

氏名（本籍）	小林 凡子（岩手県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 7503 号		
学位授与年月	平成 27 年 5 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Podocyte injury-driven intracapillary PAI-1 accelerates podocyte loss via uPAR-mediated beta 1 integrin endocytosis (ポドサイトの一次障害により誘発された係蹄内の PAI-1 発現は uPAR を介して $\beta 1$ integrin の細胞内取り込みを促進する)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	梶 正幸
副査	筑波大学教授	医学博士	二宮 治彦
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	臼井 丈一
副査	筑波大学講師	博士（医学）	齋藤 知栄

論文の内容の要旨

(目的)

巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) は難治性ネフローゼ症候群、末期腎不全をきたす一次性糸球体疾患の 1 つであるが、その発生機序は解明されていない。糸球体係蹄はポドサイト、血管内皮細胞、基底膜から成り、ポドサイト - 内皮細胞間のシグナル伝達が糸球体の恒常性維持に重要である。本研究では、糸球体構築の変化を病的に捉えるとともに原因となるシグナル分子を同定することにより、ポドサイト障害における内皮細胞障害の意義を解明し、その分子を標的とする新しい治療法を開発することを目的とした。

(対象と方法)

NEP25 マウスに LMB2 (4 ng/g BW) を投与してポドサイト特異的障害 FSGS マウスを作成した。このマウスで経時的に、蛋白尿の測定、腎臓の免疫組織学的染色、電子顕微鏡観察を行い、糸球体病変のパターンを調べた。同マウスから糸球体を単離し、RT-PCR により遺伝子発現の変化を調べた。NEP25/LMB2 マウスに plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) の阻害薬またはヘパリンナトリウムを投与し、糸球体障害の変化を調べた。不死化ポドサイト細胞に urokinase-type plasminogen activator (uPA)、PAI-1、または両方を投与した後、細胞剥離試験、蛍光二重染色、免疫電顕、 $\beta 1$ インテグリンのウェスタンブロット

を行った。

(結果)

NEP25/LMB2 マウスでは、ポドサイトの減少、尿蛋白の増加、ポドサイト障害部位に一致した内皮細胞の障害（腫大および血栓形成）が観察された。単離糸球体では血栓形成に関わる PAI-1 mRNA が増加した。PAI-1 の局在は、早期には内皮細胞マーカーCD31 と一致し、後期には一部ポドサイトと一致したが、ポドサイト障害部位には限局していなかった。

NEP25/LMB2 マウスに PAI-1 阻害薬を投与したところ、蛋白尿の軽減、ポドサイト数減少の抑制が観察された。血栓スコアが有意に減少し、組織抗体染色で PAI-1 の発現が減少した。また、ポドサイト-基底膜接着分子である β 1 インテグリンは、NEP25/LMB2 マウスではポドサイト細胞質内に局在していたが、PAI-1 阻害薬投与群では正常マウスと同様にポドサイトの表面に沿って観察された。

NEP25/LMB2 マウスにヘパリンを投与すると対照群に比べて血栓形成スコアは減少したが、蛋白尿とポドサイト数の減少は改善されなかった。

細胞剥離試験では、PAI-1/uPA 複合体投与群でのみ剥離が有意に増加した。 β 1 インテグリンと uPA 受容体 (uPAR) の蛍光二重染色では、対照群と PAI-1 投与群で β 1 インテグリンが細胞辺縁に集簇し、uPAR が細胞膜と細胞質に点在していた。PAI-1/uPA 複合体投与群では、 β 1 インテグリンと uPAR が細胞内に局在し共局在率が上昇していたが、抗 uPAR 抗体で前処置しておくとも β 1 インテグリンと uPAR の局在は正常化した。ビオチン化標識により細胞表面の蛋白を回収し、 β 1 インテグリン量を調べたところ、PAI-1/uPA 複合体投与群でのみ細胞表面 β 1 インテグリンが減少していた。二重免疫電顕では、PAI-1/uPA 複合体投与群でのみ β 1 インテグリンと uPAR が細胞質の小胞内で共局在し、細胞表面の β 1 インテグリンと uPAR が減少した。

(考察)

FSGS モデルマウスである NEP25/LMB2 マウスにおいてポドサイト障害部位に限局した微小血管病変が存在することを証明し、PAI-1/uPA 複合体が uPAR を介して接着分子 β 1 インテグリンの細胞内への取り込みを引き起こすことがその障害メカニズムの 1 つの原因であることを明らかにした。NEP25 マウスに LMB2 を投与すると、ポドサイトに不均一に障害が起こる。その後、ポドサイト障害を契機とした内皮細胞障害が限局して起こり PAI-1 の発現が上昇する。その結果、PAI-1 がポドサイトの細胞表面で uPA および uPAR と複合体を形成し、さらに β 1 インテグリンと結合し β 1 インテグリンをエンドサイトーシスによりポドサイト内へ取り込む。基底膜-細胞接着因子である β 1 インテグリンが減少することによりポドサイトの剥離が促進される。このポドサイト-内皮細胞間クロストークの破綻がポドサイト障害を契機とする糸球体硬化の進展に寄与する新しい機序と考えられる。以上の結果から、PAI-1 を抑制することにより、ポドサイト障害を軽減する新しい治療法が開発される可能性があることを示唆することができた。

審査の結果の要旨

(批評)

難治性腎疾患の1つである巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) の進展機序を明らかにした優れた研究である。FSGS モデルである NEP25/LMB2 マウスを用いて、ポドサイト障害部位に限局した微小血管病変が存在すること、内皮細胞から分泌される PAI-1 が uPA および uPAR と複合体を形成し β 1 インテグリンをエンドサイトーシスすることによりポドサイト障害が進行することを証明している。実験は正確に注意深く実施され、実験データは正しく解析されている。PAI-1 阻害による腎疾患進行阻止という新しい治療法を提案する優れた研究成果である。

平成 27 年 3 月 31 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。