

系球体上皮細胞の細胞周期制御と分化調節機構を 基盤とした系球体硬化機序の解明

課題番号 10670154

**平成 10 年度 平成 11 年度科学研究費補助金（基盤研究 C）
研究成果報告書**

平成 12 年 3 月

**研究代表者 長田 道夫
（筑波大学臨床医学系病理部）**

はしがき

糸球体硬化機序の解明にはこれまで糸球体内で働く増悪因子を特定し、それを抑制するという手法で行われてきた。糸球体疾患は多様であるためにその原因は多様であるため、増悪因子も多様であった。最近、私たちは糸球体攻撃因子に対する糸球体構成細胞の反応という点から糸球体硬化を検討した結果、糸球体上皮細胞障害は、腎疾患の原因を問わない共通の硬化促進機序であることが判明した。

これまでの研究では糸球体上皮細胞は分裂能を持たず、再生しないと運命づけられた細胞であり、細胞障害の結果糸球体基底膜から脱落しする。この細胞が再生できないために、代償性にポーマン囊上皮細胞が基底膜を被覆し、糸球体の癒着が形成される。これまで、この一連の細胞挙動の背景にある分子は不明であった。

科学研究費助成による本研究は、このメカニズムを分子レベルで解明し、糸球体上皮細胞の再生による糸球体の治療などに役立てることを目的とした。

研究組織

研究代表者：長田道夫（筑波大学臨床医学系病理部）

研究分担者：渡辺照男（筑波大学基礎医学系病理学）

研究分担者：丸山直記（東京都老人総合医療研究所）

研究費

平成 10 年度	2,100 千円
平成 11 年度	1,100 千円
計	3,200 千円

研究成果の概要

本研究は、糸球体上皮細胞の細胞周期停止・分化の分子機構を明らかにすることを目的としている。平成 10 年度には糸球体上皮細胞分化過程での細胞周期抑制因子 (CKI) の特異的発現と細胞分化が一致すること、ヒト腎疾患の生検材料において糸球体硬化部位を被覆する細胞はボーマン嚢上皮細胞の形質であり、CKI 発現がみられないことを見いだした。これらより、糸球体上皮細胞の脱分化あるいはボーマン嚢上皮細胞の代償性の増殖があることが示唆された、そこで、平成 11 年度には糸球体上皮細胞の *in vivo* 分化増殖について確立された cell line を用いて IL-4 の反応を調べた結果、増殖しドーム形成することが分かった。一方 GFP マウスで検討中の分化についての解析は糸球体上皮細胞の分化特異的に発光することが、胎児マウスなどの発生過程の組織観察、器官培養での糸球体形成からの解析からわかり、この promoter の活性と糸球体上皮細胞の分化は密接に関連していることが推察された。一方、p27, p57 が共発現する糸球体上皮細胞において、どちらが有意な機能的意義があるかについて器官培養系で検索した。その結果、培養するにつれて p27 の発現は有意に上昇したが、p57 は減少した。以上を総括すると、糸球体上皮細胞とボーマン嚢上皮細胞は CKIs により異なった調節を受けており、糸球体障害には CKIs の発現の強い糸球体上皮細胞が細胞死した後には再生せず、代償性に CKIs の発現の低いボーマン嚢上皮細胞がこれを覆うことが明らかとなった。そして、糸球体上皮細胞の分化には CKIs のうち p27 が有意に機能することが示された。

キーワード

糸球体上皮細胞、ボーマン嚢上皮細胞、サイクリン、p27、p57、糸球体硬化、ネフロン、IL-4

研究発表

1) 学会誌等

なし。

2) 口頭発表

- 1) Michio Nagata, Shu Min, Sawako Shibata, Motoshi Hattori, Katsumi Ito, Teruo Watanabe: Expression of cell cycle inhibitor in hyperplastic epithelial pathology in focal segmental glomerulosclerosis. 31st American Society of Nephrology 1998.
- 2) 長田道夫: 糸球体上皮細胞の動態と分子背景 **特別講演** 16 回愛媛免疫抑制剤研究会, 1999. 12. 4
- 3) 長田道夫: 腎臓の発生障害の病理 東京腎フォーラム 1999
- 4) 長田道夫: 糸球体上皮細胞による糸球体硬化 第 3 回腎糸球体カンファレンス

話題提供 1999

- 5) 長田道夫、渡辺照男：糸球体の瘢痕と修復に関わる上皮細胞の動態 腎生検
セミナー「臨床に役に立つ組織病変の解析」第 29 回日本腎臓病学会東部学術会議 1999
- 6) Michio Nagata, Masaru Okabe, Teruo Watanabe: Differentiation Dependent
Transgene Activation in Glomerular Podocytes of GFP Transgenic Mice with Hybrid
Promoter. 32nd American Society of Nephrology 1999.
- 7) Laura Barisoni, Michele Mokrzycki, Leonarda Sablay, Michio Nagata, Harold
Yamase, Wilhelm Kriz, Peter Mundel: Dysregulated Podocyte Cell Cycle in
Collapsing glomerulopathies (CG). 32nd American Society of Nephrology 1999.

3) 出版物

- 1) Nagata M, Nakayama K, Terada Y, Hoshi S, Watanabe T: Cell cycle regulation and
differentiation in the human podocyte lineage. Am J Pathol 1998; 153: 1511-1520
- 2) Nagata M, Hattori M, Hamano Y, Ito K, Saitoh K, Watanabe T: Origin and phenotypic
features of hyperplastic epithelial cells in collapsing glomerulopathy Am J
Kidney Dis 1998; 32: 962-969
- 3) Nagata M, Shibata S, Shigeta M, Yu-Ming S, Watanabe T: Cyclin dependent kinase inhibitors;
p27kip1 and p57kip2 expression during human podocyte differentiation. Nephrol Dial
Transplant 1999; 14 [suppl 1]:48-51
- 4) Shigeta M, Nagata M, Shimoyamada H, Shibata S, Okuno S, Hamada H, Watanabe T:
Prune-belly syndrome diagnosed at 14 weeks, gestation with severe urethral obstruction but
normal kidneys. Pediatr Nephrol 1999; 13:135-137
- 5) Nitta K, Horita S, Honda K, Uchida K, Watanabe T, Nihei H, Nagata M:
Glomerular expression of cell cycle regulatory proteins in human crescentic
glomerulonephritis. Virchows Archiv 1999 435 : 422-427
- 6) Nakahara C, Nagata M, Watanabe T, Kobayashi K, Hamaguchi H, Kanemoto K, Kashiwagi R,
Matsui A: Clinical significance of apolipoprotein (a) deposition in kidney disease of children.
Clin Nephrol 1999, 52: 131-138
- 7) Iwasa S, Fan J, Shimokama T, Nagata M, Watanabe T: Increased immunoreactivity of
endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in
atherogenesis Atherosclerosis 1999 146: 93-100
- 8) 長田道夫、根東義明：腎組織の修復と再生。日本内科学会雑誌 1999, 88:910-919
- 9) 長田道夫、新田孝作：糸球体硬化進展への糸球体構成細胞の役割。内科 1999,
84:51-57

Nagata M, Nakayama K, Terada Y, Hoshi S, Watanabe T: Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage. Am J Pathol 1998; 153: 1511-1520

Nagata M, Hattori M, Hamano Y, Ito K, Saitoh K, Watanabe T: Origin and phenotypic features of hyperplastic epithelial cells in collapsing glomerulopathy Am J Kidney Dis 1998; 32: 962-969

Nagata M, Shibata S, Shigeta M, Yu-Ming S, Watanabe T: Cyclin dependent kinase inhibitors; p27kip1 and p57kip2 expression during human podocyte differentiation. Nephrol Dial Transplant 1999; 14 [suppl 1]:48-51

Nitta K, Horita S, Honda K, Uchida K, Watanabe T, Nihei H, Nagata M: Glomerular expression of cell cycle regulatory proteins in human crescentic glomerulonephritis. Virchows Archiv 1999 435 : 422-427

Nakahara C, Nagata M, Watanabe T, Kobayashi K, Hamaguchi H, Kanemoto K, Kashiwagi R, Matsui A: Clinical significance of apolipoprotein (a) deposition in kidney disease of children. Clin Nephrol 1999, 52: 131-138

Iwasa S, Fan J, Shimokama T, Nagata M, Watanabe T: Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis Atherosclerosis 1999 146: 93-100

著書

長田道夫、奥野鈴鹿：腎の発生・分化と発達の関係は？小児腎疾患 Q & A、医薬ジャーナル社 1998, 13-15

長田道夫：腎の発生と分化 内科学 文光堂 1999, 1426-1429

Abstracts of research project grant-in aid for scientific research

- 1) 12102
- 2) University of Tsukuba
- 3) (C)
- 4) 1998-1999
- 5) 10670154
- 6) Mechanism of glomerulosclerosis on the basis of cell cycle regulation and differentiation of glomerular epithelial cells.
- 7) (1)10192238 Michio Nagata
University of Tsukuba, Pathology, Institute of Clinical Medicine、 Associate Professor.
- 8) 1: 40037396 Teruo Watanabe
University of Tsukuba, Pathology, Institute of Basic Medical sciences、 Professor
2: 00115940 Naoki Maruyama
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Molecular Pathology, Director

9) Summary of research results.

This project was aimed to find the mechanism involving cell cycle regulation of glomerular epithelial cells (podocytes). During first year of 1998, we found that cell cycle quiescent and podocyte differentiation was closely correlated in human fetal kidneys. Cell cycle stunt is tightly associated with up-regulation of cell cycle inhibitors, p27 and p57. Cell cycle promotion of presumptive podocytes was partly determined by cyclin A, B1 and D1. In addition, we found low expression of CKIs in cellular crescents and cellular lesion in focal glomerulosclerosis in human biopsy materials. These proliferating cells virtually expressed cytokeratin indicating parietal epithelial cell phenotype. Thus PECs compensate podocyte loss is an actual pathology promoting glomerulosclerosis.

The second year of 1999, we performed in vitro study. Metanephric organ culture showed up-regulation of p27, but not p57 in concert with podocyte differentiation. Thus p27 plays predominant role for the podocyte differentiation and cell cycle stunt. Next, we looked at the effect of Interleukin-4 in podocyte cell culture. We found IL4 stimulate podocyte cell line to form Dome shape. Thus IL-4 may modify cell attachment system, i.e., focal contact.. Finally we used green fluorescent transgenic mice to determine whether inserted promoter is activated with differentiation. Fetal kidneys and metanephric culture system demonstrated podocyte glowing in capillary loop stage. The stimulant for this hybrid promoter needs further investigation.

10) Key Words

1) podocyte, 2) parietal epithelial cells, 3) glomerulosclerosis, 4) cell cycle, 5) cell cycle inhibitor, 6) nephron, 7) IL-4