

**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  
糸蹄内の 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)

2 0 1 5

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

小林凡子

筑波大学

博士（医学）学位論文

## 第1章 序論

### 1-1. 本研究の背景...4-9P

1-1-1. ネフローゼ症候群と巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)...4P

1-1-2. 蛋白尿制御機構としての濾過障壁の役割...5-6P

1-1-3. ポドサイトと内皮細胞の相互連携...6-9P

### 1-2. 本研究の目的...9-10P

## 第2章 ポドサイト障害モデルマウスの組織学的、分子学的検討

### 2-1. ポドサイト障害モデルマウスにおける内皮細胞障害の組織学的、分子学的検討...12-19P

2-1-1. 本モデルマウスについて...12P

2-1-2. 対象および方法...12-15P

2-1-3. 結果...15-17P

2-1-4. 考察...17-18P

2-1-5. 小括...19P

### 2-2. ポドサイト障害モデルマウスにおける PAI-1 抑制薬の有効性の検討...20-25P

2-2-1. 対象および方法...20-22P

2-2-2. 結果...22-24P

2-2-3. 考察...24-25P

2-2-4. 小括...25P

### 2-3. ポドサイト障害モデルマウスにおける抗凝固剤(ヘパリンナトリウム)の有効性の検討...26-28P

2-3-1. 対象および方法 26-27P

2-3-2. 結果...27-28P

2-3-3. 考察...28P

2-3-4. 小括...28P

## 第3章 培養ポドサイトを用いた PAI-1 のポドサイト傷害メカニズムの解明

3-1. 背景...30-32P

3-2. 対象および方法...32P-35P

3-3. 結果...35-36P

3-4. 考察...37-38P

3-5. 小活...38P

#### 第4章 総括

4-1. 本研究の考察...40-45P

4-2. 結論...46P

4-3. 謝辞...46-47P

参考文献...47-62P

図 1-14...64-82P

表 1,2...83-84P

# 第 1 章

## 序論

## 1-1 本研究の背景

### 1-1-1 ネフローゼ症候群と巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)

ネフローゼ症候群とは1日3.5g以上の多量の蛋白尿を認め、低アルブミン血症をきたす疾患群の総称である(図 1A)<sup>1)3)</sup>。原因は微小変化型、膜性腎症、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)などの一次性(原発性)糸球体疾患が61.0%と最も多い(図1B)<sup>4)</sup>。一次性糸球体疾患の患者は若年であることも多く、疾患によっては早期治療によって腎不全の発症を遅らせたり、予防したりすることが可能となる。しかし、中には治療抵抗性の腎炎が存在し、その代表的な疾患がFSGSである<sup>5),6)</sup>。FSGSは微小変化型ネフローゼと同様の発症様式をとりながらしばしばステロイド抵抗性の経過をとり、末期腎不全になり得る予後不良の疾患である。全体の2/3がネフローゼ症候群を呈し、腎生存率は5年: 85.3%、10年: 70.9%、15年: 60.9%、20年: 43.5%と、概ね直線的に低下する(図 1C)<sup>4)</sup>。

FSGSの本態がポドサイト障害を端緒とした係蹄壁の破綻であることは知られているが、その糸球体硬化にいたる機序は未だ不明な点が多く、根治治療はないのが現状である<sup>7-10)</sup>。

### 1-1-2 蛋白尿制御機構としての濾過障壁の役割

糸球体はポドサイト(足突起)、毛細血管内皮細胞、メサンギウム細胞、ボウマン囊上皮細胞によって構成されている(図2A)<sup>9)</sup>。とくに毛細血管内皮細胞、ポドサイト(足突起)とその両者が産生する基底膜の三層構造を糸球体係蹄とよぶ(図2B,C)<sup>10)</sup>が、これらはそれぞれが蛋白を血管外に漏出させないためのバリア機能を果たしている。

バリア機能研究の開明期には基底膜が陰性荷電しているためにアルブミンなどの陰性荷電物質が電氣的に反発して通りにくいという理論；**charge-barrier theory**<sup>12)</sup>や、基底膜を透過する物質は大きさによって選択されるという理論；**size-barrier theory**が提唱され注目を集めた<sup>13)</sup>。しかし近年では基底膜のみならずポドサイトや内皮細胞がそれぞれ重要な濾過バリアとして役割をもち、ポドサイト・内皮細胞の機能低下が蛋白尿を呈する疾患に関与していることがわかってきた。例えばポドサイトのスリット膜を形成するネフリンは編み目構造をなしており**size-barrier**として働きうることや<sup>14)</sup>、ポドサイトの表面はポドカリキシンなどのシアル酸に富み、高度な陰性荷電を持ち細胞形態維持や

charge-barrierの機能を果たすことなどが報告されている<sup>15)</sup>。また内皮細胞のもつ直径50-100  $\mu\text{m}$ の隔壁のない孔(fenestra)は、透過性は高いが表面は陰性荷電をもつ糖タンパク-グリコカリックスに覆われており、charge-barrierのひとつとして機能していることが明らかになっている<sup>16)</sup>。

このようにポドサイト、内皮細胞、基底膜はそれぞれ重要なバリア機能を果たしており、同時に同じ目的を持つものどうし緻密な相互連携を行っていることが推察される。近年この相互連携、とくにポドサイト-内皮細胞連携の破綻こそが蛋白尿出現、糸球体硬化の機序ではないかと考えられるようになってきた。

### 1-1-3 ポドサイトと内皮細胞の相互連携

FSGSの病態はポドサイト傷害、およびポドサイト剥離であるが、それに伴った内皮細胞傷害が起きることは形態学、および分子レベルで示されている。

ポドサイトから糸球体内皮細胞にシグナル伝達があることを示す一つの方法として、ポドサイトに特異的障害を起し、連鎖する内皮細胞の反応を可視化するという手法がある。2005年にMatsusakaらは、ネフリンプロモーターを用いてポドサイトのみにヒトCD25を発現させたマウスを作製した。これは、そのリ



ガンドであるイムノトキシンを投与することでポドサイト特異的に障害によるネフローゼを惹起する(図 3A,B)<sup>17)</sup>。このマウスではイムノトキシンはポドサイト以外に傷害を与えないが、ポドサイト障害を認める糸球体で内皮細胞障害が認められた(図 3C)<sup>17)</sup>。さらに、Peti-Peterdiらがmultiphoton imagingを用いてポドサイト障害モデルであるPAN腎症ラットの糸球体濾過障壁の動きを可視化した結果、ポドサイトの障害部直下の内腔に血栓が確認された<sup>18)</sup>。これらの方法により、ポドサイト障害部に限局して血管内皮細胞障害が起きることを表し、ポドサイトからの恒常的シグナルが、毛細血管内の微小環境を維持している可能性を示唆している。これらは、2つの細胞間の相互作用が現象として確認されたものであるが、それに関与する特異的シグナルは、偶然にも臨床現場からの報告であった。

糸球体内におけるVascular Endothelial Growth Factor (VEGF)は、ポドサイトが主に産生し、発生の段階では血管内皮細胞の増殖・分化に関わり、さらに糸球体が成熟してからも内皮細胞の形態を保つ働きを担っている<sup>19-21)</sup>。

Ereminaらは6名の抗VEGF抗体投与後に蛋白尿が認められた患者に腎生検を行い、光顕像でメサンギウム融解、内皮細胞の腫大、赤血球破碎像、係蹄内へ

の血栓沈着、基底膜の二重化を、電顕ではフィブリン沈着や内皮細胞腫大による内皮下腔の開大を確認した(図 4A)<sup>22)</sup>。この所見は、糸球体内皮細胞障害の病理の典型とされるthrombotic microangiopathy (TMA)に相当する。そこで、ポドサイト特異的プロモーターとTet-On (ドキシサイクリンを投与すると標的遺伝子がノックアウトされる) システムを用いたポドサイト特異的VEGFノックアウトマウスを作成し評価したところ、このマウスでもヒトと同様にTMA様病変が認められた。これらのことは、ポドサイトがVEGFを介して内皮細胞の機能維持に関わることを示している(図 4B)<sup>22)</sup>。

一方内皮細胞がポドサイトへ「何らか」の情報伝達を行い、ポドサイト障害を引き起こす可能性を示唆する形態学的報告も散見される。前述の抗VEGF抗体投与患者の中には投与を中止したにもかかわらず蛋白尿、腎機能低下が進行し、腎生検によってFSGS病変が観察された症例がある<sup>23)</sup>。これは内皮細胞傷害が進行することで、健全なポドサイトに傷害を来すことを示している。また重篤な妊娠高血圧腎症は一般的に糸球体内皮細胞障害によるTMA様所見を示すが、尿中にはポドサイトが多量に排泄されることがわかった<sup>24)</sup>。いずれも内皮細胞傷害を端緒として認められたポドサイト傷害の所見である。

こうした糸球体内皮細胞からポドサイトへの関わりを示唆する形態学的な報告は基礎研究でも複数認められるが、特定の分子の役割を明らかにした研究は細胞実験を含めて調べ得る限り過去に3例のみである<sup>25-27</sup>。なぜならばポドサイトには2000年代に相次いで発見された特異的プロモーター(NEPHS1,2)があり、様々な分子においてポドサイト特異的ノックアウトマウスを作成できるという背景がある一方で<sup>28,29</sup>、血管内皮細胞のプロモーターTie-1, Tie-2, eNOS, PECAM-1, P-selectinは血球系細胞や平滑筋細胞にも発現しており、糸球体内皮細胞特異的プロモーターとしては十分ではないためである。

## 1-2 本研究の目的

以上の背景より、ポドサイト-内皮細胞の相互連携は、糸球体の恒常性を考えるうえで非常に重要であり、また病態の進展に関わるという点でFSGSのみならず慢性腎臓病：CKDの治療戦略として大きな意味を持つと考えられる。

しかしポドサイト-内皮細胞間のシグナル伝達には未だ不明な点が多く、特に内皮細胞からポドサイトへどのようなシグナルを介して形態を維持するか、もしくは傷害を与えているかを解明することが必要不可欠である。

我々は先行研究から<sup>30)</sup>ポドサイト障害による内皮細胞障害が非常に限局した病変であることに注目し、内皮障害によって増加する分子が二次的なポドサイト障害に関わる可能性を考えた。そこで、本研究の目的をポドサイト障害における内皮細胞障害の意義の解明とし、糸球体構築の変化を病理学的に捉え、その変化に同調して変化する分子を同定し、それらの分子を標的とした新しい治療法を提案することと定めた。

## 第2章

# ポドサイト障害モデルマウスの 組織学的、分子学的検討

## 2-1 ポドサイト障害モデルマウスにおける内皮細胞障害の組織学的、分子学的検討

### 2-1-1 本モデルマウスについて

我々が今回実験に用いた NEP25 マウスは、前述の 2005 年に Matsusaka らによって開発されたポドサイト障害の機序解明に最適なモデルマウスである(図 3)<sup>17)</sup>。ネフリンプロモーターを用いてヒト CD25 をポドサイト特異的に発現させ、そのリガンドであるイムノトキシン(LMB2)を静注することによってポドサイト障害を起点とする糸球体硬化病変を誘発することができる。

### 2-1-2 対象および方法

#### a.動物モデル

NEP25 マウス(12-18 週)32 匹を LMB2 4 ng/g BW(n = 26、以下 NEP25/LMB2)、もしくはリン酸緩衝バッファー(n = 6、以下 NEP25/PBS)投与群にランダムに振り分けそれぞれ尾静脈投与を行った。そのうち NEP25/LMB2 群 6 匹、

NEP25/PBS 群 6 匹を、LMB2 投与日を 0 日目と設定し、前日、8 日目にそれぞれ右腎下極、左腎下極の腎生検を行い、12 日目に 4% パラフォルムアルデヒド(以下 PFA)で左室よりかん流後に腎臓を摘出し組織学的検討を行った。かん流後 4%PFA で固定した組織はパラフィン包埋後 WT-1 染色、fibrinogen 染色、PAI-1 染色、uPAR 染色、synaptopodin 染色を行った。一部の腎臓はクリオプロテクションを行い、凍結切片を作成して蛍光染色における PAI-1/CD31 染色の二重染色を行った。また 2%グルタルアルデヒドで固定した組織は電顕観察に用いた。

次に NEP25/LMB2 マウス 20 匹を-1 日目(LMB2 の静注前日)、1 日目、8 日目、12 日目でそれぞれ 5 匹ずつに分けて糸球体単離を行った。1 日目の一部の組織は染色および電顕に用いた。これらの単離糸球体は個体ごとに mRNA 抽出を行い、タンパク質は個体ごとの単離糸球体をプールして解析に用いた。24 時間蓄尿は LMB2 投与後 0 日目、5 日目、8 日目、12 日目で行った。

#### b.糸球体染色

パラフィン包埋切片および、クリオプロテクションを行った凍結切片を用いて

染色を行った。パラフィン切片(2  $\mu$  m)については PAS 染色、PAM 染色と免疫組織学的染色に用いた。免疫組織学的染色には Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) と peroxidase-conjugated EnVision+Single Reagent (Dako, Glostrup, Denmark)を用いた。また可視化のため diaminobenzidine (DAB substrate-chromogen system, Dako)もしくは nitro blue tetrazolium (NBT/BCIP; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて説明書に基づいた染色を行った<sup>30),31)</sup>。凍結切片は免疫蛍光染色のみに用いた。一次抗体に対してそれぞれ二次抗体標識の Alexa488、568 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 、 rhodamine のいずれかを用いて可視化を行った。核染色には DAPI を用いた。ポドサイト数のカウントには WT-1 染色を用いた。1 日目、8 日目の検体では少なくとも 30 個以上、12 日目の検体では 70 個以上の糸球体を無作為に抽出し WT-1 陽性細胞数をカウントした。血栓については PAM 染色の標本を用いて-1 日目、8 日目の検体では少なくとも 30 個以上、12 日目の検体では 70 個以上の糸球体を無作為に抽出し、それぞれの糸球体の血管極を中心に 4 分割した血栓の割合を 0%, 1- 25%, 26-50%, 51-75%, もしくは > 75%の 0-4 点にスコア化した。その合計を検体ごとにカウントした



総糸球体数で割り、血栓スコアとした。染色に用いた一次抗体については表 1 に記載した。

#### c. 糸球体単離法

Takemoto らの方法に沿って<sup>32)</sup>、0.8%Fe/PBS 30 ml でマウス左室よりかん流を行い、腎臓を摘出した。1 mm 角にカットし、コラゲナーゼ溶液を用いて結合織の溶解を行った後に 100  $\mu\text{m}$ →70  $\mu\text{m}$  のメッシュで溶解液の濾過を行った。濾過液に混じった Fe の入った糸球体を磁石で回収し、滅菌 PBS で洗浄後に 1500 回転 5 分で遠心し、沈殿した糸球体を回収した。

#### d. RNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

単離糸球体から ISOGEN (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan).を用いて RNA 回収を行った。Total RNA から Thermoscript RT-PCR System (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)を説明書通りに用いて逆転写にて 1 本鎖 DNA を作成した。定量分析は GAPDH で補正を行い、 $\Delta\Delta\text{Ct}$  法で評価を行った。設計プライマーについては表 2 に記載した。

### 2-1-3 結果

#### a. ポドサイト障害は係蹄内の限局した内皮細胞障害を来す

NEP/LMB2 マウスはLMB2 投与後8日目より蛋白尿の増加を認めた(図 5A)。

一方ポドサイト数を示す WT-1 染色は8日目より減少を認めた(図 5B)。糸球体を血栓の有無に分けてポドサイト数をカウントしたところ、血栓有りの糸球体で有意にポドサイト数の減少が認められた(図 5C)。PAM 染色、および Fibrinogen 染色の連続切片ではポドサイト障害部に一致したフィブリン血栓を示した(図 5D,E)。WT-1 染色および fibrinogen 染色の二重染色を行ったところポドサイトの障害部に限局した血栓が確認された(図 5F)。さらに電顕像からもポドサイト障害に一致した限局性の血栓および内皮細胞障害像が確認された(図 5G)。

#### b. 内皮細胞障害は血栓に付随して起きる

ポドサイトの産生する VEGF および内皮細胞の産生する eNOS の mRNA は

12 日目より減少を認めた (図 6A,B)。

また糸球体組織の血栓を半定量的に測定したところ、8 日目、12 日目で -1 日目の腎生検組織と比較して血栓の増加を認めた (図 6C)。さらに TGF- $\beta$  mRNA, PAI-1mRNA は 1 日目より発現が増加していた (図 6D,E)。

局在および発現を確認するために腎糸球体の蛍光染色、免疫組織学染色を行ったところ PAI-1 は 1 日目ですでに糸球体の係蹄に、びまん性に発現を認めた。

これは CD31 との共局在を認めており内皮細胞に発現していることが確認された (図 6F)。NEP25/LMB2 day12 では一部 synaptopodin との共局在を認め、後期には PAI-1 が一部ポドサイトで発現していた (図 6G)。FSGS の患者の病因の可能性として指摘されている uPAR の染色を行ったところ、NEP25/LMB2 マウス 1 日目ではコントロール群に比べてポドサイトに発現が増強しており (図 6H)、電顕像ではポドサイトに明らかな変化はないものの内皮細胞に浮腫が認められた (図 6D)。

#### 2-1-4 考察

ポドサイト障害が内皮細胞障害を伴うことは他の論文でも報告があるが、非常

に局限した部位で起きている事象であることが今回の結果から示された。ヒトにおいて内皮細胞障害が起きる腎疾患でポドサイト障害の所見が報告されている。それは TMA、糖尿病、DIC、妊娠中毒症などである<sup>33),34)</sup>。これらに共通して上昇するとの報告がある分子が PAI-1 である<sup>35),36)</sup>。メカニズムの証明はないものの、妊娠中毒症や DIC などの内皮細胞障害疾患においては病変組織局所の PAI-1 mRNA が強発現していることが知られている<sup>35),36)</sup>。また、Eddy らのグループは STZ により糖尿病を誘発した PAI-1 KO マウスでは、STZ を投与した PAI-1 +/+マウスに比べ、蛋白尿が減少し、糸球体の細胞外基質の増加が抑制されたことを示している<sup>37)</sup>。これは PAI-1 が糸球体局所で係蹄のバリア機能に負の影響を与えていることを示唆したものである。さらに我々が得た結果を用いてポドサイト障害因子(蛋白尿、ポドサイト数、VEGF mRNA)、内皮細胞障害因子(血栓スコア、eNOS mRNA、PAI-1 mRNA)にわけてその相関を見たところ、PAI-1 mRNA の発現がポドサイト障害因子と最も相関していた。PAI-1 は線溶系を阻害する分子であり、血栓に関連すると考えたが、実際の発現は1日目で内皮細胞に広範囲に発現していた。そこで我々は次に NEP25/LMB2 マウスの PAI-1 発現を抑制することにより、組織学的にどのような変化がおきるかを検討

することにした。

#### 2-1-5 小括

ポドサイト障害によって起きる微小血栓症は非常に限局したもののだが、PAI-1は早期ポドサイト傷害マウスの内皮細胞に広範に発現する。

## 2-2 ポドサイト障害モデルマウスにおける PAI-1 抑制薬の有効性の検討

### 2-2-1. 対象および方法

#### a. 動物モデル

NEP25/LMB2 マウス(n = 24)を LMB2 投与日より PAI-1 抑制薬 (n = 13, 以下 NEP25/LMB2 + PI)、10  $\mu$  g/g/BW または PAI-1 抑制薬の溶媒(vehicle)である 0.5%カルメロース (n = 11, 以下 NEP25/LMB2 + VH)を 12 日間経口投与する 2 群にランダムに振り分けて検討を行った。そのうち NEP25/LMB2 + PI 群(n = 8)、NEP25/LMB2 + VH 群 (n = 6) はプロトコール 1 と同様に LMB2 投与日を 0 日目とし、前日、8 日目にそれぞれ右腎下極、左腎下極の腎生検を行い、12 日目に 4% パラフォルムアルデヒドで左室よりかん流後に腎臓を摘出し組織学的検討を行った。かん流後 4%PFA で固定した組織はパラフィン包埋後 WT-1 染色、PAI-1 染色を行った。一部の腎臓はクリオプロテクションを行い、凍結切片を作成し、 $\beta$ 1 integrin 染色を行った。また 2%グルタルアルデヒドで固定した組織は電顕観察に用いた。次に NEP25/LMB2 + PI (n = 5)および

NEP25/LMB2 + VH (n = 5) の 12 日目のマウスの糸球体単離を行った。これらの検体は個体ごとに mRNA 抽出を行い、タンパク抽出は個体ごとの単離糸球体をプールしたものを用いた。また採血を行い ELISA による血中 PAI-1 濃度測定に用いた。24 時間蓄尿は LMB2 投与後 0 日目, 5 日目, 8 日目, 12 日目でを行った。

#### b. PAI-1 抑制薬 TM 5484 について

東北大学 分子病態治療学分野 宮田敏男教授よりご提供いただき今回の研究に用いた PAI-1 抑制薬は、PAI-1 分子内のあるポケットにペプチドを挿入することにより活性を失活させる働きを持つ化合物である。この化合物は、ラットでは t<sub>1/2</sub> が 6 時間程度で、動物(マウス、ラット、サル)に対する単回経口投与 (2,000mg/kg) 毒性は認められていない。我々の用いた TM 5484 (分子量 384.8、clogP 2.32) は X 線結晶構造解析情報を基に作成された 450 個あるリード化合物の一つ TM5007 をもとにデザインされた薬剤である<sup>38),39)</sup>。頻回投与毒性についての評価のため、TM5484 を 30mg/kg で 2 週間、雌雄 5 匹ずつのラットに投与したが副作用は認められなかった。TM5484 は in vitro での chromogenic

assay による 50%阻害濃度が 3.56  $\mu\text{M}$  であり、他のセリンプロテアーゼ (アンチトロンビンⅢや $\alpha$ 2-アンチプラスミンなど)は阻害しない。物質の変異原性を調べるエームズテストは陰性であった。hERG (human ether-a-go-go) 遺伝子阻害について hERG 遺伝子を組み込んだ HEK293 細胞で確認したが、PAI-1 濃度 10  $\mu\text{mol/L}$  までに hERG を介した電流には影響が認められなかった<sup>40)</sup>。

### c.糸球体染色

2-1-2b の糸球体染色法と同様に行った。糸球体硬化スコアについては血栓スコアと同様に、PAM 染色の標本を用いて-1 日目、8 日目の検体では少なくとも 30 個以上、12 日目の検体では 70 個以上の糸球体を無作為に抽出し、それぞれの糸球体の血管極を中心に 4 分割した血栓の割合を 0%, 1- 25%, 26-50%, 51-75%, もしくは > 75%の 0-4 点にスコア化した。その合計を検体ごとにカウントした総糸球体数で割り、硬化スコアとした。

### 2-2-2. 結果

NEP25/LMB2 + PI 群では PAI-1 発現がコントロール群に比べ抑制されていた



(図 7A)。NEP25/LMB2 + PI 群では蛋白尿は 12 日目でカルメロース投与群に比べ明らかに減少を認めた(図 7B)。血栓の減少も確認された(図 7C)。また WT-1 陽性細胞数については 8 日目、12 日目とも減少が緩やかになった(図 7D)。単離糸球体を用いた VEGF mRNA および eNOS mRNA の発現は 12 日目で NEP25/LMB2 + VH 群に比べ保たれ、ポドサイト障害マーカーである desmin、veimentin の発現については抑制されていた(図 7E)。NEP25/LMB2 + PI 群では光顕像、電顕像とも組織学的にも形態が保たれていることを確認し、特に電顕ではポドサイトの足突起消失などの傷害像が顕著に減少していた(図 8A)。糸球体の硬化糸球体数をカウントしたところ 12 日目では有意に NEP25/LMB2 + PI 群で減少を認めた(図 8B)。蛍光染色では NEP25/PBS 群および NEP25/LMB2 + PI 群ポドサイトの基底膜側膜表面に  $\beta 1$  integrin 発現を認め、ポドサイトマーカーの synaptopodin とは共局在を認めない(図 9)。一方 NEP25/LMB2 + VH 群ではポドサイトの細胞質内に局在している。これは  $\beta 1$  integrin の細胞表面から細胞質への移動を PAI-1 抑制剤が阻害していることを示唆する。

### 2-2-3. 考察

血栓抑制の働きを期待して LMB2 マウスに PAI-1 抑制薬を投与したところ、血栓抑制のみならずポドサイトの障害を抑制するという結果を得た。PAI-1 は肝臓や内皮細胞、血小板などから産生され、組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) やウロキナーゼ (uPA) の活性を消失して、線溶系を抑制するポリペプチドである<sup>41)</sup>。近年では線溶系の働きのみならず、敗血症、動脈硬化、心筋梗塞、肝疾患、悪性腫瘍、重症感染症、DIC などでも上昇するという報告がある<sup>42)</sup>。また正常糸球体では発現しないが、FSGS、膜性腎症、半月体形成性糸球体腎炎においても発現上昇の報告が示されており、多面的な働きを持っていることが予想される<sup>43-45)</sup>。本研究前に行った、NEP25/LMB2+VH マウス (n = 3) と NEP25/LMB2+PI マウス (n = 3) の ELISA による PAI-1 血中濃度測定では両群の差は認められなかった ( $2.66 \pm 0.66$  in vehicle vs.  $3.68 \pm 1.37$  ng/ml in PAI-1 inhibitor、 $P = 0.61$ )。このことから PAI-1 発現は糸球体に局限したものであることが考えられ、内皮細胞や血小板由来であることが予想される。

PAI-1 阻害薬のポドサイト保護についての機序としては、①抗血栓作用による内皮の保護や、②抗血栓以外の多面的作用の効果が考えられる。多面的作用の一

つとして PAI-1 が uPA と uPAR を介して  $\beta 1$  integrin の細胞内取り込みを促進するという報告がある<sup>46)</sup>。実際にポドサイト-基底膜の主要な細胞接着因子である  $\beta 1$  integrin の局在を各群で確認したところ、NEP25/LMB2 + VH 群での  $\beta 1$  integrin の細胞膜から細胞質への移動と、NEP25/LMB2 + PI 群での  $\beta 1$  integrin 移動の阻害が確認されておりポドサイトの剥離が進行の一因となっている可能性を考えた。

次の実験では PAI-1 抑制によるポドサイト保護作用機序解明のため、ヘパリンナトリウムでの血栓抑制によるポドサイト保護効果を検討することとした。

#### 2-2-4. 小括

PAI-1抑制薬はNEP/LMB2マウスの血栓形成のみならずポドサイト障害を軽減する

## 2-3 ポドサイト障害モデルマウスにおける抗凝固剤(ヘパリンナトリウム)の有効性の検討

### 2-3-1. 対象および方法

#### a. 動物モデル

NEP25/LMB2 マウス 10 匹をヘパリンナトリウム投与群 (n = 5、以下 NEP25/LMB2 + Hep)、もしくはリン酸緩衝バッファー投与群(n = 5、以下 NEP25/LMB2 + PBS)に分けた。NEP25/LMB2 + Hep 群は 12 時間ごとにヘパリンナトリウム 25 単位 (1 単位/ $\mu$ l、富士製薬工業)、NEP25/LMB2 + PBS 群は 12 時間ごとにリン酸緩衝バッファーを 25  $\mu$ l それぞれ皮下注射した。ヘパリンの投与濃度は予備実験にてカルシウム再加時間を測定し<sup>47)</sup>、コントロールの 3 倍の延長時間を示すように調整した。NEP25/PBS + Hep 群、NEP25/LMB2 + PBS 群ともに LMB2 投与日を 0 日目と設定し、前日にそれぞれ右腎下極の腎生検を行った。また 12 日目に 4%パラフォルムアルデヒドで左室よりかん流後に腎臓を摘出し組織学的検討を行った。かん流後 4%パラフォルムアルデヒドで

固定した組織はパラフィン包埋し、切片を WT-1 染色、PAS 染色にて評価した。

WT-1 カウントおよび血栓スコアは 2-1-1b と同様の方法で行った。24 時間蓄尿は LMB2 投与後 0 日目, 5 日目, 8 日目, 12 日目で行った。

#### b. カルシウム再加時間

1.5 ml エッペンチューブに 200  $\mu$  L の全血を採取し、同量の 3.2%クエン酸と転倒混和した。37°C、3 分間水槽内でインキュベートした後、200  $\mu$  L の 100 mM 塩化カルシウムを添加。10 秒ごとにチューブを傾けて、流動性が消失した時間を凝固時間とした<sup>47)</sup>。

#### 2-3-2. 結果

24 時間蛋白尿は NEP/PBS + Hep 群、NEP/LMB2 + PBS 群とも 8 日目、12 日目で顕著に増加を認めた(図 10A)。両者間に有意差は認めなかった。また WT-1 染色を用いて行ったポドサイト数カウントでは両群ともに day12 で著明に減少しておりやはり両群間に有意差は認めなかった(図 10B)。一方血栓スコアは NEP/PBS + Hep 群で有意に抑制されていた(図 10C)。以上よりヘパリンナトリ

ウムは NEP/LMB2 マウスにおいて血栓を抑制するがポドサイト傷害は軽減しないことが示された。

### 2-3-3. 考察

PAI-1 の主たる働きに tPA および uPA、いわゆる線溶系の抑制が挙げられる。PAI-1 抑制剤のポドサイト保護効果が抗血栓作用による血流の改善にあるのかを調べるため、PAI-1 抑制剤とは別の機序で血栓を抑制する抗凝固剤：ヘパリンナトリウムの投与を行った。その結果血栓形成は抑制されたが蛋白尿およびポドサイト数減少の抑制はされなかった。この実験から PAI-1 抑制剤のポドサイト保護効果は抗血栓作用によるものではなく、近年報告されている多面的な作用にあることが推察される。

### 2-3-4. 小括

PAI-1抑制によるポドサイト保護作用は血栓抑制によるものではない。

## 第3章

培養ポドサイトを用いた PAI-1 のポドサイト  
ト傷害メカニズムの解明

### 3-1. 背景

PAI-1 が局所で細胞障害に働くという間接的な証明はがん細胞で多く報告されている。がんの領域において、PAI-1 は線溶系を抑制し、血栓形成に働くのみでなく、uPA や uPAR との complex 形成によって細胞の mobility や増殖を促進する物質であるという考えが一般的になっている。その根拠としては、まず様々なヒトの癌において uPA、uPAR、PAI-1 の 3 分子の mRNA またはタンパクの局所の強発現が予後不良因子であること、癌の悪性度と関連することがあげられる<sup>48)</sup>。例えば 106 人の乳がん患者のがん組織を lysate にし、サンドイッチ ELISA で uPA、PAI-1、uPAR のタンパク発現量を予後と比較したところ、いずれにおいても発現量の多さに生命予後(over all survival)の悪さが相関していた<sup>49)</sup>。また colon neoplasia の組織で uPA PAI-1、uPAR の mRNA 発現はすべて normal、adenoma、carcinoma の順に増加していた<sup>50)</sup>。さらに 14 人の大腸がんで肝臓に転移のある患者のガン領域を染色したところ、浸潤部位の遠位端にあきらかに uPA、PAI-1、uPAR mRNA の発現が増強していることが示された<sup>51)</sup>。他にもメラノーマ、肺がんなど多くの固形ガンにおいて同様の報告が示されている<sup>48)</sup>。しかし uPA、PAI-1、uPAR の 3 分子がそれぞれどう関連しているかそのメ



カニズムについて示した論文は少なく、過去に報告されたもので最も理論的に説明されたものとして、2003年のCzekayらの論文がある<sup>46)</sup>。CzekayらはHT-1080細胞(ヒト肉腫細胞)のmobilityを示す手段として、PAI-1がde-adhesive moleculeであることを明らかにした。それによるとPAI-1はuPAとcomplexを作り細胞膜表面のuPARに結合する。PAI-1/uPA/uPARの3分子は細胞膜表面で $\alpha v\beta 5$ や $\alpha 3\beta 1$  integrin(およびLRP)とcomplex形成し、細胞内に取り込まれる。細胞表面の接着分子integrinがエンドサイトーシスすることで細胞剥離が促進される<sup>46),52)</sup>。PAI-1単独、uPA単独ではこの反応は起きず、complexの形成によって初めて細胞内取り込みが起きる。筆者らはこのPAI-1/uPA/uPAR/integrin/(LRP) complexが細胞内に取り込まれる際に細胞膜表面のintegrinが半分以上取り込まれるとdetachmentしやすい状況なると考察している。ポドサイトでは $\alpha 3\beta 1$  integrinが基底膜との接着に主に関わる分子であることが知られており<sup>53)</sup>、さらに $\beta 1$  integrinはuPARと結合することが知られている<sup>52)</sup>。第2章ではvivoにおいてPAI-1の抑制により、 $\beta 1$  integrinのポドサイト内への移動が抑えられることを染色で明らかにした。この結果より我々は、ポドサイトにおいても同様の事象が起きている可能性があると考え、

PAI-1/uPA/uPAR が  $\beta 1$  integrin と結合し、細胞内に取り込まれると仮定し実験を行った。

### 3-2. 対象および方法

分化 4 日目のマウス培養不死化ポドサイトを用いて実験を行った<sup>54)</sup>。

5 nM PAI-1 と 5 nM uPA (いずれも Molecular Innovations) を 37°C 10min でインキュベートし、5 nM PAI-1/uPA complex を投与前に作成した<sup>55)</sup>。あらかじめ酸処理を行い、内因性の uPA および PAI-1 を処理した培養ポドサイトを①5 nM uPA 投与群(コントロール群)、②5 nM PAI-1 投与群 (PAI-1 群)、③ PAI-1/uPA complex 投与群 (PAI-1/uPA complex 群)、④5 nM の uPAR 抗体でレセプターをブロックした後、5 nM uPA+PAI-1 complex を投与する群 (anti-uPAR 群) の 4 グループに分け以下の実験を行った。

#### a. 細胞剥離試験

4000 個の不死化ポドサイトを、コラーゲン I (高研) コートした 24 ウェルプレート (BD Biosciences) に 1 グループあたり少なくとも 3 ウェルに培養し、投与

前の状態で撮影した。上記①-④をそれぞれ添加した後 37°Cで 10 分間インキュベートし、リン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した。4%PFA で 10 分固定後クリスタルバイオレット染色し、細胞数をカウントした。

#### b. 蛍光二重染色

培養ポドサイトをコラーゲン I (高研)でコートしたカバースリップに蒔き、分化 4 日目で上記①-④を添加した後 37°Cで 10 分間インキュベートし、リン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した。4% PFA を用いて室温で 10 分間固定し、50 mM のグリシン/リン酸緩衝生理食塩水で 30 分間ブロッキングを行った。一次抗体には抗 uPAR 抗体および抗  $\beta 1$  integrin 抗体、二次抗体には抗ラット抗体標識 Alexa 488 と抗ウサギ抗体 rhodamine を用いた。観察には共焦点顕微鏡 (LEICA TCS SP5) を使用した。

#### c. ビオチン化標識膜タンパクのウエスタンブロット

不死化ポドサイトを、コラーゲン I (高研)でコートした 10cm 培養皿に培養し分化させた。上記①-④をそれぞれ添加した後 37°Cで 10 分間インキュベートし、

リン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した。サーモサイエンティフィック社の Cell Surface Protein Isolation Kit を用いて膜タンパクのみを抽出した。上記 4 グループの細胞に 0.25 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin (サーモサイエンティフィック社)を添加し、4℃下で 30 分インキュベート。洗浄後細胞を回収し、アビジンビーズ入りのカラムに添加して室温で 60 分インキュベートした。その後細胞溶解液にジチオトレイトール (サーモサイエンティフィック社) を混和してタンパクのみを抽出し、この抽出液を用いて SDS-PAGE を行い、転写後に  $\beta 1$  integrin 抗体の検出を行った。コントロールとしてアビジンビーズ吸着前の細胞溶解液を用いて同様に  $\beta 1$  integrin 抗体の検出を行った。

#### d. 細胞質抽出液を用いたウエスタンブロット

不死化ポドサイトを、コラーゲン I コートした 10 cm 培養皿に培養し分化させた。上記①-④をそれぞれ添加した後 37℃で 10 分間インキュベートし、リン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄した。上記 4 グループの細胞を回収し、サーモサイエンティフィック社の subcellular protein fractionation kit for cultured cells を用いて細胞質分画のみを抽出した。細胞を回収し pellet にしたものを 1.5 ml チューブに入れ 500 回転で 2-3 分遠心した。上清をとりのぞき、氷冷した

Cytoplasm Extraction Buffer (プロテアーゼインヒビター入り)を細胞の 10 倍量添加し、60 分間振盪器を用いて緩やかに混和した。500 g で 5 分間遠心し上清をとり、SDS-PAGE および転写後に  $\beta 1$  integrin 抗体および  $\beta$  アクチン抗体の検出を行った。

#### e. 二重免疫電顕

コントロール群、PAI-1/uPA complex 群の 2 群の細胞を Periodate Lysine Paraformaldehyde; PLP 溶液で 6 時間固定し回収した。1.5 ml チューブに入れ遠心し、ペレットにした後、polyvinylpyrrolidone 溶液にて一晩 4°C 下で浸透した。次にウルトラシン凍結切片を作成し、電顕用メッシュに乗せ、一次抗体には抗 uPAR 抗体および抗  $\beta 1$  integrin 抗体、二次抗体にはそれぞれに対して 10 nm-gold と 5 nm-gold を用いた金標識を行った<sup>56)</sup>。電顕撮影には JEOL 社の JEM-1400 を使用した。

### 3-3. 結果

細胞剥離試験ではコントロール群、PAI-1 群に比べて PAI-1/uPA complex 群で

はポドサイト数の減少を認めた。しかし、uPAR をブロックした anti-uPAR 群では剥離数はコントロール群と比べて変化を認めなかった(図 11)。このことから PAI-1/uPA complex はポドサイト剥離を促進し、uPAR 抗体によって剥離が抑制することが確認できた。

次に uPAR と  $\beta 1$  integrin の蛍光二重染色を共焦点顕微鏡で観察した結果、明らかに PAI-1/uPA complex 群でのみ、uPAR と  $\beta 1$  integrin の共局在率が有意に上昇し、かつ細胞内への移動がみられた。control 群、PAI-1 群、anti-uPAR 群では  $\beta 1$  integrin は細胞膜表面に集簇像を認め、uPAR は細胞膜、細胞質内に点在し、共局在率は低値を示した (図 12A,B)。

さらにビオチン化標識を行った細胞膜表面  $\beta 1$  integrin は PAI-1/uPA complex 群で他の 3 群に比べ明らかに減少する一方、細胞質抽出タンパクでは発現の増加が認められた(図 13A,B)。

二重免疫電顕では PAI-1/uPA complex 群では細胞質内の  $\beta 1$  integrin、uPAR が小胞内に存在することが確認された(図 13C)。実際の金標識の細胞膜/細胞質の割合をカウントしたところ  $\beta 1$  integrin、uPAR とも PAI-1/uPA complex 群で明らかに細胞膜表面の割合が減少していた(図 13D)。

#### 3-4. 考察

Vitro の実験により、ポドサイトでの PAI-1/uPA complex による  $\beta 1$  integrin のエンドサイトーシスが示された。さらに integrin の取り込みは uPAR をブロックすることで阻害された。

ポドサイトの傷害によって係蹄内で産生された PAI-1 は血中の uPA と結合し、PAI-1/uPA complex を作る。PAI-1/uPA complex はポドサイト uPAR に結合し、細胞内に取り込まれる際に  $\beta 1$  integrin を同時に細胞内に取り込む。 $\alpha 3\beta 1$  integrin はポドサイトと基底膜の主要な接着因子として知られており<sup>53)</sup>、 $\beta 1$  integrin のノックアウトマウスではポドサイトの剥離が生じることが報告されている<sup>57)</sup>。今回我々は PAI-1/uPA complex を投与し、uPAR と  $\beta 1$  integrin の変化を確認した。蛍光染色では uPAR,  $\beta 1$  integrin の細胞膜表面から細胞質内への移動と共局在を確認し、さらにウエスタンブロットにおいて細胞膜表面からの  $\beta 1$  integrin タンパク減少および細胞質内での  $\beta 1$  integrin 発現増加を示した。さらに PAI-1/uPA を投与し、uPAR および  $\beta 1$  integrin の二重免疫電顕を行ったところ細胞質内の小胞内に両分子が共存する像が確認された。我々の用いた  $\beta 1$

integrin 抗体は N 末端を標識するエピトープを持っており、活性型か非活性型であるかは染色やウエスタンブロットでは不明である。しかし、通常 integrin は細胞膜、細胞内、細胞膜へとリサイクリングしていることが報告されており、一度細胞内に取り込まれると活性型の integrin は 15-30 分以内に 7 割以上がリサイクルされる<sup>58)</sup>。一方不活性型の integrin は 30 分の時点で 2-3 割のリサイクル率である。そこで我々は観察時間を 10 分にして検討を行うこととした。これにより、移動を示した integrin は細胞膜表面で活性型であり基底膜と接着した integrin が大半であると予想される。

### 3-5. 小活

PAI-1はuPA,uPARとcomplexを作りβ1 integrinをエンドサイトーシスによって細胞内に取り込むため、細胞膜表面の接着因子が減少し、基質からのポドサイト剥離が促進される



## 第4章

### 総括

#### 4-1. 本研究の考察

我々は今回の実験で、ポドサイトを標的とした係蹄内の新たなシグナルを明らかにした。

まずポドサイトが障害されることにより、ポドサイト剥離部に一致した非常に限局した内皮細胞障害が起きることを証明した。このことはポドサイト傷害が早期に非常に限局した血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) を与えることを示唆している。一般的に TMA は妊娠高血圧腎症や溶血性尿毒症症候群などの重篤な内皮細胞傷害で認められ、いずれも PAI-1 は強い線溶系阻害物質として疾患との関連性が報告されている<sup>35-37)</sup>。また正常腎において PAI-1 は産生されず、FSGS、膜性腎症、半月体形成性腎炎などのポドサイト傷害時にも発現が増強すると報告されている<sup>43-45)</sup>。PAI-1 の上昇は重篤な内皮細胞傷害および組織のフィブリン析出を反映していると考えられたが、我々の使用した NEP25/LMB2 のモデルマウスにおいて PAI-1 タンパクの発現は LMB2 投与後 1 日目より、糸球体内皮細胞に広範に出現しており非常に特異的な所見であった。注目すべきことに、PAI-1 発現の上昇は単離糸球体における eNOS および VEGF 減少、また血栓形成に先行していた。LMB2 の半減期は 35 分と非常に早

く<sup>17)</sup>、ポドサイトは **LMB2** 静注後すぐに傷害を受ける。その後すぐに **PAI-1** が広範に発現すること、ヘパリンによる抗血栓作用が糸球体障害に対して効果的ではなかったことから **PAI-1** は抗血栓溶解のためではなく、別な機序でポドサイトの傷害に関わっていると推察した。

近年では **PAI-1** は血栓溶解抑制のみならず多面的な機能を持つことが知られるようになった。とくに癌の転移のメカニズムの研究でその多様性が明らかにされつつあり、細胞のアポトーシス経路の活性化や運動性、老化などの機序に関わることが示されている<sup>59-61)</sup>。糸球体腎炎についても膜性腎症、半月体形成性腎炎、**FSGS** など様々な糸球体疾患においてもその発現増強が報告されているがそのメカニズムはほとんど示されていない<sup>62)</sup>。我々の研究では今回そのメカニズムの一端を示すことができた。**NEP25/LMB2** マウスでは **PAI-1** 抑制剤の投与によって蛋白尿の軽減とポドサイトの保護効果を示すことができた。これは **PAI-1** が糸球体の濾過バリアとポドサイト消失に関わっていると言い換えることができる。**PAI-1** は主に内皮細胞と血小板で産生されることが知られている<sup>63),64)</sup>。

**NEP25** マウスは **LMB2** を投与すると最初のポドサイト受傷により、不均一に

ポドサイト障害を起こす。しかし、LMB2 の半減期は 35 分であるにもかかわらずポドサイト数は減少し続ける。

Matsusaka らは hCD25 陽性・陰性ポドサイトのキメラマウスにおいて LMB2 を投与すると hCD25 陰性ポドサイトも早期の時点で同様に障害を受け減少していくと報告している<sup>65)</sup>。これは、ポドサイト障害が LMB2 投与による最初の障害と 2 次的な障害に分かれることを示唆したものである。しかし、その 2 次的なメカニズムについては明らかにはされなかった。我々が示した結果はいずれの原因でも最初のポドサイト障害が起きたあとに内皮細胞から PAI-1 が分泌され、さらに問題のないポドサイトを障害していくという vicious cycle の説明となる。その機序は抗血栓作用ではなかったことから、上記のように最初のポドサイト障害が PAI-1 メカニズムを通じて二次的ポドサイト消失のポジティブフィードバックを起こしている可能性がある。また今回は染色によって内皮細胞での発現増強を確認したが、さらに血小板を阻害することで PAI-1 発現および糸球体障害がどのように変化するのかを調べる必要がある。

我々はさらに PAI-1 がどのようにポドサイト傷害に影響を及ぼすのか、そのメカニズムを、培養細胞を用いて明らかにした。HT-1080 細胞では PAI-1 が uPA

と complex を作り uPAR に結合する。その 3 分子は細胞膜表面で integrin と complex 形成し、細胞内に取り込まれる。細胞表面の接着分子  $\beta 1$  integrin が減少する結果として細胞剥離が促進され、がん細胞の転移が促進される<sup>46,52)</sup>。

そこで我々はポドサイトにおいても糸球体障害時には局所の PAI-1 が上昇し、uPA と complex を作り、ポドサイトの uPAR を介して基底膜との接着因子である integrin と結合し、細胞内に取り込むことでポドサイトが剥離するのではないかと仮説をたてた。培養ポドサイトに PAI-1/uPA complex を添加してみたところ、予測通りに剥離が起きた。また PAI-1 単独で添加した場合や、PAI-1/uPA complex を投与する前に uPAR をブロックした場合は剥離しなかった。

次に、細胞接着因子である  $\beta 1$  integrin の移動について注目した。係蹄においてポドサイトと基底膜の接着因子では  $\alpha 3\beta 1$  が重要な役割を担っており、 $\beta 1$  integrin のそれぞれの KO マウスではポドサイトが剥離し、重篤なネフローゼを来す<sup>57)</sup>。uPAR は  $\beta 1$  integrin と結合することが知られている<sup>52)</sup>。そこで我々は  $\beta 1$  integrin と PAI-1/uPA/uPAR complex の動きを追うことにした。

ウエスタンブロッティングではビオチン化標識を行い細胞膜表面のタンパクを抽出して  $\beta 1$  integrin の発現を確認した。その結果 PAI-1/uPA complex 投与群で

は細胞膜表面での発現が他のグループと比較して著明に減少していた。一方細胞質分画抽出での  $\beta 1$  integrin の発現は増加していた。また蛍光二重染色では PAI-1/uPA complex 投与群では uPAR と  $\beta 1$  integrin は細胞膜から細胞内へ移動しており、細胞内での共局在を認めた。さらに細胞内取り込みはエンドサイトーシスによるものであることを二重免疫電顕で確認した。またその検体を用いて細胞表面  $\beta 1$  integrin および uPAR の金粒子数をカウントしたところ、コントロールと比べ PAI-1/uPA complex 群では半数以下であった。

以上より、ポドサイト傷害によって VEGF の供給を絶たれた内皮細胞から PAI-1 が発現し、血中の uPA と基底膜外で complex を作り、uPAR を介して  $\beta 1$  integrin を取り込むことでポドサイト剥離を促進することが示された(図 14)。これは Czekay らの論文と一致する結果である。PAI-1 は 45 kDa、uPA は 31.5 kDa と非常に小さい分子であり<sup>66),67)</sup>、基底膜を通過することは確認されている<sup>68),69)</sup>。FSGS 患者では uPAR が血中およびポドサイト表面で上昇している<sup>70)</sup>。Wei らは可溶性 uPAR がポドサイトの  $\alpha v\beta 3$  integrin を活性化し、アクチン細胞骨格を変化させることでポドサイトの足突起消失を起こすことを報告した<sup>70,71)</sup>。さらに  $\beta 1$  integrin の減少は、Rac1 および ERK を介して  $\beta 3$  integrin の活性化を促

す<sup>72)</sup>。我々は最初のポドサイト傷害を発端として内皮細胞もしくは血小板から産生された PAI-1 がポドサイト  $\beta 1$  integrin を細胞内に取り込むことを示しているが、それにより  $\beta 3$  integrin が活性化され、さらに刺激によってポドサイトの細胞骨格の変化がおきポドサイト剥離が促進した可能性も考えられる。

PAI-1 の抑制する線溶系の因子には uPA のみならず tPA が挙げられる。Hamano らは膜性腎症、FSGS、ループス腎炎、糖尿病性腎症などの様々な腎症で PAI-1 と tPA の mRNA 発現 を定量した。その結果膜性腎症と FSGS では対照群と比較して PAI-1/tPA 比の有意な上昇を示し、PAI-1 の発現増加は蛋白尿と相関を認めた。しかし tPA 単独では対照群との発現量の差は認められなかった<sup>43)</sup>。

PAI-1 が tPA→Plasmin 系を阻害し、ポドサイトへはたらきかける保護効果を示す可能性は否定できないが、少なくとも FSGS においては tPA とは関連しない PAI-1 の発現上昇が糸球体障害の重要な因子であることが推察される。

今回の研究結果から係蹄内細胞からポドサイトへの伝達物質は報告が少ないが、PAI-1 は内皮細胞障害時にポドサイトへ悪影響を与え、vicious cycle を作る物質である可能性が示唆された。これを PAI-1 inhibitor が断ち切ることで、ポドサイト減少が抑制されたと考えられる。

#### 4-2. 結論

我々の研究における結論は以下の通りである。

ポドサイト障害を契機とした毛細血管内皮細胞障害が非常に限局したレベルで惹起され、PAI-1が上昇する。PAI-1はポドサイトの細胞膜表面上でuPA/uPARとのcomplexを形成し、さらに $\beta 1$  integrinと結合してエンドサイトーシスを介してポドサイト内に取り込まれる。基底膜-細胞接着因子であるintegrinが細胞内に移動することで、さらなるポドサイト剥離を促進する(図14)。このポドサイト-内皮細胞間クロストークの破綻は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糸球体の組織応答と考える。

#### 4-3. 謝辞

マウス不死化ポドサイトを供与してくださった群馬大学 坂入徹先生、電顕撮影のご指導をいただいた技術職員の坂本順子様、いつもお世話になりました当研究室の秘書 岩崎江美様に感謝申し上げます。



## 参考文献

- 1) Müller F. Korreferet. Morbus Brightii, Verhandl. Deut Path Gesell Merano 9:64-99, 1905.
- 2) 上田 泰. 総括研究報告. 厚生省特定疾患ネフローゼ症候群調査研究班昭和48年度研究業績: 7-9, 1974.
- 3) 小林凡子、長田道夫. 腎病理①光顕で微小糸球体変化であっても見逃してはいけない疾患. 月刊レジデント 6: 60-71, 2011.
- 4) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業進行性腎障害に関する調査研究班 難治性ネフローゼ症候群分科会. ネフローゼ症候群診療指針. 日本腎臓学会誌 53:78-122, 2011.
- 5) D'Agati VD. Podocyte injury in focal segmental glomerulosclerosis: Lessons from animal models (a play in five acts). *Kidney Int* 73: 399–406, 2008.
- 6) D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 365:2398–2411, 2011.

- 7) O'Toole JF, Sedor JR. Kidney disease: new technologies translate mechanisms to cure. *J Clin Invest* 124:2294-8, 2014 .
- 8) Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 54: 687–697, 1998.
- 9) Nagata M, Kriz W. Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int* 42: 148–160, 1992.
- 10) Nagata M. Pathogenesis of glomerulosclerosis: role of epithelial interactions. *Clin Exp Nephrol* 4:173–181, 2000.
- 11) Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 83: 253-307, 2003.
- 12) Kanwar YS, Liu ZZ, Kashihara N, Wallner EI. Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Semin Nephrol*, 11: 390-413, 1991.

- 13) Kanwar YS, Farquhar MG. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1303-1307, 1979.
- 14) Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1: 575-582, 1998.
- 15) Takeda T. Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein podocalyxin through Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor 2 and ezrin. *Clin Exp Nephrol* 7: 260-269, 2003.
- 16) Satchell S. The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nat Rev Nephrol* 12: 717-725, 2013.
- 17) Matsusaka T, Xin J, Niwa S, Kobayashi K, Akatsuka A, Hashizume H, Wang QC, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I. Genetic engineering of glomerular sclerosis in the

- mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. *J Am Soc Nephrol* 16: 1013-1023, 2005.
- 18) Peti-Peterdi J, Sipos A. A high-powered view of the filtration barrier. *J Am Soc Nephrol* 21: 1835-1841, 2010.
- 19) Takahashi T, Huynh-Do U, Daniel TO. Renal microvascular assembly and repair: power and promise of molecular definition. *Kidney Int* 53: 826-35, 1998.
- 20) Usui J, Yamada R, Kanemoto K, Koyama A, Nagata M. Murine metanephric mesenchyme possesses characteristics of vascular endothelial cells in vitro. *Nephron Exp Nephrol* 102: e93-98, 2006.
- 21) Takahashi T, Takahashi K, Gerety S, Wang H, Anderson DJ, Daniel TO. Temporally compartmentalized expression of ephrin-B2 during renal glomerular development. *J Am Soc Nephrol* 12: 2673-2682, 2001.
- 22) Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber HP, Ferrara N, Barisoni L,

Alpers CE, Quaggin SE. VEGF Inhibition and Renal Thrombotic Microangiopathy.

N Engl J Med 358: 1129-1136, 2008.

23) Takahashi D, Nagahama K, Tsuura Y, Tanaka H, Tamura T. Sunitinib-induced

nephrotic syndrome and irreversible renal dysfunction. Clin Exp Nephrol 16:

310-315, 2012.

24) Garovic VD, Wagner SJ, Turner ST, Rosenthal DW, Watson WJ, Brost BC, Rose

CH, Gavrilova L, Craig P, Bailey KR, Achenbach J, Schiffer M, Grande JP.

Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 196:

320.e1-7, 2007.

25) Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, Herzog S, Kashif M, Blautzik J, Corat

MA, Zeier M, Blessing E, Oh J, Gerlitz B, Berg DT, Grinnell BW, Chavakis T,

Esmon CT, Weiler H, Bierhaus A, Nawroth PP. Activated protein C protects against

diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. Nat Med 13:

1349-1358, 2007.

- 26) George M, Rainey MA, Naramura M, Foster KW, Holzapfel MS, Willoughby LL, Ying G, Goswami RM, Gurusurthy CB, Band V, Satchell SC, Band H. Renal thrombotic microangiopathy in mice with combined deletion of endocytic recycling regulators EHD3 and EHD4. *PLoS One* 6: e17838, 2011.
- 27) Slater SC, Ramnath RD, Uttridge K, Saleem MA, Cahill PA, Mathieson PW, Welsh GI, Satchell SC. Chronic exposure to laminar shear stress induces Kruppel-like factor 2 in glomerular endothelial cells and modulates interactions with co-cultured podocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 1482-1490, 2012.
- 28) Moeller MJ, Kovari IA, Holzman LB. Evaluation of a new tool for exploring podocyte biology: mouse *Nphs1* 5' flanking region drives LacZ expression in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 11: 306-314, 2000.
- 29) Moeller MJ, Sanden SK, Soofi A, Wiggins RC, Holzman LB. Two gene fragments that direct podocyte-specific expression in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 13: 1561-1567, 2002.

- 30) Ueno T, Kobayashi N, Nakayama M, Takashima Y, Ohse T, Pastan I, Pippin JW, Shankland SJ, Uesugi N, Matsusaka T, Nagata M. Aberrant Notch1-dependent effects on glomerular parietal epithelial cells promotes collapsing focal segmental glomerulosclerosis with progressive podocyte loss. *Kidney Int* 83: 1065–1075, 2013.
- 31) Sakamoto K, Ueno T, Kobayashi N, Hara S, Takashima Y, Pastan I, Matsusaka T, Nagata M. The direction and role of phenotypic transition between podocytes and parietal epithelial cells in focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F98-104, 2014.
- 32) 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.
- 33) Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, Inagaki T, Sonoda J, Watanabe T, Nomoto K, Nagata M. Podocyte injury promotes progressive nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Lab Invest* 82: 25-35, 2002.

34) Costero O, Picazo ML, Zamora P, Romero S, Martinez-Ara J, Selgas R. Inhibition of tyrosine kinases by sunitinib associated with focal segmental glomerulosclerosis lesion in addition to thrombotic microangiopathy. *Nephrol Dial Transplant* 25: 1001-1003, 2010.

35) Wada H, Minamikawa K, Wakita Y, Nakase T, Kaneko T, Ohiwa M, Tamaki S, Deguchi K, Shirakawa S, Hayashi T, Suzuki K. Increased vascular endothelial cell markers in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* 44: 85-88, 1993

36) Bobst SM, Day MC, Gilstrap LC 3<sup>rd</sup>, Xia Y, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion. *Am J Hypertens* 18: 330-6, 2005.

37) Collins SJ, Alexander SL, Lopez-Guisa JM, Cai X, Maruvada R, Chua SC, Zhang G, Okamura DM, Matsuo S, Eddy AA. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency has renal benefits but some adverse systemic consequences in diabetic mice. *Nephron Exp Nephrol* 104: e23-34, 2006.



- 38) Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 935-942, 2013.
- 39) Izuhara Y, Takahashi S, Nangaku M, Takizawa S, Ishida H, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Hirayama N, Miyata T. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1: its mechanism and effectiveness on coagulation and fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 672-677, 2008.
- 40) Izuhara Y, Yamaoka N, Kodama H, Dan T, Takizawa S, Hirayama N, Meguro K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 904-912, 2010.
- 41) Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 5: 102–115, 2007.
- 42) Dellas C, Loskutoff DJ. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 93: 631-640, 2005.

- 43) Hamano K, Iwano M, Akai Y, Sato H, Kubo A, Nishitani Y, Uyama H, Yoshida Y, Miyazaki M, Shiiki H, Kohno S, Dohi K. Expression of glomerular plasminogen activator inhibitor type I in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 39: 695–705, 2002.
- 44) Nakamura T, Tanaka N, Hoguma N, Kazama T, Kobayashi I, Yokota S. The localization of plasminogen activator inhibitor-1 in glomerular subepithelial deposits in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 11: 2434-2444, 1996.
- 45) Yoshida Y, Shiiki H, Iwano M, Uyama H, Hamano K, Nishino T, Dohi K. Enhanced expression of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with nephrotic syndrome. *Nephron* 88: 24-29, 2001.
- 46) Czekay RP, Aertgeerts K, Curriden SA, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol* 160: 781–791, 2003.
- 47) Hedberg A, Fismen S, Fenton KA, Fenton C, Osterud B, Mortensen ES, Rekvig OP. Heparin exerts a dual effect on murine lupus nephritis by enhancing enzymatic

chromatin degradation and preventing chromatin binding in glomerular membranes.

Arthritis. Rheum 63: 1065-1075, 2011.

48) Andreassen PA, Kjølner L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. Int J Cancer 72: 1-22, 1997.

49) Andres SA, Edwards AB, Wittliff JL. Expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPAR), and inhibitor (PAI-1) in human breast carcinomas and their clinical relevance. J Clin Lab Anal 26: 93-103, 2012.

50) Halamkova J, Kiss I, Pavlovsky Z, Tomasek J, Jarkovsky J, Cech Z, Tucek S, Hanakova L, Moulis M, Zavrelova J, Man M, Benda P, Robek O, Kala Z, Penka M. Clinical significance of the plasminogen activator system in relation to grade of tumor and treatment response in colorectal carcinoma patients. Neoplasma 58: 377-385, 2011.

51) Illemann M, Bird N, Majeed A, Laerum OD, Lund LR, Danø K, Nielsen BS. Two distinct expression patterns of urokinase, urokinase receptor and plasminogen

- activator inhibitor-1 in colon cancer liver metastases. *Int J Cancer*. 124:1860-1870, 2009.
- 52) Czekay RP, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitors regulate cell adhesion through a uPAR-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 220: 655-663, 2009.
- 53) Sachs N, Sonnenberg A. Cell–matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat Rev Nephrol* 9: 200–210, 2013.
- 54) Sakairi T, Abe Y, Jat PS, Kopp, JB. Cell-cell contact regulates gene expression in CDK4-transformed mouse podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F802–809, 2010.
- 55) Webb DJ, Thomas KS, Gonias SL. Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signalling and thereby promotes MCF-7 cell growth. *J Cell Biol* 152: 741–752, 2001.
- 56) Kurihara H, Harita Y, Ichimura K, Hattori S, Sakai T. SIRP-alpha-CD47 system functions as an intercellular signal in the renal glomerulus. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F517-527, 2010.

- 57) Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, Coffa S, Zhang X, Gewin L, Eremina V, Hudson BG, Borza DB, Harris RC, Holzman LB, Phillips CL, Fassler R, Quaggin SE, Miner JH, Zent R. Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Dev Biol* 316: 288–301, 2008.
- 58) Antti Arjonen, Jonna Alanko, Stefan Veltel, Johanna Ivaska. Distinct Recycling of Active and Inactive  $\beta$ 1 Integrins. *Traffic* 13: 610–625, 2012.
- 59) Schneider DJ, Chen Y, Sobel BE. The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis. *Thromb Haemost* 100: 1037–1040, 2008.
- 60) Dellas C, Loskutoff DJ. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 93: 631–640, 2005.
- 61) Elzi DJ, Lai Y, Song M, Hakala K, Weintraub ST, Shiio Y. Plasminogen activator inhibitor 1--insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 12052–12057, 2012.
- 62) Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 17: 2999–3012, 2006.
- 63) Gryglewski RJ. Endothelial nitric oxide, prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and tissue

- plasminogen activator (t-PA): alliance or neutrality? *Pol J Pharmacol* 47: 467-472, 1995.
- 64) Schleef RR, Loskutoff DJ. Fibrinolytic system of vascular endothelial cells. Role of plasminogen activator inhibitors. *Haemostasis* 18:328-41, 1988.
- 65) Matsusaka T, Sandgren E, Shintani A, Kon V, Pastan I, Fogo AB, Ichikawa I. Podocyte injury damages other podocytes. Podocyte injury damages other podocytes. *J Am Soc Nephrol* 22: 1275–1285, 2011.
- 66) Reilly CF, McFall RC. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta regulate plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 266: 9419-9427, 1991.
- 67) Pawse AR, Tarachand U. Characterization of urokinase-type plasminogen activator of rat decidua tissue. *Biochem Mol Biol Int* 33: 775-784, 1994.
- 68) Verhave JC, Bouchard J, Goupil R, Pichette V, Brachemi S, Madore F, Troyanov S. Clinical value of inflammatory urinary biomarkers in overt diabetic nephropathy: a prospective study. *Diabetes Res Clin Pract* 101: 333-340, 2013.
- 69) Casella R, Shariat SF, Monoski MA, Lerner SP. Urinary levels of urokinase-type

plasminogen activator and its receptor in the detection of bladder carcinoma. *Cancer* 95: 2494-2499, 2002.

70) Wei C, Möller CC, Altintas MM, Li J, Schwarz K, Zacchigna S, Xie L, Henger A, Schmid H, Rastaldi MP, Cowan P, Kretzler M, Parrilla R, Bendayan M, Gupta V, Nikolic B, Kalluri R, Carmeliet P, Mundel P, Reiser J. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med* 17: 55-63, 2008.

71) Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, Maiguel D, Karumanchi, SA, Yap HK, Saleem M, Zhang Q, Nikolic B, Chaudhuri A, Daftarian P, Salido E, Torres A, Salifu M, Sarwal MM, Schaefer F, Morath C, Schwenger V, Zeier M, Gupta V, Roth D, Rastaldi MP, Burke G, Ruiz P, Reiser J. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 17: 952–960, 2011.

72) Hayashida T, Jones JC, Lee CK, Schnaper HW. Loss of beta1-integrin enhances TGF-beta1-induced collagen expression in epithelial cells via increased alphavbeta3-integrin and Rac1 activity. *J Biol Chem* 285: 30741–30751, 2010.

73) Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in

light microscopy. *J Microsc* 224: 213–232, 2006.

74) Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675, 2012.



## 図 1. ネフローゼ症候群について

### A. ネフローゼ症候群の診断基準<sup>2),3)</sup>

表 1 ネフローゼ症候群の診断基準

(厚生省特定疾患ネフローゼ症候群調査研究班)

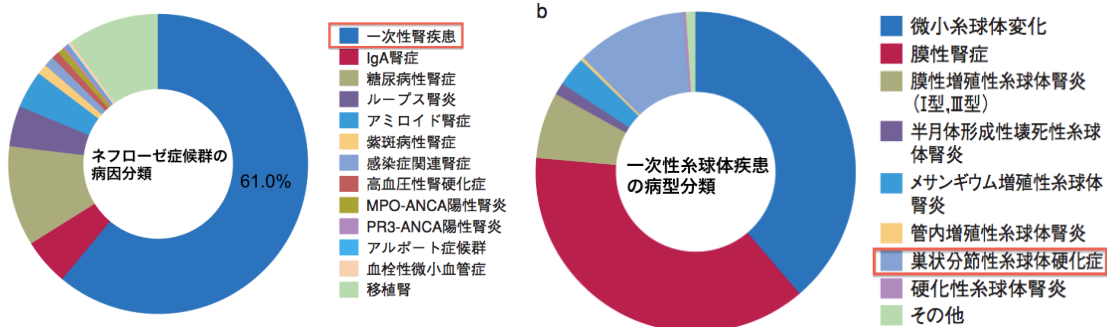
必須条件	蛋白尿	1日蛋白量 3.5 g 以上を持続する
	低蛋白血症	血清総蛋白量は 6.0 g/100 ml 以下 (低アルブミン血症とした場合は血清アルブミン量 3.0 g/100 ml 以下)
非必須条件	高脂血症	血清総コレステロール値 250 mg/100 ml 以下
	浮腫	

注1: 上記の蛋白尿および低蛋白血症 (低アルブミン血症) は、本症候群診断のための必須条件である

注2: 高脂血症および浮腫は、本症候群診断のための必須条件ではない

注3: 尿沈渣中における、多数の卵円型脂肪体および重屈折性脂肪体の検出は、本症候群診断の参考になる

### B. ネフローゼ症候群の病因分類と、一次性糸球体疾患の病型分類<sup>4)</sup>



ネフローゼ症候群における一次性糸球体疾患は 61.0% と最も多く、いずれの病型でも難治性ネフローゼ症候群は腎予後が悪い。

### C. 巣状分節性糸球体硬化症の腎生存率<sup>4)</sup>

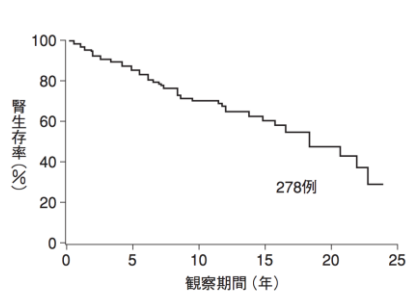
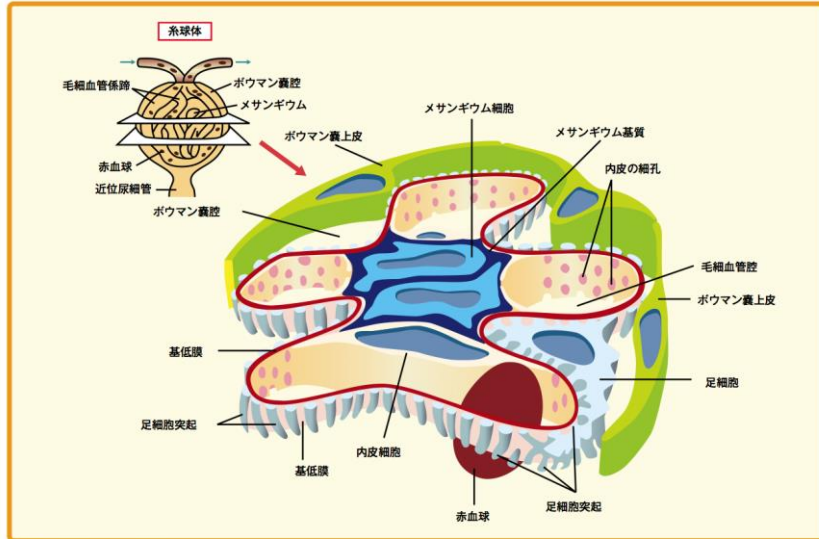


図 8 巣状分節性糸球体硬化症の腎生存率

一次糸球体疾患の中でとりわけ巣状分節性糸球体硬化症はポドサイト傷害を発端とする腎予後の悪い疾患であるが、その病態進行の機序は未だ不明な点が多い。

## 図 2. 糸球体の構造<sup>3)</sup>

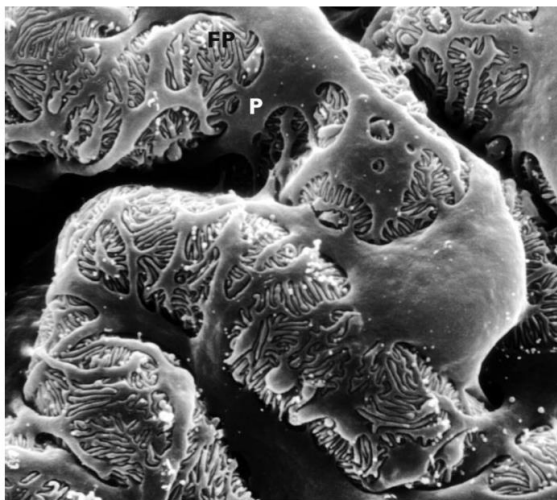
### A. 糸球体の構造



■ 糸球体の構造と構成細胞<sup>1)</sup>

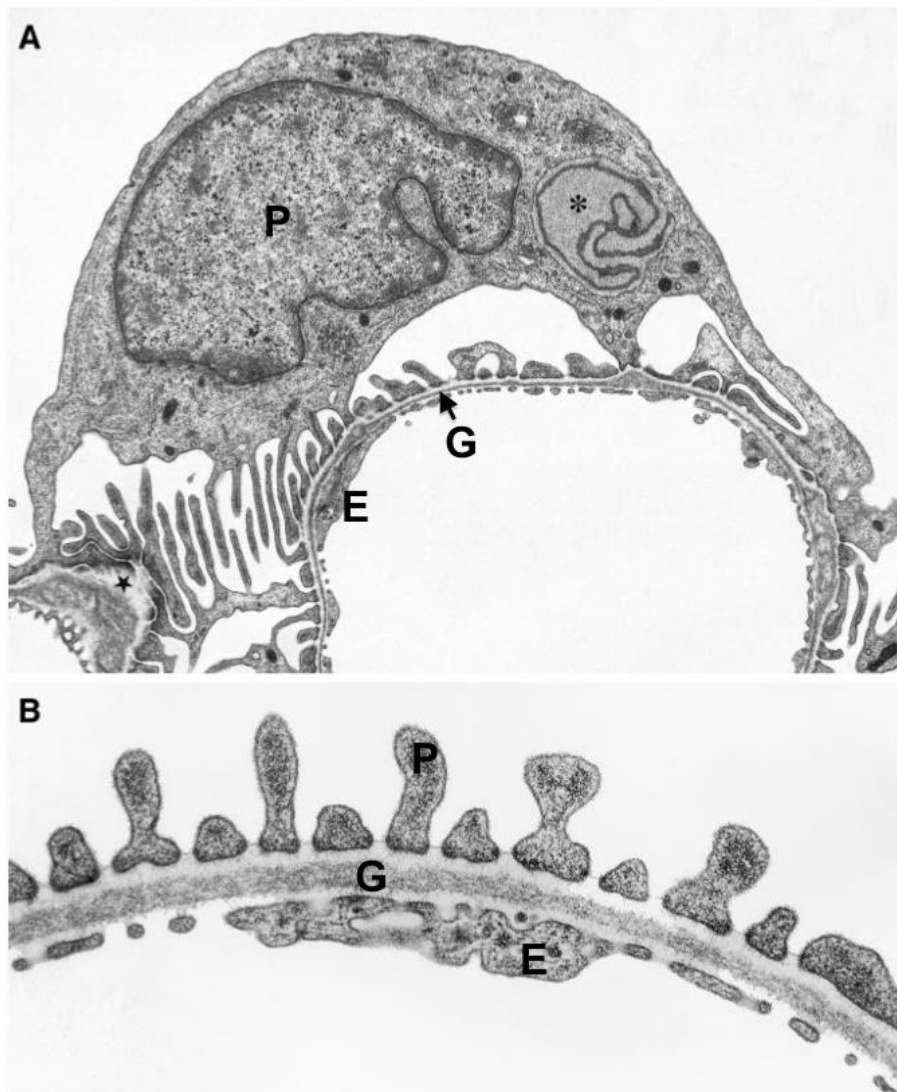
糸球体は足細胞(ポドサイト)、毛細血管内皮細胞、メサンギウム細胞、ボウマン嚢上皮細胞によって構成されている。特に足細胞(ポドサイト)、血管内皮細胞、両者で産生する基底膜の三層構造は糸球体係蹄とよばれ、濾過機能の役割を果たしている。

### B. ポドサイトの走査電子顕微鏡像<sup>1)</sup>



糸球体係蹄を尿管腔側からポドサイト足突起が規則的にかみ合って覆い、張力で毛細血管が虚脱するのを防いでいる

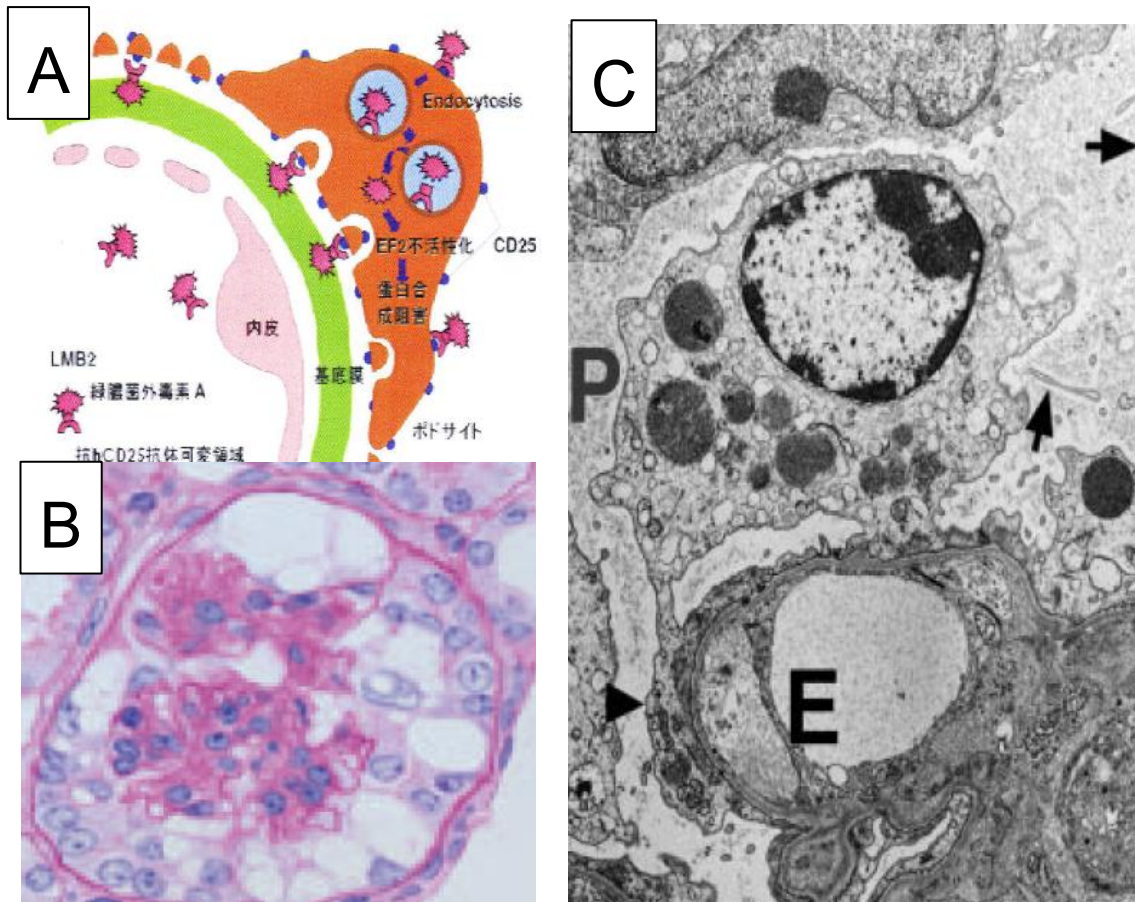
C.糸球体係蹄の透過型電子顕微鏡 <sup>1)</sup>



尿管腔側にポドサイト、血管側に内皮細胞、その間には基底膜が存在し、三者はタンパクが尿腔側に漏出しないようバリア機能をそれぞれ果たしている。

P...ポドサイト、E...糸球体内皮細胞、G...基底膜

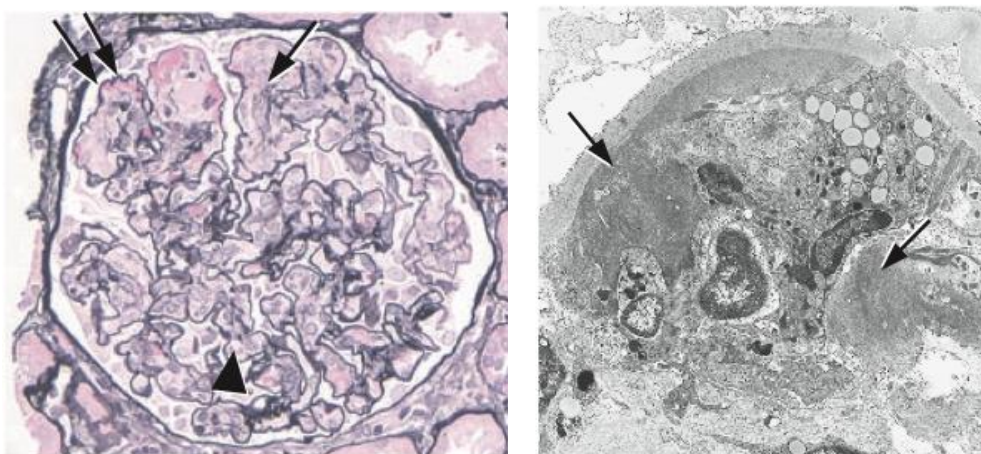
図3. NEP 25/LMB2 マウス<sup>17)</sup>



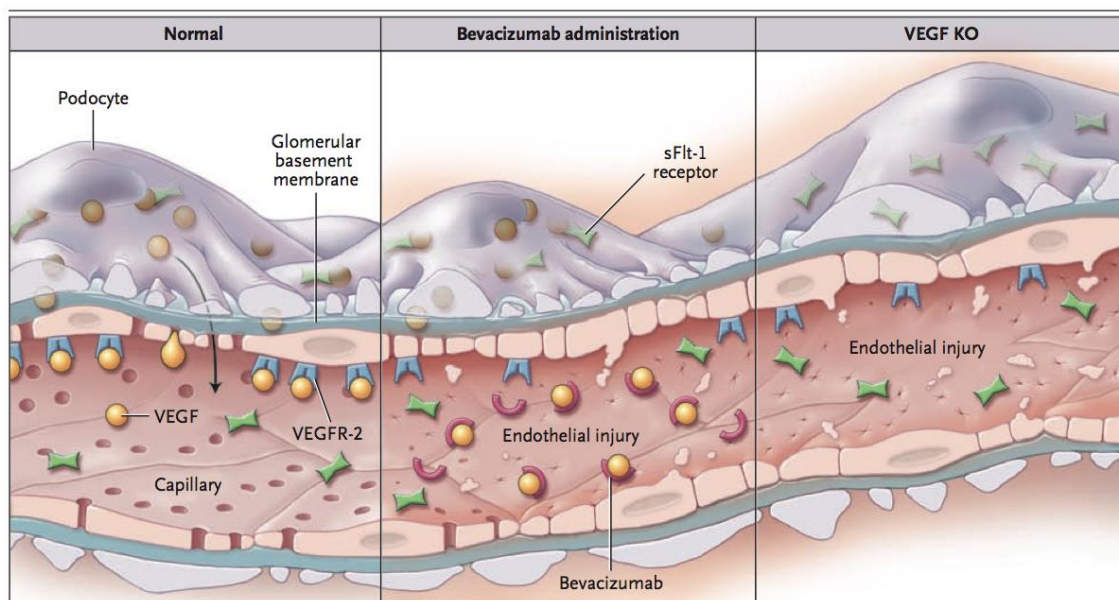
- A. NEP 25マウスはネフリンプロモーターを用いてポドサイトにhCD25を特異的に発現させている。hCD25に対する毒素イムノトキシン(LMB2)を静脈内投与することでポドサイトの蛋白合成阻害を促進し障害する。
- B. NEP25マウスはLMB2の濃度依存性にポドサイト障害を与えることができる。投与量を調整することで、ヒトcollapsing FSGS様の組織所見を得ることができる。
- C. NEP25マウスの電顕像はポドサイト障害部に一致した内皮細胞腫大像を認める P...ポドサイト E...血管内皮細胞



図4.ポドサイトは内皮細胞へVEGFを恒常的に供給し内皮の形態を保つ<sup>22)</sup>

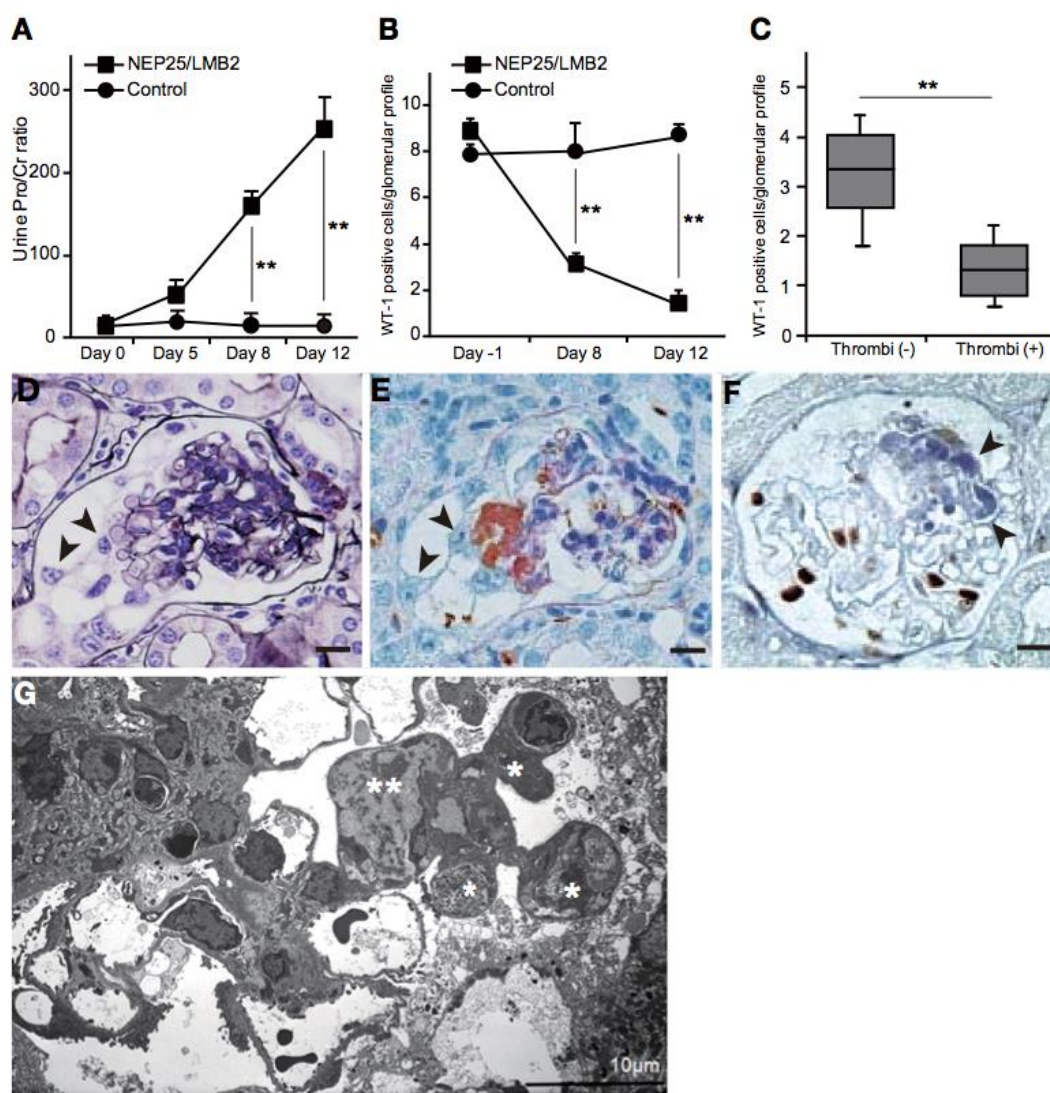


A. 抗VEGF抗体投与によるネフローゼを来した患者のPAM電顕染色(左)、メサンギウム融解(single arrow)、内皮細胞の腫大(arrow head)、赤血球破碎像(double arrows)を認める。  
電顕像(右)では係蹄内にフィブリン血栓(single arrow)を認める。



B. 正常ポドサイトからは恒常的にVEGFが産生され、VEGFR-2を介して内皮細胞に供給される。一方抗VEGF抗体(Bevacizumab)投与やポドサイト特異的VEGF KOマウスではVEGFの供給が阻害され、内皮細胞傷害を来す。

図5. LMB2投与マウスの蛋白尿およびWT-1陽性細胞数



A.蛋白尿はコントロール(n = 4)と比べLMB2投与群(n = 6)で8日目より増加を認めた (\*\*P < 0.01)。

B.WT-1陽性細胞は8日目より減少を認めた(\*\*P < 0.01)。

C.糸球体を血栓の有無で分けポドサイト数(WT-1陽性細胞数)をカウントしたところ有意に血栓陽性糸球体におけるポドサイト数は減少した( $1.24 \pm 0.31$  cells /glom vs.  $3.19 \pm 0.31$  cells /glom, \*\*P < 0.01)。

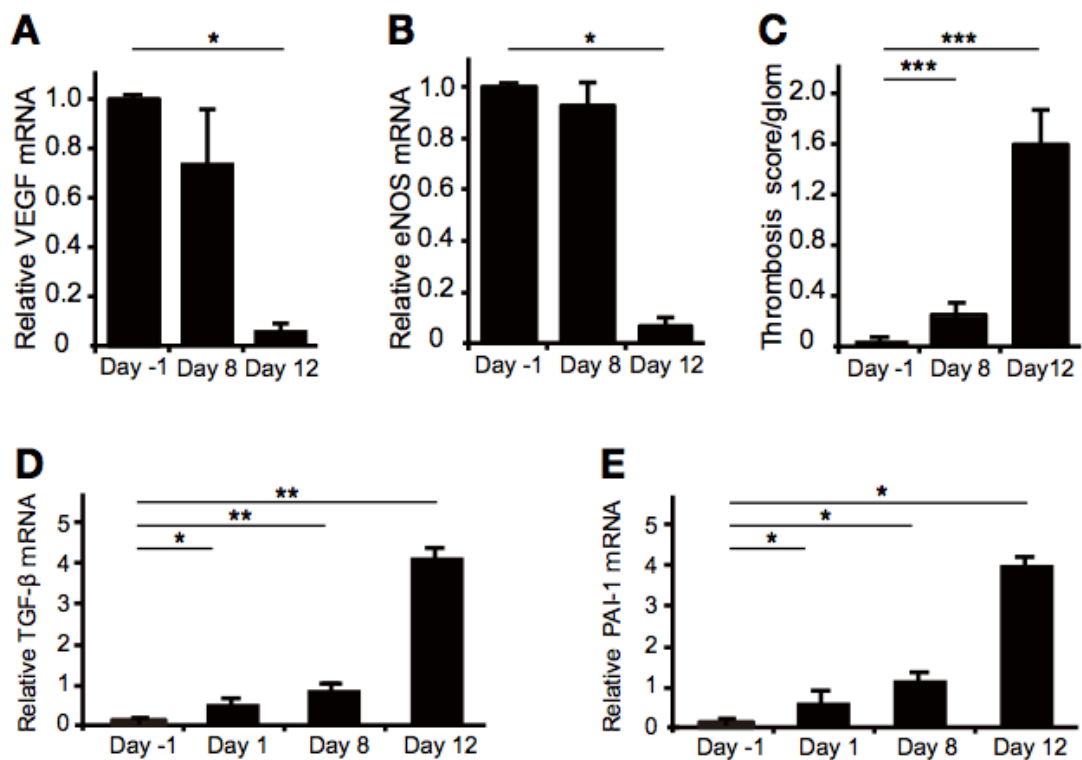
D.PAM染色：糸球体内のポドサイト障害部に一致した部位にPAS陽性の浸出を認めた (×400)。

E. Fibrinogen染色 (brown), (Dの連続切片) : PAS染色の浸出は血栓であることが確認できた(×400)

F. WT-1染色 (brown) + Fibrinogen染色 (purple): ポドサイト障害部に一致した血栓形成像が確認された、一方ポドサイトが係蹄に存在する部位には血栓は認められなかった

G.NEP25/LMB2マウスday12の電顕像。ポドサイト障害部に一致した血栓形成像(\*)とメサングウム融解(\*\*)が認められた。

図6. NEP/LMB2マウスではLMB2投与後1日目でPAI-1の上昇が内皮細胞に一致してびまん性に認められる

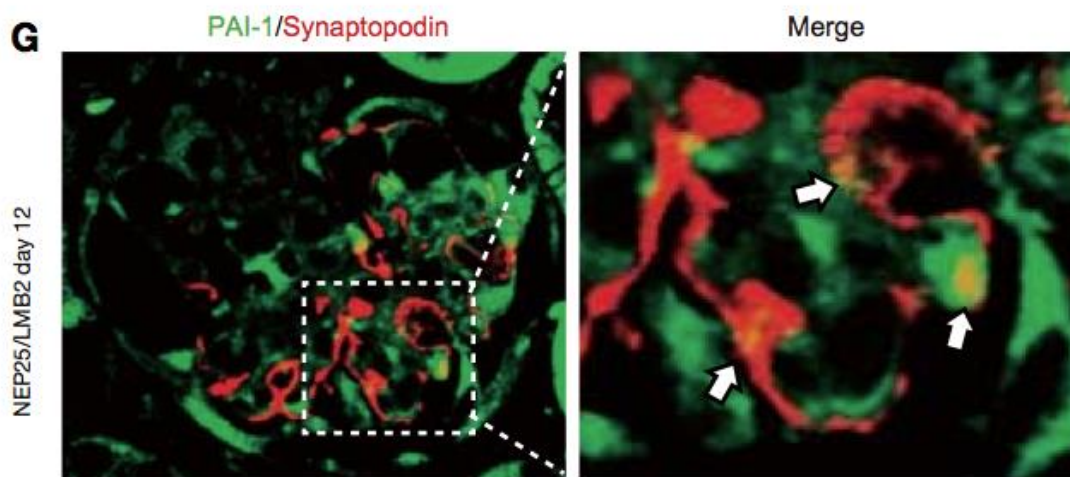
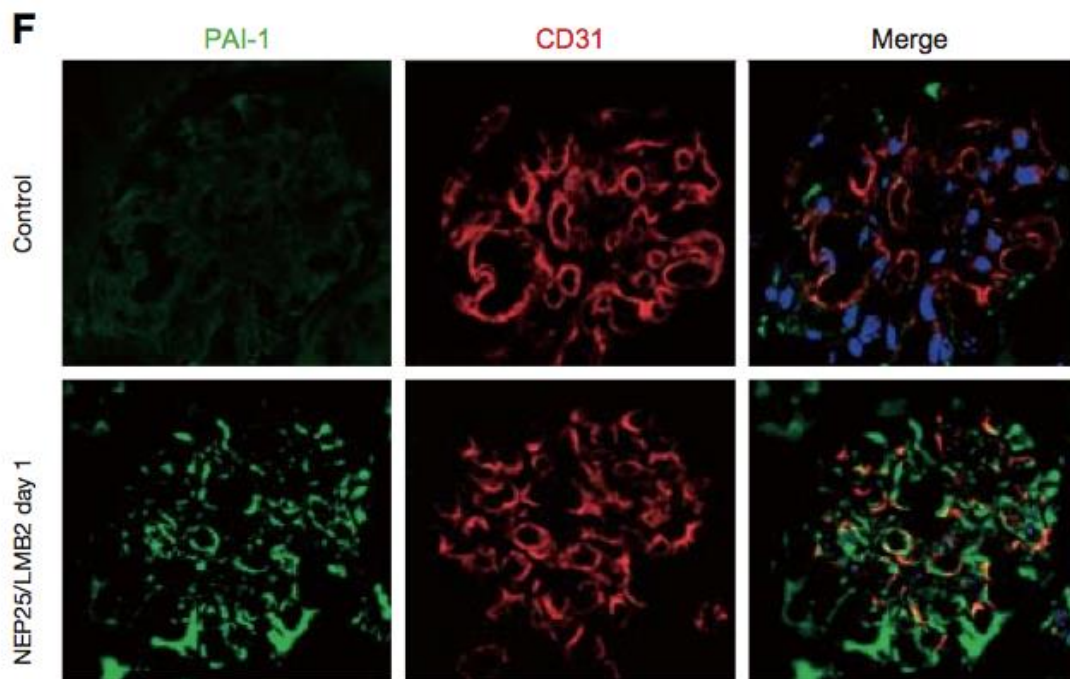


A, B. day -1と比較して単離糸球体VEGF, eNOS mRNAの発現はDay12で著明に低下した (\* $P < 0.05$ )。

C.血栓スコアは時系列に増加を認めた(\*\*\* $P < 0.001$ )。

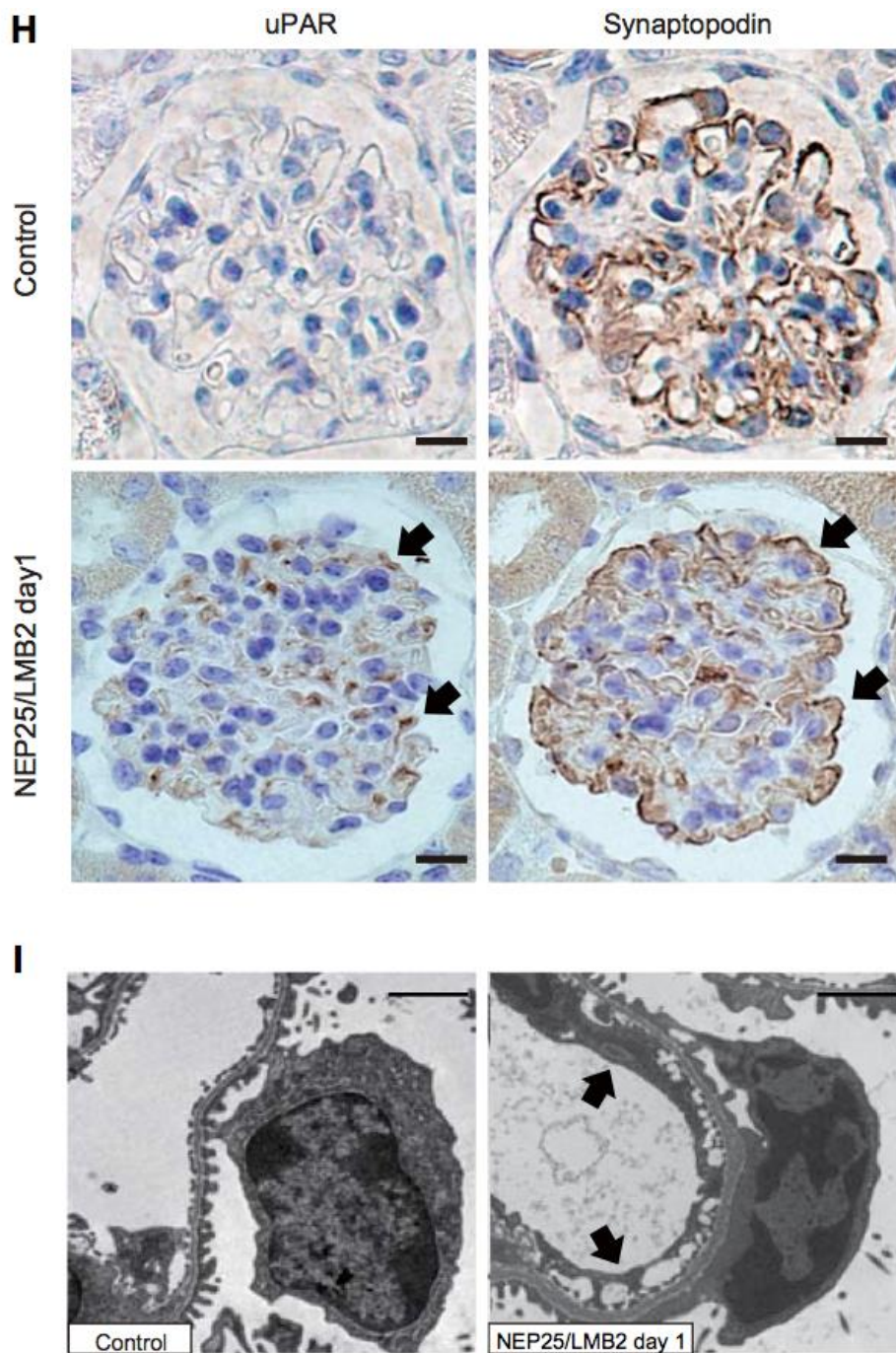
D, E. 単離糸球体TGF-β mRNA発現はPAI-1 mRNAと同様にLMB2投与後1日目から上昇した (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )。





F. PAI-1(緑)+ CD31(赤) の蛍光二重染色. LMB2投与後1日目から係蹄内にびまん性に発現を認め、一部でCD31と共局在を認める。コントロール(NEP25/PBS)ではPAI-1発現を認めなかった。

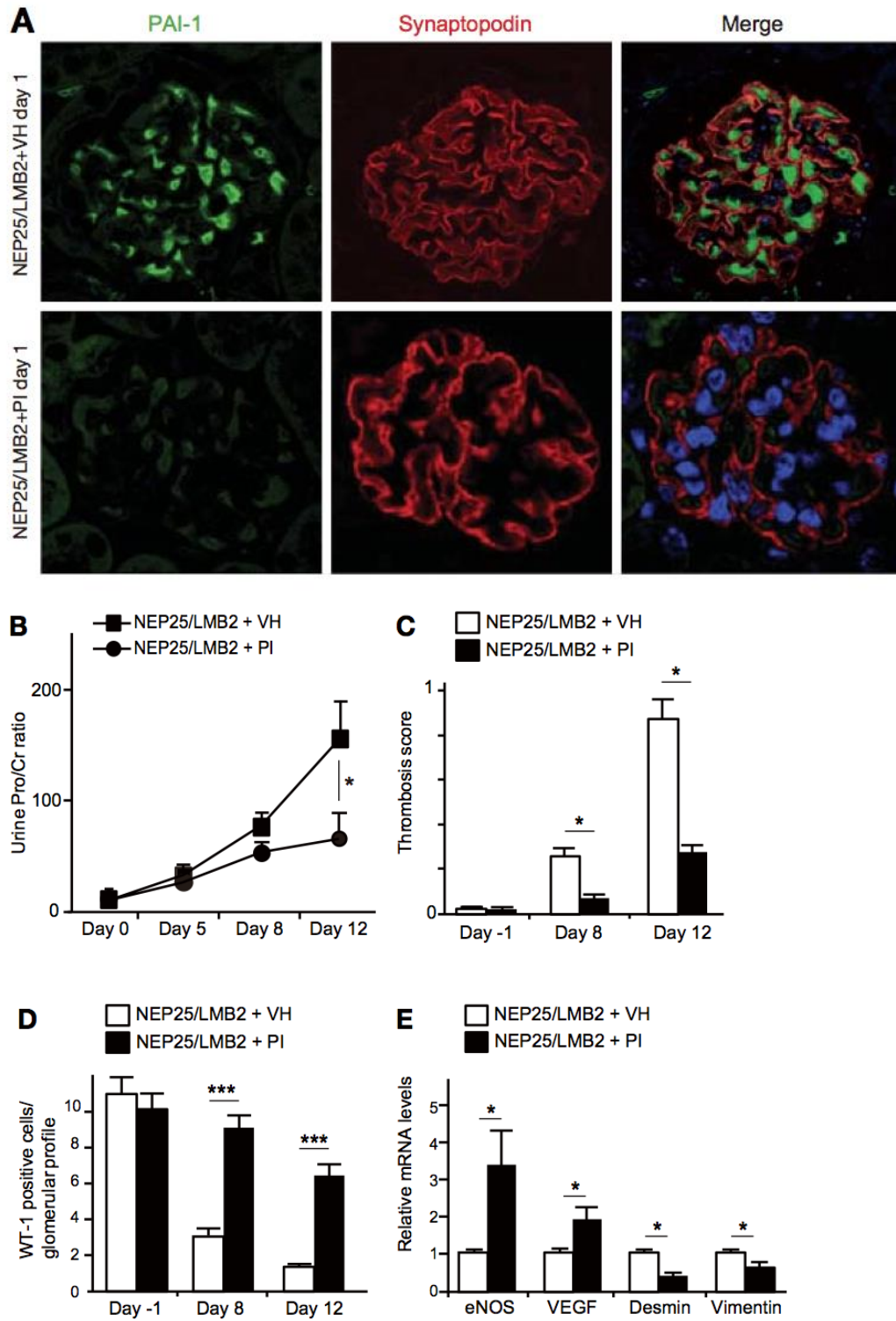
G.NEP25/LMB2 12日目の染色ではPAI-1はSynaptopodinと一部共局在を認めた。



H.連続切片でのuPAR、synaptopodin染色。NEP25/LMB2 day1ではuPAR発現が増強し、一部Synaptopodinと共局在を認めた(矢印)。コントロールではuPARは発現が認められない。

I.NEP25/LMB2 day1では内皮の腫大が認められた(矢印)

図7.PAI-1抑制はタンパク尿を軽減し、ポドサイト数減少を抑制する



A. NEP25/LMB2+VH day1ではPAI-1の発現が増強しており、局在はSynaptopodinと一致しない。NEP25/LMB2+PI day1ではPAI-1発現が認められなかった。

B. NEP25/LMB2 + PI群(n = 8)はNEP25/LMB2 + VH(コントロール)群(n = 6)と比較して、著明にタンパク尿が減少した (\*P < 0.05)。

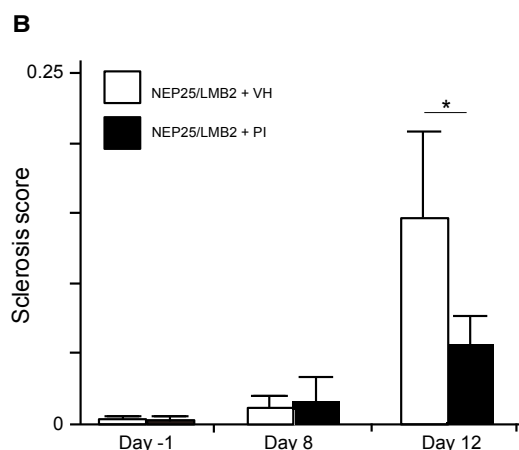
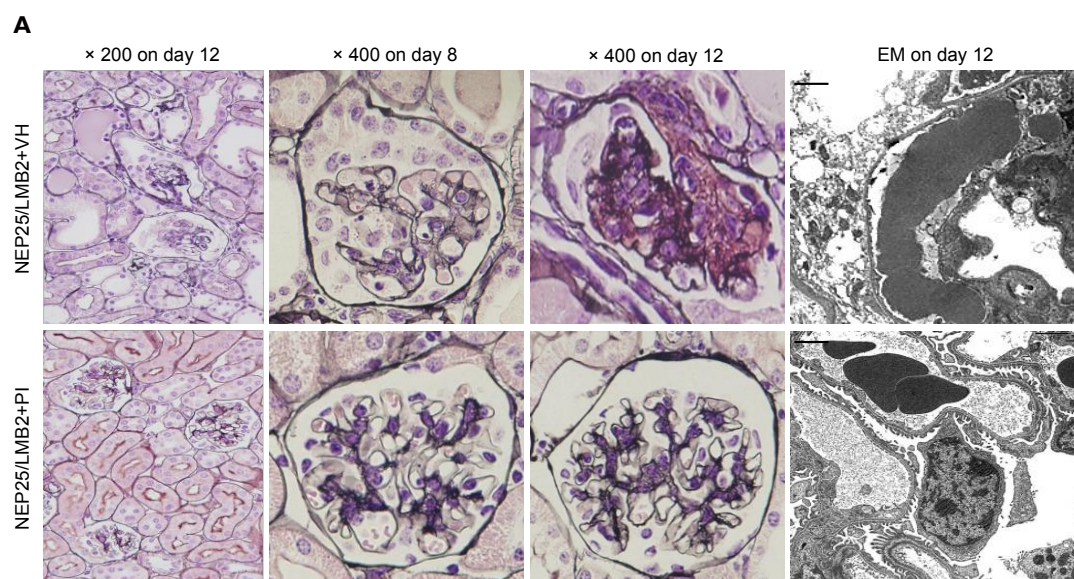
C. NEP25/LMB2 + PI群では血栓形成が軽減した (\*P < 0.05)。

D. NEP25/LMB2 + PI群 (n = 8)ではNEP25/LMB2 + VH(コントロール)群(n = 6)と比較してポドサイト数の減少が軽減した (\*\*\*P < 0.001)。

E. 単離糸球体を用いたNEP25/LMB2 + PI群 (n = 3) ではNEP25/LMB2 + VH(コントロール)群(n = 3)と比較してeNOS, VEGF mRNAは保たれおり、一方desmin, vimentin mRNAの増加は抑えられた (\*P < 0.05)。



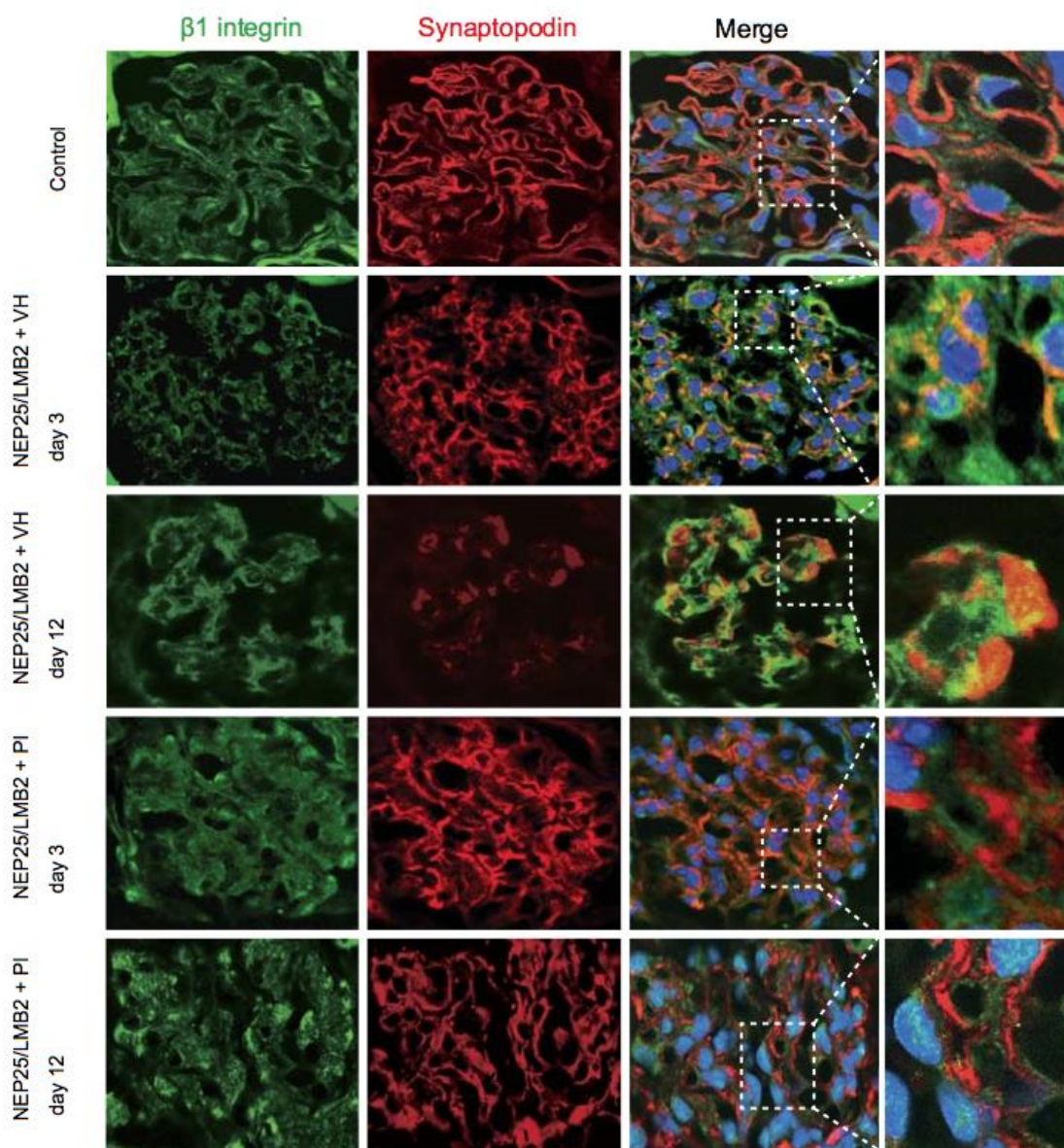
図8 PAI-1抑制はNEP25マウスにおいて糸球体の構築とポドサイトを保護する



A.腎皮質の組織像,もっとも左の低い倍率(×200)では尿細管拡張はコントロール(NEP25/LMB2マウス + VH)群(n=6)と比較してNEP25/LMB2マウス + PI群(n=8)では軽度である。強拡大(×400)ではNEP25/LMB2マウス + VH群のday8で上皮細胞増殖が認められ, day 12では硬化像が認められた。電顕ではNEP25/LMB2マウス + VH群(n=8)で糸球体内への血栓形成、またポドサイト剥離が限局して認められる一方NEP25/LMB2マウス + PI群(n=8)ではポドサイト傷害が少なかった。

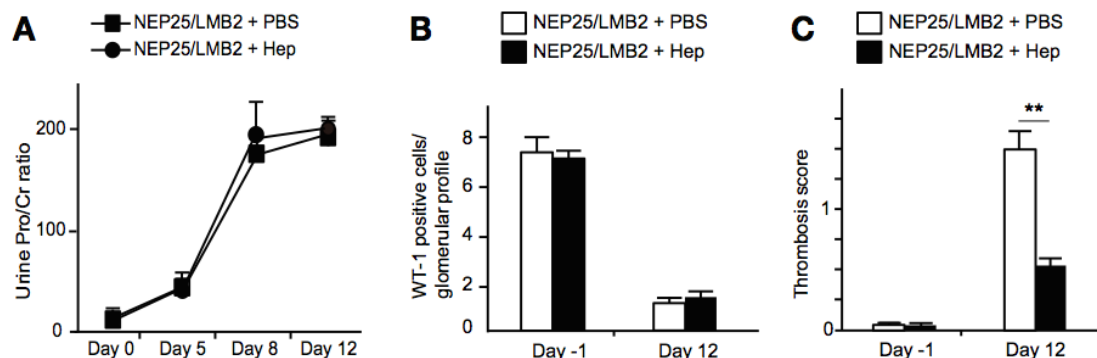
B.血栓スコアは時系列に増加するがコントロール(NEP25/LMB2マウス + VH)群(n=6)と比較してNEP25/LMB2マウス + PI群(n=8)では糸球体硬化が抑制された(\*P < 0.05)。

図9 PAI-1抑制はNEP25/LMB2の $\beta 1$  integrinのポドサイトへの取込みを抑制する



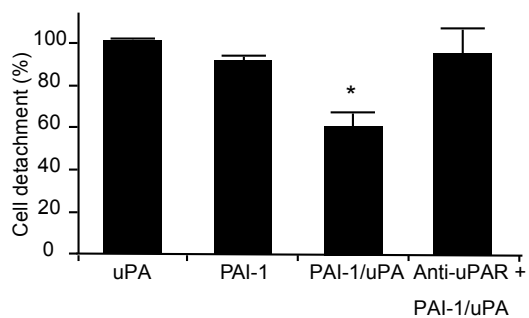
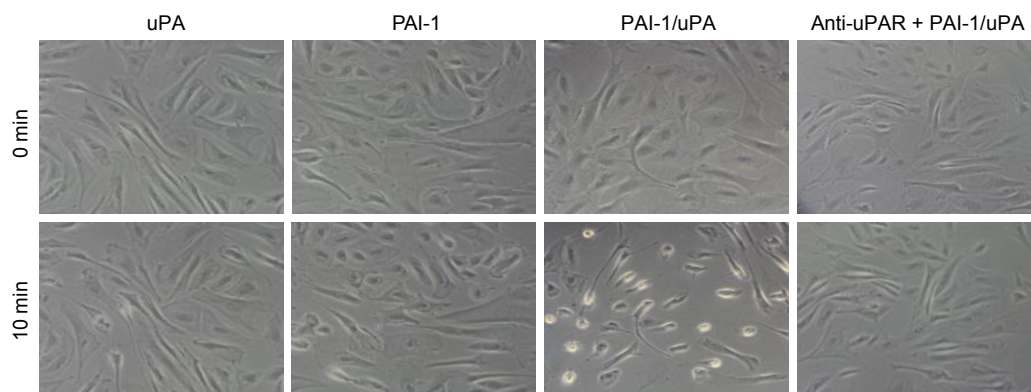
NEP25/LMB2 + VHマウスでは $\beta 1$  integrinのポドサイト内取込みを認める。  
NEP25/PBS, NEP/LMB2 + PI群では $\beta 1$  integrinはポドサイトマーカーとの  
共局在を認めない。

図10 NEP25/LMB2マウスはヘパリン投与で血栓減少するがポドサイト傷害の改善を認めない



- A. 蛋白尿はヘパリンを投与した群 (NEP25/LMB2 + Hep, n = 5) と NEP25/LMB2 + PBS群(n = 5)で有意差を認めず、両群とも時系列に増加を認めた
- B. ヘパリンを投与した群 (NEP25/LMB2 + PLab, n = 5) とNEP25/LMB2 + PBS群 (n = 5)でWT-1陽性細胞は両群とも時系列に減少した。
- C. ヘパリンを投与した群 (NEP25/LMB2 + PLab, n = 5) では血栓スコアが NEP25/LMB2 + PBS群 (n = 5) と比べ、有意に減少した(\*\*P < 0.01)。

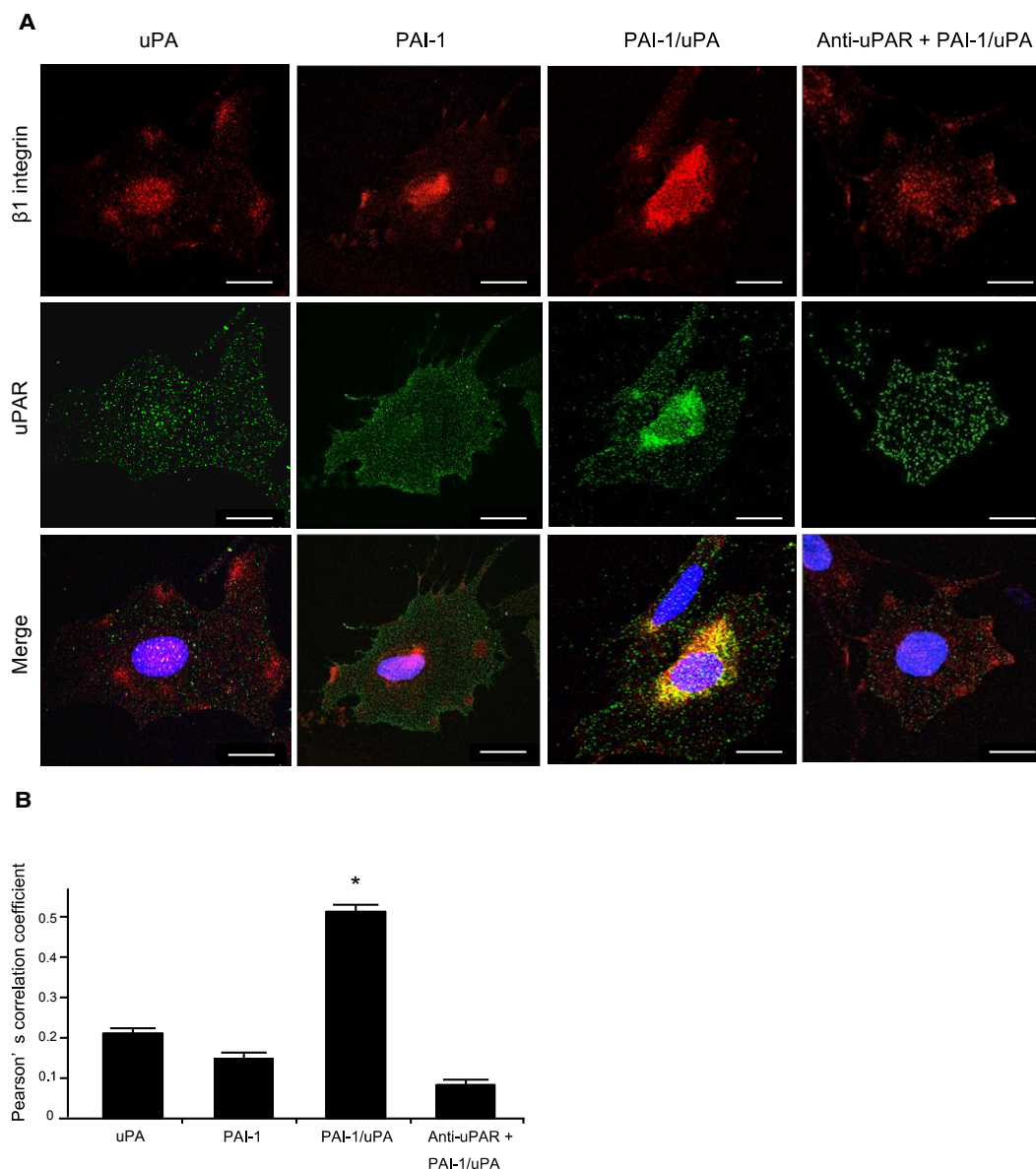
図11 PAI-1/uPA complex投与群ではポドサイト剥離が認められる



PAI-1/uPA complex投与10分後では他の群と比較して有為なポドサイト剥離が認められた(\* $P < 0.05$ )。



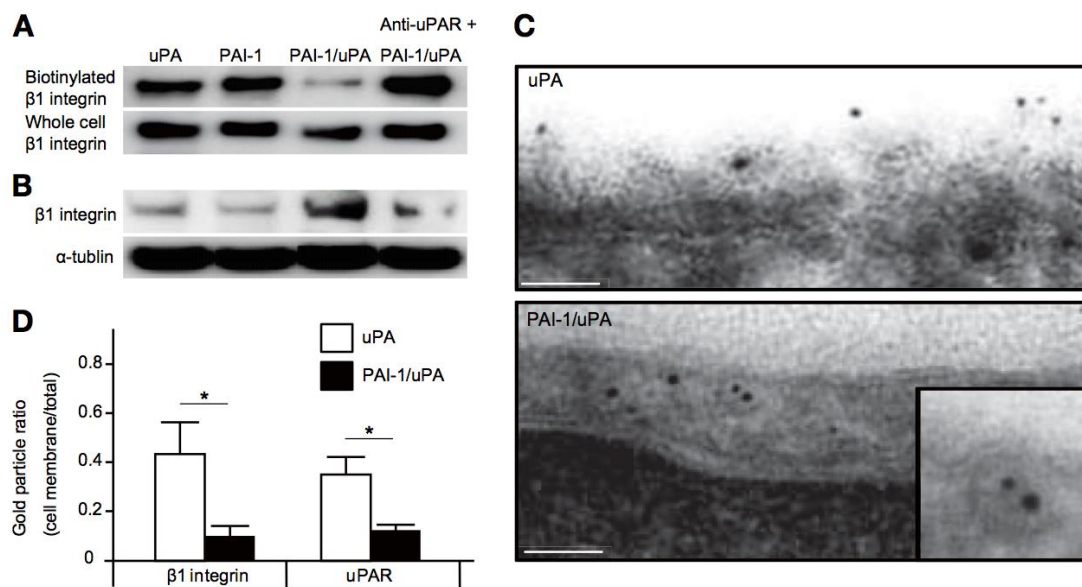
図12 PAI-1/uPA complex投与群ではβ1 integrinがuPARと共局在し、細胞質内へ移動する



A. β1 integrinとuPARを共焦点顕微鏡で撮影した。uPAもしくはPAI-1の単独投与群ではβ1 integrinは細胞膜表面に多く、uPARは散在していた。しかしPAI-1/uPA complex投与群ではβ1 integrinおよびuPARは細胞質内への移動および、共局在を示した。uPAR抗体によってuPARを阻害したところ細胞質内移動および共局在は認められなかった。

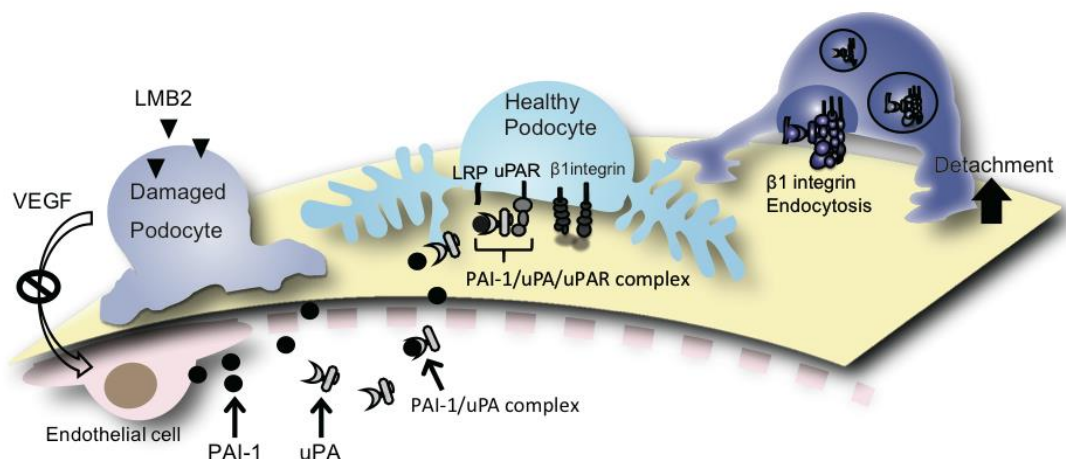
B. PAI-1/uPA complex投与群で有意な共局在率の上昇を示した (\*P < 0.05)。画像はImage J、JaCopソフトウェアを用いて検討した<sup>73),74)</sup>。

図13 PAI-1/uPA complex投与群ではβ1 integrinとuPARが小胞体に取り込まれ細胞質内へ移動する



- A. ビオチン化タンパクのβ1 integrin ウェスタンブロット. PAI-1/uPA complex 投与群では細胞膜表面のタンパクが減少していた
- B. 細胞質抽出タンパクのβ1 integrin ウェスタンブロット. Aとは逆に PAI-1/uPA complex 投与群では他の群に比べて強発現していた
- C. 二重免疫電顕(β1 integrin; 5nm gold, uPAR; 10nm gold). PAI-1/uPA complex 投与群ではβ1 integrinとuPARが小胞内への取り込み像が見られた (scale bar = 50nm)
- D. 二重免疫電顕における細胞膜表面のgold数の割合.(uPA単独投与群 n = 4, PAI-1/uPA complex投与群 n = 6) β1 integrinとuPARはPAI-1/uPA complex投与群で明らかに細胞膜表面に存在するgoldの割合が減少していた.(\*P < 0.05)

図14 PAI-1/uPA complexはuPARを介してβ1 integrinをポドサイト内に取り込む



LMB 2によって傷害を受けたポドサイトは VEGF を内皮に供給することができなくなり、内皮が傷害を受ける。内皮細胞から PAI-1 が産生され、基底膜を通り抜けて血中の uPA と複合体を作る。ポドサイトの uPAR に複合体が結合し、細胞内に取り込まれる際に β1 integrin も取り込まれることで、細胞接着力が低下し、剥離する。

LRP(低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質)は様々なリガンドのエンドサイトーシスに関与している。本研究において培養ポドサイトおよび NEP 25 マウス糸球体に LRP が存在することは RT-PCR で確認している。

表 1 染色に使用した一次抗体

Supplemental Table 1: Primary antibodies for immunostaining				
First Antibody	Application	Host Species	Dilution	Supplier
WT-1	IHC	Goat pAb	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
PAI-1	IHC,IF	Rabbit pAb	1:50, 1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
VEGF(A-20)	WB	Rabbit pAb	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Synaptopodin	IF	Mouse mAb	1:1	PROGEN Biotechnik, Heidelberg, Germany
Fibrinogen	IHC	Rabbit pAb	1:500	Dako Cytomation, Denmark, A/S
uPAR	IE	Rat pAb	1:30	R&D systems, Minneapolis, MN
$\beta$ 1-integrin	IF, WB, IE	Rabbit pAb	1:500, 1:30	Novus Biologicals, Littleton, CO
$\beta$ -actin	WB	Mouse mAb	1:2000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
$\alpha$ -tubulin	WB	Mouse mAb	1:500	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany

IHC; immunohistochemistry, IF; immunofluorescence, WB; Western blotting, IE; Immunoelectronmicroscopy, mAb monoclonal antibody, pAb polyclonal antibody,

表 2 量的 PCR に用いたプライマー

Supplemental Table 2: Sequence-specific primers for quantitative RT-PCR		
Gene		Sequence(5'→3')
PAI-1	forward	aggatcgaggtaaacgagagc
	reverse	gcgggctgagatgacaaa
TGF-β	forward	tggagcctggacacacagta
	reverse	tgtgttggtgtagaggca
eNOS	forward	ccagtgccctgcttcac
	reverse	gcagggaagttaggatcag
VEGF	forward	ccagcgaagctactgccgtcca
	reverse	acagcgcacacagcggcacac
Desmin	forward	gcgtgacaacctgatagacg
	reverse	gttgatttcctcctgtagttg
Vimentin	forward	gatcgatgtggacgttccaa
	reverse	atactgctggcgacatcac