesions. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 5-6 (2014).
48. Smeets, B. *et al.* Detection of activated parietal epithelial cells on the glomerular tuft distinguishes early focal segmental glomerulosclerosis from minimal change disease. *Am. J. Pathol.* **184**, 3239-3248 (2014).
49. Moeller, M. J. & Smeets, B. Role of parietal epithelial cells in kidney injury: the case of rapidly progressing glomerulonephritis and focal and segmental glomerulosclerosis. *Nephron Exp. Nephrol.* **126**, 97-100 (2014).

50. Ryu, M. *et al.* Plasma leakage through glomerular basement membrane ruptures triggers the proliferation of parietal epithelial cells and crescent formation in non-inflammatory glomerular injury. *J. Pathol.* **228**, 482-494 (2012).
51. Koshikawa M. *et al.* Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2690-2701 (2005).