HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	カルシニューリン阻害薬による腎毒性を呈するマウスモデルにおけるCD44陽性糸球体壁側上皮細胞の役割 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	林, 麻子
Description	配架番号：2310
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12569号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66092
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Asako_Hayashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　林　麻子

学 位 論 文 題 名

カルシニューリン阻害薬による腎毒性を呈するマウスモデルにおける CD44 陽性糸球体壁側上皮細胞の役割

(The role of CD44-positive glomerular parietal epithelial cells in the mouse model of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity)

【背景と目的】

シクロスポリン（CsA）は移植領域、自己免疫性疾患、腎疾患治療へ広く用いられているが、これらの疾患の多くは、治癒や病状の改善を得るのに長期間を要し、CsA の長期間投与を必要とする。慢性シクロスポリン腎症（CsAN）は不可逆的な構造変化を伴うため、早期の発見、が重要である。慢性 CsAN の糸球体病変の一つに巣状分節性糸球体硬化症（focal segmental glomerulosclerosis, FSGS）があげられる。FSGS は最終的に末期腎不全に至る共通の最終経路であり、糸球体上皮細胞障害により発症すると考えられている。近年 FSGS の病変形成には、壁側上皮細胞（glomerular parietal epithelial cell; PEC）の動態がカギとなると考えられるようになり、病変形成に関与する PEC の状態を「PEC の活性化」と称し、活性化を示すマーカーとして CD44 が新規に発現することが示された。これまでの実験腎炎動物モデルを用いた検討においては糸球体への傷害が強いことから、PEC の活性化とポドサイト傷害、硬化病変の形成がほぼ同時に生じており、活性化 PEC の発現と硬化病変形成のタイミングの検討が困難であった。我々は硬化病変形成における PEC の関与を詳細に検討するために、緩徐に進行する CsAN マウスモデルを用いることにより、FSGS 病変形成過程における CD44 の糸球体内の発現について検討した。

【材料と方法】生後 5 週齢 ICR 雄マウスを CsA 投与開始の 7 日前からナトリウム制限餌にてプレコンディショニングを施行後、CsA 投与群（CsA 群 n=34）と正常コントロール群（コントロール群　n=24）を設けた。6 週齢の CsA 群マウスに対し、CsA 30 mg/kg をオリーブオイルに溶解し、連日皮下に投与した。他方、正常コントロール群には同量のオリーブオイルを連日皮下投与した。CsA またはオリーブオイル投与後、1、2、4、12、20、25w 時に屠殺し採血、採尿、腎組織の採取を行い、解析した。得られた検体に対して、体重、腎機能、蛋白尿および腎組織学的検討を行った。腎病理組織学的には、光学顕微鏡を用いて、尿細管障害、動脈肥厚、硬化病変を、電子顕微鏡を用いて、ポドサイトの足突起癒合について検討した。さらに、免疫組織学的な手法を用いて、ポドサイト傷害と CD44 の発現についての検討を行った。

【結果】CsA 投与開始 2 週後より、尿細管間質傷害、ポドサイトの足突起癒合を認め、同時期から糸球体の CD44 の発現を認めた。共焦点顕微鏡を用いて、CD44 陽性細胞は、PEC マーカーである Claudin-1 と共発現を示し、ポドサイトマーカーである Synaptopodin とは共発現を示さないことから、CsAN においても CD44 は PEC に発現していることが示された。CsA 投与 4 週後から糸球体動脈の硝子化肥厚を認め、ポドサイトの足突起癒合率が増加するのに相関して、PEC への CD44 発現が増加した。さらに CsA 投与後 20 週で Podocin、Synaptopodin、WT－1 などのポドサイトマーカーの発現低下を認めるようになってはじめて有意な硬化病変の増加を認めた。糸球体 CD44

発現の局在に関しては CsA 投与後早期（CsA 投与 2 週後）には一部のボウマン嚢に発現が出現した。その後は徐々に糸球体 CD44 発現部位は拡大し、CsA 投与 4 週後には全周性に発現した。さらに、硬化病変の形成がみられた 20 週以降では、CD44 陽性 PEC は糸球体血管係蹄へと陥入し、ボウマン嚢と血管係蹄の間に架橋形成を認め、さらに血管係蹄側での CD44 発現を認めた。

【考察】本研究は CsAN における PEC の活性化と FSGS の形成過程について検討したはじめての報告である。さらに、本研究では PEC の活性化とポドサイト傷害の関連についての検討も行った。CsAN において、尿細管間質傷害、動脈病変、ポドサイト傷害の進行に伴って CD44 陽性 PEC が出現し、さらに、FSGS を形成した糸球体において、CD44 陽性 PEC は糸球体血管係蹄へと陥入し、ボウマン嚢と血管係蹄の間に架橋形成を認め、血管係蹄側での CD44 発現を認めた。これらの研究結果は、CD44 陽性 PEC とポドサイト傷害が深い関わりをもち、CsAN においても、FSGS の形成には CD44 陽性 PEC が深い関係性をもつことを示唆した。

過去に報告された FSGS 腎症マウスモデルでは、傷害の程度が強いため、ポドサイト傷害と硬化病変の形成がほぼ同時期になされており、CD44 の発現起点とポドサイト傷害、硬化病変進展の時相が明確にはされてこなかった。慢性 CsAN における硬化病変形成には、ヒトでは約 10 年以上、マウスやラットなどの齧歯類では 1 年以上かかるとされており、実験動物モデルでは CsA の連日投与が必要となるため、利便性のすぐれたモデルではなく、FSGS モデルとしては一般的ではない。しかし、緩徐に進行することから、ポドサイト傷害の進行過程や CD44 陽性 PEC が発現した糸球体が FSGS に至る過程を詳細に検討することができると考えられた。そこでわれわれは CsAN マウスモデルを用いて検討を行ったところ、CsA 投与開始 2 週後より、尿細管間質傷害、FPE で示されるポドサイト傷害の発現と同時期から PEC への CD44 発現を認め、CsA 投与 4 週後から動脈病変が出現し、ポドサイトの足突起癒合率が増加するのに相関して、PEC への CD44 発現が増加した。さらに CsA 投与後 20 週でポドサイトマーカーの発現低下を認めてはじめて有意な硬化病変の増加を認めた。以上より CD44 陽性 PEC の発現起点はポドサイト傷害と深く関与し、その時期は硬化病変形成よりも極めて早期であり、糸球体における CD44 の出現はポドサイト傷害の程度や時期を鋭敏に反映していることを見出した。

【結論】CNI による腎毒性を呈するマウスモデルにおいて、CD44 陽性 PEC は分節性糸球体硬化病変の出現時期より、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ポドサイト傷害を反映していることが推察された。また、CD44 の糸球体での発現は一部の浸潤細胞の他、ボウマン嚢、一部糸球体係蹄上皮側、糸球体上皮細胞の硬化部にみられ、CD44 陽性 PEC は硬化病変の形成に深く関与していると考えられた。