

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

Heparan Sulfate 6-O-EndoSulfatases, Sulf1 and
Sulf2, Regulate Glomerular Integrity by Modulating
Growth Factor Signaling

(ヘパラン硫酸 6-O-エンドスルファターゼは
成長因子シグナル伝達を調整し
糸球体構造と機能の維持に関与する)

2016

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

高 島 康 利

目次

1. 要約	P. 3
2. 背景	P. 5
(i) 腎臓の構造と機能	
(ii) 腎臓に存在する細胞外マトリックス ～ ヘパラン硫酸 ～	
(iii) ヘパラン硫酸と sulfatase1、sulfatase2 による成長因子シグナル伝達調節	
(iv) ヒト糖尿病性腎症と糖尿病モデルマウス	
(v) 糸球体恒常性維持に関与する成長因子シグナル伝達調節	
3. 目的	P. 19
4. 対象と方法	P. 20
5. 結果	P. 38
6. 考察	P. 50
7. 結論	P. 61
8. 謝辞	P. 62
9. 図表の説明	P. 63
10. 参考文献	P. 71
11. 図	
12. 表	

1. 要約

腎臓糸球体の恒常性維持には糸球体構成細胞間の成長因子シグナル伝達が関与している。ヘパラン硫酸はプロテオグリカンのコア蛋白質に共有結合した二糖繰り返し配列で構成される糖鎖であり、細胞表面または細胞間に存在する。ヘパラン硫酸は、成長因子とその受容体との相互作用を介して細胞間の成長因子シグナル伝達を制御することで、細胞分化や細胞増殖を調節する。糸球体においても基底膜やメサンギウム基質にヘパラン硫酸が存在するため、糸球体内成長因子シグナル伝達の制御にはヘパラン硫酸が関与すると考えられる。

ヘパラン硫酸の二糖繰り返し配列は細胞内の一連の酵素反応により合成され、それに加えて細胞外の *endo* 型の *sulfatase* により酵素的修飾を受けることで、細胞環境に応じたヘパラン硫酸構造を維持している。*endo* 型の *sulfatase* には *Sulfatase1* (*Sulf1*)、*Sulfatase2* (*Sulf2*) の 2 つのサブタイプが存在し、糸球体内には *Sulf1* と *Sulf2* の発現を認めるため、*Sulf1*、*Sulf2* は腎臓糸球体の恒常性維持に関与すると推察した。最初に、*Sulf1*^{-/-} マウス (*Sulf1* SKO マウス)、*Sulf2*^{-/-} マウス (*Sulf2* SKO マウス)、*Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス (DKO マウス) を用いて糸球体構造と腎臓機能を分析したが、*Sulf1* SKO マウスと *Sulf2* SKO マウスの形質変化はわずかであったため、主に Wild type (WT) マウスと DKO マウスを比較した。低頻度ながらも DKO マウスではメサンギウム細胞増殖とメサンギウム基質増加、基底膜の不整像 (Out pocket: OP)、腎臓機能障害を認めた。特に DKO マウス

のメサングウム領域異常が明らかであったため、Sulf1、Sulf2 はメサングウム細胞の分化、増殖、生存に關与する Platelet derived growth factor-B (PDGF-B)や Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Transforming growth factor- β (TGF- β)の細胞間シグナル伝達を制御していると考えた。*in vivo* のヘパラン硫酸構造を保持した糸球体をマウスから単離、培養し、成長因子刺激実験を行い細胞内下流因子(Akt、Erk、Smad2/3)のリン酸化を Western blot 法で定量した。DKO マウス由来糸球体では PDGF-B、VEGF、TGF- β シグナル伝達が抑制されており、Sulf1、Sulf2 は糸球体内 PDGF-B、VEGF、TGF- β シグナル伝達の促進因子であることが判明した。

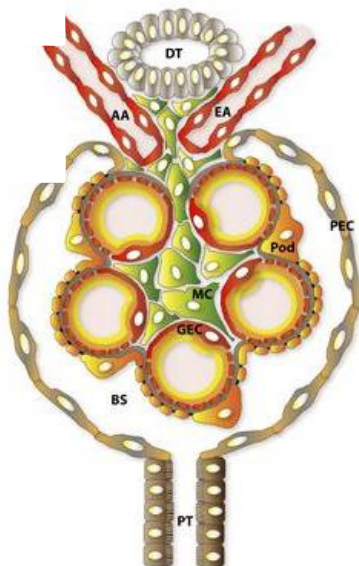
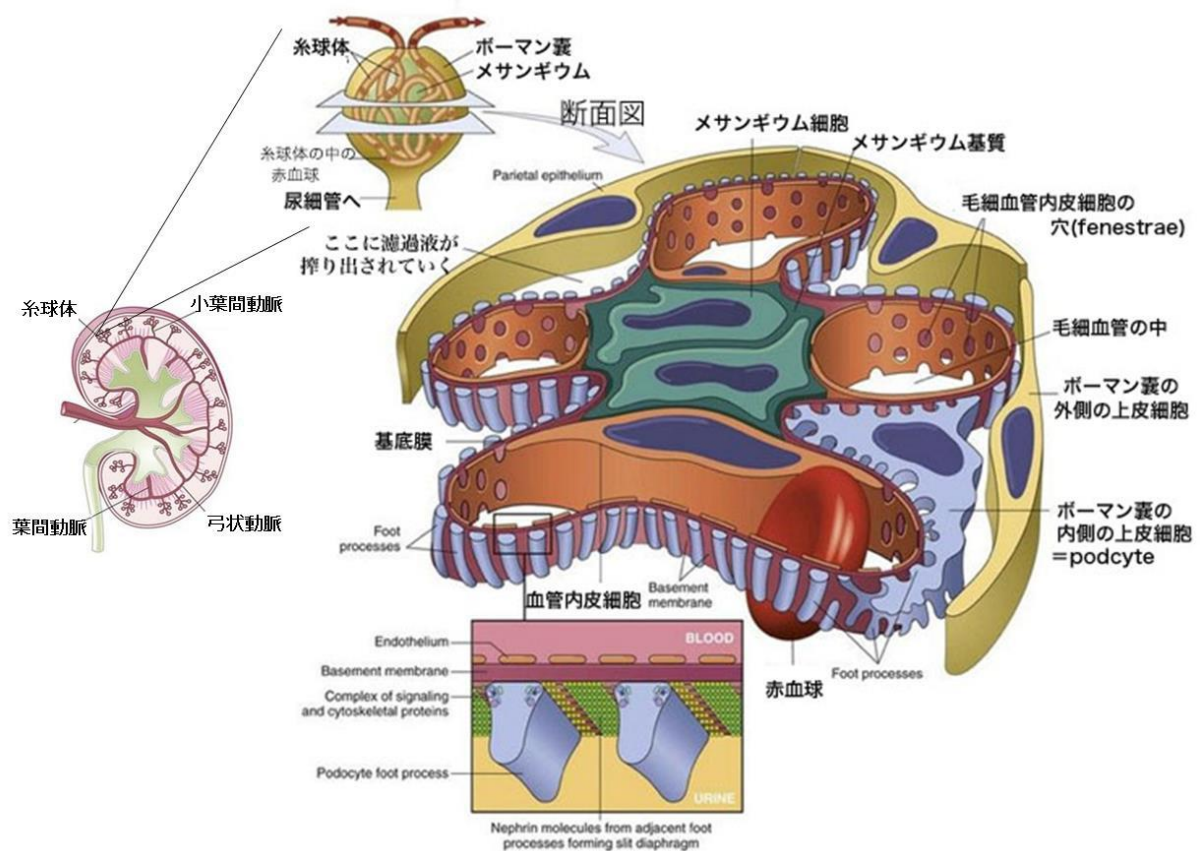
糖尿病性腎症は成長因子シグナル伝達異常を背景として発症すると考えられていることから、糖尿病性腎症モデルマウスを用いて糖尿病性腎症の進展過程における Sulf1、Sulf2 の影響を検討した。Streptozotocin(STZ)で誘導した糖尿病発症 WT マウスでは糸球体内 Sulf1、Sulf2 mRNA 発現量が共に増加していた。このことから、Sulf1、Sulf2 は高血糖環境下の糸球体メサングウム領域に対し保護的に作用していたと考えられる。、さらに糖尿病発症にともない、WT マウスでは糸球体内で成長因子のシグナル活性化を示すリン酸化 Akt が増加するのに対して、DKO マウスではそれが検出されなかった。これは、単離糸球体培養実験の結果と一致した。病態生理学的観点から Sulf1、Sulf2 は糸球体の成長因子シグナル伝達に対して促進的に働くことで、糸球体構造と機能を維持する重要な分子である考えられた。

2. 背景

(i) 腎臓の構造と機能

腎臓は細胞内液、細胞外液に含まれる溶質と水分を排泄することで、生体の内部環境を保持する重要な役割を担っている。腎臓での溶質、水分排泄機能にとって最も重要な構造は血漿の限外濾過液(原尿)が形成される腎臓糸球体である(1)。糸球体の限外濾過は糸球体毛細血管での静水圧とボウマン嚢腔での静水圧の差と、糸球体毛細血管でのコロイド浸透圧とボウマン嚢腔でのコロイド浸透圧の差によって生じた糸球体毛細血管腔からボウマン嚢腔側への圧力によって調節される。糸球体毛細血管を流れる血漿成分は原尿になる際に糸球体濾過障壁を通過する。糸球体濾過障壁は血漿中の微小分子を通過させるが、血漿タンパク成分の 50～65%を占めるアルブミン(分子量: 66000, 直径: 3.6 nm)より大きな溶質は通過させない。糸球体濾過障壁は糸球体血管係蹄とも呼ばれ、血管内皮細胞、基底膜、糸球体上皮細胞(ポドサイト)が折り重なった網目構造【参考 1】を形成し大分子の濾過を妨げているだけでなく(サイズバリアー) (1-8)、硫酸化グリコサミノグリカン(ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケタラン硫酸、ヒアルロン酸)を含む種々の細胞外マトリックス成分を血管内皮細胞やポドサイトの細胞膜や基底膜に保持することで陰性荷電を帯びているため、陰性に帯電したアルブミン等のタンパクと電氣的に反発して原尿へのアルブミンやタンパク排泄を抑制する(チャージバリアー)と推測されているが賛否両論がある(3, 8-10)。

糸球体には多数の糸球体毛細血管が存在して血漿濾過に必要な表面積が十分確保されており、その糸球体毛細血管のネットワーク維持には毛細血管を束ねるメサンギウム細胞とメサンギウム基質からなるメサンギウム領域が欠かせない(1)。メサンギウム細胞は糸球体に固有な平滑筋様細胞と、単球やマクロファージ様の単核球細胞の2種類が存在するがその多くは平滑筋様細胞であり、メサンギウム領域のもう一つの構成成分であるメサンギウム基質の組成は基底膜の組成に類似している(11)。生体内の水や溶質(タンパク、電解質)が適切に保持されるためには、これらの糸球体構成細胞と細胞外マトリックスの恒常性が維持されなければならない(1-11)。



【参考 1: 正常糸球体構造】

上図: ロビンス基礎病理学 第 8 版と Cecil textbook of medicine より改変して掲載。

下図: Rizaldy P *et al. J. Cell. Biol* 209:199-210, 2014 Figure 1 より引用して掲載。

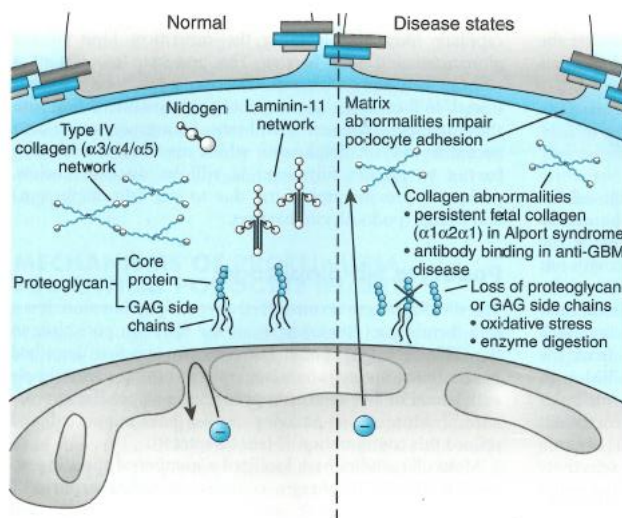
MC: Mesangial cell (メサンギウム細胞)、Pod: Podocyte (ポドサイト)、GEC: Glomerular endothelial cell (糸球体血管内皮細胞)、PEC: Parietal epithelial cell (ボーマン嚢上皮細胞)、BS: Bowman's space (ボーマン嚢腔)、PT: proximal tubules (近位尿細管)、DT: Distal tubules (遠位尿細管)、AA: afferent arteriole (輸入細動脈)、EA: efferent arteriole (輸出細動脈)。

糸球体構成細胞の分化過程や成熟後の恒常性維持、病変形成には糸球体構成細胞間の PDGF-B (12-25) や VEGF (25-34)、Fibroblast growth factor-2 (FGF2) (14-16, 25, 35)、TGF- β (34, 36, 37) 等の成長因子シグナル伝達が関与しており、細胞分化や細胞増殖、細胞外マトリックス産生増加の制御因子である。成長因子はオートクライン形式(13)やパラクライン形式(13, 21, 27-30)でシグナル伝達を行うが、いずれの形式においても細胞膜上や細胞間に存在する細胞外マトリックスとの相互作用が、成長因子と受容体との親和性や細胞外マトリックス内の拡散能を決定する重要な因子である(38,39)。

(ii) 腎臓に存在する細胞外マトリックス ～ ヘパラン硫酸 ～

糸球体では細胞間の細胞外マトリックスとして基底膜やメサンギウム基質が存在するため、糸球体内の成長因子シグナル伝達を考える際にも、成長因子が拡散する足場となる基底膜やメサンギウム基質の役割を無視することはできない(40)。このことから、糸球体内の細胞外マトリックスは基底膜やメサンギウム領域などの組織構造の形成や維持に貢献するだけでなく、成長因子シグナル伝達を調節することで細胞生存や細胞増殖に関わっていると考えられる(38-40)。近年、糸球体内の細胞外マトリックス成分であるコラーゲンやフィブロネクチン、フィブリノーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸に成長因子調節作用があると報告されるようになった(38-45)。

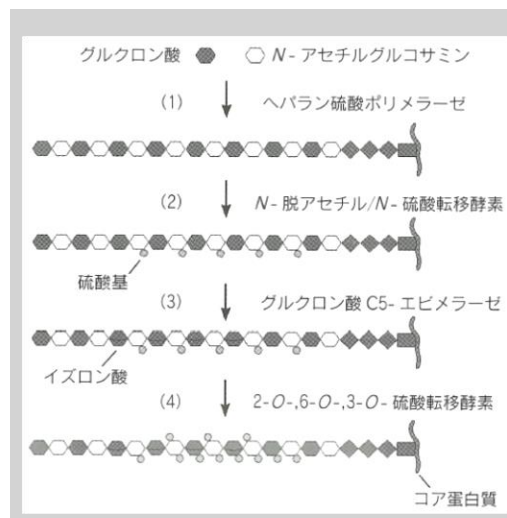
糸球体の構成細胞表面や細胞外マトリックスに、細胞外マトリックス型分子である Agrin、Perlecan や膜型分子である Syndecan などのヘパラン硫酸プロテオグリカンが存在する(46, 47)【参考 2】。ヘパラン硫酸は長い糖鎖が共有結合した巨大分子であり、陰性に荷電した多くの硫酸基を持つことから(42-44)、これまで主に基底膜内のチャージバリアーとして認識されてきたが、最近になり基底膜のヘパラン硫酸をノックアウトしたマウスで尿中タンパク排泄量に変化が認められない例が報告されてきた。具体的には、基底膜構成成分を供給するポドサイト特異的に、ヘパラン硫酸合成の初発酵素である *EXT1* 遺伝子(8)やヘパラン硫酸プロテオグリカンである Agrin、Perlecan 遺伝子(47)をノックアウトしたマウスにおいて、尿中タンパク排泄量が増加しなかったというものである。このことから、ヘパラン硫酸の陰性荷電による成長因子や凝固因子、細胞外マトリックス、細胞外接着因子などとの結合を介した生理的作用(42-46)が注目されており、腎臓において成長因子シグナル伝達の調節因子となる可能性がある。



【参考2: 正常時と異常時の糸球体基底膜組成の変化: David B. Mount (2008)、Molecular and Genetic Basis of Renal Disease, ELSEVIER SAUNDERS、Figure 21-4 より引用して掲載】

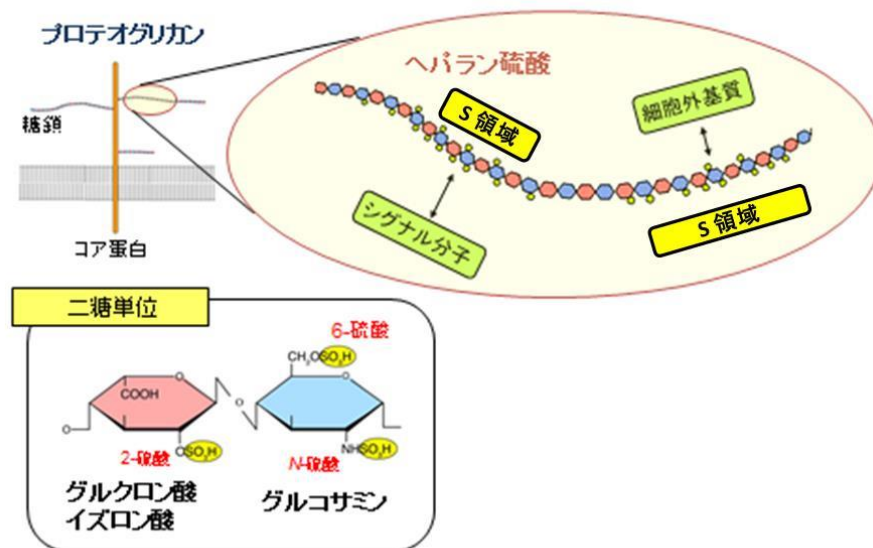
GAG side chain : Glycosaminoglycan side chain。

ヘパラン硫酸はプロテオグリカンのコア蛋白質に共有結合したグルクロン酸もしくはイズロン酸と N-アセチルグルコサミンからなる二糖単位が 50～100 程度繰り返されてできた枝分かれのない直鎖状の糖鎖である。ヘパラン硫酸が細胞内で生合成される過程では、コア蛋白質のセリン残基にキシロースを含む四糖結合領域が付加された後、グルクロン酸とグルコサミンからなる二糖繰り返し構造が合成され、N-デアセチラーゼ/N-スルホトランスフェラーゼによる脱アセチル化と N-硫酸化、グルクロン酸 C-5 エピメラーゼによるグルクロン酸からイズロン酸への異性化、ヘパラン硫酸 2-O-、6-O-、3-O-硫酸転移酵素による硫酸化が逐次行われるため、ヘパラン硫酸の硫酸化パターンにかなりの多様性が生まれる(44) 【参考 3】。1 本のヘパラン硫酸糖鎖には 1～2 か所、ヘパラン硫酸の二糖繰り返し配列のうち、2 位、N 位、6 位が硫酸化され 3 つの硫酸基による強力な陰性荷電を帯びた三硫酸化二糖を多く含む S 領域が存在する 【参考 4】。ヘパラン結合性分子はヘパラン硫酸の S 領域と結合すると考えられている 【参考 5】。



【参考 3: ヘパラン硫酸糖鎖の構造: 梶正幸、蛋白質 核酸 酵素 Vol. 53 No. 4 (2008) 図

2 を引用】



【参考 4: ヘパラン硫酸構造: 梶正幸、蛋白質 核酸 酵素 Vol. 53 No. 4 (2008) 図 1 を改

変し掲載】

General class	Examples
Adhesion molecules	L-selectin, Mac-1, NCAM, PECAM-1
Chemokines	IL-8, CXCL12, CCL21, CXCL10, CCL2
Cytokines	IL-7, IFN- γ , IL-3, TNF- α , GM-CSF
Growth factors	HB-EGF, VEGF, PDGF, FGF-1, FGF-2, FGF-8, HGF, amphiregulin, midkine, pleiotrophin
Morphogens	Wnts, Shh, BMPs, TGF- β
Axon guidance molecules	Netrin-1, slit, semaphorin-5A, ephrin-A3
ECM molecules	Laminin, fibronectin, thrombospondin, fibrin, collagens, tenascin, vitronectin
Enzymes	Lipoprotein lipase, urokinase, elastase, hyaluronidase, superoxide dismutase, thrombin

【参考 5: ヘパラン硫酸と相互作用するタンパク(ヘパリン結合性分子): 内村健治、生化学 83 巻、 216-223、2011 より引用して掲載】

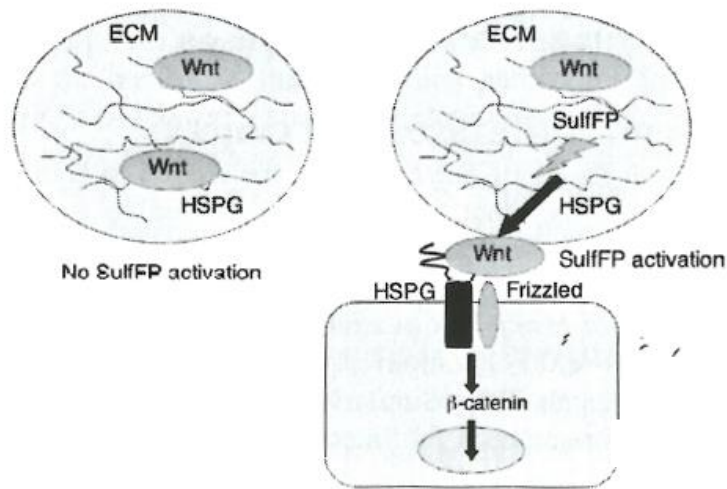
(iii) ヘパラン硫酸と Sulf1、Sulf2 による成長因子シグナル伝達調節

細胞内のリソソーム内でヘパラン硫酸の二糖繰り返し配列の硫酸基を加水分解する分解系の一群の酵素として古典的 Sulfatase が同定されているが(44)、最近になり細胞外へ分泌され、細胞膜上や細胞間に存在するヘパラン硫酸糖鎖内部の 6 位の硫酸基を脱硫酸化する endo 型酵素として Sulf1、Sulf2 の 2 つのサブタイプが同定された(42-44, 48-50)。これらの酵素活性に対する至適 pH は 6 以上で認められるようになり最も酵素活性が高くなるのは pH 7(中性)であることから(48)、この酵素が細胞外で作用することを強く支持していた。

Sulf1、Sulf2 は共にヘパラン硫酸の繰り返しされる糖鎖配列のうち 2 位、N 位、6 位が硫酸化された三硫酸化二糖の 6 位の硫酸基を脱硫酸化する酵素であるが、単独の三硫酸化二糖とは酵素的反応を示さず、5 回以上連続した三硫酸化二糖に対してのみ高い酵素活性を示す(48)。したがって、Sulf1、Sulf2 の基質は主に S 領域であると考えられる。

以上から、Sulf1、Sulf2 はヘパラン硫酸と成長因子間の親和性に最も強く影響を与えていると予想される(50-55)。

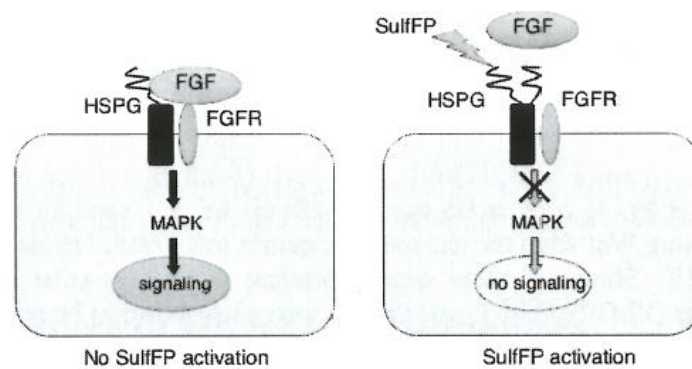
Sulf1、Sulf2 によりリモデリングされたヘパラン硫酸の硫酸化パターンは、成長因子の細胞外マトリックス中での拡散・濃度勾配形成や、受容体活性化過程に関与している(42-45)。具体的には Sulf1、Sulf2 の酵素的修飾により、ヘパラン硫酸と成長因子の結合が弱まることで成長因子の拡散能が亢進し成長因子シグナル伝達が増強される場合(Wnt) (51)と FGF でみられる様に成長因子と受容体との結合が弱まり受容体活性化が減弱する場合(52-55)が報告されており【参考 6, 7】、成長因子や組織環境により Sulf1、Sulf2 の生理的効果が決定される。



【参考 6: Wnt シグナル伝達における Sulf1, Sulf2 の役割: Nobuaki Maeda (2007), Neural

Proteoglycans 2007, Research Signpost , P109 Figure 5 より引用して掲載】

SulfFP: endosulfatase、ECM: extracellular matrix、HSPG: heparan sulfate proteoglycan



【参考 7: FGF シグナル伝達における Sulf1,Sulf2 の役割: Nobuaki Maeda (2007), Neural

Proteoglycans 2007, Research Signpost , P110 Figure 6 より引用して掲載】

SulfFP: endosulfatase、FGF: fibroblast growth factor

FGFR: fibroblast growth factor receptor、HSPG: heparan sulfate proteoglycan

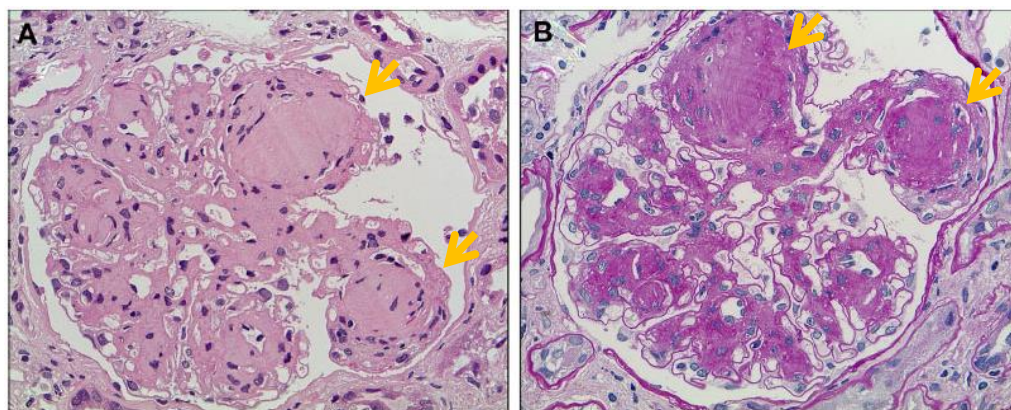
Sulf1、Sulf2 は腎臓糸球体内に発現しているがその役割の多くは未解明であったが、Schumacher(56)らは *Sulf1*、*Sulf2* 両欠損時に基底膜内の VEGF 含有量が低下することから、Sulf1、Sulf2 修飾によりリモデリングされたヘパラン硫酸がポドサイトから血管内皮細胞への細胞間 VEGF シグナル伝達を促進すると報告した。同時に彼らはメサンギウム領域拡大や糸球体濾過障壁異常を示唆する尿中アルブミン排泄増加も報告していたが、実験的な証明はされておらず問題提起するだけにとどまっていた。Sulf1、Sulf2 が糸球体内の成長因子シグナル伝達に果たす役割については未解明な点が多く、さらなる検討が必要であるが、その実験方法には十分な配慮が必要である。なぜならば、ヘパラン硫酸の硫酸化のパターンは組織や細胞環境により様々な酵素的修飾を受けることから、*in vitro* で *in vivo* のヘパラン硫酸構造を正確に再現することやその機能を評価することは極めて困難である(57-59)。このことから糸球体内における Sulf1、Sulf2 の役割を分析するためには、Sulf1 SKO マウス、Sulf2 SKO マウス、DKO マウスの詳細な分析が有用であると考えられる。

(iv) ヒト糖尿病性腎症と糖尿病モデルマウス

ヒト糖尿病性腎症【参考 9】に完全に一致するモデルマウスは存在しないが、一般的に遺伝子改変マウスへは化学物質や食事負荷を実施することで、糖尿病とその合併症である糖尿病性腎症を誘導している(60, 61)。1 型糖尿病モデルとして頻用されてきた化学物質、STZ は膵臓β細胞に毒性を持ちインスリン分泌不全を誘導することで、糖尿病

性腎症モデルマウスを作製することができる【参考 10、11】。STZ 誘導性の糖尿病性腎症では、ヒト糖尿病性腎症で認められる軽度のメサンギウム増殖病変や基底膜不整を再現することは可能であるが、進行性の糖尿病性腎症に特徴的な糸球体の結節性病変（限局性のメサンギウム基質増加）、糸球体硬化（糸球体内の広範囲にわたるメサンギウム基質増加と糸球体毛細血管消失）や尿細管間質の線維化を誘導することは非常に難しいことから(61)、尿中アルブミン排泄が軽度増加する糖尿病性腎症モデルとして使用されることが多い。

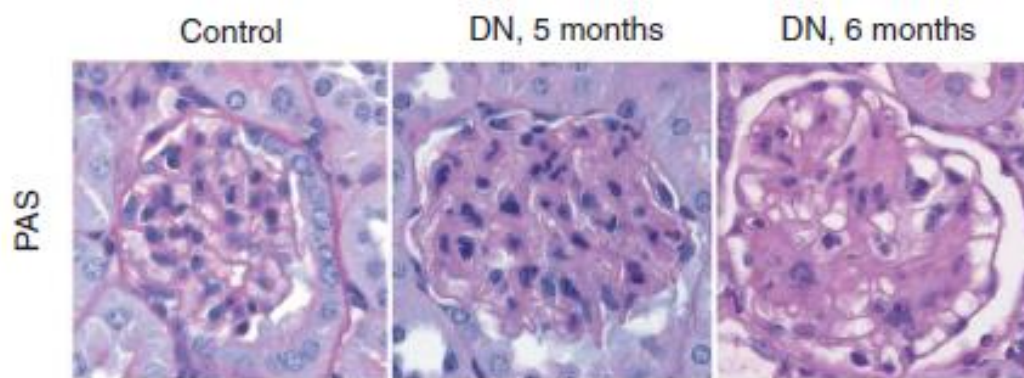
ヒト糖尿病性腎症 糸球体病変



【参考 9: ヒト糖尿病性腎症のメサンギウム病変: *Dove press* 7: 316-381, 2014 より引用】

A: ヘマトキシリンエオジン染色、 B: Periodic acid-Schiff reagent 染色、黄色矢印: 限局性の糸球体メサンギウム基質増加 (Kimmelstiel-Wilson 結節)

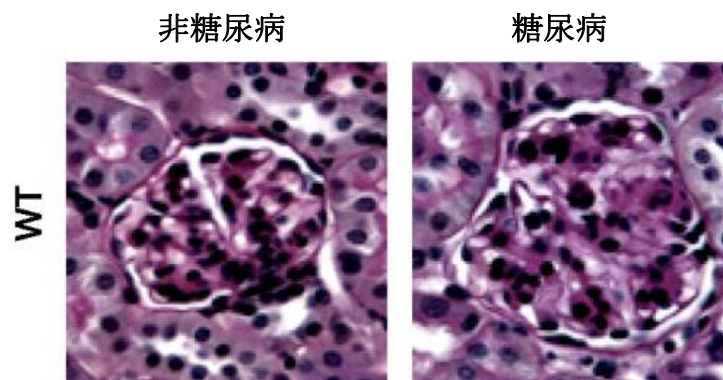
高容量 STZ 投与モデルマウス



【参考 10: STZ 200mg/kg Body weight 単回投与モデルの糸球体構造変化: Sugimoto H *et al. Nature Medicine* 1: 396-405, 2012.より引用して掲載】 PAS: Periodic acid-Schiff reagent)。

メサンギウム増殖病変が出現しているが、結節病変は認められない。

中容量 STZ 投与モデルマウス



【参考 11: STZ 100mg/kg Body weight 3 連日投与モデルの糸球体構造変化 (薬剤投与後 6 週目): Wang A *et al. Am J Physiol Renal Physiol* 293: 1657-1665, 2007.より引用して掲載】

軽度のメサンギウム増殖病変を認めた。

(v) 糸球体恒常性維持に関与する成長因子シグナル伝達調節

成長因子シグナル伝達が組織環境に応じて適切に調節されることで、糸球体構成細胞と細胞外マトリックスの恒常性が維持されている。一方、後天的に糸球体に高血糖環境を誘導した糖尿病モデルマウスにおいても、糸球体内の成長因子シグナル調節異常と糸球体恒常性破綻の関連性が報告されている(22, 23, 26, 60)。そのため、糸球体内に発現する Sulf1、Sulf2 が正常環境や病的環境のいずれにおいても糸球体構成細胞と細胞外マトリックスの恒常性維持に、成長因子シグナル伝達の調節を介して、関与すると考えた。

3. 目的

腎臓糸球体の恒常性維持や病態生理における成長因子シグナル伝達の役割を検討する従来の研究は、糸球体内の成長因子発現量と形態異常や機能異常の相関関係を捉えることで、成長因子シグナル伝達の調節異常を評価してきた。一方、組織内の成長因子発現量と細胞外マトリックスを介した細胞間伝達メカニズムが細胞間の成長因子シグナル伝達の調節にどの様に関与するかについてはほとんど議論されてこなかった。

今回、成長因子とヘパラン硫酸の相互作用を制御する *Sulf1*、*Sulf2* が腎臓糸球体内でも様々な成長因子シグナル伝達を調節することで糸球体恒常性を保っていると考え、*Sulf1*、*Sulf2* 欠損マウスを用いて糸球体構成細胞間の成長因子シグナル伝達の調節機序を解析した。さらに、糸球体内の成長因子シグナル伝達異常が誘因となる糸球体障害モデルとして糖尿病性腎症を惹起し、糖尿病性腎症の進展機序における *Sulf1*、*Sulf2* の働きを解析した。以上のように *Sulf1*、*Sulf2* 欠損マウスと疾患モデルでの解析を行うことで、*Sulf1*、*Sulf2* の生理機能を明らかにすることを目指した。

4. 対象と方法

実験動物 (成獣マウス)

(i) *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} 成獣マウスの遺伝的背景

定法に従い 129/Ola 由来胎生幹細胞を用いて作製した *Sulf1*^{+/-} マウスと *Sulf2*^{+/-} マウスを C57BL/6N に 5 代交配した N5 世代の *Sulf1*^{-/-} マウス(*Sulf1* SKO)と *Sulf2*^{-/-} マウス(*Sulf2* SKO)は見かけ上、正常で交配も可能であった。これらの交配により作製した *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} (DKO)マウスは出生日中にほとんど死亡した(49)。N5 世代の *Sulf1*^{+/-}; *Sulf2*^{+/-} マウスあるいは *Sulf1*^{+/-}; *Sulf2*^{-/-} マウスを ICR/CD1 マウスと 1 回交配して *Sulf1*^{+/-}; *Sulf2*^{+/-} マウスを作製した(N1)。この *Sulf1*^{+/-}; *Sulf2*^{+/-} マウス同士を交配することで *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} (DKO)マウス(N1)を作製した。また、*Sulf1*^{+/-}; *Sulf2*^{+/-} マウス(N1 と N5 世代マウスを交配して(N2)、*Sulf1*^{+/-}; *Sulf2*^{-/-} マウスと *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{+/-} マウスから *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} (DKO)マウス(N2)を作製した。混合遺伝子背景である N1 と N2 の DKO マウスは成獣期まで生存可能となった。実験にはすべての遺伝子型について N1、N2 の動物を用い、妊娠出産の影響や性差による形質の違いを除外するために雄マウスのみを使用した。動物実験は筑波大学動物実験取扱い規定に準じて実施した。

(ii) 糖尿病性腎症モデルマウスの作製

文献(37, 61)を参考に STZ の 1 回投与量を 100 mg/kg mouse body weight へ減らして、できる限り細胞毒性を弱める工夫をした。生後 2 月齢のマウスに Streptozotocin (STZ; Sigma-Aldrich, St Louis, USA) を腹腔内投与することで 1 型糖尿病を発症させた。-20℃ 保存の STZ を使用時に氷上へ移し、0.2 ml の 10 mM クエン酸ナトリウム溶解液(pH 4.5) へ溶解し STZ 投与量が 100 mg/kg mouse body weight となるよう調製した。27G 針(Terumo, Tokyo, Japan)を取り付けた 0.5 ml ツベルクリンシリンジ(Terumo, Tokyo, Japan)を用いてマウス右下腹部から腹腔内へ STZ を投与した。STZ 腹腔内投与は連続 3 日間行った。コントロール群では 0.2 ml の 10 mM クエン酸ナトリウム溶解液(pH 4.5)を STZ と同様に連続 3 日間投与した。糖尿病発症を確認するために薬剤投与後 2 週時点で随時血糖値を測定した。随時血糖値は吸入麻酔薬(イソフルラン：プロピレングリコール=3：7)を使用してマウスを鎮痛鎮静状態にしたのち、採取した尾静脈血の血糖値を Glucose pilot system (Aventir Biotech, LLC, Carlsbad, USA)を用いて測定した。STZ 投与群のうち随時血糖値が 220 mg/dl 以上であったマウスを糖尿病発症マウスとして実験に使用した。糖尿病発症マウスでは多飲多尿が認められ飼育ケージの環境維持目的に頻回にケージ交換を行い、薬剤投与後 8~18 週時点でマウスの蓄尿検査と血液採取、組織採取を行った。

(iii) マウスの血液採取と組織採取の手順

吸入麻酔薬(イソフルラン：プロピレングリコール=3：7)を用いて鎮痛鎮静後に、ピン針で四肢を固定し仰臥位とした。腹部から両側胸腹部を切開してすみやかに両側気胸を作製したのち心臓周囲脂肪組織を剥離して両心房心室を露出した。27G 針(Terumo, Tokyo, Japan)を取り付けたヘパリンコーティング済みのツベルクリンシリンジ(Terumo, Tokyo, Japan)を使用して右心房から静脈血を採取した。採血検体を氷上に保存し 4℃、3000 rpm、5 分の条件で遠心分離することで血球成分と血漿成分を分離した。血清 Creatinine 測定は外部機関である SRL Inc (Tokyo, Japan)へ依頼した。採血後速やかに、ピンセットの先端で右心房を右心室から剥離して脱血路を確保し左心室へ 23G 翼状針(Terumo, Tokyo, Japan)を穿刺した。腎臓と肝臓の脱血が確認できるまで 1×Phosphate Buffered Saline (PBS)を還流した後、1×PBS に溶解した 4%パラホルムアルデヒド溶液(約 50 ml/匹)を還流した。摘出腎臓を 4%パラホルムアルデヒド溶液へ投入して 4℃の冷蔵庫内で約 12 時間の後固定を行った。パラフィンブロック作製は組織標本作製室へ依頼した。凍結ブロックは後固定後の摘出腎臓を 10%スクロース溶液と 20%スクロース溶液内で各 12 時間振とうした後、O.C.T. compound (Sakura finetek,, Tokyo, Japan)で包埋して液体窒素で急速に凍結してから - 80℃で保存した。マウス腎臓検体の採取方法は、電子顕微鏡用の検体も含めて後述する (組織化学染色用検体: 21 頁、免疫染用検体: 21 ~26 頁、電子顕微鏡用検体:26 頁、*In situ* hybridization 用検体: 27 頁)。

組織化学染色

(i) Periodic acid-Schiff reagent 染色、Periodic acid-methenamine silver 染色

筑波大学組織標本作製室へ、パラフィンブロックからの薄切切片作製と periodic acid-Schiff reagent(PAS)染色、periodic acid-methenamine silver(PAM)染色を依頼した。PAS、PAM 染色の観察結果に基づいて、メサンギウム領域内の細胞増殖や細胞外マトリックス異常が観察された糸球体の出現頻度を観察可能な全糸球体に占めるメサンギウム病変を有する糸球体の割合として定量化した。糸球体肥大は糸球体面積(μm^2)をもとに評価した。糸球体面積(μm^2)は近位尿細管上皮細胞へ移行するボウマン囊上皮細胞を除く糸球体血管係蹄の面積を Lumina vision system (Olympus, Tokyo, Japan)を用いて測定し、その平均値を算出した。

免疫染色—酵素抗体法

(i) Platelet derived growth factor-B(PDGF-B)染色

(ii) Platelet derived growth factor receptor- β (PDGFR- β)染色

パラフィンブロックから 2 μm の薄切切片を作製して、キシレン、エタノールによる脱パラフィン後、10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)で満たした圧力釜へ移し密閉した状態で電子レンジによる煮沸を 5 分間行った。自然冷却後に室温で 10 分間、メタノール (99.8 %)に溶解した 3%過酸化水素溶液でペルオキシダーゼブロックを行い、引き続き

室温で Avidin / Biotin blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA)を用いて Avidin と Biotin のブロックを各 30 分間行った。プロテインブロックはヒストファイン SAB-PO キット(Nichirei, Tokyo, Japan)を使用し、動物種は PDGF-B では 10%正常ヤギ血清、PDGFR-beta では 10%正常ウサギ血清をもちいて室温で 1 時間実施した。一次抗体は 1×PBS を用いて抗 PDGF-B 抗体(1 : 50)、抗 PDGFR-β 抗体(1 : 40)、抗 α-smooth muscle actin (SMA)抗体(1 : 100) へ希釈してから、4℃の湿潤な湿箱内で約 20 時間インキュベートした。ビオチン化二次抗体(ヒストファイン SAB-PO キット; Nichirei, Tokyo, Japan)と組織切片を室温で 1 時間インキュベートしたのち、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ヒストファイン SAB-PO キット) と室温で 30 分間反応させた。1×PBS でよく洗浄した後に Diaminobenzidine(DAB)溶液(K3468; Dako, Tokyo, Japan)を滴下して発色させた。核染色にはヘマトキシリン染色を用いた。なお、上記行程の各ステップで 1×PBS 洗浄を十分行った。一次抗体、二次抗体の詳細は表 2 に記載した。

(iii) α-smooth muscle actin(α-SMA)染色

パラフィンブロックから 2 μm の薄切切片を作製して、キシレン、エタノールで脱パラフィン後、賦活化は行わずメタノール(99.8%)に溶解した 3%過酸化水素溶液で室温、5 分間ペルオキシダーゼブロックを行い、事前に作製した一次抗体と二次抗体の複合体(一次抗体と二次抗体の複合体の作製手順は 23 頁で後述する)を組織上に滴下して 4℃で

12時間反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ヒストファイン SAB-PO キット)を2滴滴下して室温で30分間反応させた。1×PBSでよく洗浄後にDAB溶液(K3468; Dako, Tokyo, Japan)を滴下して発色を確認した。核染色にはヘマトキシリン染色を用いた。なお、上記行程の各ステップで1×PBS洗浄を十分行った。一次抗体と二次抗体の複合体は、0.5 µl 抗 α -SMA抗体と24.5 µl ビオチン化した抗 mouse 二次抗体(ヒストファイン SAB-PO キット)を室温で1時間反応させ、次に50 µl の10 %マウス血清(ヒストファイン SAB-PO キット; Nichirei, Tokyo, Japan)を加え室温で1時間反応させ、一次抗体と二次抗体の複合体を作製した。一次抗体、二次抗体の詳細は表2に記載した。

(iv) CD68 染色

凍結ブロックから5 µm の薄切切片を作製して、1×PBSでコンパウンド洗い流した。凍結切片を室温で10分間かけてアセトン固定後に、アビジンとビオチンのブロッキング (Vector Laboratories, Burlingame, USA)を室温で各30分間、10%正常ヤギ血清(ヒストファイン SAB-PO キット; Nichirei, Tokyo, Japan)によるプロテインブロックを室温で1時間行った。1×PBSを用いて希釈した抗 CD68 抗体(1 : 2000)を切片上に滴下して4℃の湿潤な湿箱内で約12時間インキュベートした。ニチレイ社のビオチン化二次抗体(ヒストファイン SAB-PO キット)と室温で1時間インキュベートした。室温で5分間メタノール(99.8 %)に溶解した3%過酸化水素溶液に浸して、ペルオキシダーゼブロックを行

った。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ヒストファイン SAB-PO キット; Nichirei, Tokyo, Japan)と室温で 30 分間反応させたのち、1×PBS でよく洗浄後に DAB 溶液(K3468; Dako, Tokyo, Japan)を滴下して発色を確認した。なお、上記行程の各ステップで 1×PBS 洗浄を十分行った。ポジティブコントロールには糸球体内へのマクロファージや単球浸潤が報告されている Low-density lipoprotein receptor deficiency (*LDLR*^{-/-}) mice の腎臓組織を使用した。核染色にはヘマトキシリン染色を用いた。一次抗体、二次抗体の詳細は表 2 に記載した。

(v) Collagen type VI 染色

パラフィンブロックから 2 μm の薄切切片を作製して、キシレン、エタノールで脱パラフィン後、Proteinase K 溶液 (0.1 μg/μl Proteinase K (Wako, Tokyo, Japan)、5 × 10⁻³ M Tris-HCl (pH 7.5)) と 37°C、10 分間反応させてから、室温で 30 分間メタノール(99.8%)に溶解した 3%過酸化水素溶液でペルオキシダーゼブロックを行った。プロテインブロックはヒストファイン SAB-PO キット(Nichirei, Tokyo, Japan)の 10%正常ヤギ血清を使用して室温で 30 分間反応させた。一次抗体は 1×PBS を用いて抗 Collagen type VI 抗体(1 : 50)へ希釈してから、4°Cの湿潤な湿箱内で約 12 時間インキュベートした。Dako Envision system-HRP 試薬(Dako, Tokyo, Japan)と室温で 30 分間反応させたのち、1×PBS でよく洗浄後に DAB 溶液(K3468; Dako, Tokyo, Japan)を滴下して発色を確認した。。核染色にはヘ

マトキシリン染色を用いた。なお、上記行程の各ステップで 1×PBS 洗浄を十分行った。

一次抗体の詳細は表 2 に記載した。

免疫染色—蛍光抗体法

(i) CD31 染色

凍結ブロックから 5 μ m に薄切した凍結切片を作製し、1×PBT (Phosphate Buffered Saline, 0.1% Tween 20)内で 30 分間静置した後、室温で 1 時間 10%正常ヤギ血清(ヒストファイン SAB-PO キット)とインキュベートしてから、1×PBT で希釈した抗 CD31 抗体(1 : 100)と 4℃で約 12 時間反応させた。二次抗体は 1×PBT で希釈した抗 rat IgG-Alexa 568 (1 : 100)を使用して暗所、室温で 1 時間反応させたのち、水溶性封入剤 (Mount-quick aqueous, Daido sangyo, Tokyo, Japan) で封入して観察を行った。すべての行程間で 1×PBT 洗浄を十分に行った。一次抗体、二次抗体の詳細は表 2 に記載した。

(ii) AO4B08 染色

文献(49, 62)を参考にして染色を行った。高硫酸化ヘパラン硫酸の検出のために凍結腎臓標本作製した。頸椎脱臼後に採取した 1.5~2 月齢マウスの腎臓を液体窒素により冷却されたイソペンタン内へ投入した。その後、液体窒素で満たされた 15 ml チューブへ急速に凍結した腎臓を投入して、さらに 1 時間かけてゆっくりと凍結した。10 μ m に薄切した凍結切片を 1×PBS で洗浄後に、室温の 0.5% Blocking reagent (Roche Diagnostics,

Basel, Swiss)内で 20 分間静置した。次に抗 HS phage display 抗体(AO4B08, 1 : 5)と室温で 90 分間インキュベートしてから 1×PBS 洗浄を行い抗 VSV tag 抗体(1 : 200)と室温で 60 分間インキュベートした。さらに、抗 rabbit IgG-Alexa568 と暗所、室温で 60 分間インキュベートした。水溶性封入剤 (Fluoromount-G; Southern Biotech, Birmingham, USA で封入後、Zeiss LSM 510 confocal microscopy を用いて腎皮質と糸球体内の Alexa 568 蛍光シグナルを定量化した。定量化には平均蛍光強度を用いた。一次抗体、二次抗体の詳細は表 2 に記載した。

透過型電子顕微鏡観察

2% グルタルアルデヒドで還流固定後に採取した腎臓を 1 mm³に細切して、さらに 1%四酸化オスミウム酸で固定した。エタノールによる脱水とプロピレンオキシド置換後にエポキシ樹脂で包埋を行った。ウルトラミクロトームを使用して超薄切切片を作製し、酢酸ウラニウムとクエン酸鉛による 2 重染色を行った。作製した試料を透過型電子顕微鏡 (JEM-1400, Nihondenshi corp, Tokyo, Japan) で観察した。Polyethyleneimine (PEI) 染色の手順は文献(47)を参考にして実施した。1 mm³へ細切された 2%グルタルアルデヒド固定後の腎臓を、室温の Solution 1 (PEI (1.8 kDa ; Sigma, St Louis , USA), 0.1M sodium cacodylate buffer, 10% sucrose)に 30 分間浸透した後、0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4) で洗浄後、室温の Solution 2 (10% sucrose, 2% glutaraldehyde, 2% phosphotungstic

acid)に 30 分間浸透した。0.05 M cacodylate buffer(pH 7.4)で洗浄してから 1%四酸化オスミウム酸で固定した。酢酸ウラニウムとクエン酸鉛による 2 重染色法の手順は透過型電子顕微鏡の資料作製手順に準じた。

In situ hybridization

文献(49)を参考に、凍結ブロックから 10 μm に薄切した凍結標本を作製して、1×PBT で 10 分間洗浄し O.C.T. compound (Sakura finetek, Tokyo, Japan)を洗い流した後、Proteinase K 溶液 (0.1 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K, 1×PBST) と 37°C で 1 分間反応させた。1×PBT 洗浄と室温の 4% パラホルムアルデヒドでの 20 分間の固定を行い、洗浄後に *Sulf1* と *Sulf2* のジゴキシゲニン標識 antisense RNA probe を 65°C に維持した hybridization buffer (50% Formamide, 5×SSC, 1% SDS, 50 $\mu\text{g/ml}$ Heparin, 50 $\mu\text{g/ml}$ yeast RNA) 内で 24 時間反応させた。恒温槽内で 65°C に温めた Washing buffer 1 (50% Formamide, 5×SSC, 1% SDS)で 1 時間×1 回、30 分×2 回洗浄後、続けて Washing buffer 2 (50% Formaldehyde、2×SSC)を用いて 30 分×3 回洗浄した。室温の 1×PBT で洗浄後に、0.5%Blocking reagent (Roche Diagnostics, Basel, Swiss) で、室温で 60 分間ブロッキングを行った。次に、4°C 環境下で 0.5% Blocking reagent (Roche Diagnostics, Basel, Swiss) に溶解した alkaline phosphatase 標識の anti-ジゴキシゲニン抗 (1 : 2000) と 24 時間反応させた。2 mM Levamisole を含有した 1×PBST 洗浄×3 回と NTMT (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50

mM MgCl₂, 0.1 % Tween 20, 2 mM Levamisole) 洗浄 1 回後に、2 mM Levamisole 含有 BM purple (Roche Diagnostics, Basel, Swiss) と室温、遮光下で反応を開始し、1×TE (0.01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA) で BM purple の発色反応を止め、水溶性封入剤 (Mount-quick aqueous) を使用して封入し観察した。

蓄尿と尿中アルブミン濃度測定

給水ビンを用いて飲水可能な環境を作ったうえで採尿用の代謝ケージ内でマウスを飼育した。尿中の Albumin 排泄量を測定することが目的であったため、食事によるタンパク負荷の影響を最小限にするため代謝ケージでの飼育中は絶食とした。蓄尿時間も非糖尿病発症マウスでは 12 時間前後をかけて蓄尿したが、糖尿病発症マウスは多尿でかつ低体温であったため尿中 Albumin 排泄量を評価するのに必要な 1500～2000 μl の尿量を確保できた時点で通常の飼育ケージへ戻した。採取したマウス尿検体は-20℃で保存した。尿中 Albumin 排泄量の評価には、尿中 Albumin 濃度 (mg/dl) /尿中 Creatinine 濃度 (mg/dl) 比を用いた。尿中 Albumin 濃度 (mg/dl) と尿中 Creatinine 測定 (mg/dl) は SRL Inc (Tokyo, Japan)へ依頼した。

マウス収縮期血圧測定

Softron 社 (Tokyo, Japan) のマウス固定具を用いて暗所環境に置きながらマウスの体動を制限した。拘束されたマウスを 37℃に保温された血圧測定台に静置して、マウス尾

に血圧測定器(BP98AWM; Softron corp, Tokyo, Japan)を取り付け動脈拍動の有無を確認した。血圧測定器が安定して動脈波形を捉えることができた時点で収縮期血圧を測定した。収縮期血圧は2〜3日かけて測定して、マウスごとの平均値を求めた。

糸球体単離法

文献(63)を参考に、吸入麻酔薬（イソフルラン：プロピレングリコール＝3：7）を用いて鎮痛鎮静後に仰臥位でマウスを固定し、腹部から両側胸腹部を切開して気胸を作製したのち、心臓周囲脂肪組織を剥離して両心房心室を露出させ、右心室へ穿刺した 27G 針付ツベルクリンシリンジ(Terumo, Tokyo, Japan)で採血した。採血終了後に、ピンセットで右心房を剥離してから左心室へ留置した 23G 翼状針へ 1×PBS に溶解した 0.8 mg/ml の iron particle(直径 3-5 μm)懸濁液を投与した(投与量は 60〜90 ml/匹)。採取した腎臓を 1×HBSS へ溶解した 2 ml の 1 mg/ml Collagenase A 液 (Roche, Basel, Swiss) 内で 1mm 角大になるまでハサミで細分化してから 37°C、60 回/分のスピードで振とうした。その後、100 μm と 70 μm のセルストレイナー(Life Science, Durham, USA)でろ過して選択的に採取した糸球体を Magnetic particle concentrator (DynaLab Biotech ASA, Oslo, Norway)を用いて濃縮した。濾過洗浄には滅菌した 1×PBS を用いた。さらに、タンパク抽出を行う際はタンパク分解酵素阻害薬（アプロチニン（1：100）、ロイペプチン（1：100）、PMSF（1：10））を加えた RIPA バッファー（1 % NP-40, 0.025 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl,

2% SDS)に溶解してから Deoxyribonuclease I (Invitrogen) (1 : 40)を加えて、超音波ホモジナイザーで破砕(2 分×2 回)してから、-80℃で保存した。100 μ l の単離糸球体浮遊液をスライドガラスへのせ、熱固定したのちに観察を行い、採取した糸球体個数を計算した。

Real time PCR

単離糸球体に含まれる RNA を ISOGEN Reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。Nano drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)を用いて RNA 濃度を測定して、1 μ g の抽出 RNA を Thermo Script RT-PCR System (Invitrogen)を使用して逆転写することで c DNA を作製した。単離糸球体内の mRNA 発現は SYBR Green PCR amplification reagent(Applied Biosystems)と 7500 fast real time PCR system を用いて定量化した。House keeping gene には Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を使用した。プライマーはつくばオリゴサービス株式会社(Tsukuba, Japan)へ作製を依頼した。使用したプライマーの塩基配列は表 3 に記載した。

単離糸球体培養方法

生後 1.5～3 月齢の WT マウス、DKO マウスから腎臓糸球体を選択的に採取するために、まず糸球体単離を行った。糸球体単離の手順は前述通りに実施した。単離糸球体培養実験は文献(64)を参考に実施した。各 Tube 内に同数(2000～9000 個/tube)の単離糸球体を入れ RPMI -1640 (Sigma, St Louis , USA)培地内で 4～20 時間、37℃、CO₂:5%環境下で

前培養した。前培養終了直後で成長因子を投与する直前を 0 時間目とした。成長因子の刺激は 10% FBS を含んだ RPMI -1640 (Sigma, St Louis , USA)培地に以下の濃度で各成長因子を添加することで開始した。10 ng/ml recombinant human PDGF-BB (P3201; Sigma-Aldrich, St Louis, USA)、50 ng/ml Recombinant mouse VEGF (PMG0111; Biosource, San Diego, USA)、10 ng/ml Recombinant human TGF- β (240-B/CF; R&D Systems, Minneapolis, USA)、100 ng/ml Recombinant human basic FGF (63006; PROGEN, Heidelberg, Germany)。PDGF-B 添加実験は 24 時間目まで、その他は 12 時間目まで培養を継続した。前培養開始から培養終了までの時間が約 30 時間以内であれば、単離系球体は培養液内で生存できた。100 μ m と 70 μ m のセルストレイナー(Life Science, Durham, USA)を用いて回収した単離系球体をタンパク分解酵素阻害薬(アプロチニン (1 : 100, ロイペプチン (1 : 100), PMSF (1 : 10))を加えた RIPA バッファー(1 % NP-40, 0.025 M Tris-HCl (pH7.5), 0.15 M NaCl, 2% SDS)に溶解した。タンパク抽出を行う際は Deoxyribonuclease I (Invitrogen) (1 : 40)を加え、超音波ホモジナイザーで組織を破砕した(2 分間×2 回)。使用時までは-80℃で保存した。

Western blot 法

単離糸球体と培養単離糸球体をタンパク分解酵素阻害薬 (アプロチニン (1 : 100), ロイペプチン (1 : 100), PMSF (1 : 10))を加えた RIPA バッファー(1 % NP-40, 0.025 M Tris-HCl (pH7.5), 0.15 M NaCl, 2 % SDS)と混和してから超音波ホモジナイザーで破碎した(2 分×2 回)。糸球体溶解液のタンパク濃度測定は DC プロテインアッセイ (Bio-Rad, Hercules, USA)を用いて比色法でタンパク濃度測定を行い、各サンプルのタンパク溶解量が一定になるように調整後、タンパク溶解液と NuPAGE LDS sample buffer (1 : 4) (Life technologies, Carlsbad, USA)、Sampling reducing agent (1 : 10) (Life technologies, Carlsbad, USA) と混和して、最後にタンパク分解酵素阻害薬を加えた RIPA バッファーで 20 μ l へメスアップした。5 分間の室温静置と 98℃、10 分間の SDS 化の後、氷上で冷却保存した。1×MES SDS running buffer (Life technologies, Carlsbad, USA)で満たされた NuPAGE Bis-Tris ゲル (Life technologies, Carlsbad, USA)へ SDS 化後のタンパク溶解液を加えて、定電流 0.03 A で 2 時間泳動した。次に、タンパク転写に用いる 7×8 cm PVDF membrane (Life sciences, Pall Corporation)を 2 分間メタノール内で浸透してから、1×Transfer buffer (Life technologies, Carlsbad, USA) で洗浄した。NuPAGE Bis-Tris ゲル (Life technologies, Carlsbad, USA) から 0.2 μ m PVDF blotting membrane (GE healthcare, Chalfont, UK)への転写は 1×Transfer buffer (Life technologies, Carlsbad, USA)内で NuPAGE Bis-Tris ゲル (Life technologies, Carlsbad, USA) と 0.2 μ m、7×8 cm² PVDF blotting membrane (GE healthcare,

Chalfont, UK)を重ね合わせ、0.07A を 1 時間 40 分にわたり通電した。タンパク転写後の PVDF membrane を 1×Tris-buffered saline (1×TBST、0.01 M Tris-HCl (pH 7.4)、0.15 M NaCl、0.1 % Tween 20)に溶解した 5% スンキムミルク溶解液内で室温、30 分間振とうしてから、1×TBST に溶解した一次抗体液 2 ml と PVDF membrane をパッキングして 4℃ 下で振とうしながら約 12~24 時間インキュベートした。その後、1×TBST で洗浄した PVDF membrane と 4000 倍の希釈倍率で 1×TBST に溶解した horseradish peroxidase 標識の二次抗体をパッキングして室温で振とうしながら 60 分間インキュベートした。1×TBST 洗浄後に chemiluminescence detection reagent (NCI32132; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) と LAS4000 (Fuji Film, Tokyo, Japan)を利用して PVDF membrane 上の化学発光シグナルを検出した。タンパクの内部標準にはβ-actin を用い、プロテインマーカーには Novex Sharp Pre-stained Standard (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を使用したため、メンブレン写真を撮影してタンパク分子量を確認した。Western blotting に使用した一次抗体、二次抗体の詳細は表 4 に記載した。

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

糖尿病モデルマウス作製実験で薬剤投与後 8 週目において採取した単離糸球体を 100 µl の細胞溶解液 (Cell Lysis buffer (#9803; Cell Signaling Technology, Beverly, USA): Deoxyribonuclease I (18047-019; Invitrogen, Carlsbad, USA) : phenylmethanesulfonyl fluoride

=100 : 1 : 10)と混和し、超音波ホモジナイザー破碎溶解した(5分×2回)。糸球体溶解液を4℃、10分、14000回転/分で遠心分離することで、細胞骨格成分を分離破棄した。精製された糸球体溶解液は-80℃で保存した。DCプロテインアッセイ(Bio-Rad, Hercules, USA)を用いて比色法でタンパク濃度測定を行い、5 µgの糸球体溶解液を100 µl溶液になるようにリン酸化Akt発現定量化ELISA kit (#7160C; Cell Signaling Technology, Beverly, USA)のSample diluentと混和して各wellへ加え、37℃で2時間インキュベートした。Washing buffer(#7160C; Cell Signaling Technology, Beverly, USA)で洗浄後に100 µlのreconstituted detection antibody (#7160C; Cell Signaling Technology, Beverly, USA)を各wellへ加えて37℃、1時間インキュベートした。Washing buffer (#7160C; Cell Signaling Technology, Beverly, USA)で洗浄後に100 µlのreconstituted HRP linked secondary antibody (#7160C; Cell Signaling Technology, Beverly, USA)を各wellに加えて37℃、30分間インキュベートした。Washing buffer (#7160C; Cell Signaling Technology, Beverly, USA)で洗浄後に100 µlのTMB substrate (#7160C; Cell Signaling Technology, Beverly, USA)を各wellに加えて37℃、10分間インキュベートしてから、100 µlのStop solution (#7160C; Cell Signaling Technology, Beverly, USA)を各wellに加え2-3分室温で振とうした。マイクロプレートリーダー Varioskan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)を用いて450 nmの吸光度を測定した。

統計学的分析方法

統計学的分析には統計ソフト **JMP** を使用し、全ての指標を平均値±標準誤差で示した。

2 群間の比較検討は **Student *t*-test** を用い、3 群間以上の比較検討には **ANOVA** の

post-hoc-Turkey-Kramer HSD test を用いて評価した。 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判

定した。

5. 結果

(i) *Sulf1*、*Sulf2* 両欠損時に片側腎臓が欠損したマウスを認めた

腎臓における *in situ* hybridization 法では、*Sulf1* mRNA は主に糸球体係蹄に沿って強いシグナルを発現しておりポドサイトの局在を呈していた(図 1A)。*Sulf2* は遠位尿細管上皮細胞に強く発現していたが、糸球体内の血管極に近いメサンギウム領域にもごくわずかに発現が認められた(図 1A)。

マウス腎臓は出生後 2 月齢までは成熟過程であるため (65)、成熟糸球体の構造や機能を評価するためには生後 2 月齢以上のマウスを用いる必要がある。WT マウス、*Sulf1* SKO マウス、*Sulf2* SKO マウス、DKO マウスについて体重と腎重量を測定し腎重量/体重比を測定した。2 月齢の DKO マウスは、体重、腎重量ともに WT マウスよりも軽かったが、腎重量/体重比には有意差がなく、DKO マウスの腎臓が萎縮しているとは考えられなかった(図 1B, 表 1)。

DKO マウスでは低頻度ながら片側腎臓欠損が認められたことから、*Sulf1*、*Sulf2* が腎臓発生に関与していると考えた。DKO マウスでは 1~10 月齢の合計 103 匹中 7 匹で片側腎臓欠損がみられたが、WT マウスと *Sulf1* SKO マウス、*Sulf2* SKO マウスでは腎臓欠損は全く認められなかった(表 1)。腎臓発生段階では多くの成長因子が継続的に必要であるため(21, 66)、*Sulf1*、*Sulf2* がいずれかの発生段階に関与していると考えられた。

(ii) *Sulf1*、*Sulf2* 欠損マウスでは腎機能障害とメサンギウム領域構造異常が出現した

糸球体濾過機能を反映する血清 Creatinine 濃度 (mg/dl) は 8 月齢時点において、DKO マウスが WT マウスよりも有意に高値を示していた(図 2)。8 月齢の尿中 Albumin 排泄量 (尿中 Albumin 濃度 (mg/dl) / 尿中 Creatinine 濃度 (mg/dl) 比) も血清 Creatinine 濃度 (mg/dl) と同様に DKO マウスで高かった (図 2)。また、糸球体が成熟する 2 月齢時点では WT マウスと DKO マウスの間に血清 Creatinine 濃度 (mg/dl) の有意差がないことから、加齢とともに *Sulf1*、*Sulf2* は糸球体機能や糸球体構造の恒常性維持に深く関与すると言えた。さらに、*Sulf1* SKO マウスと *Sulf2* SKO マウスでは、WT マウスと比較して 2 ～8 月齢の血清 Creatinine 濃度(mg/dl)と 8 月齢の尿中 Albumin 排泄量(尿中 Albumin 濃度 (mg/dl)/尿中 Creatinine 濃度 (mg/dl) 比)に有意差はなかったが(図 2)、*Sulf1*、*Sulf2* 単独欠損マウスのうち、*Sulf1* SKO マウスでのみ尿中 Albumin 排泄量(尿中 Albumin 濃度 (mg/dl)/尿中 Creatinine 濃度 (mg/dl) 比)の増加傾向を認めたため、糸球体濾過機能維持には *Sulf1* の関与が大きいと推察された。

組織学的には DKO マウスの光学顕微鏡所見においてメサンギウム領域異常と基底膜不整が認められた(図 3A)。メサンギウム領域異常はメサンギウム細胞増殖とメサンギウム基質増加、融解を含んでおり、多くのメサンギウム病変は糸球体メサンギウム領域の一部分(分節性) に出現していた。メサンギウム細胞増殖とメサンギウム基質異常は

同一糸球体に混在することがあったが、これはメサンギウム細胞増殖時のメサンギウム基質の融解と増加を伴うメサンギウム領域のリモデリング過程を観察していると考えた(67)。2～8 月齢のマウスのうち、8 月齢の **DKO** マウスに出現したメサンギウム領域の構造異常は、分節性から全節性にわたる多様なメサンギウム増殖病変を呈していた。また、メサンギウム領域異常を認める糸球体は腎皮質内に巣状に出現していることが多かったため、**DKO** マウスにおけるその出現頻度は観察可能な糸球体の約 6～10 %程度と比較的低かった。しかし、メサンギウム領域異常を伴う糸球体の出現頻度は成長とともに増加した (図 3A,3B)。これらの結果から 2～8 月齢の **DKO** マウスの糸球体構造異常は腎臓全体から考えて軽微であることがわかり、2～8 月齢の **DKO** マウスの腎機能障害が軽微であることとも一致していた。2～8 月齢の **Sulf1 SKO** マウスと **Sulf2 SKO** マウスでもメサンギウム増殖やメサンギウム基質異常の出現頻度は増加傾向を示したものの出現頻度は約 1～4%程度と低く、**WT** マウスと有意差がなかった(図 3A,3B)。

2～8 月齢の血清 Creatinine 濃度(mg/dl)と 8 月齢の尿中 Albumin 排泄量(尿中 Albumin 濃度(mg/dl)/尿中 Creatinine 濃度(mg/dl)比)の結果とメサンギウム領域異常の頻度を考慮すると、糸球体恒常性維持には **Sulf1**、**Sulf2** が共に関与しているが、*Sulf1*、*Sulf2* の単独欠損時には、もう一方の遺伝子はその機能を補っている可能性があり、**Sulf1**、**Sulf2** の糸球体内における役割を明らかにするためには、**DKO** マウスを解析する必要があると判断した。以降の実験では主に **WT** マウスと **DKO** マウスを用いることにした。

DKO マウスで観察されたメサンギウム領域異常を透過型電子顕微鏡を用いて、さらに詳しく観察した。メサンギウム領域の細胞成分は、形態学的に増殖したメサンギウム細胞や血管内皮細胞、単球様細胞で構成されていた(図 3C)。また、一部の糸球体毛細血管において血管内皮細胞の fenestrae 構造が崩壊していた(図 3C)。糸球体血管係蹄を繋ぎとめる細胞外マトリックスであるメサンギウム基質ではその増加と融解が混在しており、光学顕微鏡所見と一致していた。

次に、増殖しているメサンギウム細胞の性状を評価するために、 α -SMA 染色を行った。メサンギウム細胞が脱分化し活性化すると α -SMA 陽性の平滑筋様細胞となり、メサンギウム細胞増殖やメサンギウム基質産生亢進を示すことが知られている(68-71)。WT マウスでは糸球体血管極の輸入細動脈の血管平滑筋細胞に発現が認められたが、DKO マウスでは、それに加えてメサンギウム領域において α -SMA 陽性細胞を認めた(図 4A, 4B)。メサンギウム領域の α -SMA 陽性細胞はメサンギウム領域内の細胞増殖部位に一致していたため、DKO マウスのメサンギウム領域で活性型メサンギウム細胞が増加していることがわかった。さらに、透過型電子顕微鏡で観察されたメサンギウム領域内の単球様細胞や血管内皮細胞増殖について、免疫染色法を用いて糸球体内での出現頻度を評価した。CD68 (単球やマクロファージマーカー)染色は DKO マウスの腎臓糸球体内では陰性であり(図 4C)、CD31 (血管内皮細胞マーカー)もメサンギウム増殖部位の一部に発現を認めるのみであった(図 4D)。これらの結果から DKO マウス糸球体のメサ

ンギウム領域で増殖している細胞は、主に活性化型メサングウム細胞であると判明した。

DKO マウスでは、尿中アルブミン排泄増加の原因となる糸球体濾過障壁のサイズバリアー障害の指標となる 血管内皮細胞の fenestrae 消失を認めたが、基底膜内のチャージバリアー障害の有無については、PEI 染色を用いて基底膜内の陰性荷電を可視化した。当初、高硫酸化ヘパラン硫酸が増加している DKO マウスでは PEI 粒子密度が増加すると予想されたが、8 月齢の WT マウスと DKO マウス間に基底膜内 PEI 粒子密度の有意差はなかった(図 5A、5B)。PAM 染色で認められた基底膜のスパイク様不整構造 (Out pocket; OP)は、基底膜 3 層構造のうち緻密斑が局所的に肥厚していることが電子顕微鏡的観察で判明した(図 5C)。8 月齢時点で、基底膜の単位長さあたりに占める基底膜不整 (Out pocket; OP)の出現割合は、WT マウスと比較して DKO マウスで明らかに高かった(図 5D)。OP は基底膜構成成分の産生亢進や分解抑制により出現すると思われる。糸球体血管係蹄の形成期において OP が認められることから、DKO マウスでは一部の糸球体において基底膜形成が未熟である可能性もある。Sulf1、Sulf2 が基底膜の産生や分解の調節に関与することが示唆された。

(iii) DKO マウス腎臓において高硫酸化ヘパラン硫酸が増加した

糸球体において *Sulf1* と *Sulf2* 欠損の影響を評価するために、結合に三硫酸化二糖が必要な Phage display 抗体である anti-HS phage display antibody (AO4B08: Toin H. van Kuppevelt より供与された phage display antibody) を用いてマウス腎臓を染色した(図 6A)。1.5~2 月齢 DKO マウスの腎臓皮質と糸球体の AO4B08 染色結果を AO4B08 の平均蛍光強度で定量化すると、WT マウスよりも約 1.5 倍だけ平均蛍光強度が高かった(図 6B)。

(iv) DKO マウス糸球体では PDGF-B、VEGF、TGF- β シグナル伝達が抑制された

メサンギウム領域異常の原因には、一般的に成長因子シグナル伝達の異常があると考えられている(14-16)。そこで、糸球体内の成長因子とその受容体の mRNA 発現を評価するためにマウス糸球体を単離し定量 RT-PCR を行った(図 7A)。WT マウスの糸球体では *PDGF-B*、*PDGFR- β* 、*FGF2*、*TGF- β* 、*VEGF* が 2 月齢と比べて 8 月齢で発現が上昇傾向にあり、この傾向は DKO マウスの糸球体でも認められた。さらに、DKO マウスの糸球体では *PDGF-B* や *PDGFR- β* mRNA 発現が加齢とともに増加し、8 月齢時点で DKO マウスの糸球体内 *PDGF-B*、*PDGFR- β* mRNA 発現が WT マウスよりも高くなった(図 7B)。組織でのタンパク発現を酵素抗体法で検出した場合でも PDGF-B、PDGFR- β は DKO マウスで発現強度が強かった(図 7C)。

Sulf1、Sulf2 により直接変化するのはヘパラン硫酸の硫酸化パターンであり、ヘパラン硫酸によって細胞間成長因子シグナル伝達は正にも負にも制御されうる(42-45, 51-55)。糸球体局所での成長因子シグナル伝達において、Sulf1、Sulf2 によるヘパラン硫酸の修飾がどのように機能しているかを知るために、*in vivo* のヘパラン硫酸構造を保持した DKO マウス由来の単離糸球体を培養し、成長因子添加によるシグナル伝達を検証した。

生後 2 月齢では、DKO マウスにおけるヘパラン硫酸組成の変化は AO8B08 染色により明らかであるものの、WT マウスと DKO マウスの糸球体内 *PDGF-B*、*PDGFR-β* mRNA 発現量に有意差はないことから、2 月齢前後(1.5～3 月齢)のマウスから単離した糸球体を用いた。

PDGF-B 添加後の培養糸球体では時間依存性に細胞内下流因子活性化の指標となる Akt のリン酸化が観察され、内部標準である total-Akt (t-Akt)と phospho-Akt (p-Akt)の比を測定して細胞内シグナル下流因子の活性化を評価したところ、DKO マウス由来の培養糸球体では、WT マウス由来の培養糸球体と比較して細胞内下流因子活性化が抑制されていた (PDGF-B 刺激後 12 時間目、24 時間目)(図 8A, 8B)。同様に VEGF、TGF-β 刺激後の DKO マウス由来の培養糸球体でも、リン酸化 Erk1/2 (VEGF 刺激後 8 時間目)、リン酸化 Smad2/3 (TGF-β 刺激後 12 時間目) が抑制されていた(図 8C, 8D, 8E, 8F)。従っ

て、Sulf1、Sulf2 により糸球体内における成長因子シグナル伝達は促進されていることが明らかになった。

FGF2 刺激を受けた糸球体において細胞内下流因子の活性化が顕在化しなかったことは、FGF2 の受容体である FGF receptor が正常糸球体環境ではほとんど発現しないことから(35)、妥当な結果であると考えられた。また、この培養系を用いた各成長因子下流シグナルの検出が特異的であることの傍証であると考えられた。

(v) DKO マウスでは糖尿病性腎症が増悪した

高血糖環境が糸球体恒常性を破綻させる機序に、糸球体内の成長因子シグナル伝達の調節異常が関与しており (22-23, 26, 60-61)、糖尿病性腎症を導入したマウス糸球体においても、その障害進展機序に *Sulf1*、*Sulf2* の有無がなんらかの影響を及ぼすと予想した。

Streptozotocin(STZ)誘導性の糖尿病性腎症モデルマウスにおいて、ヒトの進行性糖尿病性腎症で観察される (a) メサンギウム基質の限局的な増加(結節性病変)を再現することは難しいが、(b) 軽度のメサンギウム細胞増殖や (c) 糸球体肥大 (糸球体面積拡大)、(d) 糸球体濾過機能異常 (血清 Creatinine 濃度上昇や尿中 Albumin 排泄量増加) を引き起こすことは可能である(61)。本研究では(a)～(d)の指標を用いてマウス糖尿病性腎症の進行度を評価した。一般的に STZ 投与後 15 週が経過した時点で、メサンギウム細胞増殖などの形態異常が顕在化しはじめることが知られており、形態学的評価は 15 週前

後から開始することが望ましいと考えられた。ただし、高血糖による多尿多飲やインスリン欠乏による体重減少を合併することから死亡率も高く、STZ 投与後の長期間の経過観察は難しいため、薬剤投与後 30 週までに実験に用いられることが多い。本研究でも STZ 投与後、できるだけ早期に糖尿病性腎症の解析を行い、マウスへの負荷を軽減するよう考慮し、解析時期を決定した。薬剤投与後 6 週目以降に細胞内下流因子の活性化がメサンギウム病変の形成に関与しはじめることから(37)、今回は薬剤投与後 8 週時点で、糖尿病発症マウスの糸球体における成長因子シグナル伝達の変化を解析した。続いて、糖尿病性腎症に特徴的なメサンギウム増殖病変が出現すると報告されている薬剤投与後 15 週時点を基準に、その前後 3 週の薬剤投与後 12 週時点と 18 週時点で、メサンギウム細胞増殖やメサンギウム基質増加の出現頻度を評価した(表 5)。薬剤投与後 18 週時点は、生後約 7.5 月齢のマウスに該当しており非高血糖環境下でも腎機能障害が明らかになる時期であることから、高血糖刺激による腎臓形態異常や機能異常を正確に評価するためには 18 週よりも経過した糖尿病発症マウスを用いることは適切でないと考えた。コントロール群には STZ の溶媒である 10 mM クエン酸ナトリウム溶解液(pH 4.5)を投与した Vehicle 投与群を用いた。

投与後 8 週の時点では、組織学的に WT マウスと DKO マウスともに STZ 投与群と Vehicle 投与群のメサンギウム領域異常の発生頻度に有意な差は認められなかった。しかしながら、PDGF-B と PDGFR- β タンパク発現量を免疫組織学的に抗原染色陽性面積

で評価したところ、PDGF-B は STZ を投与した WT マウスと DKO マウスで増加していた(図 9A、9B)。また、PDGFR- β は STZ を投与した DKO マウスでのみ発現面積が増加していた(図 9A、9B)。

この時点のマウスから糸球体を単離し、タンパクを抽出して、Western blot 法を用いて、PDGFR- β の下流因子である Akt のリン酸化(70)を調べた。糖尿病発症に伴い WT マウス糸球体内ではリン酸化 Akt 発現が増加していたが、糖尿病発症 DKO マウスでは検出されなかった(図 9C、9D)。このことから、PDGF-B と PDGFR- β を介した細胞内シグナルである Akt 活性化機序に対して Sulf1、Sulf2 が促進的に働いていることがわかった。

次に、STZ 投与後 12 週と 18 週時点における腎臓糸球体構造を分析した(図 10A、10B、10C)。STZ 投与後 12 週時点では糖尿病発症 WT マウスと DKO マウスの糸球体形態変化に明らかな差を認めなかったが、薬剤投与後 18 週時点において、糖尿病発症 DKO マウスのメサンギウム増殖病変の出現頻度が、糖尿病発症 WT マウスと比較して有意に高くなったため、STZ 投与後 18 週時点の血糖値や腎重量/体重比、腎臓形態、腎臓機能に加え、収縮期血圧も解析した。収縮期血圧測定を行う意義は、糖尿病状態ではインスリン欠乏による体重低下や腎臓容積増大、糸球体毛細血管へ血液を供給する輸入細動脈拡張が原因である糸球体高血圧が引き起こされると報告されており(72,73)、特に糸球体高血圧は糸球体構成細胞へ圧負荷を加え、糸球体面積拡大(糸球体肥大)やメサンギウ

ムや基底膜の細胞外マトリックス成分の増加を促進するだけでなく、全身血圧を上昇させ、多臓器不全を引き起こすことが知られており、糖尿病性腎症に留まらず、その他の糖尿病合併症の制御という観点で非常に重要な因子であると考えられるからである(72-73)。

しかし、マウスの糸球体内血圧測定を直接的に実施することは困難である。そのため、糸球体血管系蹄内圧亢進時に収縮期血圧が二次的に上昇するという考えにもとづいて、収縮期血圧の測定結果から糸球体血管系蹄内圧を推測することにした。

糖尿病を発症した WT マウスと DKO マウス間で、血糖値、収縮期血圧、腎重量 / 体重比には有意差がなかった (表 6)。糸球体傷害後に二次性の全身性血圧上昇を来すまでにはタイムラグが存在することから、本実験における収縮期血圧測定結果から、糖尿病発症 DKO マウスのメサンギウム病変出現メカニズムに糸球体高血圧が関与しないとは言いきれないが、関与する可能性はかなり低いと考えられる。

糖尿病性腎症に特徴的なメサンギウム増殖病変(a, b)をはじめとした形態変化と腎臓機能障害を評価した。糖尿病性腎症に特徴的なメサンギウム細胞増殖やメサンギウム基質増加などのメサンギウム増殖病変の出現頻度は糖尿病発症 DKO マウスで高く(図 10B, 10C)、メサンギウム増殖病変の主体はメサンギウム基質増加であった。糸球体濾過障壁構造を透過型電子顕微鏡を用いて評価すると、糖尿病発症 DKO マウスでのみポドサイト障害を反映する foot process effacement が出現しており(図 10D)、糖尿病発症 DKO マ

ウスでは糸球体濾過障壁に異常が起きていた。(d)糸球体濾過機能を反映する血清 Creatinine 濃度 (mg/dl) と尿中アルブミン排泄量 (尿中 Albumin 濃度 (mg/dl)/尿中 Creatinine 濃度 (mg/dl) 比) も高値であり(図 10E)、糸球体濾過障壁構造異常とその機能異常は一致していた。また、糖尿病性腎症の進展時にみられる(c)糸球体面積拡大は、糸球体血管系蹄内の圧力と、成長因子シグナル伝達亢進による糸球体構成細胞増殖や細胞外マトリックス増加を反映する形態学的変化である。STZ 投与後 12 週時点では WT マウスと DKO マウス共にメサンギウム細胞増殖を主体としたメサンギウム領域拡大をとるが、STZ 投与後 18 週時点では、糖尿病発症 DKO マウスでのみメサンギウム基質増加と糸球体面積縮小を同時に認める糸球体が散見された(図 10A, 10B)。高血糖刺激は WT マウスの糸球体における *Sulf1*、*Sulf2* 発現を増加させ(図 10A)、糖尿病発症 WT マウスは糖尿病発症 DKO マウスよりも病変の進展が抑制されたことから、*Sulf1*、*Sulf2* は糖尿病性腎症の進展に対して抑制的に作用すると推察できた。

6. 考察

(i) 糸球体に発現する *Sulf1*、*Sulf2* は相補的に作用する

Sulf1、*Sulf2* は出生直後だけでなく 8 月齢においても糸球体に発現しており、成長後も発現パターンは過去の報告(49)に類似していた。*Sulf1* mRNA がポドサイトに、*Sulf2* mRNA がメサンギウム細胞や血管内皮細胞に局在する異なった発現パターンを示したため、当初、糸球体内で *Sulf1* と *Sulf2* は異なる生理的機能を持つと考えて、WT マウス、*Sulf1* SKO マウス、*Sulf2* SKO マウス、DKO マウスにおける腎臓機能と腎臓糸球体構造を評価したが、*Sulf1* と *Sulf2* 単独欠損時では、DKO マウスと比較して糸球体にわずかな異常が観察されるのみであった。したがって、*Sulf1*、*Sulf2* は発現細胞が異なっている点においても、糸球体内の酵素活性レベルという点において相補的に作用すると考えられる。これは、*Sulf1* と *Sulf2* が細胞表面や細胞外マトリックス（基底膜やメサンギウム基質）へ放出され、基質であるヘパラン硫酸の S 領域に対して生理的機能を発揮する分泌タンパクであることも矛盾はしておらず、成育や筋細胞の分化において *Sulf1*、*Sulf2* が補償作用を持つという報告(74)を支持していた。

(ii) *Sulf1*、*Sulf2* が腎機能維持に不可欠な糸球体濾過障壁の恒常性を維持する

DKO マウスの腎臓機能障害は 8 月齢まで推移して初めて明らかになった。Creatinine (分子量: 113)は筋肉のエネルギー源となるアミノ酸の一種である Creatine が代謝された

物質であり、腎機能障害時に血清濃度が上昇する腎排泄性タンパクである。WT マウスと比較して体格が小さく筋肉量も少ない DKO マウスでは血清 Creatinine 濃度(mg/dl) が過小評価されやすく、わずかかもしれないが、8 月齢の DKO マウスの実質的な腎機能は見かけよりも悪化していると考えられる。

次に、糸球体濾過障壁のうちサイズバリアーとチャージバリアーが *Sulf1*、*Sulf2* 欠損時にどの様に変化するのかを解析した。電子顕微鏡所見に血管内皮細胞のフェネストラ構造の消失が認められ糸球体濾過障壁のサイズバリアーは障害されていた。また、チャージバリアーの評価方法として確立している PEI 染色を行ない、基底膜内の PEI 粒子数を定量化したところ、WT マウスと DKO マウス間に有意差を認めなかった。抗 HS phage display 抗体 (AO4B08) を用いた染色で、DKO マウスの糸球体においてヘパラン硫酸の三硫酸化二糖成分が増加していることが確認できたことから、*Sulf1*、*Sulf2* 両欠損によるヘパラン硫酸の組成変化は PEI 染色に影響を与えない程度であることがわかる。PEI は陰性荷電部位に結合する沈着物として観察可能であることから、基底膜内にヘパラン硫酸よりも多く含まれるコンドロイチン硫酸などの他の陰性荷電物質を主に検出していると推察できる。実際、基底膜に向けてヘパラン硫酸を供給するポドサイトで、ヘパラン硫酸合成過程の最初の酵素である *Ext1* をノックアウトしてヘパラン硫酸そのものを無くしても、糸球体濾過障壁障害を反映する尿中タンパク排泄量は増加しなかった(8)ことが報告されており、ヘパラン硫酸自体が糸球体濾過障壁のチャージバリアーの

主成分として機能するとは考えにくい。

以上から、*Sulf1*、*Sulf2* は腎機能維持に不可欠な糸球体濾過障壁のうち血管内皮細胞の恒常性維持に必要な分子であり、過去の報告(56)と我々の研究結果から血管内皮細胞に障害が生じた機序にはポドサイトから血管内皮細胞への VEGF シグナル伝達異常があると考えた。さらに、ヘパラン硫酸がポドサイトの分化成熟機序や糸球体濾過機能維持に関与することが報告されており(41,75)、本研究でもポドサイトが産生する基底膜成分に異常な蓄積所見 (基底膜不整)を認めていることから、何らかのポドサイト障害が背景に存在すると考えられる。

(iii) *Sulf1*、*Sulf2* がメサンギウム細胞とメサンギウム基質の恒常性を維持する

DKO マウスの糸球体構造異常のうちメサンギウム細胞増殖とメサンギウム基質増加といったメサンギウム増殖病変が月齢とともに増加した。メサンギウム増殖病変が出現する機序として、糸球体では免疫学的異常(76)や成長因子シグナル伝達異常 (14-16) がよく知られている。ヘパラン硫酸には前述の成長因子シグナル伝達制御だけでなく、組織内への炎症細胞浸潤を調節することが報告されており(77)、*Sulf1*、*Sulf2* 欠損時にも糸球体内のヘパラン硫酸が炎症細胞浸潤や免疫複合体の沈着に関与し、炎症細胞浸潤やメサンギウム細胞とその基質のリモデリングに伴うメサンギウム増殖病変を引き起こす可能性があった。同時に、成長因子シグナル伝達異常もメサンギウム細胞の活性化(脱

分化)を惹起することでメサンギウム細胞増殖やメサンギウム基質増加をきたすことが知られている(68-70)。

DKO マウス糸球体の光学顕微鏡と電子顕微鏡観察では、明らかな炎症細胞浸潤や免疫複合体の沈着を認めず、免疫学的異常の関与を指摘できなかった。一方、DKO マウスのメサンギウム領域内で α -SMA 陽性の活性化型メサンギウム細胞が増加しており(68-70)、メサンギウム細胞が調節しているメサンギウム基質の異常(蓄積や融解)も認められたことから、メサンギウム細胞の恒常性維持に不可欠な成長因子の細胞間シグナル伝達異常により、メサンギウム細胞が活性化されメサンギウム増殖病変を引き起こしたと考えた。

(iv) **Sulf1**、**Sulf2** はメサンギウム細胞の恒常性維持に関与する **PDGF-B**、**VEGF** の細胞間シグナル伝達を促進する。

Sulf1、*Sulf2* 欠損が糸球体構成細胞の恒常性破綻に関連する **PDGF-B** や **TGF- β** 、**FGF**、**VEGF** などの複数の成長因子シグナル伝達異常を引き起こすと考えた。なかでも成獣期の **WT** マウスと **DKO** マウスのポドサイトに発現する **PDGF-B** は、相互作用によりヘパラン硫酸と結合・解離することが知られており(78)、メサンギウム細胞の **PDGFR- β** シグナル経路である **PI3K-Akt** 経路活性化を介してメサンギウム細胞の生存と増殖を調節している(68)。**PDGF-B** や **FGF2**、**TGF- β** のシグナル伝達亢進が、メサンギウム増殖病変を

惹起すると考えられていることから(13-20)、*Sulf1*、*Sulf2* 欠損時の糸球体内の高硫酸化ヘパラン硫酸増加はポドサイトからメサングウム細胞へ PDGF-B 等のシグナル伝達異常を誘導してメサングウム増殖病変を引き起こす可能性を考えた。

まず、糸球体内の細胞間成長因子シグナル伝達を評価するためにはヘパラン硫酸の特徴を配慮する必要がある。ヘパラン硫酸の糖鎖構造は多様であり動物種や組織環境に応じて二糖単位の組成、直鎖の長さや硫酸化パターンも多様性を持つことが知られることから(57-59)、特に Cell line として実験に用いられるメサングウム細胞やポドサイトの不活化細胞と *in vivo* の腎臓糸球体ではヘパラン硫酸構造が大きく異なると考えられる。

したがって、*in vivo* のヘパラン硫酸構造を保ち、かつ機能単位である糸球体構成細胞と細胞外マトリックスを保持した“単離糸球体”を用いて、成長因子のシグナル伝達制御を評価することが不可欠であると考えた。VEGF や TGF- β 、FGF もヘパリン結合性物質であり、それらのシグナル伝達も *Sulf1*、*Sulf2* によって促進もしくは抑制される場合があると報告されていることから、PDGF-B と同様に培養糸球体を各成長因子で刺激する実験を行った。

PDGF-B と VEGF、TGF- β 刺激時には WT マウスと DKO マウス由来の培養糸球体において細胞内下流因子の活性化が認められたが、DKO マウス由来の培養糸球体では、WT マウス由来の培養糸球体と比較すると、PDGF-B と VEGF、TGF- β のシグナル伝達

は大幅に抑制されていたことから、Sulf1、Sulf2 が成長因子シグナル伝達を促進していると考えられた。

(v) Sulf1、Sulf2 欠損時のメサンギウム増殖病変は PDGF-B、VEGF シグナル伝達抑制によるメサンギウム細胞の恒常性破綻に起因する

Sulf1、Sulf2 欠損時によるメサンギウム増殖病変の出現と悪化はこれらのシグナル伝達亢進によるものと予想したが、予想に反してそれらのシグナル伝達は抑制されていた。

PDGF-B については、PDGF-B の血中投与によりメサンギウム増殖病変が出現するという報告(14)と相反する報告として、PDGF-B の受容体である PDGFR- β の細胞内ドメインを PDGFR- α の細胞内ドメインに置き換えることで、PDGFR- β を最上流とする細胞内活性化シグナルを抑制する PDGFR- β 改変マウスにおいて、メサンギウム増殖病変 (メサンギウム細胞増殖とメサンギウム基質増加) が出現する(20)ことが知られている。我々の DKO マウスの実験結果と合わせて考えると、PDGF-B シグナル伝達は過剰になっても、不足しても、メサンギウム領域の恒常性を維持できなくなる重要な成長因子であり、細胞環境に応じて厳密に調節されると示唆される。このようなメカニズムを維持するために、DKO マウスの糸球体で WT マウスよりも糸球体内の PDGF-B、PDGFR- β mRNA 発現が増加していたのは、このようなメカニズムによる代償作用であると推察できる。さらに、ポドサイト特異的に VEGF 産生をノックアウトしたマウスでは血管内皮細胞障

害が誘導され、血管内皮細胞由来の PDGF-B 産生量が減少してメサンギウム細胞障害が起こると考えられている(29)。メサンギウム細胞傷害後にはリモデリング機序としてメサンギウム細胞増殖やメサンギウム基質増加がみられることから、VEGF シグナル伝達異常から DKO マウスでメサンギウム増殖病変の出現と増悪に関与するかもしれない。ただし、光学顕微鏡所見では血管内皮細胞障害を反映する血栓形成や細胞剥離像は認められず、メサンギウム増殖病変出現の主なメカニズムは PDGF-B シグナル伝達抑制であると思われる。

TGF- β についても細胞増殖抑制因子として糸球体メサンギウム基質増加を誘導することが知られているが(36)、他分野の上皮細胞で検討されているような細胞増殖抑制効果が、糸球体メサンギウム細胞でも発揮されるかについては、ほとんど検討されてこなかった。そのため、TGF- β シグナル伝達抑制がメサンギウム細胞増殖を引き起こす要因になるかを、過去の報告をもとに検討することができなかった。また、FGF2 については、遺伝子背景に関わらず、加齢とともに糸球体内 *FGF2* mRNA 発現は増加しており、8 月齢の DKO マウスにおいてその傾向が顕著であったが、*FGF* mRNA 増加が FGF シグナル伝達抑制に対する代償反応なのか、また独立した調節系による変化であるかは今後の検討課題である。

(vi) **Sulf1、Sulf2 は糖尿病性腎症の進展に対して抑制的に作用する**

これまでのデータでは糸球体の恒常性維持に Sulf1、Sulf2 が関与することがわかった。

一方、後天的に高血糖環境となった糖尿病発症後においても、糸球体内の成長因子シグナル調節異常と糸球体恒常性破綻の関連性が報告されており (22, 23, 26, 60)。Sulf1、Sulf2 が糸球体内の成長因子シグナル伝達調節機序に関与しているとするれば、糖尿病性腎症モデルマウスにおける糸球体構成細胞や細胞外マトリックスの恒常性破綻機序に深く関与している可能性があるかと推察した。

本研究で使用した STZ 誘導性の糖尿病性腎症は、薬剤投与後 15～30 週で糖尿病性腎症に特徴的なメサンギウム増殖病変 (メサンギウム細胞増殖、メサンギウム基質増加 (一部は結節化)) が出現するモデルであるが、メサンギウム病変の出現頻度や程度は極めて軽微であり、ヒト糖尿病性腎症の早期の病変に類似するモデルである。

STZ 投与後 12 週時点では WT マウスと DKO マウスの糸球体形態に明らかな差はなかったが、STZ 投与後 18 週時点においては、糖尿病発症 WT マウスにおいても過去の報告同様に、軽度のメサンギウム細胞増殖と糸球体肥大、腎機能障害を認めた。一方、糖尿病発症 DKO マウスでは、顕著なメサンギウム基質増加と糖尿病性腎症に特徴的なメサンギウム領域の Collagen type VI 発現増加が認められた。糖尿病発症 DKO マウスのメサンギウム病変は、薬剤投与後 12 週時点ではメサンギウム細胞増殖が目立ちメサンギウム基質増加が明らかでなかったが、薬剤投与後 18 週時点では広範なメサンギウム基

質増加が認められ、ヒト糖尿病性腎症の進展時に出現する糸球体内の細胞外マトリックス増加病変へつながる病変であった。

(vii) 糖尿病による高血糖環境が糸球体内の *Sulf1*、*Sulf2* mRNA 発現を亢進させた

糖尿病発症 WT マウスでは糸球体内の *Sulf1*、*Sulf2* mRNA 発現亢進だけでなく、近位尿細管上皮細胞内での *Sulf2* mRNA 発現亢進が認められた。特に近位尿細管上皮細胞での *Sulf2* mRNA 発現亢進は非糖尿病発症 WT マウスでは確認できない所見であった。マウス腎臓内の *Sulf1*、*Sulf2* は組織環境に応じて発現が制御されており、病変の進展に関与していると予想された。実際、糸球体内 *Sulf1*、*Sulf2* mRNA 発現が増加した糖尿病発症 WT マウスではメサンギウム増殖病変や糸球体機能障害の進展は緩徐であった。このことから *Sulf1*、*Sulf2* は糖尿病性腎症進展の抑制因子であると考えられた。*Sulf2* が糖尿病発症 WT マウスの尿細管上皮細胞で増加していた理由を明確にできなかったが、少なくとも糖尿病発症 DKO マウスでみられた尿細管上皮細胞の平坦化や萎縮は、糖尿病発症 WT マウスでは目立たないことから、尿細管上皮細胞の恒常維持に *Sulf2* が深く関与している可能性がある。

(viii) *Sulf1*、*Sulf2* は糖尿病性腎症時の糸球体内成長因子シグナル伝達を促進した

糖尿病発症 WT マウスでは糖尿病性腎症に特徴的な糸球体肥大が明らかであったが、糖尿病発症 DKO マウスでは糸球体面積の縮小傾向が認められた。この結果を糸球体高

血圧と糸球体内成長因子シグナル伝達亢進が糸球体肥大の原因であるという報告(73, 79) にもとづいて考えると、糖尿病発症 WT マウスと DKO マウスの 2 群間で収縮期血圧に有意差がないため、糖尿病発症 DKO マウスでは糸球体内の成長因子シグナル伝達が抑制されており、糖尿病発症 DKO マウス糸球体の細胞内下流因子活性化(リン酸化 Akt 発現) も抑制される事が判明したため、逆説的に Sulf1、Sulf2 は糸球体内の成長因子シグナル伝達を促進すると考えられた。ただし、糖尿病性腎症が増悪して糸球体内の細胞外マトリックス過剰産生により糸球体硬化を呈する段階に至ると、糸球体面積は低下すると考えられ、糖尿病発症 DKO マウスで糸球体面積拡大が顕著でなかった理由の一つには、糖尿病性腎症によるメサンギウム基質や基底膜の細胞外マトリックス増加による糸球体硬化進展が関与していたかもしれない。

(ix) Sulf1、Sulf2 はヘパリン結合性分子との相互作用を介して糖尿病性腎症を抑制する

これまでの研究から糸球体内 VEGF 発現低下が糖尿病環境において血管内皮細胞とメサンギウム細胞の障害を促進することが知られており(33)、糖尿病発症 DKO マウスでみられた糖尿病性腎症増悪のメカニズムにも VEGF シグナル伝達異常が関与していると思われる。しかし、複数の成長因子シグナル伝達異常が関与する糖尿病性腎症モデルマウスを使用しているため、糖尿病性腎症に特徴的なメサンギウム領域の細胞増殖や細胞外マトリックス増加を VEGF シグナル伝達異常のみで十分説明できたとは言えない。

糖尿病性腎症の予後改善や治療効果を考える際にメサンギウム基質増加による糸球体硬化機序を解明することが非常に重要である。本研究ではヘパラン硫酸と相互作用するヘパリン結合性物質の中で成長因子に注目して Sulf1、Sulf2 の機能分析を行ってきたが、ヘパラン硫酸はメサンギウム基質分解に関与する Matrix metalloproteinase(MMP)の MMP-2 や MMP-9 と結合することが知られており、その活性化機序にも関与している(80-81)。MMP-2、MMP-9 は糖尿病性腎症のメサンギウム基質増加や DKO マウスでみられた基底膜不整の出現機序を説明する重要な分子であることから、今後はヘパラン硫酸と相互作用する様々なヘパリン結合性物質の活性化調節機序等についても検討する必要がある。

7. 結論

Sulf1、Sulf2 は糸球体内のヘパラン硫酸をリモデリングすることで、PDGF-B のシグナル伝達を促し、正常糸球体の恒常性維持と糖尿病性腎症の進展抑制に寄与する。

謝辞

本研究に関して終始ご指導とご鞭撻を頂いた本学 腎・血管病理学教室 長田道夫教授に心より感謝致します。また、共同研究者として余りあるご協力を賜りました副指導教員の梶和子講師に深謝いたします。また、研究内容全般について御助言を賜りました梶正幸教授と梶研究室の皆様方へ感謝致します。マウスの採尿や血圧測定について多大な御助言を頂き、さらに蓄尿に必要なマウス代謝ケージや血圧測定機器を快く貸与してくださいました筑波大学動物資源センター 杉山文博准教授に感謝致します。糖尿病によって多尿や低体温を発症したマウス達のケージ交換や保温に努めて頂き、本研究において最も重要なマウスの管理を常に支えてくださいました筑波大学生命科学動物資源センターの職員の方に感謝致します。最後になりますが、在学中に共に研究に取り組み、支えてくださったすべての皆様と、私の家族に心から深謝いたします。

ありがとうございました。

8. 図表の説明

図 1 糸球体における *Sulf1*、*Sulf2* mRNA 発現

A: 8 月齢マウスの糸球体における *Sulf1*、*Sulf2* mRNA 発現を *in situ* hybridization で確認した。*Sulf1* mRNA は主に糸球体係蹄に沿って強いシグナルを発現しておりポドサイトの局在と一致した。*Sulf2* mRNA は主に腎皮質の遠位尿細管上皮細胞に発現しており、糸球体内ではメサンギウム領域にわずかに発現を認めた。Scale bar: 100 μ m (弱拡大)、10 μ m (強拡大)。B: WT マウスと DKO マウスの全身像 (左図) と腎臓 (右図)、Scale bar: 1 cm (左図)、1 cm (右図)。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス、*Sulf1*: *Sulfatase1*、*Sulf2*: *Sulfatase2*、sense: sense probe、antisense: antisense probe。

図 2 *Sulf1*^{-/-} マウス、*Sulf2*^{-/-} マウス、*Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウスにおける腎臓機能障害

血清 Creatinine 濃度 (mg/dl) (上表)、尿中 Albumin 濃度 (mg/dl) / 尿中 Creatinine 濃度 (mg/dl) 比 (下表)。数値は平均値 \pm 標準誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は、(上表)では ANOVA の post-hoc-Kramer HSD test、(下表)では Student *t*-test を用いた。*: $p < 0.05$ 。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウス、Sulf1 SKO: *Sulf1*^{-/-} マウス、Sulf2 SKO: *Sulf2*^{-/-} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス。

図3 *Sulf1*^{-/-}マウス、*Sulf2*^{-/-}マウス、*Sulf1*^{-/-};*Sulf2*^{-/-}マウスにおける糸球体構造異常

A: 8月齢DKOマウスの糸球体構造変化。Periodic acid-methenamine silver (PAM)で染色されたマウス腎臓の光学顕微鏡的観察では、DKOマウス糸球体にメサンギウム細胞増殖とメサンギウム基質増加、メサンギウム基質融解、spike様の基底膜不整 (Out pocket; OP) が認められ、糸球体は肥大していた。糸球体病変は腎皮質に巣状に出現しており (DKOマウス腎臓の PAM 染色: 上段)、その他の部位は光学顕微鏡上、形態学的変化を認めなかった (DKOマウス腎臓の PAM 染色: 下段)。Scale bar: 100 μ m (左図)、10 μ m (中図)、2 μ m (右図)。B: メサンギウム領域異常を有する糸球体の割合はDKOマウスで高かった。メサンギウム領域異常の頻度を定量化する際には、PAM染色を用いて腎皮質を染色し、観察可能なすべての糸球体を評価した。各マウス腎臓標本につき約60~90個の糸球体を観察した。C: 8月齢マウス糸球体の透過型電子顕微鏡観察ではWTマウスで軽微な構造異常を認めたが、DKOマウスではメサンギウム細胞増殖とメサンギウム基質増加、メサンギウム基質融解 (**) に加えてメサンギウム領域内への単球様細胞浸潤 (★) を認めた。基底膜不整像 (*) と、増殖した血管内皮細胞とその fenestrae 構造の消失 (Arrow head) を認めた。Scale bar: 10 μ m。数値は平均値 \pm 標準誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は B では ANOVA の post-hoc-Kramer HSD test を用いた。*: $p < 0.05$ 。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+}マウス、*Sulf1* SKO: *Sulf1*^{-/-}マウス、*Sulf2* SKO: *Sulf2*^{-/-}マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-};*Sulf2*^{-/-}マウス、END: Endothelial cell (血管内皮細胞)、GBM:

Glomerular basement membrane (基底膜)、MES: Mesangial cell (メサンギウム細胞)、POD: Podocyte (ポドサイト)、RBC (Red blood cell)、 N.S. no significant difference, ND No detectable expression。

図4 *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス糸球体では活性化型メサンギウム細胞が増加した

A: α -SMA は WT マウスの血管極の血管平滑筋に発現していたが、DKO マウスでは血管平滑筋に加えてメサンギウム細胞で発現していた。Arrow head は α -SMA 陽性メサンギウム細胞を指す。Scale bar: 10 μ m。B: 糸球体メサンギウム領域に α -SMA 陽性細胞を認めた糸球体の割合。C: 8 月齢 DKO マウス糸球体の糸球体と腎皮質では CD68 (単球、マクロファージ陽性細胞) 陽性細胞を観察できなかった。CD68 染色の Positive control として Low-density lipoprotein receptor deficiency (LDLR K.O.)マウス腎臓を使用した。Scale bar: 100 μ m (弱拡大)、10 μ m (強拡大)。D: 8 月齢マウスの Periodic acid-Schiff reagent (PAS) 染色 (左図)と CD31 (血管内皮細胞マーカー) 蛍光染色 (右図)。DKO マウスでみられるメサンギウム領域内の増殖細胞のうち CD31 陽性細胞はごく一部であった。Arrow head はメサンギウム領域内の細胞核を指す。Scale bar: 10 μ m。 数値は平均値 \pm 標準誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は B では ANOVA の post-hoc-Kramer HSD test を用いた。*: $p < 0.05$ 。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス、ND No detectable expression。

図 5 *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウスにおける基底膜の機能と構造

A: Polyethyleneimine (PEI) 染色により基底膜内の陰性荷電を定量化した。PEI 粒子を Arrow head で指し示した。Scale bar: 250 nm。B: 基底膜長 (nm) あたりの PEI 粒子密度。8 月齢マウスの 5 つの糸球体を透過型電子顕微鏡で観察して定量化した。C : DKO マウスで基底膜の不整像 (Out pocket: OP) が認められた。Arrow head は OP を指し示している。Scale bar: 1 μ m。D : OP (nm) が全基底膜長 (nm) に占める比率を定量化した。数値は平均値 \pm 標準誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は B、D ともに Student *t*-test を用いた。*: $p < 0.05$ 。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}, *Sulf2*^{+/+} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス、N.S. no significant difference。

図 6 糸球体における *Sulf1*、*Sulf2* mRNA 発現と高硫酸化ヘパラン硫酸発現

A: 2 月齢マウスの糸球体と腎皮質の高硫酸化ヘパラン硫酸を検出する AO4B08 染色の結果、Scale bar: 100 μ m (弱拡大)、10 μ m (強拡大)。B: AO4B08 染色の平均蛍光強度を糸球体と腎皮質のそれぞれにおいて定量化した。上表: 任意に選択した 30 個の糸球体における平均蛍光強度。下表: 任意に選択した 20 個の腎皮質における平均蛍光強度。数値は平均値 \pm 標準誤差。統計学的有意差の評価は Student *t*-test を用いた。*: $p < 0.05$ 。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}, *Sulf2*^{+/+} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス。

図 7 *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス糸球体では *PDGF-B*、*PDGFR-β* mRNA が増加した

A: マウス腎臓から選択的に採取した糸球体。黒色粒子は鉄粒子 (直径 2~5 μm) の集合体。Scale bar: 50 μm。B: *PDGF-B*、*FGF*、*TGF-β*、*VEGF*、*PDGFR-β* の糸球体内 mRNA 発現量を 2 月齢と 8 月齢マウスで評価した。House keeping gene には GAPDH を用いた。C: *PDGF-B* は糸球体のポドサイトに発現を認めた。*PDGFR-β* はメサンギウム領域と Bowman 嚢上皮細胞に発現していたが、ポドサイトには発現しなかった。*PDGF-B* 染色の最上段には一次抗体の代わりに 1×PBS を使用した negative control を示した。Arrow head はポドサイト内の *PDGF-B* 発現を示す。Scale bar: 10 μm。数値は平均値±標準誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は ANOVA の post-hoc-Kramer HSD test を用いた。*: $p < 0.05$ 。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス、month: 月齢、N.S. no significant difference。

図 8 *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス糸球体では *PDGF-B*、*VEGF*、*TGF-β* シグナル伝達が抑制された

A: 培養中の単離糸球体へ 10 ng/ml *PDGF-B* を添加すると、DKO マウス由来の培養糸球体ではリン酸化 Akt (p-Akt) 発現が抑制された。B: リン酸化 Akt (p-Akt) と Akt (t-Akt) の発現比。C: 培養中の単離糸球体へ 50 ng/ml *VEGF* を添加すると、DKO マウス由来の培養糸球体ではリン酸化 Erk1/2 (p-Erk1/2) 発現が抑制された。D: リン酸化 Erk1/2

(p-Erk1/2) と Erk1/2 (t-Erk1/2) の発現比。 E: 培養中の単離糸球体へ 10 ng/ml TGF- β を添加すると、DKO マウス由来の培養糸球体ではリン酸化 Smad2/3 (p-Smad2/3) 発現が抑制された。 F: リン酸化 Smad2/3 (p-Smad2/3) と Smad2/3 (t-Smad2/3) の発現比。 G: 培養中の単離糸球体へ 100 ng/ml FGF2 を添加したが、WT マウスと DKO マウス由来の培養糸球体のいずれにおいてもリン酸化 Erk1/2 (p-Erk1/2) 発現は認められなかった。 Positive control: 培養中の DKO マウス由来単離糸球体へ 50 ng/ml VEGF を添加した試料を用いた。 Negative control には NuPAGE LDS sampling buffer (1 : 4)、Sampling reducing agent (1 : 10)、RIPA バッファの混合液を用いた。 内部標準に β -actin を用いた。 統計学的有意差の評価は ANOVA の post-hoc-Kramer HSD test を用いた。 *: $p < 0.05$ 。 略語 : WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウス由来の培養糸球体、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス由来の培養糸球体、N.S. no significant difference。

図 9 糖尿病発症 *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウスでは成長因子シグナル伝達が抑制された

A- F: 薬剤投与後 8 週時点での評価。

A: 糸球体における PDGF-B と PDGFR- β の発現を酵素抗体法で評価した。 Scale bar: 50 μ m (弱拡大)、10 μ m (強拡大)。 B : PDGF-B と PDGFR- β の染色範囲を定量化することでタンパク発現量を推察した。 C: Western blot 法を用いて単離糸球体内のリン酸化 Akt (p-Akt)、Akt (t-Akt), β -actin 発現量を評価した。 D: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

(ELISA) を用いて糸球体内リン酸化 Akt (Phospho-Akt) 発現量を測定した。数値は平均値±標準誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は B では Student *t*-test、D では ANOVA の post-hoc-Kramer HSD test を用いた。*: $p < 0.05$ 。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス、Vehicle: 10mM クエン酸ナトリウム溶解液 (pH 4.5) 投与マウス(非糖尿病発症群)、STZ: Streptozotocin 投与マウス(糖尿病発症群)、N.S. no significant difference。

図 10 *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウスでは糖尿病性腎症が増悪した

A- F: 薬剤投与後 12 週と 18 週時点において腎機能と腎糸球体形態を評価した。

A: 糖尿病発症 WT マウスの糸球体と腎皮質の *Sulf1*、*Sulf2* mRNA 発現を *In situ* hybridization で評価した。Scale bar: 100 μm (弱拡大: 腎皮質)、10 μm (強拡大: 糸球体)。

B: 糸球体と腎皮質の Periodic acid-methenamine silver (PAM) 染色と、糸球体の Collagen VI 染色を用いた形態評価。Scale bar: 100 μm (弱拡大)、10 μm (強拡大)。C: メサンギウム領域の構造異常を認めた糸球体の割合 (上表) と糸球体係蹄面積 ($\times 10^2 \mu\text{m}^2$) (下表)。D: 糸球体濾過障壁構造の電子顕微鏡的観察。Scale bars; 2 μm 。E: 血清 Creatinine 濃度 (mg/dl) (上表)、尿中 Albumin 濃度 (mg/dl) / 尿中 Creatinine 濃度 (mg/dl) 比 (下表)。数値は平均値±標準誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は C、E では ANOVA の post-hoc-Kramer HSD test を用いた。*: $p < 0.05$ 。略語: WT: *Sulf1*

^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}; *Sulf2*^{-/-} マウス、Vehicle: 10mM クエン酸ナトリウム溶解液 (pH 4.5) 投与マウス (非糖尿病発症群)、STZ: Streptozotocin 投与マウス (糖尿病発症群)、N.S. no significant difference。

なお、図 1A, 図 3B, 図 4A, 図 4B, 図 4C, 図 4D, 図 5A, 図 5B, 図 5C, 図 5D, 図 6A, 図 6B, 図 7C, 図 8, 図 9A, 図 9B, 図 9C, 図 9D, 図 10A, 図 10B, 図 10C, 図 10D, 図 10E は *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F395-F408, 2016.から引用しており、図 2、図 3A, 図 7B は *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F395-F408, 2016.から引用したうえで改変している。

9. 参考文献

1. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J. Cell. Biol* 209: 199-210, 2015.
2. Abrahamson DR. Role of the podocyte (and glomerular endothelium) in building the gbms. *Semin Nephrol* 32: 342-349, 2012.
3. Jarad G, Miner JH. Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18: 226-232, 2009.
4. Miner JH. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol* 26: 1413-1417, 2011.
5. Miner JH. The glomerular basement membrane. *Exp Cell Res* 318: 973-978, 2012.
6. Suh JH, Miner JH. The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol* 9: 470-477, 2013.
7. Miner JH. Renal basement membrane components. *Kidney Int* 56 : 2016-2024, 1999.
8. Chen S, Wassenhove-McCarthy DJ, Yamaguchi Y, Holzman LB, van Kuppevelt TH, Jenniskens GJ, Wijnhoven TJ, Woods AC, McCarthy KJ. Loss of heparan sulfate glycosaminoglycan assembly in podocytes does not lead to proteinuria. *Kidney Int* 74, 289-299,

2008.

9. Kanwar YS, Linker A, Farquhar MG. Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J Cell Biol* 86: 688-693, 1980.

10. Morita H, Yoshimura A, Kimata K. The role of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Kidney Int* 73, 247-248. 2008.

11. 黒川清 (2015)、体液異常と腎臓の病態生理 第3版、メディカルサイエンスインターナショナル。

12. Bjarnegård M, Enge M, Norlin J, Gustafsdottir S, Fredriksson S, Abramsson A, Takemoto M, Gustafsson E, Fässler R, Betsholtz C. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormality. *Development* 131: 1847-1857, 2004.

13. Boor P, Ostendorf T, Floege J. PDGF and progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant Suppl* 1: 45-54, 2014

14. Floege J, Eng E, Young BA, Alpers CE, Barrett TB, Bowen-Pope DF, Johnson RJ. Infusion of platelet-derived growth factor or basic fibroblast growth factor induces selective glomerular

mesangial cell proliferation and matrix accumulation in rats. *J Clin Invest* 92: 2952-2962, 1993.

15. Floege J, Eng E, Young BA, Johnson RJ. Factors involved in the regulation of mesangial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Kidney Int Suppl* 39: S47-54, 1993.

16. Floege J, Johnson RJ, Couser WG. Mesangial cells in the pathogenesis of progressive glomerular disease in animal models. *Clin Investig* 70: 857-864, 1992.

17. Gilbert RE, Kelly DJ, Mckay T, Chadban S, Hill PA, Cooper ME, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. PDGF signal transduction inhibition ameliorates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 59: 1324-1332, 2001.

18. Iida H, Seifert R, Alpers CE, Gronwald RGK, Phillips PE, Pritzl P, Gordon K, Gown AM, Ross R, Bowen-Pope DF, Johnson RJ Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor are induced in mesangial proliferative nephritis in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6560-6564, 1991.

19. Johnson RJ, Raines EW, Floege J, Yoshimura A, Pritzl P, Alpers C, Ross R. Inhibition of mesangial cell proliferation and matrix expansion in glomerulonephritis in the rat by antibody to platelet-derived growth factor. *J Exp Med* 175: 1413-1416, 1992.

20. Klinghoffer RA, Mueting-Nelsen PF, Faerman A, Shani M, Soriano P. The two PDGF

receptors maintain conversed signaling *in vivo* despite divergent embryological functions. *Mol Cell* 7: 343-354, 2001.

21. Lindahl P, Hellström M, Kalén M, Karlsson L, Pekny M, Pekna M, Soriano P, Betsholtz .C. Paracrine PDGF-B/PDGFR- β signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development* 125: 3313-3322, 1998.

22. Nakagawa H, Sasahara M, Haneda M, Daisuke K, Hazama F, Kikkawa R. Immunohistochemical characterization of glomerular PDGFB-chain and PDGF-receptor expression in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 48: 87-98, 2000.

23. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H. m RNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 42: 450-456, 1993.

24. Schultz PJ, Dicorleto PE, Siver BJ, Abboud HE. Mesangial cells express PDGF mRNA and proliferative in response to PDGF. *Am J Physiol* 255: F674-F684, 1988.

25. Takahashi T, Huynh-Do U, Daniel TO. Renal microvascular assembly and repair: power and promise of molecular definition. *Kidney Int* 53: 826-835, 1998.

26. Baelde HJ, Eikmans M, Doran PP, Lappin DWP, Heer E, Bruijn JA. Gene expression profiling in glomeruli from human kidneys with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 43:

636-650, 2004.

27. Brosius FC, Coward RJ. Podocytes, signaling pathways, and vascular factors in diabetic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 21: 304-310, 2014.

28. Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE. Role of the VEGF-a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron Physiol* 106: 32-37, 2007.

29. Eremina V, Cui S, Gerber H, Ferrara N, Haigh J, Nagy A, Ema M, Rossant J, Jothy S, Miner JH, Quaggin SE. Vascular endothelial growth factor a signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. *J Am Soc Nephrol* 17: 724-735, 2006.

30. Fu J, Lee K, Chuang PY, Liu Z, He JC. Glomerular endothelial cell injury and crosstalk in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 308: 287-297, 2015.

31. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Geber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 111: 707-716, 2003.

32. Liu E, Morimoto M, Kitajima S, Koike T, Yu Y, Shiiki H, Nagata M, Watanabe T, Fan J.

Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J Am Soc Nephrol* 18; 2094-2104, 2007.

33. Sivaskandarajah GA, Jeansson M, Maezawa Y, Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE. Vegfa protects the glomerular microvasculature in diabetes. *Diabetes* 61: 2958-2966, 2012.

34. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev* 4: 39-45, 2008.

35. Jyo-Oshiro Y, Sasaki T, Kawakami Y, Nohno T, Itoh N, Osawa G, Kashihara N. Expression of the fibroblast growth factor receptor 1-4 genes in glomeruli in anti-Thy1.1 mesangial proliferative glomerulonephritis. *Virchow Arch* 435(5): 501-508, 1999.

36: Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF- β : Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 41: 557-559, 1992.

37. Wang A, Ziyadeh FN, Lee EY, Pyagay PE, Sung SH, Sheardown SA, Laping NJ, Chen S. Interference with TGF- β signaling by Smad3-knockout in mice diabetic glomerulosclerosis without affecting albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: 1657-1665, 2007.

38. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Luolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of

fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 4563-4568, 2013.

39. Martino MM, Briquez PS, Güc E, Tortelli F, Kilarski WW, Metzger S, Rice JJ, Kuhn GA, Müller R, Swartz MA, Hubbell JA. Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. *Science* 343: 885-888, 2014.

40. Sterzel RB, Schulze-Lohoff E, Weber M, Goodman SL. Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines, and extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 2, S126-131, 1992.

41. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131, 6009-6021, 2004.

42. Uchimura K. Sulfs:extracellular endosulfatases that regulate physiological functions of heparan sulfate. *Seikagaku* 83: 216-223, 2011.

43. Masu M, Keino-Masu K. Role of heparan sulfate endosulfatases in extracellular signal transduction. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 49: 2376-2383, 2004.

44. Masu M. Heparan sulfate regulates axon guidance. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 53: 489-94, 2008.

45. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446: 1030-1037, 2007.
46. Chen S, Wassenhove-McCarthy D, Yamaguchi Y, Holzman L, van Kuppevelt TH, Orr AW, Funk S, Woods A, McCarthy K. Podocytes require the engagement of cell surface heparan sulfate proteoglycans for adhesion to extracellular matrices. *Kidney Int* 78: 1088-1099, 2010.
47. Goldberg S, Harvey SJ, Cunningham J, Tryggvason K, Miner JH. Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement. *Nephrol Dial Transplantation* 24: 2044-2051, 2009.
48. Nagamine S. Expression and functional characterization of heparan sulfate 6-O-endosulfatases, sulfatase FP1 and sulfatase FP2. *Dissertation, graduate school of comprehensive human sciences university of tsukuba*, 2005.
49. Nagamine S, Tamba M, Ishimine H, Araki K, Shiomi K, Okada T, Ohta T, Kunita S, Takahashi S, Wismans RGP, van Kuppevelt TH, Masu M, Keino-Masu K. Organ-specific sulfation pattern of heparan sulfate generated by extracellular sulfatases Sulf1 and Sulf2 in mice. *J Biol Chem* 287: 9579-9590, 2012.
50. Nobuaki Maeda (2007), Neural proteoglycans 2007, research signpost.

51. Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, Sun W, Standiford DM, Emerson CP Jr.. Regulation of wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* 293:1663-6, 2001.
52. Uchimura K, Morimoto-Tomita M, Bistrup A, Li J, Lyon M, Gallagher J, Werb Z, Rosen SD. Hsulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem* 7: 2. 2006.
53. Lamanna WC, Baldwin RJ, Padva M, Kalus I, Ten Dam G, van Kuppevelt TH, Gallagher JT, von Figura K, Dierks T, Merry CL. Heparan sulfate 6-O-endosulfatases: discrete in vivo activities and functional co-operativity. *Biochem J* 400, 63-73, 2006.
54. Lamanna WC, Frese MA, Balleininger M, Dierks T. Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem* 283: 27724-27735, 2008.
55. Wang S, Ai X, Freeman SD, Pownall ME, Kessler DS, Emerson, Jr CP. Qsulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4833-4838, 2004.

- 56 Schumacher VA, Schlötzer-Schrehardt U, Karumanchi SA, Shi X, Zaia J, Jeruschke S, Zhang D, Pavenstädt H, Drenckhan A, Amann K, Ng C, Hartwig S, Ng KH, Ho J, Kreidberg JA, Taglienti M, Royer –Pokora B, Ai X. WT-1 dependent sulfatase expression maintains the normal glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol* 22: 1286-1296, 2011.
57. Esko JD, Selleck SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* 71:435-7, 2002.
58. Nakato H, Kimata K. Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. *Biochim Biophys Acta* 1573:312-8, 2002.
59. Lamanna WC, Kalus I, Padva M, Baldwin RJ, Merry CL, Dierks T. The heparanome--the enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation. *J Biotechnol* 129:290-307, 2007.
60. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH. Macrophages in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: potential role in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2987-2996, 2004.
61. Breyer MD, Böttinger E, Brosius III FC, Coffman TM, Harris RC, Heiling CW, Sharma K, AMDCC. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16: 27-45, 2005.

62. Kurup S, Wijnhoven TJ, Jenniskens GJ, Kimata K, Habuchi H, Li JP, Lindahl U, van Kuppevelt TH, Spillmann D. Characterization of anti-heparan sulfate phage display antibodies AO4B08 and HS4E4. *J Biol Chem* 282: 21032-21042, 2007.
63. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, Betsholtz C. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol* 161: 799-805, 2002.
64. Zhou L, Li Y, He W, Zhou D, Tan RJ, Nie J, Hou FF, Liu Y. Mutual antagonism of Wilms' tumor 1 and β -catenin dictates podocyte health and disease. *J Am Soc Nephrol* 28: 677-691, 2014.
65. Nyengaard JR. The quantitative development of glomerular capillaries in rats with special reference to unbiased stereological estimates of their number and sizes. *Microvasc Res* 45: 243-261, 1993.
66. Vaughan MR, Quaggin SE. How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? *J Am Soc Nephrol* 19: 24-33, 2008.
67. Schocklman HO, Lang S, Sterzel RB. Regulation of mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 56: 1199-1207, 1999.

68. Shimamura H, Terada Y, Okado T, Tanaka H, Inoshita S, Sasaki S. The pi3-kinase-akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis *in vitro* via NF-κB and bad. *J Am Soc Nephrol* 14: 1427-1434, 2003.
69. Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Pritzl P, Gordon K, Gown AM. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *J Clin Invest* 87, 847-858, 1991.
70. Stephenson LA, Haney LB, Hussaini IM, Karn LR, Glass II WF. Regulation of smooth muscle alpha-actin expression and hypertrophy in cultured mesangial cells. *Kidney Int* 54: 1175-1187, 1998.
71. Choudhury GG, Karamitsos C, Hernandez J, Gentilini A, Bardgett J, Abboud HE. Pi-3-kinase and mapk regulate mesangial cell proliferation and migration in response to pdgf. *Am J Physiol* 273: 931–938, 1997.
72. Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanism of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16: S30-S33, 2005.
73. Kosugi T, Heinig M, Nakayama T, Connor T, Yuzawa Y, Li Q, Hauswirth WW, Grant MB,

Croker BP, Campbell-Thompson M, Zhang L, Atkinson MA, Segal MS, Nakagawa T. Lowering blood pressure blocks mesangiolysis and mesangial nodules, but not tubulointerstitial injury, in diabetic enos knockout mice. *Am J Pathol* 174: 1221-1229, 2009.

74. Holst CR, Bou-Reslan H, Gore BB, Wong K, Grant D, Chalasani S, Carano RA, Frantz GD, Tessier-Lavigne M, Bolon B, French DM, Ashkenazi A. Secreted sulfatase sulf1 and sulf2 have overlapping yet essential roles in mouse neonatal survival. *PLoS One* 2: e575, 2007.

75. Sugar T, Wassenhove-McCarthy DJ, Esko JD, van Kuppevelt TH, Holzman L, McCarthy KJ. Podocyte-specific deletion of NDST1, a key enzyme in the sulfation of heparan sulfate glycosaminoglycans, leads to abnormalities in podocyte organization in vivo. *Kidney Int* 85: 307-318, 2014.

76. Kondo Y, Shigematsu H, Okabayashi A. Cellular aspects of rabbit masugi nephritis. III. mesangial changes. *Lab Invest* 34: 363-371, 1976.

77. Rops AL, van der Vlag J, Lesen JF, Wijnhoven TJ, van den Heuvel LP, van Kuppevelt TH, Berden JH. Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation. *Kidney Int* 65: 768-785, 2004.

78. Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S, Abramsson A, Enge M, Hellström M, Bäckström G, Fredriksson S, Landegren U, Nyström HC, Bergström G, Dejana E, Östman A, Lindahl P, Betsholtz C. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev* 17: 1835-1840, 2003.
79. Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 56: 393-405, 1999.
80. Munesue S, Yoshitomi Y, Kusano Y, Koyama Y, Nishiyama A, Nakanishi H, Miyazaki K, Ishimaru T, Miyaura S, Okayama M, Oguri K. A novel function of syndecan-2, suppression of matrix metalloproteinase-s activation, which causes suppression of metastasis. *J Biol Chem* 282: 28164-28174, 2007.
81. Koyama Y, Naruo H, Yoshitomi Y, Munesue S, Kiyono S, Kusano Y, Hashimoto K, Yokoi T, Nakanishi H, Shimizu S, Okayama M, Oguri K. Matrix metalloproteinase-9 associated with heparan sulfate chains of gpi-anchored cell surface proteoglycans mediates motility of murine colon adenocarcinoma cells. *J. Biochem.* 143: 581-592, 2008.

図表

1A

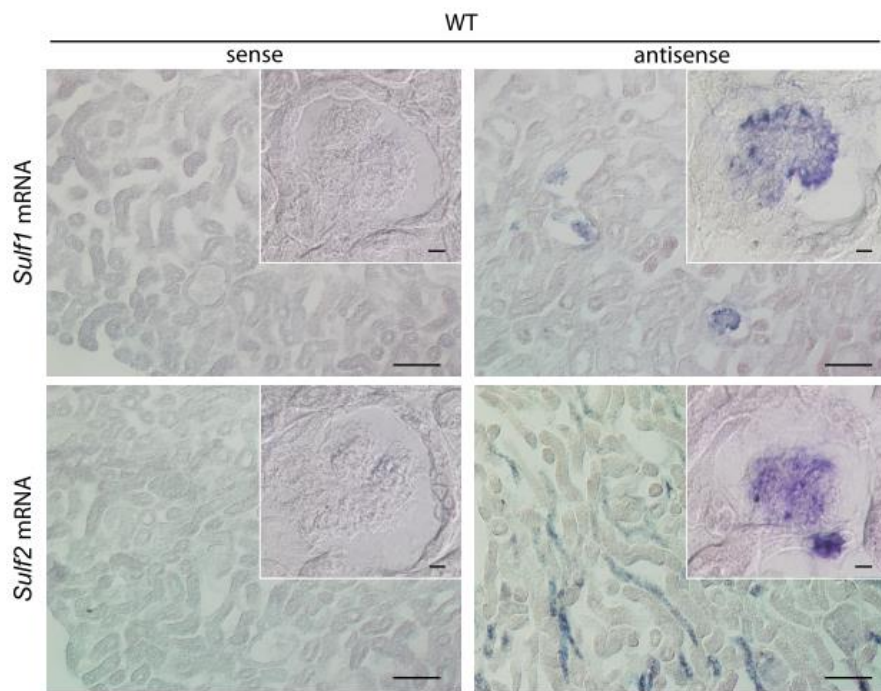


图 1B

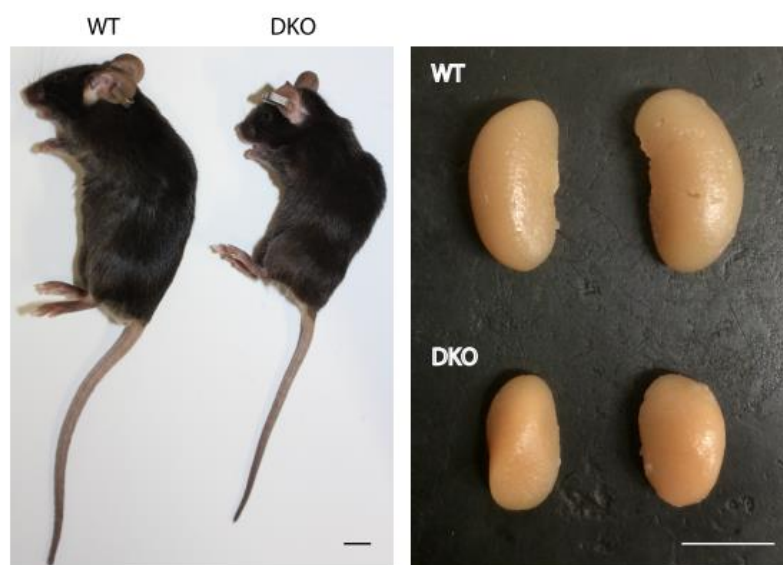


図 2

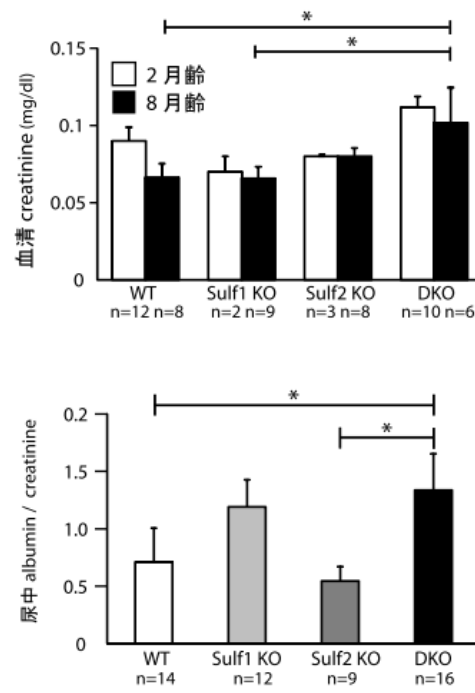


图 3A

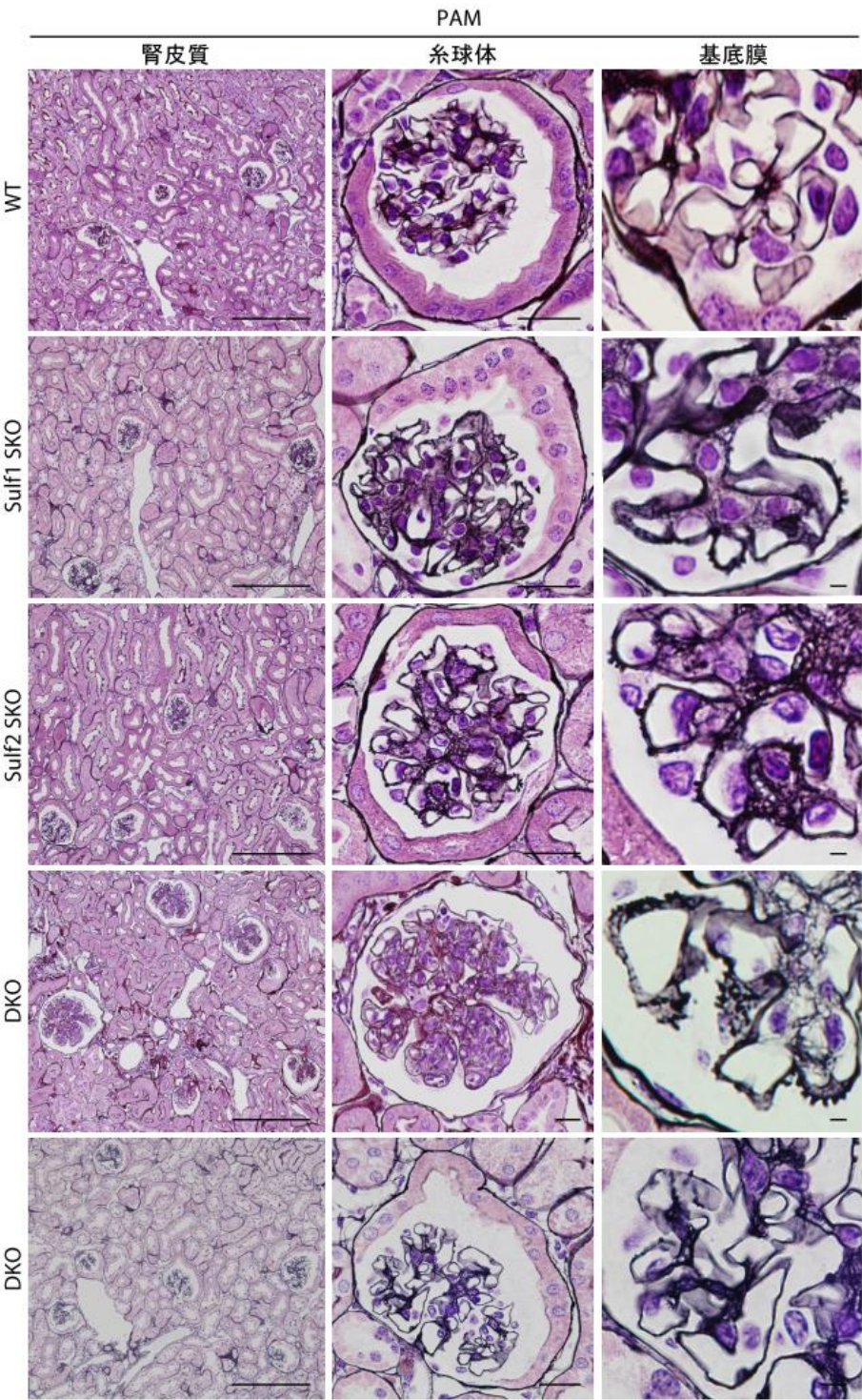


図 3B

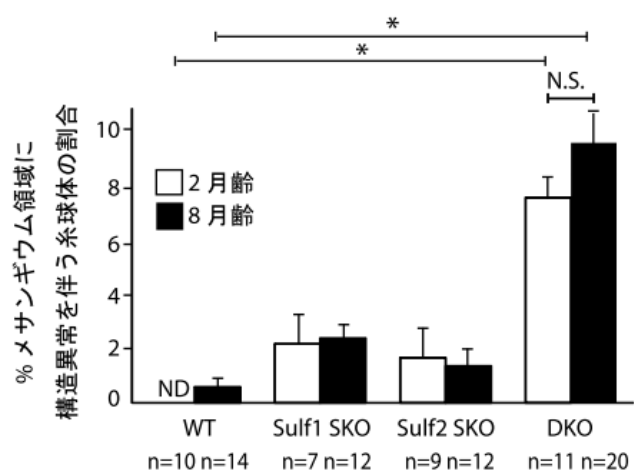
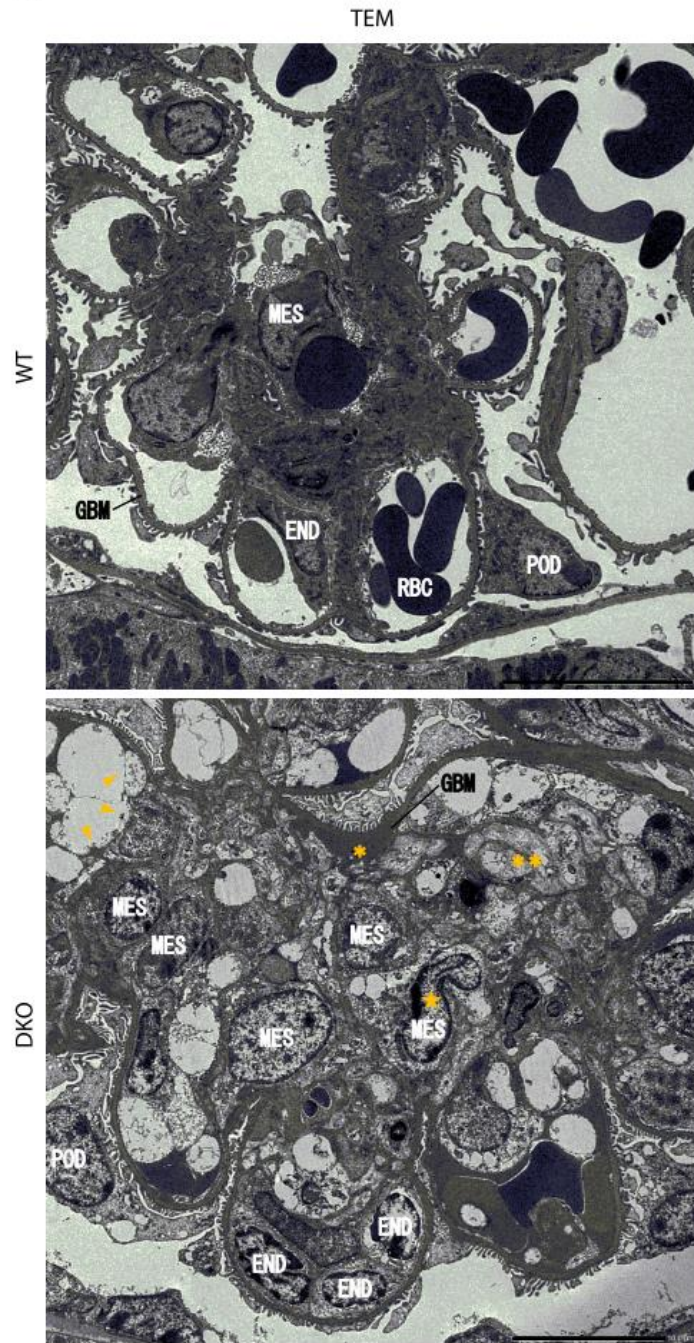


图 3C



4A

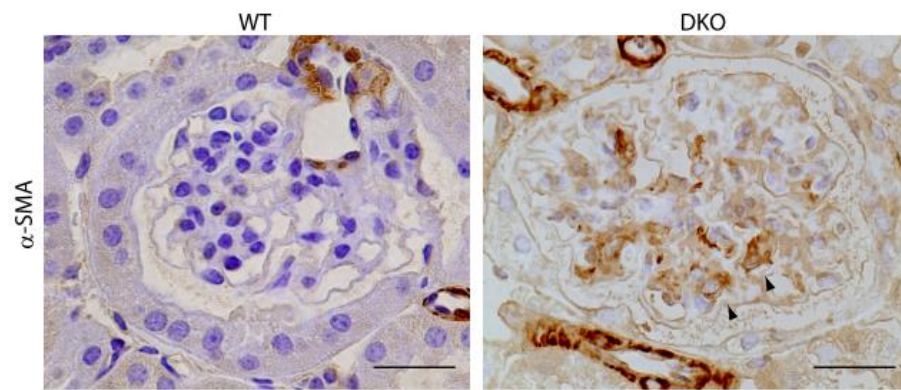


図 4B

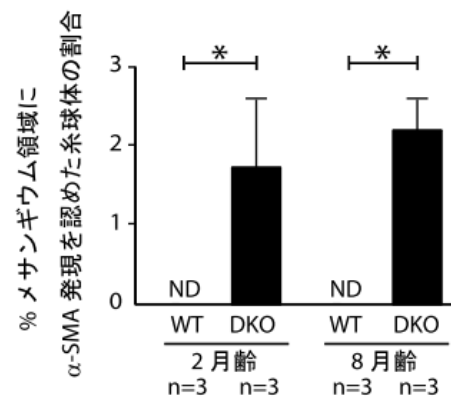
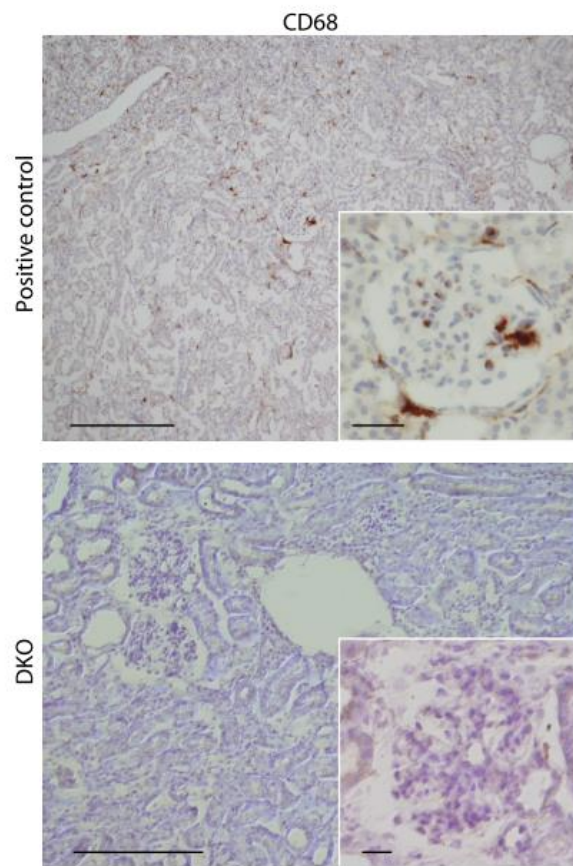
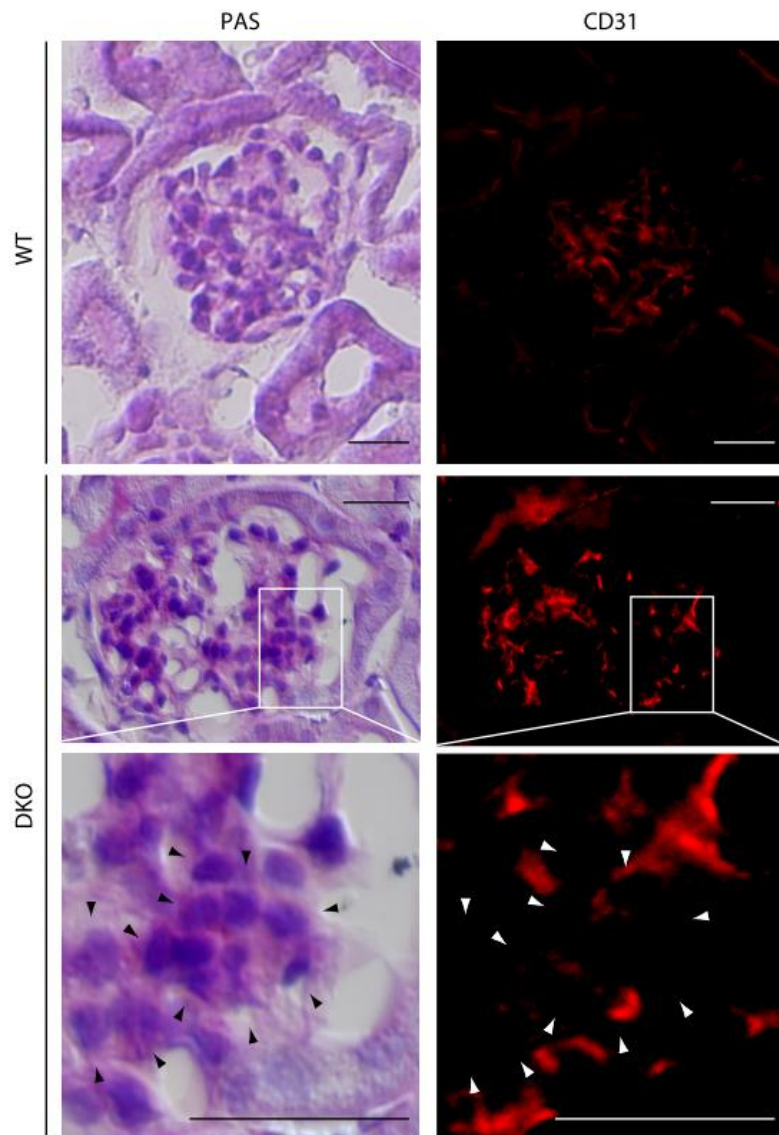


图 4C



4D



☒ 5A

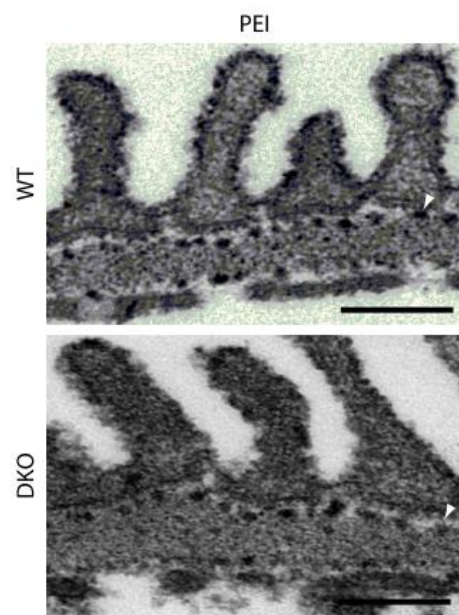


図 5B

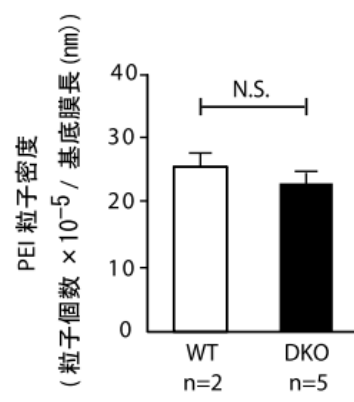


图 5C

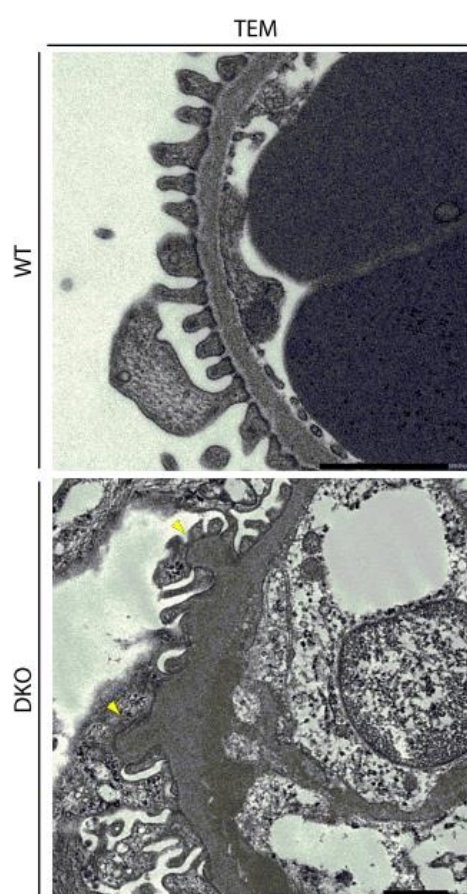
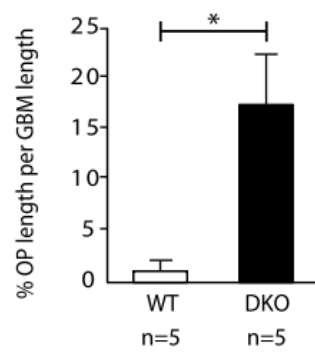


图 5D



☒ 6A

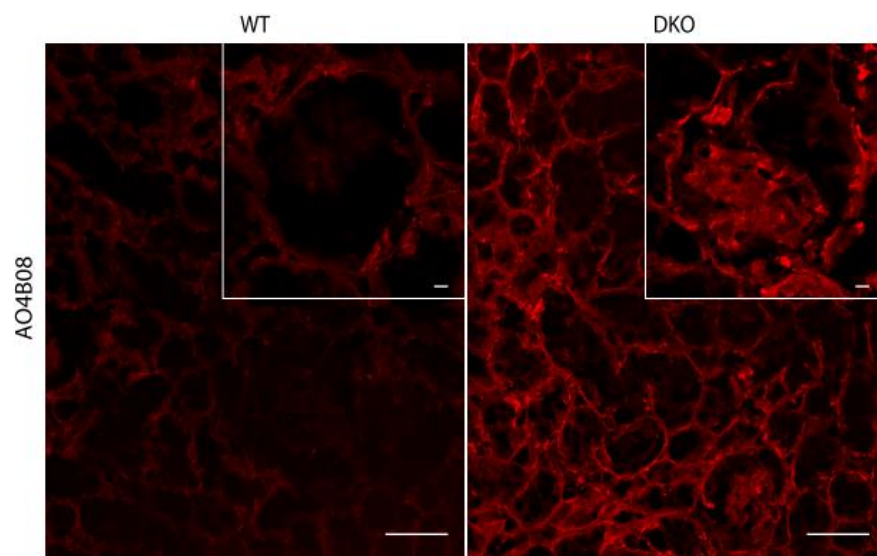


图 6B

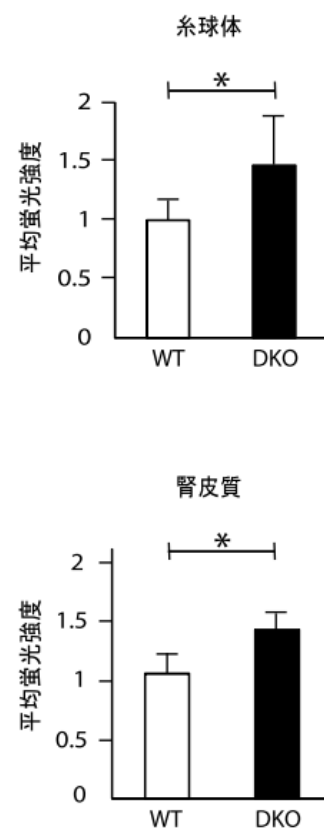


图 7A

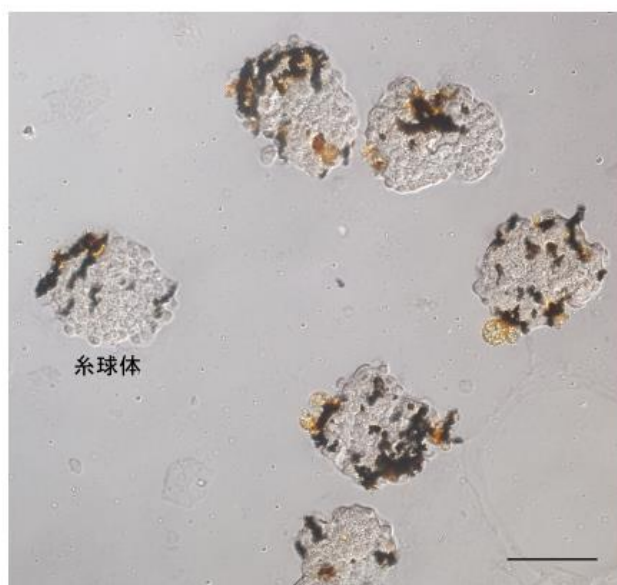
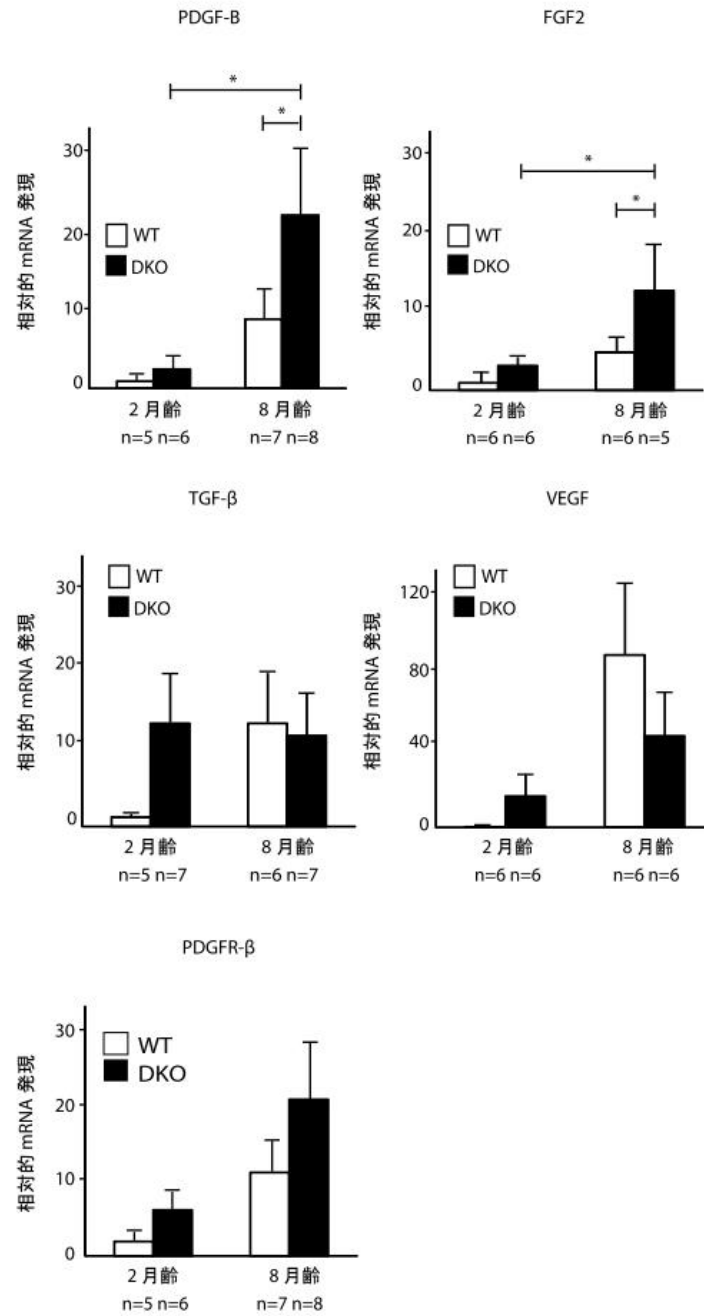
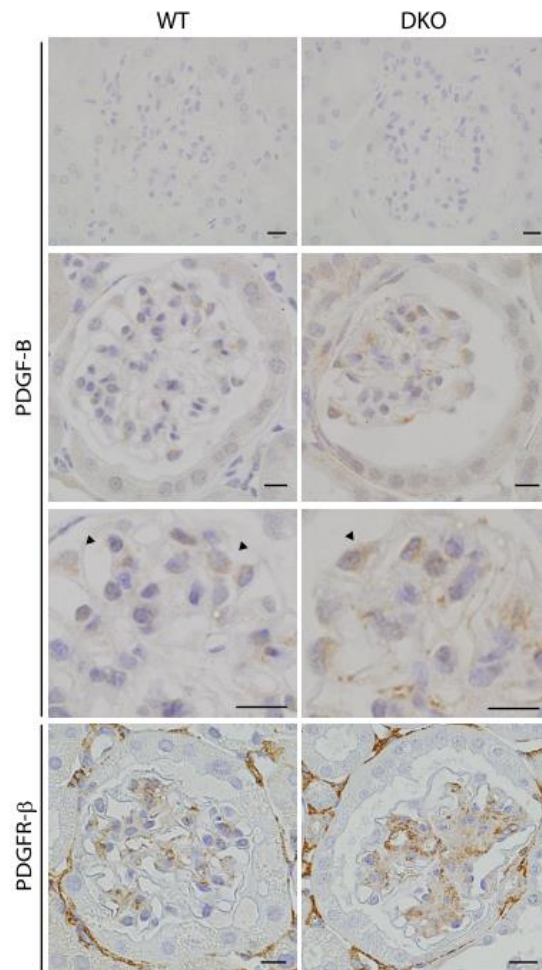


图 7B



7C



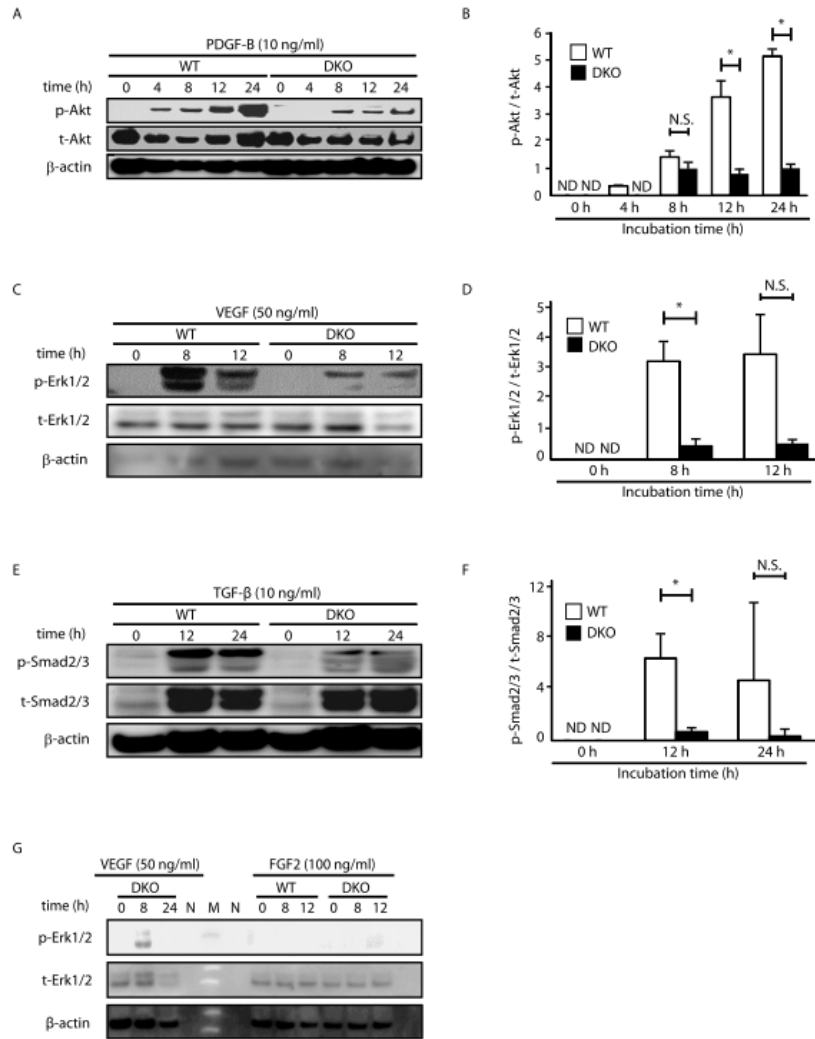


図 9A

【薬剤投与後 8 週】

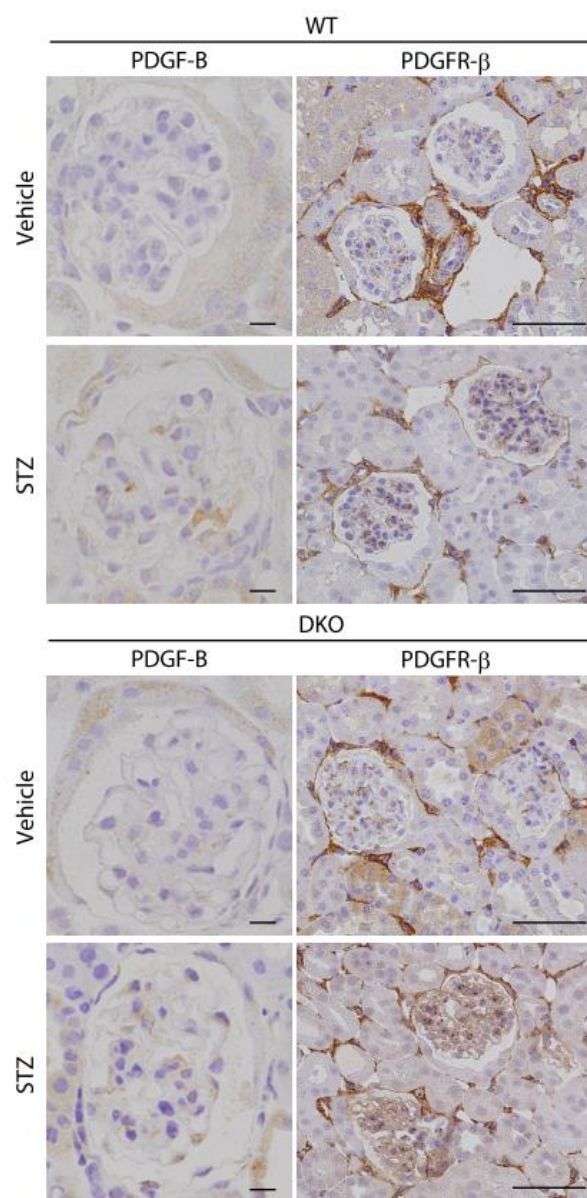


図 9B

【薬剤投与後 8 週】

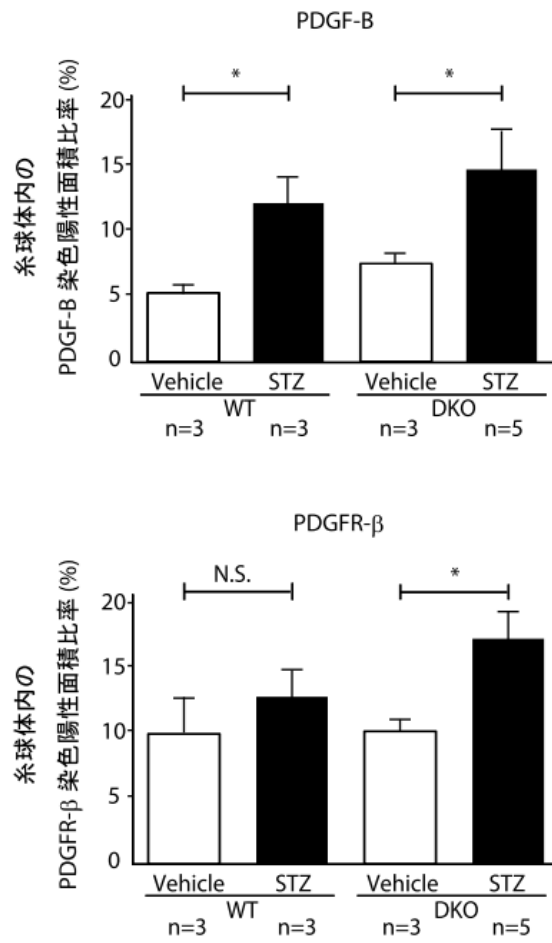


図 9C

【薬剤投与後 8 週】

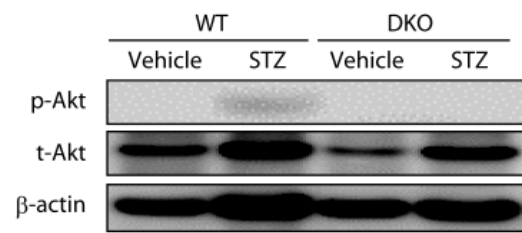


図 9D

【薬剤投与後 8 週】

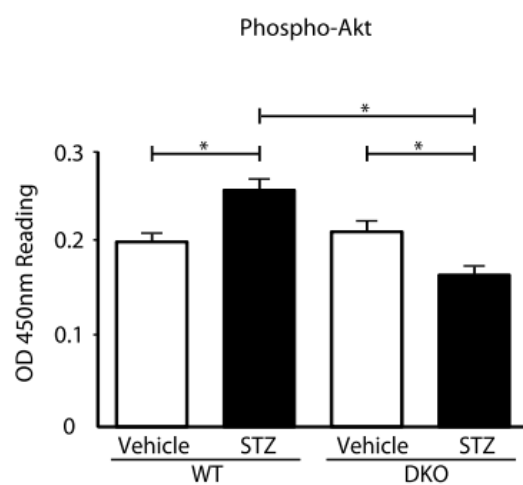


図 10A

【薬剤投与後 18 週】

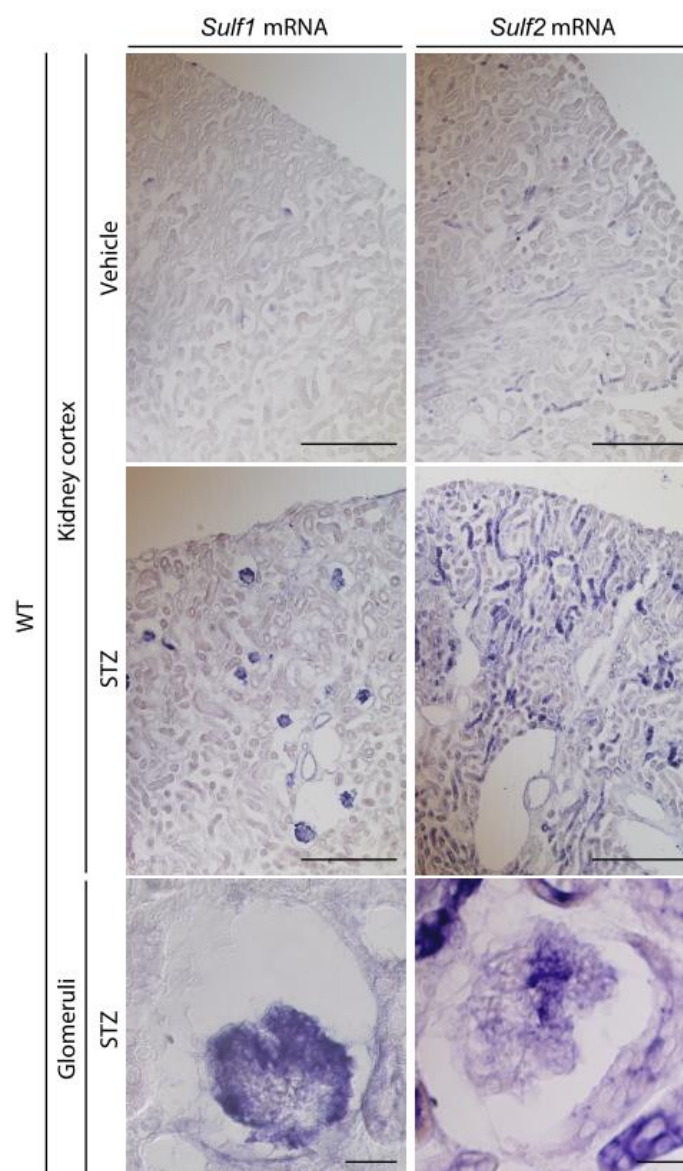


図 10B

【薬剤投与後 12 ～ 18 週】

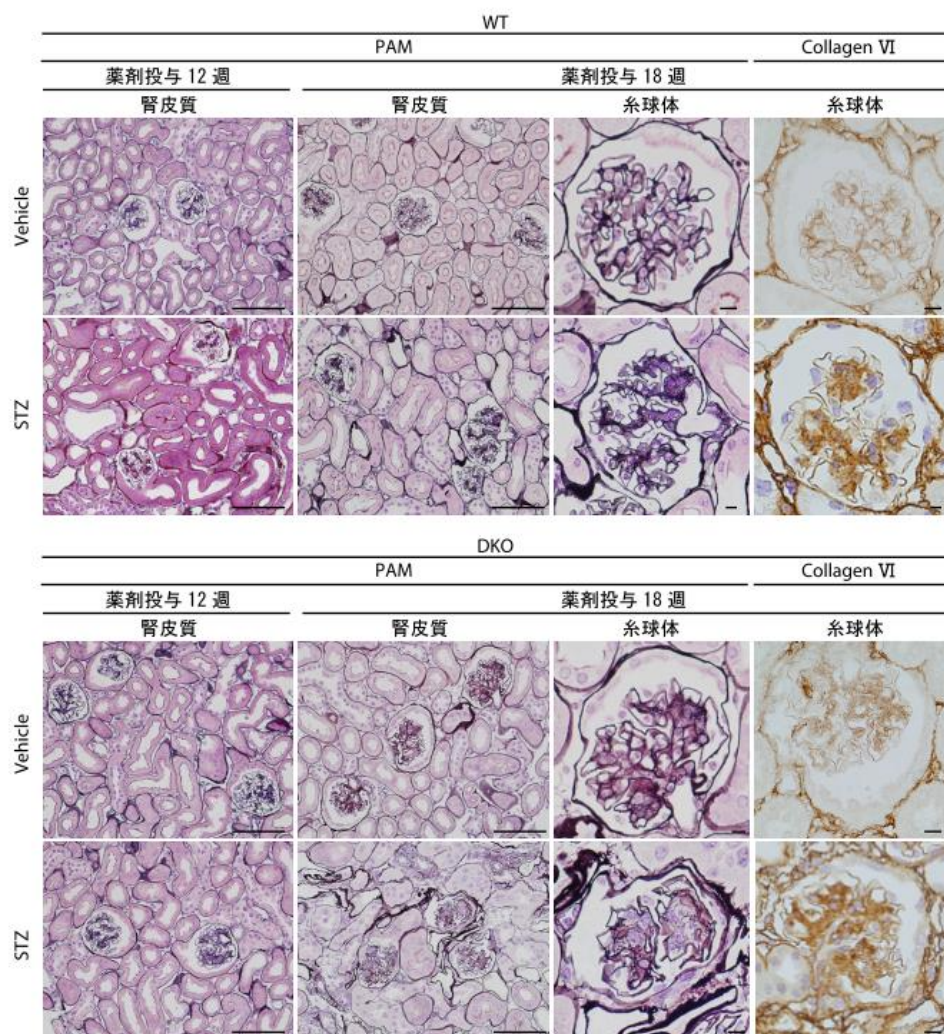


図 10C 【薬剤投与後 18 週】

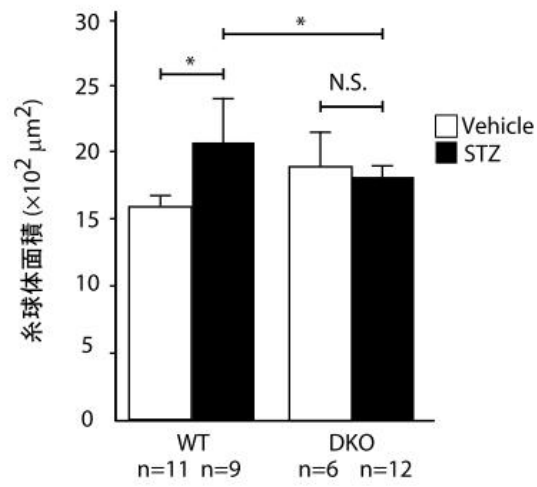
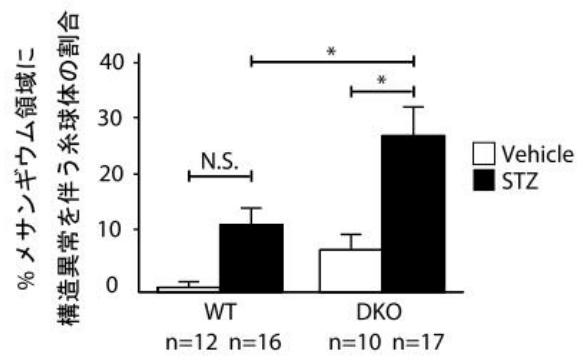


図 10D

【薬剤投与後 18 週】

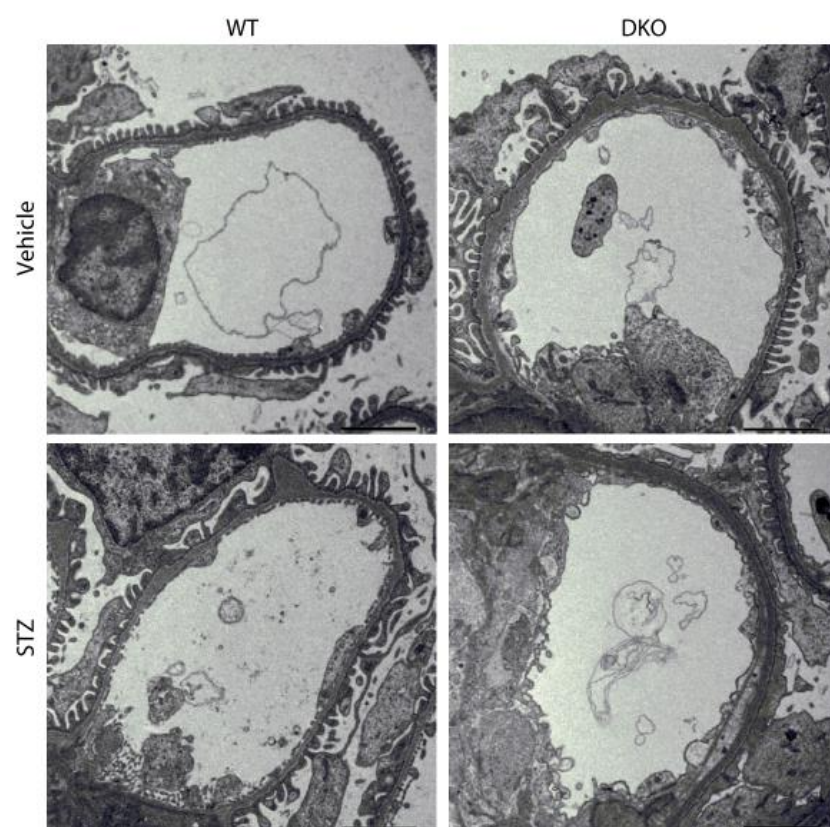


図 10E 【薬剤投与後 18 週】

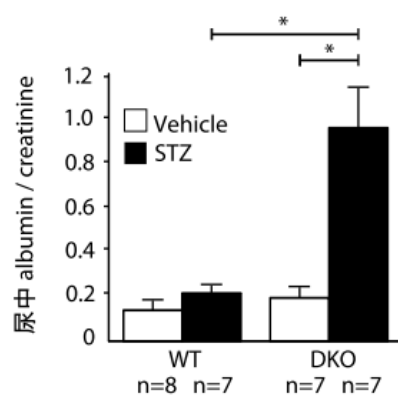
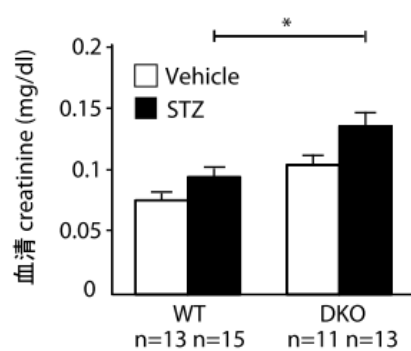


表 1 体重、腎重量、腎重量体重比、腎欠損率

	WT	Sulf1 SKO	Sulf2 SKO	DKO
体重 (g)	24.93±0.82 (n=8)	21.67±0.56 (n=5)	20.51±0.51 (n=11)	16.81±0.77 (n=10) *
腎重量 (g)	0.50±0.04 (n=8)	0.38±0.01 (n=5)	0.39±0.01 (n=11)	0.33±0.23 (n=10) *
腎重量 / 体重比 ($\times 10^{-3}$)	2.00±0.04 (n=8)	1.76±0.06 (n=5)	1.95±0.06 (n=11)	1.97±0.07 (n=10)
片側腎臓欠損 (%)	0 (n=101)	0 (n=49)	0 (n=61)	6.79 (n=103)

体重 (g)、腎重量 (g)、腎重量 / 体重比 ($\times 10^{-3}$) は 2 月齢マウスの数値である。片側腎臓欠損は

1～10 月齢のマウスを用い、片側腎臓欠損を認めた割合 (%) を示している。数値は平均値±標準

誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は ANOVA の post-hoc-Kramer HSD test

を用いた。*: $p < 0.05$ v.s. WT マウス。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウス、Sulf1 SKO: *Sulf1*^{-/-}、

Sulf2^{+/+} マウス、Sulf2 SKO: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{-/-} マウス、DKO: *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウス。

表 2 組織染色に用いた抗体

一次抗体	製造元	カタログ番号	ホスト動物
抗PDGF-B 抗体	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc127	rabbit
抗PDGFR- β 抗体	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF1042	goat
抗 α -SMA 抗体	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A2547	mouse
抗CD31抗体	BD Pharmingen, San Diego, USA	550274	rat
抗CD68 抗体	AbD Serotec, Oxford, UK	MCA1957GA	rat
抗HS phage display 抗体 (AO4B08)	Gifted by Dr. Toin H. van Kuppevelt (20, 28)	—	—
抗Collagen VI 抗体	Abcam, Cambridge, UK	ab6588	rabbit
二次抗体	製造元	カタログ番号	ホスト動物
peroxidase-標識 二次抗体	Nichirei, Tokyo, Japan	SAB-PO	rabbit or goat
抗VSV-G 抗体	MBL, Nagoya, Japan	563	rabbit
Alexa 568-標識抗rabbit IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA	A-11036	goat
Alexa 568-標抗rat IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA	A-11077	goat

表 3 プライマー塩基配列

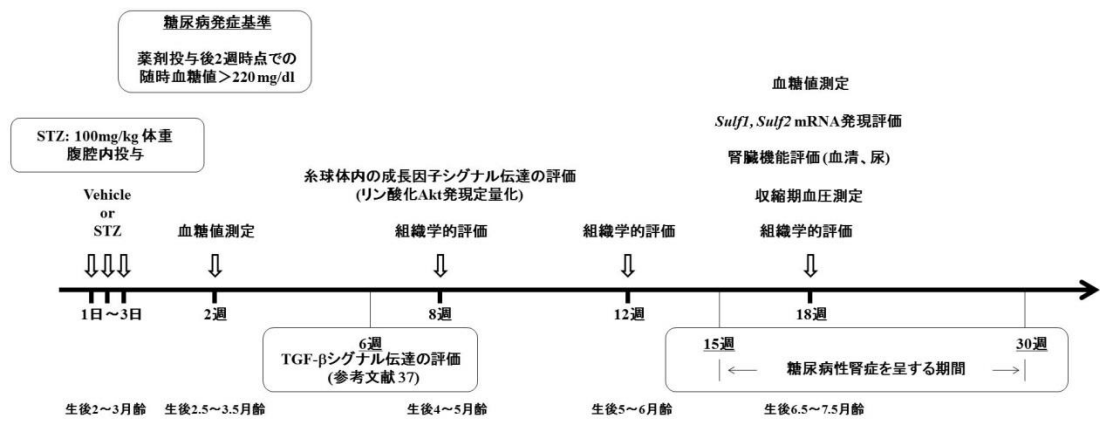
遺伝子名		プライマー配列
<i>PDGF-B</i>	<i>forward</i>	5'-GAAAGCTCATCTCGAGGGAGG-3'
<i>PDGF-B</i>	<i>reverse</i>	5'-GCGTCTTGCACTCGGCG-3'
<i>FGF</i>	<i>forward</i>	5'-CCAACCGGTACCTTGCTATGA-3'
<i>FGF</i>	<i>reverse</i>	5'-TTCGTTTCAGTGCCACATACCA-3'
<i>TGF-β</i>	<i>forward</i>	5'-TCAAATGCACAGCCACCAAT-3'
<i>TGF-β</i>	<i>reverse</i>	5'-TGTGTTGGTTGTAGAGGGCA-3'
<i>VEGF</i>	<i>forward</i>	5'-CAGGCTGCTGTAACGATGAA-3'
<i>VEGF</i>	<i>reverse</i>	5'-GCTTTGGTGAGGTTTGATCC-3'
<i>PDGFR-β</i>	<i>forward</i>	5'-TCAAGCTGCAGGTCAATGTC-3'
<i>PDGFR-β</i>	<i>reverse</i>	5'-CCATTGGCAGGGTGA CTC-3'
<i>GAPDH</i>	<i>forward</i>	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'
<i>GAPDH</i>	<i>reverse</i>	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'

表 4 ウェスタンブロット法に用いた抗体

一次抗体	製造元	カタログ番号	ホスト動物
抗phospho-Akt (Ser473) 抗体	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	#4058	rabbit
抗Akt 抗体	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	#9272	rabbit
抗phospho-Erk1/2 抗体	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	#4376	rabbit
抗Erk1/2 抗体	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	#4695	rabbit
抗phospho-Smad2/3 抗体	Cell Signaling Technology, Beverly, USA	#8828	rabbit
抗Smad2/3 抗体	BD Transduction Laboratories, Lexington, USA	610843	mouse
抗 β -actin 抗体	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A5441	mouse
二次抗体	製造元	カタログ番号	ホスト動物
抗Mouse Horseradish Peroxidase標識抗体	GE Healthcare, Little Chalfont, USA	N931	sheep
抗Rabbit Horseradish Peroxidase標識抗体	GE Healthcare, Little Chalfont, USA	N934	donkey

表 5 糖尿病性腎症誘導実験のプロトコール

略語: STZ, Streptozotocin; *Sulf1*, *Sulfatase1*; *Sulf2*, *Sulfatase2*; TGF- β Transforming growth factor- β 。



腎臓組織学的評価項目

- (a) メサンギウム基質の限局的な増加 (結節性病変)
- (b) メサンギウム細胞増殖
- (c) 糸球体肥大 (糸球体面積拡大)

腎臓機能評価項目

- (d) 糸球体濾過機能異常 (血清 Creatinine 濃度、尿中 Albumin 排泄量)

※補足説明※ (a)~(d)の表記は本文中の表記に合わせた。

表 6 糖尿病導入後のマウスの血糖値、収縮期血圧、腎臓重量、体重

	WT		DKO	
	Vehicle	STZ	Vehicle	STZ
血糖値 (mg/dl) 投与後2週時点	170.0 ± 7.2 (n=13)	435.4 ± 34.1 (n=22) *	161.5 ± 11.9 (n=12)	417.1 ± 32.5 (n=20) †
血糖値 (mg/dl) 投与後18週時点	181.2 ± 14.7 (n=13)	542.9 ± 32.8 (n=22) *	139.0 ± 43.1 (n=12)	452.0 ± 31.2 (n=20) †
収縮期血圧 (mmHg)	116.9 ± 2.9 (n=7)	111.3 ± 3.1 (n=6)	116.4 ± 3.8 (n=8)	119.0 ± 3.0 (n=7)
体重 (g)	38.3 ± 1.7 (n=12)	28.4 ± 1.5 (n=22)	27.1 ± 1.5 (n=10)	19.2 ± 1.1 (n=19) †, ‡
腎重量 (g)	0.70 ± 0.02 (n=12)	0.80 ± 0.03 (n=22)	0.48 ± 0.02 (n=10)	0.50 ± 0.04 (n=19)
腎重量 / 体重比 (×10 ⁻³)	18.4 ± 0.7 (n=12)	30.3 ± 1.9 (n=22) *	18.1 ± 1.3 (n=10)	26.5 ± 1.9 (n=19) †

収縮期血圧 (mmHg)、体重 (g)、腎重量 (g)、腎重量 / 体重比は糖尿病導入後 18 週時点での数

値である。数値は平均値±標準誤差。マウス個体数を n で表記。統計学的有意差の評価は ANOVA

の post-hoc-Kramer HSD test を用いた。*: p<0.05 v.s. 非糖尿病発症 WT マウス; †: p<0.05 v.s. 非糖

尿病発症 DKO マウス; ‡: p<0.05 v.s. 糖尿病発症 WT マウス。略語: WT: *Sulf1*^{+/+}、*Sulf2*^{+/+} マウ

ス、DKO: *Sulf1*^{-/-}、*Sulf2*^{-/-} マウス、Vehicle: クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5)、STZ:

Streptozotocin。