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 [全文の要約]
Author(s)	林, 麻子
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：2310 他
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/2115/66094
Type	doctoral thesis
File Information	Asako_Hayashi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

（要約）

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)

2017 年 3 月

北　海　道　大　学

林　麻子

学　位　論　文

（要約）

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)

2017 年　3 月

北　海　道　大　学

林　麻子

目次

1. 発表論文目録および学会発表目録 …… 1
2. 緒言 …… 2
　2-1　慢性 CsAN …… 2
　2-2　FSGS …… 2
　2-3　PEC の活性化 …… 4
　2-4　本研究の目的 …… 4
3. 略語表 …… 6
4. 実験方法 …… 7
　4-1　動物および試薬 …… 7
　4-2　CsAN マウスモデル作成プロトコールの詳細 …… 7
　4-3　腎機能、CsA 血中濃度、尿蛋白 …… 7
　4-4　腎病理組織学的解析 …… 8
　　4-4-1　尿細管障害の検討方法
　　4-4-2　動脈肥厚の検討方法
　　4-4-3　硬化病変の検討方法
　　4-4-4　足突起癒合の検討方法
　4-5　免疫組織学的検討と定量 …… 9
　　4-5-1　免疫組織学的検討に用いた一次抗体
　　4-5-2　免疫組織学的検討
　　4-5-3　免疫組織染色の定量的解析
　4-6　統計学的分析方法 …… 11
5. 結果 …… 11
　5-1　CsAN 群の体重・腎機能・尿蛋白の推移 …… 11
　5-2　CsAN 群の腎病理組織学的変化 …… 11
　5-3　CsAN 群の糸球体 CD44 発現の変化 …… 12
　5-4　CsAN 群におけるポドサイトおよび PEC マーカー発現の検討 …… 12
　5-5　糸球体における CD44 陽性 PEC の出現とポドサイト傷害との関係 …… 12
6. 考察 …… 13
7. 総括および結論 …… 15

8. 謝辞 ····· 16
9. 引用文献 ····· 16

1. 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に発表した。

1. Asako Hayashi, Takayuki Okamoto, Yasuyuki Sato, Takeshi Yamazaki, Toshiyuki Takahashi, Tadashi Ariga

   The role of CD44-positive glomerular parietal epithelial cells in the mouse model of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity.
   The American Journal of Pathology (投稿中) (2016)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Asako Hayashi, Takayuki Okamoto, Yasuyuki Sato, Takeshi Yamazaki, Toshiyuki Takahashi, Tadashi Ariga

   Activated parietal epithelial cells in CsA-induced nephropathy and its association with the podocyte injury.
   17th congress of the International Pediatric Nephrology Association, September 23, 2016, Iguazu, Brazil.

2. 緒言

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おり、その有用性が示されてきた。一方、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。このような状況下における問題の１つとしてCsAによる腎毒性であるシクロスポリン腎症（CsA-induced nephropathy: CsAN）が挙げられる[1]。CsAN には急性 CsAN と慢性 CsAN に分けられ、慢性 CsAN は不可逆的な構造変化を伴うため、早期の発見、介入が重要である。

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[2]。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が詳細な機序は明らかになっていない。本項ではまず、慢性 CsAN、FSGS の現在の位置づけおよび問題点に言及し、本研究の目的について述べる。

2-1 慢性 CsAN

CsA による慢性毒性の発症機序については、これまでの報告によると、細血管の収縮因子や拡張因子のバランスの破綻、レニンアンジオテンシン系が亢進した結果などにより、血管の攣縮が起こり、細動脈の硝子化肥厚により、糸球体が虚血に陥り硬化への進行がみられる。また、CsA による尿細管上皮細胞への直接的な侵襲、炎症細胞浸潤、TGF-β などのサイトカイン発現誘導等の関連が指摘されているが未だに CsAN の主たる因子の解明はされていない[2,3]。慢性 CsAN の主な病変の発現部位は動脈、尿細管、糸球体があげられる。動脈病変では閉塞性細動脈病変、尿細管病変では縞状間質線維化、糸球体病変では巣状分節性硬化を認める[2,3]。これまで慢性 CsAN における、動脈病変、尿細管病変についての研究は多数なされてきたが、動物モデルを用いた糸球体病変についての報告は極めて少ない[4,5]。

2-2 FSGS

FSGS は慢性 CsAN の糸球体病変の一つであり、慢性腎臓病の中でも特に末期腎不全に至る可能性が高い原発性糸球体疾患である[6,7]。FSGS はステロイド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、最終的には末期腎不全に至るなど、きわめて難治性の経過をたどる[6]。FSGS の病変は多様であり、perihilar variant、tip variant、cellular variant、collapsing

variant 、not otherwise specified （NOS）variant という 5 つの形態学的バリアントが存在する。特に CsAN では perihilar variant と collapsing variant がみられる[8]。FSGS には原因のわかっていない一次性（特発性）FSGS と原因の明らかな二次性（続発性）FSGS にわけられ、特発性 FSGS では後天的に何らかの原因によって発症し、液性因子の関与が推察されている。一方、続発性 FSGS には Podocin、WT-1 をはじめとする遺伝子異常によって発症する遺伝性 FSGS、ウィルス感染、薬剤、膀胱尿管逆流現象、低形成腎などのネフロンの減少による残存ネフロンの減少に伴う代償反応への適応としておこる FSGS が知られている。また糖尿病性腎症や慢性糸球体腎炎を含む多くの慢性腎疾患の進展過程に共通な病態と考えられることから、その発症・進展機序の解明や新たな診断・治療の開発は慢性腎臓病全般の治療対策につながりうる[6,8]。

一次性、二次性に共通して FSGS は糸球体臓側上皮細胞（podocyte: ポドサイト）の傷害により、糸球体濾過機能の減少を伴なう進行性糸球体硬化をきたす代表疾患である[7,9]。

近年の研究から、FSGS においては種々の原因によって生じたポドサイト傷害に伴う進行性の喪失が、FSGS の発症・進展を引き起こす共通の一時的な要因であることが明らかになってきた[7,9]。ポドサイト傷害から糸球体硬化の発症、進展機序に関するいくつかの知見を以下にまとめる。まず、上記にあげたような種々の要因によりポドサイト傷害が生じると、ポドサイトが糸球体基底膜（glomerular basement membrane: GBM）から剥離し、GBM の尿腔側が露出する。引き続いて糸球体を囲むボウマン嚢を尿腔側から覆う壁側上皮細胞（glomerular parietal epithelial cell: PEC）の GBM 側への遊走・浸潤、尿腔内へ増殖病変（半月体）の形成が FSGS 進展へとつながる[10-12]。以上述べた様に、FSGS の進展過程においては、その一次的要因とされるポドサイト傷害を契機として糸球体固有細胞や炎症細胞の増殖や遊走、癒着・接着などの事象が複合的に関与するが、その中でも近年 PEC の動態は硬化病変形成の鍵となる因子の一つと考えられるようになった[13-15]。近年、数多くの腎疾患において、PEC はその形態、および機能を変化させながら病変の形成に深く関わっていることが示唆されるようになった[13]。PEC は尿腔を挟んで、ポドサイトに対向して存在し、ボウマン嚢を裏打ちしている糸球体を構成する上皮細胞の一つである。正常糸球体においては、極めて扁平な細胞群であり、小さな核と扁平な細胞質を有する上皮細胞である[16]。一方、前述のような腎疾患に関与する PEC の状態を「PEC の活性化」と称し、近年活性化 PEC の病

変形成の関与の解明が試みられている[13-15]。

2-3　PEC の活性化

活性化した PEC は形態学的には、核は腫大・円形化し、細胞質は膨化し、全体的に球状の形態を示すようになる。また機能的には細胞増殖能や、遊走能を獲得し、半月体形成や癒着、硬化病変の形成に関与するようになると考えられている[13]。さらに活性化 PEC は細胞外基質の増生を誘導し、糸球体硬化に関与するようになる[14,17]。ポドサイトが傷害をうけた結果、ポドサイトの喪失がおこり、GBM が露出すると、活性化 PEC は露出した GBM へ遊走し細胞外基質の産生、または誘導することにより FSGS の硬化病変形成に深く関与していることが明らかになってきている[13-15]。また、一方で活性化 PEC は傷害を受けたポドサイトや近位尿細管細胞の補完に関与する progenitor cell としての役割も注目されるようになってきている[18,19]。Smeets らは硬化病変形成糸球体腎炎モデル動物における PEC の動態を観察し、PEC の活性化を示すマーカーとして CD44 が新規に発現することを報告した[14]。CD44 はヒアルロン酸やオステオポンチンなど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与する糖蛋白であり、細胞-細胞間、細胞-基質間接着に関連した細胞接着、細胞骨格維持、遊走や接着などの事象に積極的に関与する[20]。癌領域においては細胞の増殖、浸潤や転移、アポトーシス等に積極的に関連する因子として近年注目されている[21]。

最近我々のグループも、代表的な FSGS 動物モデルであるアドリアマイシン腎症マウス（adriamycin-associated nephropathy mouse）を用いて、糸球体硬化病変形成過程において、CD44 陽性活性化 PEC の出現頻度と、ポドサイト傷害の重症度に相関がみられる事を報告した[22]。さらに、最近になって、ヒト腎疾患においての診断マーカーとしての有用性も報告されるようになっており、FSGS の移植後再発の早期マーカーや[23]、微小変化型ネフローゼと FSGS の鑑別として CD44 が有用であることが示されるようになった[15]。

2-4　本研究の目的

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の喪失、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、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 の糸球体発現を中心に検討し、本モデルにおいても病変進行と共に CD44 の新規発現とその増強を認めることを見出した。また、CsAN の進行が極めて緩徐であることから、PEC の活性化の発現やその増強はポドサイト傷害の進行のタイミングと相関し、硬化病変形成よりもかなり早期の段階で発現することを見出した。そこで硬化病変形成における CD44 陽性活性化 PEC の動態、及び FSGS の一時的要因とされるポドサイト傷害と活性化 PEC の出現との関連性について、病理組織学的な解析を試みた。また、CsAN マウスモデルにおける投与期間の違いを起因とする病変重症度の違いを利用して、ポドサイト傷害の重症度と CD44 陽性活性化 PEC 出現の相関に関して解析した。

3. 略語表

本文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
CNI	calcineurin inhibitor
CsA	cyclosporine A
CsAN	cyclosporine A induced nephropathy
Cy3	cyanine 3
Cy5	cyanine 5
DAB	diaminobenzidine
ELISA	enzyme linked immune sorbent assay
FITC	fluorescein isothiocyanate
FPE	foot process effacement
FSGS	focal segmental glomerulosclerosis
GBM	glomerular basement membrane
HE	hematoxylin-eosin
ICR	institute of cancer research
NOS	not otherwise specified
PAS	periodic acid-Schiff
PEC	parietal epithelial cell
PLP	periodate-lysine-paraformaldehyde
RIA	radioimmunoassay
WT-1	Wilms’ tumor-1

4. 実験方法

4-1 動物および試薬

今回の実験において、FSGS における PEC の活性化を解析するために CsAN マウスを用いた。CsAN マウスの作製については、マウスの系統、性別、週齢、CsA 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。本実験では、他の報告でも使用頻度が高く、かつ CsA に対する感受性の高い Slc-ICR（institute of cancer research）雄マウス（三協ラボサービス社、東京、日本）を用いた[24]。CsA の投与量に関しては、過去の報告を参考にしながら、予め予備実験をした上で血中濃度を測定しながら決定した。準備実験では、30 mg/kg の CsA（SRL 社、東京、日本）を連日皮下注射し検討したが、血中濃度を 1500～2000 ng/ml に保つことが、最も安定して FSGS の病理像が観察出来る条件であることから[25]、血中濃度を上記に保つように投与日数を調整した。

本実験で行っ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」に基づいて施行した。

4-2 CsAN マウスモデル作製プロトコールの詳細

生後 5 週齢 ICR 雄マウス（体重 25～27 g）を、光、温度環境を調整し飼育室のケージにて飼育した。検討に際しては、CsA 投与群（CsAN 群：CsA、n=34）とコントロール群（コントロール群：Control、n=24）を設けた。過去の報告より、CsAN 作成に有効とされる、低ナトリウム制限餌を用いた[24,25]。CsA 投与開始の 7 日前からナトリウム制限餌（0.01 % 低塩飼料、Research Diets、米国）にてプレコンディショニングを施行した。プレコンディショニングが終了した後、CsAN 群では 6 週齢から CsA 30 mg/kg（オリーブオイルにより 15 mg/ml に希釈）を皮下注射により投与した。他方、コントロール群にはオリーブオイル 2 ml/kg を同様に皮下投与した。CsA またはオリーブオイル投与後、1、2、4、12、20、25 週時に屠殺し採血、採尿、腎組織の採取を行い、解析した。血漿は 4 ℃で遠心分離後測定まで -80 ℃で凍結保存とした。

4-3 腎機能、CsA 血中濃度、尿蛋白

屠殺時に採取した血液により、血清クレアチニンを ELISA（enzyme linked immune sorbent assay）法によって測定し、腎機能を評価した。また CsA 血中濃度は尾静脈から定期的に採血し、血漿濃度を RIA（radioimmunoassay）

法にて測定した。CsA 血中濃度は過去の報告[25]から、げっ歯類の CsA 腎症作製のために有効と報告されている 1500 ng/ml から 2000 ng/ml の範囲となるように調整した。尿蛋白、尿クレアチニン濃度は屠殺時、または実験中に採取し、ELISA 法によって測定した。測定は、株式会社エスアールエルへ依頼した。

4-4　腎病理組織学的解析

腎組織は、新鮮凍結、periodate-lysine-paraformaldehyde（PLP）固定及びホルマリン固定を行い、標本を作成した。新鮮凍結、または PLP 固定標本はクライオスタットで 3-4 μｍに薄切し各種免疫組織学的検討を行った。ホルマリン固定標本は、10％ホルマリンによる固定後に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 μｍの薄切切片を作製し、薄切切片に対し、ヘマトキシリン・エオジン（hematoxylin-eosin: HE）染色、および 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、日本）にて撮影した画像を用いた。また、同じく採取した腎臓を 3 %グルタルアルデハイドによる固定後、1 %オスミウム固定を行い、エタノールによる脱水処理、エポキシ樹脂（Epon 812、応研、東京、日本）への包埋を行った。超薄切ミクロトーム（Leica Reichert、Bensheim、ドイツ）により試料を 70-80 nm 厚に薄切し、ウラン、鉛染色後に透過型電子顕微鏡（JEM-1400 Plus、日本電子、東京、日本）による観察を行った。

4－4－1　尿細管障害の検討方法

PAS 染色標本を用い、デジタル顕微鏡カメラ装置（DP20、オリンパス光学工業、東京、日本）画像解析ソフト（DP2 BSW、オリンパス光学工業、東京、日本）により、100 倍の倍率で重複しない任意の 10 ヶ所を撮影し、腎皮質領域に占める尿細管萎縮、間質線維化の面積の割合を定量評価した。そして、尿細管障害の占める面積の割合により、次のように半定量化を行った[26]。

Tubular injury score 0; 尿細管障害なし、0.5;<5%、1.0;5～20%、 1.5;21～35%、2.0;36～50%、2.5;51～65%、3.0＞65%

4－4－2　動脈肥厚の検討方法

CsAN では、糸球体の輸出または輸入細動脈が硝子化肥厚することが報告さ

れている。そこで、PAS 染色標本を用い、4－4－1 と同様の解析装置を用いて、1 検体あたり最低 50 個以上の輸入または輸出細動脈を観察し、各動脈の内壁の厚さの平均値を算出した[27]。

4－4－3　硬化病変の検討方法

PAS 染色標本を用い、100 個以上の糸球体を観察し得た検体にて検討た。分節性または全節性硬化を呈する糸球体の割合を算出した。

4－4－4　足突起癒合の検討方法

ポドサイト足突起癒合は、ポドサイト傷害を鋭敏に反映する電子顕微鏡的所見の一つとして知られる。我々は、ポドサイト傷害の評価を行うことを目的として、ポドサイト足突起癒合の定量的評価を下図に示す方法で行った。すなわち、糸球体の各血管係蹄の全長を測定し、血管係蹄長に占める足突起の数を算出することで、各血管係蹄 10 μm あたりの足突起数を計算した。これを、CsAN 群、コントロール群ともに 1 個体につき最低 2 個の糸球体、1 糸球体につき 3 係蹄以上を評価し、足突起癒合の程度に関する比較検討を行った[28]。

4-5　免疫組織学的検討と定量

4－5－1 免疫組織学的検討に用いた一次抗体

免疫組織学的解析には、過去の我々の報告に従って施行した。一次抗体は以下のものを用いた。ラット抗マウス CD44 抗体（BioLegend 社、CA、カリフォルニア州、米国)、ウサギ抗マウス Claudin-1 抗体（Abcam 社、ケンブリッジ、MA、米国)、ウサギ抗マウス Wilms’tumor-1（WT-1）抗体（Santa Cruz 社、CA、米国)、ウサギ抗マウス Podocin 抗体（Sigma-Aldrich 社、セントルイス、MO、米国)、ウサギ抗マウス Synaptopodin 抗体（Sigma-Aldrich 社、セントルイス、MO、米国)、ヤギ抗マウス Synaptopodin 抗体（Santa Cruz 社、CA、米国)。

4－5－2 免疫組織学的検討

蛍光抗体法では、過去の報告に従って新鮮凍結腎組織をクライオスタットにより厚さ 4 μm の薄切切片を作製し、間接蛍光抗体法にて検討した。切片を PBS にて洗浄後、二次抗体と同じ動物種の正常血清にてブロッキング処理を行った後、一次抗体と一晩 4 ℃で反応させた。その後、二次抗体として、

fluorescein isothiocyanate（FITC）、cyanine 3（Cy3）標識抗ウサギまたは抗ヤギ IgG、cyanine 5（Cy5）標識抗ヤギ IgG 抗体を反応させ、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製し、一晩 4℃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。標本は共焦点レーザー走査型顕微鏡（FV10i、OLYMPUS 社、東京、日本）にて撮影し、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。4 μm 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、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。抗原の賦活化には Histo VT one(ナカライテスクス社、京都、日本)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®EliteABC キット（Vector Laboratories 社、米国）を使用した。またペルオキシダーゼの基質には DAB(MerckMillipore 社、Darmstadt、ドイツ）を選択し、核染色にはメチルグリーン（Vector Laboratories 社、米国)、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。

4－5－3 免疫組織染色の定量的解析

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、1 検体につき 100 個以上の糸球体で評価し、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。

これまでの報告によれば、ポドサイト傷害が生じることによって、Podocin、WT-1 をはじめとする各ポドサイトマーカーの免疫組織学的発現性の低下を認めることが知られている。今回我々は、CsAN 群、コントロール群におけるポドサイト傷害の重症度を継時的に定量評価する事を目的に、Podocin、WT-1 の各蛋白の免疫組織学的発現を下記に示す方法で定量化し、比較検討した。

Podocin score を各糸球体の Podocin 発現面積に従ってスコア化し、半定量的評価を行った。スコア 0; 発現なし、1; <25 %、2; 25～50 %、3; 50～75 %、4; >75 %。100 個以上糸球体が観察できる検体で検討した。

WT-1 の発現については、画像解析ソフト（DP2 BSW、オリンパス光学工業、東京、日本）を用いて糸球体の係蹄で囲まれる面積を測定し、同一糸球体における WT-1 陽性細胞数を測定し、単位面積あたり（mm^2）の WT-1 陽性細胞

数で表した。各検体 100 個以上の糸球体を評価し、各検体の WT-1 陽性細胞数を平均化して比較検討した[29]。

4-6　統計学的分析方法

すべての統計学的数値は平均±標準偏差で表示した。2 群間の比較には Unpaired t test または Mann Whitney U test を用いた。解析ソフトウエアは、JMP software（version 11.0.0、SAS Institute Inc.、NC、米国）を使用した。すべての解析において統計学的有意水準を 5 %に設定した。

5.　実験結果

5-1　CsAN 群の体重・腎機能・尿蛋白の推移

CsAN 群およびコントロール群における、CsA あるいはオリーブオイル投与から 1 週後（1w)、2 週後（2w)、4 週後（4w)、12 週後（12w)、20 週後（20w)、25 週後（25w）の体重、血清クレアチニン、尿蛋白クレアチニン比を検討した。CsAN 群ではコントロール群に比して、体重減少、血清クレアチニンの増加傾向を認めた。また 12 週までの観察では尿蛋白クレアチニン比の増加を認めなかった。

5-2　CsAN 群の腎病理組織学的変化

CsAN 群の腎障害の程度を腎病理組織学的に検討するため、光学顕微鏡を用いて、糸球体硬化病変、尿細管障害、動脈病変についての定量的、または半定量的解析を行った。

CsAN 群では CsA 投与 20 週後から分節性または一部全節性硬化病変が有意に出現した。

また、尿細管間質に関しては、CsAN 群がコントロール群に比べて CsA 投与 1 週後より有意な尿細管間質障害の増悪を認めた。CsAN 群の間質では尿細管間質の線維化、尿細管の萎縮、炎症細胞の浸潤を認めた。

動脈病変に関しては、CsAN 群ではコントロール群に比べて CsA 投与 4 週後から輸出入動脈の硝子化肥厚を認めた。

以上より、CsAN 群においては、糸球体、尿細管間質、動脈ともに従来の慢性 CsAN の病理組織学的特徴を有しており、それぞれコントロール群と有意差をもつ変化であったことより、CsA による病理組織学的変化と考えられた。

5-3　CsAN 群の糸球体 CD44 発現の変化

次に、糸球体における CD44 の発現の推移を半定量的に解析した。また、免疫組織学的に CD44 の発現部位についても経時的に検討を行った。

CD44 発現の半定量的解析では、コントロール群では糸球体 CD44 の発現は有意な変化を認めなかった。一方、CsAN 群では、硬化病変の出現時期に比して、より早期にあたる CsA 投与 2 週後から、一部の糸球体に CD44 の発現を認めた。その後、CD44 陽性糸球体数は増加傾向を示した。

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。また、硬化病変の形成がみられた 20 週以降では、糸球体血管係蹄上皮側、硬化病変部位に CD44 の発現を認め、一部はボウマン嚢と係蹄の間に CD44 陽性細胞の架橋形成を認めた。

5-4　CsAN 群におけるポドサイトおよび PEC マーカーの発現の検討

次に我々は糸球体 CD44 陽性細胞の起源を推察するために、共焦点顕微鏡を用いて、糸球体における CD44、ポドサイトマーカー、PEC マーカーの共発現の解析を行った。コントロール群では CD44 の発現はみられず、PEC マーカーである Claudin-1 の発現のみが確認された。

一方、CsA 投与後 4 週では、糸球体 CD44 陽性細胞は、解剖学的にポドサイトの対側に位置し、PEC マーカーである Claudin-1 との共発現性を示したのに対し、ポドサイトマーカーである Synaptopodin との共発現性は認めなかった。

以上の結果から、CsAN 群において観察される糸球体 CD44 陽性細胞は PEC 由来であることが推察された。

5-5　糸球体における CD44 陽性 PEC の出現とポドサイト傷害との関係

これまでの結果から、糸球体における CD44 陽性 PEC の出現とポドサイト傷害とが深く関与していることが示唆された。そこで、我々は、両者の関係性をより明らかにするために、糸球体 CD44 分子発現とポドサイト傷害を経時的かつ定量的に評価することを試みた。

ポドサイト傷害の評価は、免疫組織学的解析によるポドサイトマーカー（WT-1、Podocin）の発現の低下と、電子顕微鏡によるポドサイト足突起癒合（foot process effacement）の増加を用い、それぞれ定量的、経時的解析を行った。本研究で用いたポドサイトマーカー発現および、ポドサイト足

突起癒合の定量的評価方法に関しては、「実験方法」4-4-4 中に記載した。

ポドサイトマーカー発現の解析では、コントロール群では WT-1 の発現は有意な変化を認めなかった。一方 CsAN 群では CsA 投与 20 週後から糸球体内の単位面積あたりの WT-1 陽性細胞数の低下を認めた。同じくポドサイトマーカーの一つである Podocin 発現の解析では、WT-1 と同様、CsA 投与 20 週後から有意な減少を認めた。

次に、共焦点顕微鏡を用いて、ポドサイトマーカーである Synaptopodin と CD44 の発現に関して観察した。CsA 投与後 4 週では、CD44 発現を認める糸球体においても、Synaptopodin の発現の低下は認めなかったのに対し、CsA 投与後 25 週においては、PEC に CD44 の発現が増強している部位に接する Synaptopodin の発現の低下を認めた。次にポドサイトの足突起癒合率は CsA 投与 2 週後からコントロール群と比して有意な増加を認め、CsA 投与 25 週まで漸増傾向を示した。

以上、糸球体における CD44 分子発現とポドサイト傷害の定量的評価、および発現部位の解析から、糸球体 CD44 陽性細胞の出現とポドサイト傷害との深い関与が示された。前述したように、糸球体における CD44 分子発現は、CsA 投与 2 週後から一部の糸球体に出現し、その後漸増傾向を認めた。つまり、CD44 分子はポドサイト傷害を反映する極軽度の足突起癒合と同時期から発現し、ポドサイトマーカーの発現低下よりもさらに早期の段階で発現することが示された。

6. 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り、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。

CsA は移植領域、自己免疫性疾患、腎疾患治療において、欠かせない薬剤となっているが、これらの治療は長期にわたるため、不可逆的な構造変化を伴う慢性 CsAN が問題となる [1]。慢性 CsAN の糸球体病変の一つである FSGS[2] 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 [7,9]。近年 FSGS の形成に関して、尿腔を挟んで、ポドサイトに対向して存在する PEC の活性化が重要であることが報告されるようになった [13-15]。活性化した PEC は細胞増殖能や、遊走能を獲得し、半月体形成や癒着、硬化 病変の形成に関与し [13]、さらに活性化 PEC は細胞

外基質の増生を誘導し、糸球体硬化に関与する[14,17]。これまでに FSGS 実験モデルを用いて、活性化した PEC では CD44 が新規に発現することが示され[14]、糸球体硬化病変は PEC が主体となって形成され、中でも CD44 陽性活性化 PEC が重要な役割を果たしていることが報告された。我々のグループでは過去に、FSGS 動物モデルとして代表的なモデルであるアドリアマイシン腎症マウスを用いて、糸球体硬化病変形成過程において、CD44 陽性活性化 PEC の出現頻度と、ポドサイト傷害の病変重症度に相関がみられる事を報告した。さらに、糸球体 CD44 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示した[22]。

本研究での CsAN においても PEC や血管係蹄上皮側、硬化病変部位に CD44 発現の増加を認めた。さらに CD44 の新規発現と発現の増強は、ポドサイト傷害の指標であるポドサイトの足突起癒合、ポドサイトマーカーの発現低下と相関しており、さらに一部糸球体では 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、血管係蹄側での CD44 発現も認めた。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。

今までのアドリアマイシン腎症マウスを含めた 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[4,30]、マウスやラットなどの齧歯類では 1 年以上かかる[31]とされている。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とはいえず、慢性 CsAN は FSGS モデルとしては一般的ではない[32]。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。

そこでわれわれは本研究において CsAN マウスモデルを用いることによって、CsA 投与開始 1 週後より尿細管間質障害、2 週後より足突起癒合を認め、同時期から PEC への CD44 発現を確認した。その後、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が増加するのに相関して、PEC への CD44 発現の増加を認めた。さらに CsA 投与後 20 週で Podocin、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。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。

以上から、PEC における CD44 の発現は、FSGS 形成よりもかなり早期の段階にみられ、ポドサイト傷害を鋭敏に反映していることが示唆された。一般的に、FSGS は非可逆性の組織学的変化である[8,33]のに対して、ポドサイト傷害は可逆性の変化である[34]。特発性や、慢性 CsAN のような続発性に関わらず、ポドサイト傷害が生じると、ポドサイトが GBM から剥離し、露出した GBM を補うように PEC が GBM 側へ遊走・浸潤、尿腔内へ増殖病変形成が FSGS 進展へとつながると考えられている[10-12]。FSGS は最終的に末期腎不全に至る共通の最終経路であり早期発見が重要である。今回、我々の研究においては、最終的に FSGS に至る慢性 CsAN において、軽微なポドサイト傷害を認める段階での CD44 陽性 PEC の発現を確認した。CD44 は慢性 CsAN において FSGS の早期マーカーとなりうることが示唆された。

7. 総括および結論

今回の研究から得られた成果を総括し、今後の課題、展開、将来的展望を記すことにより、本学位論文の結びとする。

①本研究では、末期腎不全へ至る共通の最終経路である FSGS における糸球体臓側上皮細胞（ポドサイト）と糸球体壁側上皮細胞（PEC）という 2 種の異なる糸球体上皮細胞間のクロストークの意義の一部を明らかにすることを試みた。

②動物モデルとしては、シクロスポリン関連腎症マウスモデル（CsAN マウス）を用いた。CsA 投与初期から投与後 25 週までという長期間を経時的に観察することにより、ポドサイト傷害の程度と CsAN 病理像、腎機能の増悪がリンクすることが示唆された。

③CD44 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、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主にみられた。

④共焦点顕微鏡を用いて、糸球体 CD44 発現細胞の同定を行った。CD44 発現細胞は、ポドサイトマーカーである、Podocin、Synaptopodin とは共発現を示さなかった。以上から CsAN 群においてみられる 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、CsAN 群においてみられる 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。

8. 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)、そして研究グループの皆さまに心より謝辞を述べさせていただきます。

9. 引用文献

1 Myers, B. D., Sibley, R., Newton, L., Tomlanovich, S. J., Boshkos, C., Stinson, E., Luetscher, J. A., Whitney, D. J., Krasny, D., Coplon, N. S. The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int.* 33, 590-600 (1988).

2 Naesens, M., Kuypers, D. R. & Sarwal, M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 4*, 481-508 (2009).

3 Perico, N., Detcheva, A., Khalil, E. I. & Remuzzi, G. Cyclosporine induces glomerulosclerosis: three-dimensional definition of the lesions in a rat model of renal transplant. *Kidney Int.* 49, 1283-1288 (1996).

4 Bagnis, C. I., Du Montcel, S. T., Beaufils, H., Jouanneau, C., Jaudon, M. C., Maksud, P., Mallet, A., Lehoang, P. & Deray, G. Long-term renal effects of low-dose cyclosporine in uveitis-treated patients: Follow-up study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2962-2968 (2002).

5 Snanoudj, R., Royal, V., Elie, C., Rabant, M., Girardin, C., Morelon, E., Kreis, H., Fournet, J. C., Noel, L. H. & Legendre, C. Specificity of histological markers of long-term CNI nephrotoxicity in kidney-transplant recipients under low-dose cyclosporine therapy. *Am. J. Transplant.* 11, 2635-2646 (2011).

6 D'Agati, V. D., Kaskel, F. J. & Falk, R. J. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 365, 2398-2411 (2011).

7 Berger, K. & Moeller, M. J. Podocytopenia, parietal epithelial cells and glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29, 948-950 (2014).

8 D'Agati, V. D., Alster, J. M., Jennette, J. C., Thomas, D. B., Pullman, J., Savino,

D. A., Cohen, A. H., Gipson, D. S., Gassman, J. J., Radeva, M. K., Moxey-Mims, M. M., Friedman, A. L., Kaskel, F. J., Trachtman, H., Alpers, C. E., Fogo, A. B., Greene, T. H. & Nast, C. C. Association of Histologic Variants in FSGS Clinical Trial with Presenting Features and Outcomes. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 399-406 (2013).

9 Wharram, B. L., Goyal, M., Wiggins, J. E., Sanden, S. K., Hussain, S., Filipiak, W. E., Saunders, T. L., Dysko, R. C., Kohno, K., Holzman, L. B. & Wiggins, R. C. 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).

10 Wiggins, R. C. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 71, 1205-1214 (2007).

11 Shankland, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 69, 2131-2147 (2006).

12 Mundel, P. & Shankland, S. J. Podocyte biology and response to injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 3005-3015 (2002).

13 Shankland, S. J., Smeets, B., Pippin, J. W. & Moeller, M. J. The emergence of the glomerular parietal epithelial cell. *Nat. Rev. Nephrol.* 10, 158-173 (2014).

14 Smeets, B., Uhlig, S., Fuss, A., Mooren, F., Wetzels, J. F., Floege, J. & Moeller, M. J. Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2604-2615 (2009).

15 Smeets, B., Stucker, F., Wetzels, J., Brocheriou, I., Ronco, P., Grone, H. J., D'Agati, V., Fogo, A. B., van Kuppevelt, T. H., Fischer, H. P., Boor, P., Floege, J., Ostendorf, T. & Moeller, M. J. 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).

16 Ohse, T., Pippin, J. W., Chang, A. M., Krofft, R. D., Miner, J. H., Vaughan, M. R. & Shankland, S. J. The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney Int.* 76, 1225-1238 (2009).

17 Smeets, B., Kuppe, C., Sicking, E. M., Fuss, A., Jirak, P., van Kuppevelt, T. H., Endlich, K., Wetzels, J. F. M., Grone, H. J., Floege, J. & Moeller, M. J. Parietal Epithelial Cells Participate in the Formation of Sclerotic Lesions in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 1262-1274 (2011).

18 Smeets, B., Angelotti, M. L., Rizzo, P., Dijkman, H., Lazzeri, E., Mooren, F.,

Ballerini, L., Parente, E., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Ronconi, E., Becherucci, F., Benigni, A., Steenbergen, E., Lasagni, L., Remuzzi, G., Wetzels, J. & Romagnani, P. Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 2593-2603 (2009).

19 Appel, D., Kershaw, D. B., Smeets, B., Yuan, G., Fuss, A., Frye, B., Elger, M., Kriz, W., Floege, J. & Moeller, M. J. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 333-343 (2009).

20 Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 33-45 (2003).

21 Weber, G. F., Bronson, R. T., Ilagan, J., Cantor, H., Schmits, R. & Mak, T. W. Absence of the CD44 gene prevents sarcoma metastasis. *Cancer Research* 62, 2281-2286 (2002).

22 Okamoto, T., Sasaki, S., Yamazaki, T., Sato, Y., Ito, H. & Ariga, T. Prevalence of CD44-Positive Glomerular Parietal Epithelial Cells Reflects Podocyte Injury in Adriamycin Nephropathy. *Nephron Exp. Nephrol.* 124, 11-18 (2013).

23 Fatima, H., Moeller, M. J., Smeets, B., Yang, H. C., D'Agati, V. D., Alpers, C. E. & Fogo, A. B. Parietal epithelial cell activation marker in early recurrence of FSGS in the transplant. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 1852-1858 (2012).

24 Yang, C. W., Faulkner, G. R., Wahba, I. M., Christianson, T. A., Bagby, G. C., Jin, D. C., Abboud, H. E., Andoh, T. F. & Bennett, W. M. Expression of apoptosis-related genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity in mice. *Am. J. Transplant.* 2, 391-399 (2002).

25 Doh, K. C., Lim, S. W., Piao, S. G., Jin, L., Heo, S. B., Zheng, Y. F., Bae, S. K., Hwang, G. H., Min, K. I., Chung, B. H. & Yang, C. W. Ginseng treatment attenuates chronic cyclosporine nephropathy via reducing oxidative stress in an experimental mouse model. *Am. J. Nephrol.* 37, 421-433 (2013).

26 Andoh, T. F., Lam, T. T., Lindsley, J., Alpers, C. E. & Bennett, W. M. Enhancement of chronic cyclosporine nephrotoxicity by sodium depletion in an experimental mouse model. *Nephrology* 3, 471-478 (1997).

27 Perez-Rojas, J., Blanco, J. A., Cruz, C., Trujillo, J., Vaidya, V. S., Uribe, N., Bonventre, J. V., Gamba, G. & Bobadilla, N. A. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 292, F131-139 (2007).

28 Lindskog, A., Ebefors, K., Johansson, M. E., Stefansson, B., Granqvist, A., Arnadottir, M., Berg, A. L., Nystrom, J. & Haraldsson, B. Melanocortin 1 receptor agonists reduce proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1290-1298 (2010).

29 Zhang, J., Hansen, K. M., Pippin, J. W., Chang, A. M., Taniguchi, Y., Krofft, R. D., Pickering, S. G., Liu, Z. H., Abrass, C. K. & Shankland, S. J. De novo expression of podocyte proteins in parietal epithelial cells in experimental aging nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 302, F571-580 (2012).

30 Paller, M. S., Cahill, B., Harmon, K. R., Miller, R. B., Sinaiko, A. R., Burke, B. & Manivel, J. C. Glomerular disease and lung transplantation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 26, 527-531 (1995).

31 Perico, N., Detcheva, N., Khalil, E. I. & Remuzzi, G. Cyclosporine induces glomerulosclerosis: Three-dimensional definition of the lesions in a rat model of renal transplant. *Kidney Int.* 49, 1283-1288 (1996).

32 Pippin, J. W., Brinkkoetter, P. T., Cormack-Aboud, F. C., Durvasula, R. V., Hauser, P. V., Kowalewska, J., Krofft, R. D., Logar, C. M., Marshall, C. B., Ohse, T. & Shankland, S. J. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 296, F213-229 (2009).

33 Cravedi, P., Kopp, J. B. & Remuzzi, G. Recent Progress in the Pathophysiology and Treatment of FSGS Recurrence. *Am. J. Transplant.* 13, 266-274 (2013).

34 Tondel, C., Kanai, T., Larsen, K. K., Ito, S., Politei, J. M., Warnock, D. G. & Svarstad, E. Foot process effacement is an early marker of nephropathy in young classic Fabry patients without albuminuria. *Nephron* 129, 16-21 (2015).