

筑波大学

博士（医学）学位論文

Biphasic MIF and SDF1 expression during  
podocyte injury promote CD44-mediated  
glomerular parietal cell migration  
in focal segmental glomerulosclerosis

(ポドサイト傷害時、MIF と SDF1 の二相性発現が  
FSGS 病変における CD44 を介した  
糸球体ボウマン嚢壁側上皮細胞の遊走を促進する)

2 0 2 0

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

井藤 奈央子

## <目次>

	ページ
【論文概要】	2
【略語リスト】	5
【背景】	7
【目的】	19
【対象と方法】	20
【結果】	32
【考察】	51
【結語】	57
【謝辞】	58
【出典】	59

## 【論文概要】

### <目的>

巣状分節性糸球体硬化症（focal segmental glomerulosclerosis, FSGS）は、糸球体足細胞（ポドサイト）の傷害に端を発する腎予後不良の疾患である。ポドサイト傷害が起こると、その係蹄の対面近傍に位置するボウマン嚢壁側上皮細胞（parietal epithelial cell, PEC）は、扁平な形から立方体に細胞形態を変え、ポドサイトが傷害された係蹄に向かって遊走し、増殖や細胞外基質産生を行うことで硬化病変を形成する。このように性質を変えたPECを「活性化PEC」と呼ぶが、これら一連の反応は糸球体の局所で起こり始めることから、傷害を受けたポドサイトから何らかのシグナルがPECに伝わり活性化すると推測される。本研究では、活性化PECの性質の中でも遊走能に着目し、以前より活性化PECのマーカーとして知られているCD44と、その上流因子であるmacrophage migration inhibitory factor（MIF）やstromal cell-derived factor 1（SDF1）を介したシグナル伝達が、活性化PECが遊走能を獲得することを目的とした「傷害ポドサイトー活性化PEC」に存在する細胞間シグナルではないかという仮説を立て実験を行った。

### <対象と方法>

実験1. ポドサイトにヒトCD25を発現させたNEP25マウスにイムノトキシンLMB2を尾静注投与することでポドサイトを特異的に傷害できるNEP25/LMB2マウスの腎組織切片を用いて免疫染色を行い、CD44、MIF、SDF1および受容体であるC-X-C

chemokine receptor type 4 (CXCR4) とCD74の糸球体での発現局在を経時的に評価した (day 0, 4, 8, 12, n=5)。CD44はポドサイトマーカーp57との二重免疫染色を行い、CD44発現初期の局在と傷害ポドサイトとの位置関係を評価した。

実験2. 不死化マウスボウマン嚢壁側上皮細胞 (mPEC) をrecombinant mouse MIF (rMIF) またはSDF1 $\alpha$  (rSDF1 $\alpha$ ) で24時間刺激し、それぞれCD44とCXCR4の発現を定量PCR、ウェスタンブロッティング、細胞免疫染色で評価した。さらに同様に刺激したmPECでのMIFとSDF1の発現も定量PCRで評価した。同刺激mPECを使ってBoyden chamberによる遊走アッセイを行い、siRNAを用いたCD44ノックダウンによる遊走能の変化を評価した (n=5)。

実験3. NEP25/LMB2マウスにMIF阻害薬 (ISO-1) またはSDF1-CXCR4阻害薬 (AMD3100) を投与し、蛋白尿や糸球体病変、CD44の発現に与える影響を評価した (n=5)。

#### <結果>

実験1. NEP25/LMB2マウスの糸球体では、PECにおけるCD44の発現はポドサイト傷害の進行とともに亢進した。CD44の発現初期像を示す糸球体のうち、67.5%でその発現局在がポドサイトの消失した係蹄の対面のPECに位置していた。ポドサイトにおけるMIFとSDF1の発現はポドサイト傷害の進行とともに亢進し、MIFはday 8、SDF1はday4にピークを認めた。またその発現局在は、病変の進行とともに傷害ポドサイトからCD44陽性PECへと移行した。CXCR4は、病変の進行とともにCD44陽性

PECに発現した。CD74は糸球体内には発現がなく、ボウマン嚢周囲に増加した細胞に発現していた。

実験2. rMIFまたはrSDF1 $\alpha$ で24時間刺激したmPECは、非刺激mPECと比較し、いずれもCD44とCXCR4の発現がmRNAおよび蛋白レベルで有意に増加した。さらに同刺激mPECでのMIFやSDF1の発現も増加した。遊走能も非刺激mPECと比較し有意に亢進しており、CD44ノックダウンによりその遊走能は抑制された。

実験3. NEP25/LMB2マウスにISO-1あるいはAMD3100を投与しても、溶媒投与群と比較し、病変、蛋白尿、ポドサイト数、CD44の発現に有意な変化を認めなかった。

<考察>

*In vivo*実験と*in vitro*実験の結果から、傷害ポドサイトに発現したMIFやSDF1が、液性因子として対岸近傍のPECに作用してCD44とCXCR4の発現を誘導し、活性化PECのCD44を介した傷害濾過障壁への遊走を促進していると考えられた。さらにポドサイトが剥離した後は、PECが内因性のMIFやSDF1を発現し、自らの遊走を促進している可能性が考えられた。この傷害ポドサイトと活性化PECにおけるMIFとSDF1の二相性発現により、傷害された濾過障壁の修復機構が促進され、結果として糸球体硬化に発展すると推察された。

## 【略語リスト】

CKD, chronic kidney disease

CXCR4, C-X-C chemokine receptor type 4

DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole

eNOS, endothelial nitric oxide synthase

FSGS, focal segmental glomerulosclerosis

GP, growth permissive state

GR, growth restrictive state

MIF, macrophage migration inhibitory factor

PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1

PAS, Periodic acid-Schiff

PEC, parietal epithelial cell

PFA, paraformaldehyde

RIPA, radioimmunoprecipitation assay

rMIF, recombinant mouse macrophage migration inhibitory factor

rSDF1 $\alpha$ , recombinant mouse stromal cell-derived factor 1 $\alpha$

SDF1, stromal cell-derived factor 1

siRNA, small interfering RNA

TMA, thrombotic microangiopathy

uPA, urokinase plasminogen activator

uPAR, urokinase plasminogen activator receptor

U-Pro/Cr, urine protein-to-creatinine ratio

VEGF, vascular endothelial growth factor



## 【背景】

### 巣状分節性糸球体硬化症とポドサイト傷害

慢性腎臓病（chronic kidney disease, CKD）は進行性腎疾患の総称であり、本邦では現在約1,330万人が罹患している頻度の高い疾患である[1]。またCKDの終末像である透析患者数は本邦では30万人以上にのぼり、患者のQOLのみならず医療経済的にも重大な疾患であると言える[2, 3]。巣状分節性糸球体硬化症（focal segmental glomerulosclerosis, FSGS）は、高度蛋白尿を示すネフローゼ症候群を呈する腎疾患の中でも、治療抵抗性を示し腎機能廃絶に至って透析や腎移植といった腎代替療法が必要となる代表的な疾患であり（図1）[4]、FSGSの進展機序を明らかにし治療介入することは、CKD対策における重要な課題の一つである。ヒトおよび動物モデルを用いた多くの検討から、FSGSは糸球体足細胞（ポドサイト）の傷害に端を発することが明らかとなっているが[5-8]、発症から糸球体硬化に至るまでの詳細なメカニズムは未だ不明な点が多く、特異的治療がないのが現状である。

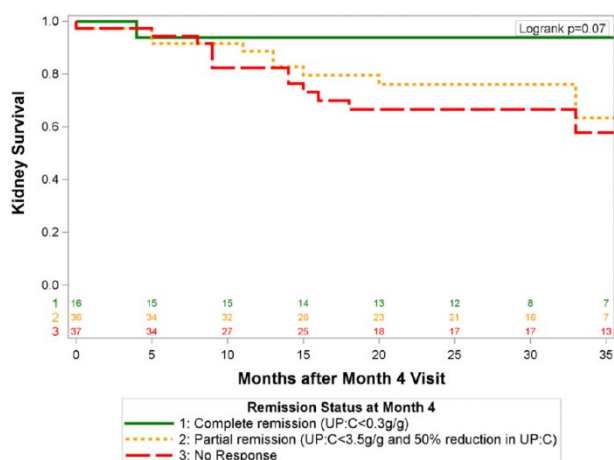


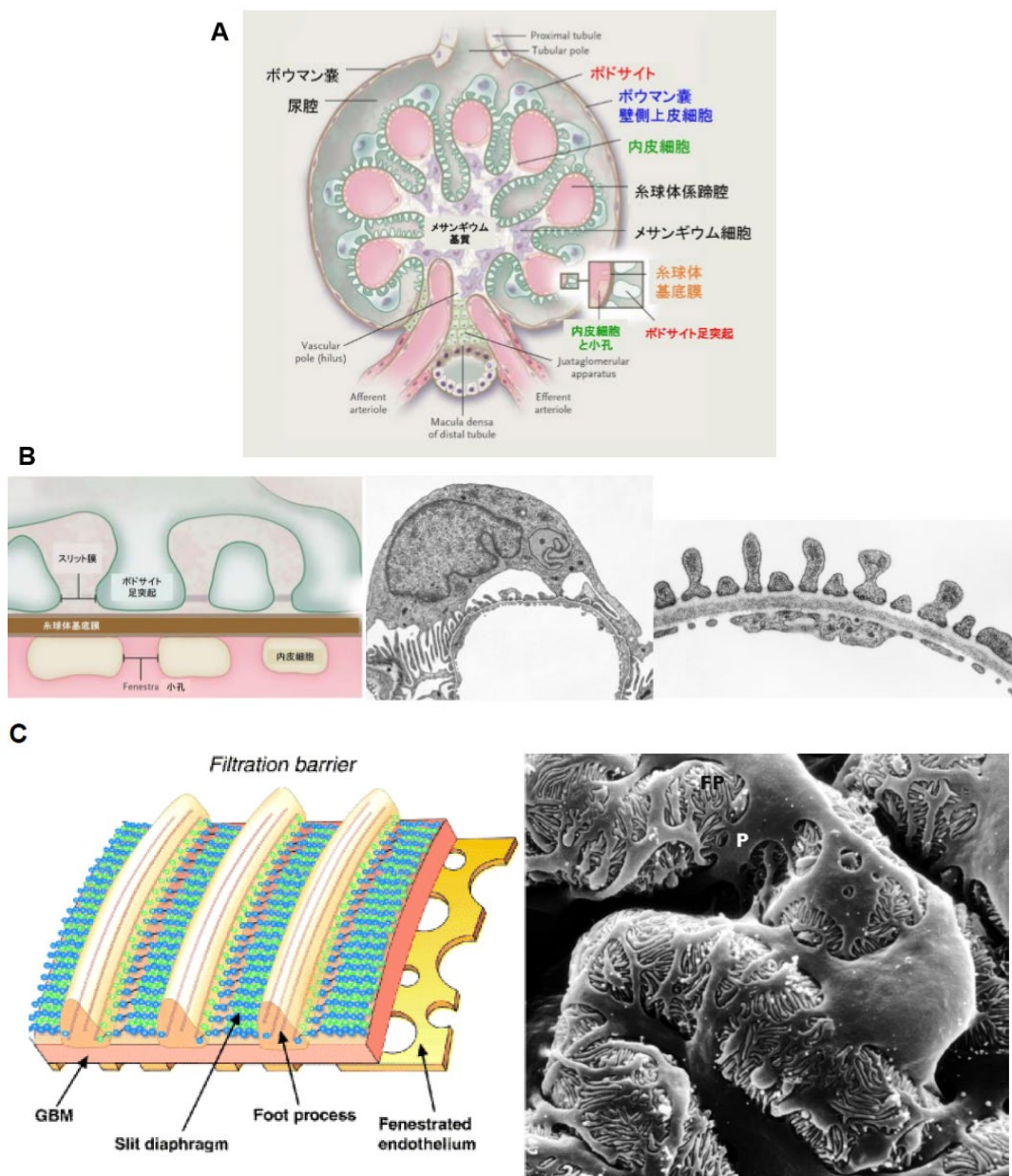
図1. 巣状分節性糸球体硬化症の腎予後[4]  
各種治療に抵抗し蛋白尿が持続する場合（黄色点線または赤色破線）は、3年以内に約40%が腎死に至り、透析や腎移植といった腎代替療法が必要となる。

UP:C, urine protein-to-creatinine ratio

## 糸球体構造とポドサイトによる蛋白尿制御機構

糸球体は毛細血管が球状に塊をなした組織であり、ポドサイト、内皮細胞、メサンギウム細胞が存在する（図 2A） [5]。その中で、ポドサイト、糸球体（毛細血管）基底膜、内皮細胞が構成する濾過障壁が、糸球体毛細血管内の血液が濾過されることによって産生される原尿中に多量の蛋白が漏出するのを抑止している（図 2B） [9]。濾過障壁としての具体的な機序や構造として、糸球体基底膜には陰性荷電による charge-barrier や大きさによる size-barrier が存在することや [10, 11]、内皮細胞が持つ孔（fenestra）にも陰性荷電による charge-barrier が存在することが知られている [12]。ポドサイトでは、細胞体から延びる足突起が隣り合うポドサイトの足突起との間で規則的な噛み合わせによりスリット膜というジッパー構造を形成することによって蛋白尿を抑止している（図 2C） [9, 13]。しかしポドサイトは終末分化細胞であり、増殖能を有していない。そのため、ポドサイトが傷害を受け尿中に剥離すると、蛋白漏出制御機構は破綻する [9]。一方、糸球体を取り囲むボウマン嚢にはボウマン嚢壁側上皮細胞（parietal epithelial cell, PEC）が存在し、ボウマン嚢基底膜とともに、濾過圧に対してボウマン嚢の形態を維持している。

図2. 糸球体構造 ([5, 9, 13]より引用、一部改変)



A. 糸球体には、ポドサイト、毛細血管内皮細胞、メサンギウム細胞、それを取り囲むボウマン嚢にボウマン嚢壁側上皮細胞（parietal epithelial cell, PEC）が存在する。

B. ポドサイト、内皮細胞、糸球体基底膜の三層構造によって濾過障壁は形成されている。C. 隣り合うポドサイトの足突起間では、規則的な噛み合わせにより、濾過障壁の最終関門としてスリット膜というジッパー構造が形成されている。

## 糸球体硬化形成過程におけるポドサイトクロストーク

前述のとおり、ポドサイト、内皮細胞、糸球体基底膜は蛋白尿を抑止する濾過障壁にとってそれぞれ重要な役割を果たしているが、これらの細胞はお互いに緻密な連携をとりながら、バリア機能を維持していることが徐々に明らかとなりつつある [14-16]。

### ポドサイトー内皮細胞クロストーク

典型的な例としては、ポドサイトが恒常的に産生する vascular endothelial growth factor (VEGF) とその受容体を有する内皮細胞とのクロストークが挙げられる。VEGF 阻害薬が投与されたヒトおよびマウスでは、高血圧、急性腎障害、蛋白尿を呈し、腎病理組織では糸球体内皮細胞傷害による血栓性微小血管症 thrombotic microangiopathy (TMA) が認められることから、ポドサイト由来の VEGF により内皮細胞の恒常性や機能が保たれていることが明らかとなった [17]。

さらに当研究室では、ポドサイト特異的傷害モデルマウスを用いて、新たなポドサイトー内皮細胞クロストークを見出した [18]。ポドサイトが傷害されると内皮細胞に plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) が新たに発現し、PAI-1 はポドサイトの細胞膜表面上で urokinase plasminogen activator (uPA) および uPA receptor (uPAR) と複合体を形成、さらにポドサイトに発現する  $\beta 1$  integrin と結合した後、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。 $\beta 1$  integrin は基底膜ー細胞接着分子であり、細胞内に移動することでポドサイトの糸球体基底膜から尿中への剥離が

促進される。つまり、糸球体局所のポドサイト傷害が契機となり、ポドサイトー内皮細胞間の恒常性が失われ、内皮細胞での PAI-1 発現とポドサイトでの PAI-1/uPA/uPAR 複合体形成が誘導される結果、隣接するポドサイトの剥離が次々と糸球体全体に広がり、糸球体硬化が進展していく機序を明らかにした。

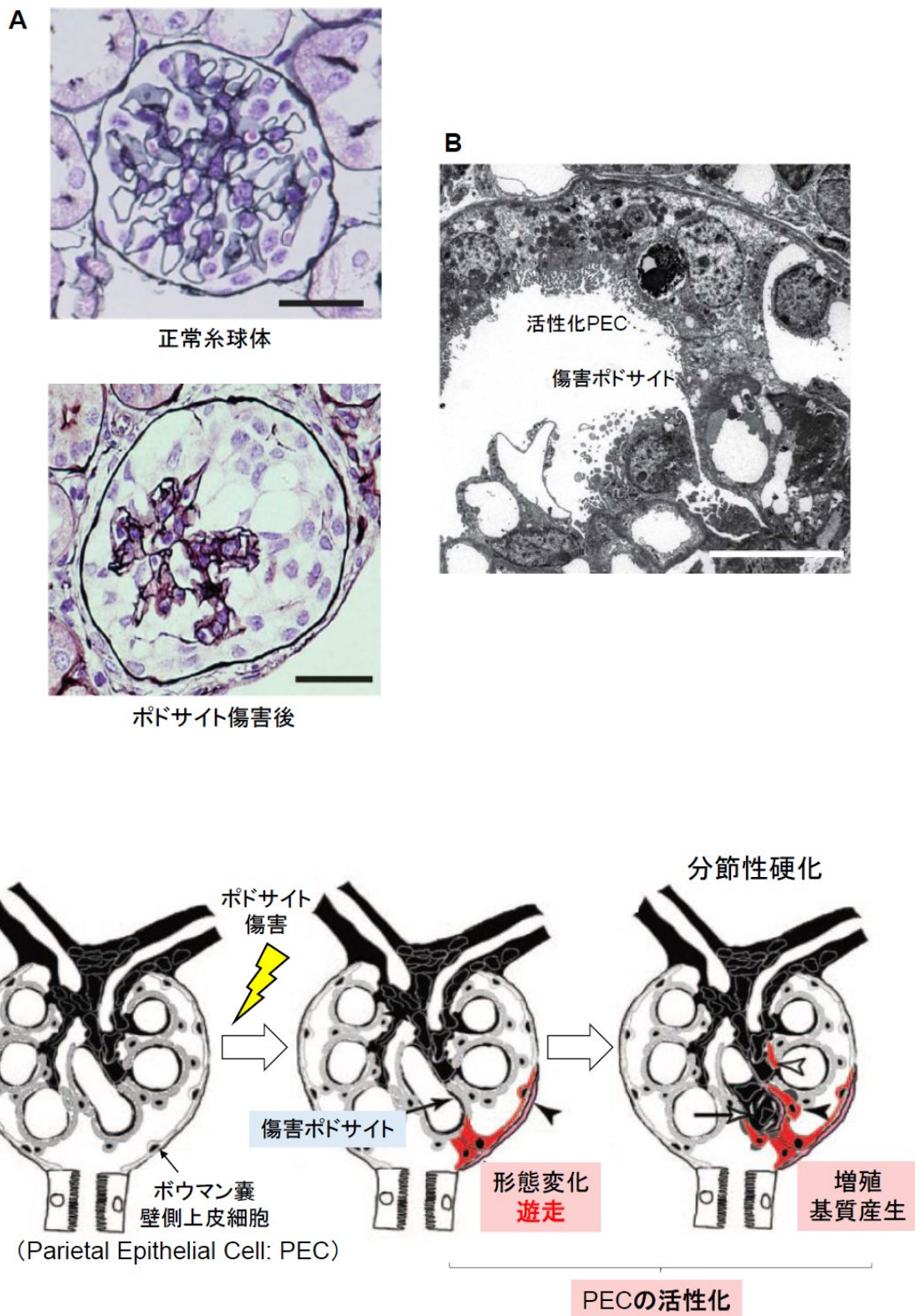
VEGF や PAI-1 以外のポドサイトー内皮細胞クロストーク因子としては、内皮一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) がある。eNOS は、一酸化窒素産生を介した血管拡張や活性酸素除去などの働きにより組織保護的に作用しており[19]、糸球体腎炎や糖尿病性腎症の糸球体内皮細胞では eNOS の発現低下や機能異常が報告されていた[20-22]。糸球体内皮細胞の eNOS をノックアウトしたマウスに糖尿病性腎症を発症させると、ポドサイトの細胞骨格維持が損なわれ高度蛋白尿が出現することから、内皮細胞の産生する eNOS によってもポドサイトの恒常性が維持されていると考えられる[23]。

#### ポドサイトーPEC クロストーク

糸球体硬化の進展に関わるもう一つの細胞間クロストークとして、ポドサイトーPECクロストークの存在が、これまでのFSGSモデルを用いた研究から示唆されている[7, 8, 24-26]。PECは、正常ではボウマン嚢基底膜上にあり扁平な形態を呈しているが、ポドサイトが傷害されると、その対面近傍に存在するPECは、立方体に細胞形態を変え、ポドサイトが傷害された部位に向かって遊走し、さらにそこで増殖や細胞外基質産生を行う (図3A-C) [7, 8, 27-29]。このように、細胞として性質を変化

させたPECは「活性化PEC」と呼ばれ、ポドサイト傷害による糸球体硬化病変の形成には、この活性化PECが重要な役割を果たしていると考えられている。特に興味深い点は、PECの活性化は、傷害されたポドサイトの対面近傍局所のPECで起こるという点であり[5, 8, 15, 25]、傷害されたポドサイトに由来する何らかのシグナルがPECに伝達されていることが示唆されるが、その明確な機序は明らかではない。活性化PECの機能と糸球体硬化の形成機序を明らかにすることは、FSGSの病態解明と治療介入に重要な意義を持つと考えられ、今回私は、活性化PECの遊走を促進するのに必要な「ポドサイト-PECシグナル」を明らかにすることを目的として本研究を行った。

図3. ポドサイト傷害とPECの活性化 ([26, 30] より引用、一部改変)



A. 正常PECとポドサイト傷害後の活性化PECの形態の違い。B. 傷害されたポドサイトに向かって遊走する活性化PECの電顕像。C. ポドサイトが傷害されると、尿腔をはさんで対面近傍に位置するPECは、立方体に細胞形態を変え、ポドサイトが傷害された部位に向かって遊走し、さらにそこで増殖や細胞外基質産生を行うことで分節性硬化病変が形成される。

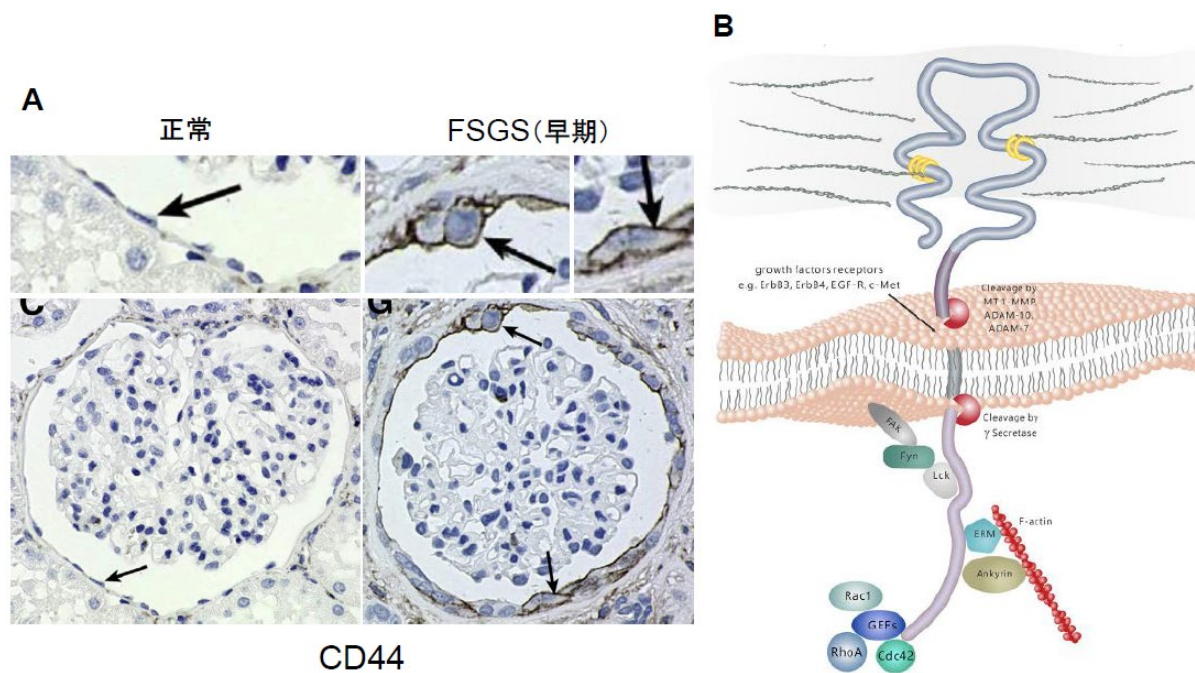


## 活性化PECとCD44

活性化したPECには、CD44という分子が*de novo*に発現することが、これまでのヒトおよび動物モデルを用いた複数のFSGSの研究で示されている（図4）[27, 31-34]。

CD44は細胞表面に発現する糖タンパクで、増殖、遊走、接着、上皮間葉転換などに関わる多機能分子である[35]。近年、CD44と活性化PECの遊走との関連についての検討や、CD44ノックアウトマウスを用いたFSGSモデルの検討が相次いで報告された。Roeder SSらは、CD44ノックアウトマウスにポドサイト特異的抗体を投与してポドサイトを傷害すると、PECの遊走が抑制されて硬化病変は軽減し蛋白尿は減少すること、*in vitro*の実験で、CD44を過剰発現させたPECでは遊走能と基質産生能が亢進すること、pERKがCD44の発現を亢進させている制御因子であることを示した[36]。Eymael Jらも、CD44ノックアウトマウスにポドサイト特異的傷害モデルであるThy1.1モデルを掛け合わせると硬化病変は軽減し蛋白尿は減少すること、*in vitro*の実験で、ヒトPECでは抗CD44抗体によって遊走能が阻害されることを示した[37]。これらの結果から、CD44は活性化PECの遊走能獲得に重要な役割を果たしていることが推測される。しかし、どのようにしてPECがポドサイト傷害を感知してCD44を発現し、傷害ポドサイトに向かう遊走能を獲得するのかについての詳細なメカニズムは明らかではない。

図4. 活性化PECにおけるCD44の*de novo*発現 ([33, 38] より引用、一部改変)

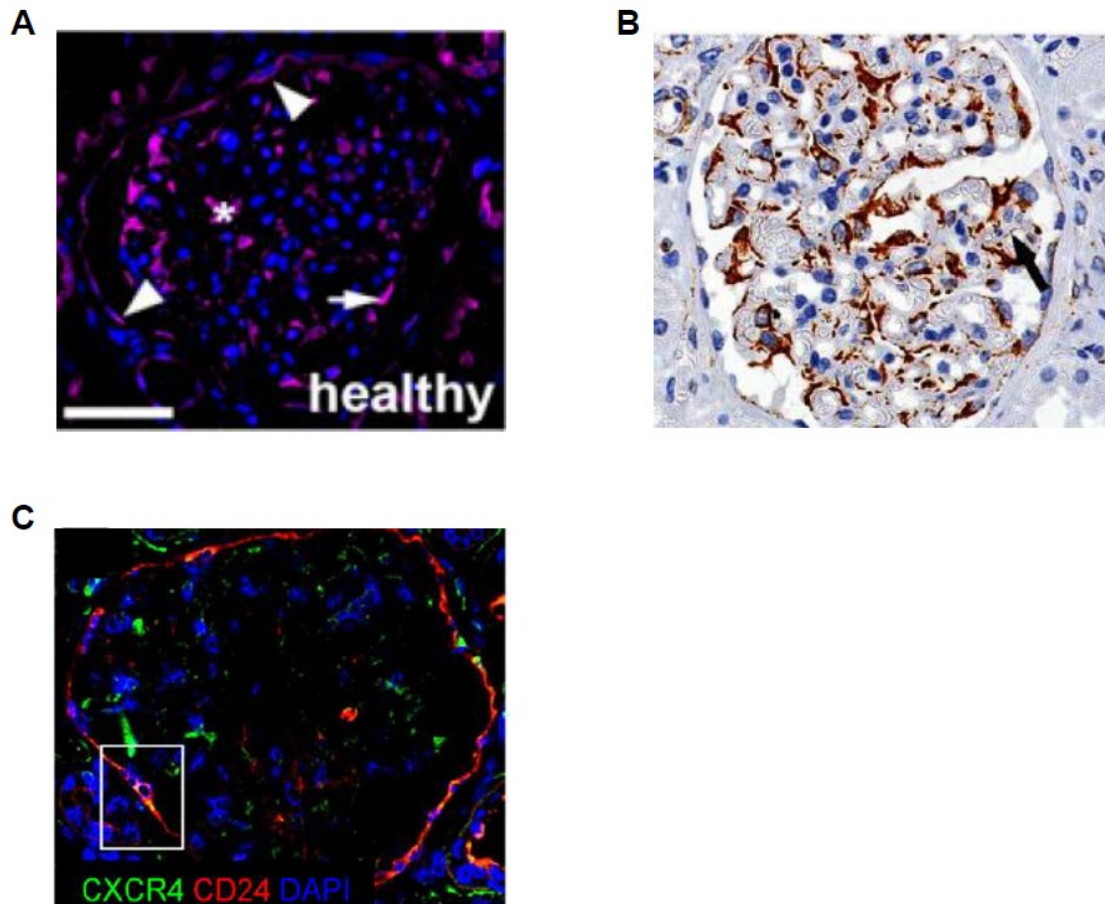


A. 糸球体にまだ明らかな形態変化が認められない段階でのFSGS腎移植後再発患者の活性化PECにCD44の発現が確認できる。B. CD44の分子構造。CD44は一回膜貫通型の85kDaの糖タンパクで、増殖、遊走、接着、上皮間葉転換など多機能を有する。

## ポドサイトとMIF、SDF1

ケモカインは白血球をはじめとする様々な細胞の遊走活性を有するサイトカインの総称であり[39, 40]、その多くがケモカイン受容体とともに、CD44と様々な相互作用を示すことが知られている。中でもmacrophage migration inhibitory factor (MIF) とstromal cell-derived factor 1 (SDF1) は、CD44を介したシグナルの上流分子としての機能も持ちながら、MIFはCD74を介して、SDF1はC-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) を介して、それぞれ細胞の遊走能獲得に関与していることが報告されている[41-44]。さらにこれまでの報告から、正常および傷害されたポドサイトはMIFやSDF1を発現すること、さらにPECはCXCR4を発現することが明らかにされているが(図5A-C) [45-50]、これらのケモカインやその受容体がポドサイトやPECに発現する意義は明らかではない。今回私は、傷害ポドサイトから分泌されるMIFやSDF1が、活性化PECにCD44の発現を介してその遊走能獲得に関与している可能性を考え、本研究を行った。

図5. ポドサイトとPECにおけるMIF、SDF1およびCXCR4の発現[46, 47, 51]



A. 正常ヒト糸球体でのMIFの発現。ポドサイト (→)、メサンギウム細胞 (\*)、PEC (▶) にわずかな発現を認める。B. 正常ヒト糸球体で、ポドサイトにSDF1の発現を認める。糸球体内皮細胞にもわずかな発現がある (→)。C. 正常ヒト糸球体で、PEC (白枠) にCXCR4の発現を認める。CD24はヒトPECマーカー。

## 【目的】

傷害ポドサイトー活性化 PEC に存在するクロストーク、すなわち細胞間シグナルとして、ポドサイトが発現する MIF や SDF1 と、CD44 を介した活性化 PEC の遊走能獲得との関係性を明らかにする。

## 【対象および方法】

### ＜ポドサイト特異的傷害モデル NEP25/LMB2 マウス＞

本研究では、ポドサイト特異的傷害モデルとして NEP25/LMB2 マウスを使用した

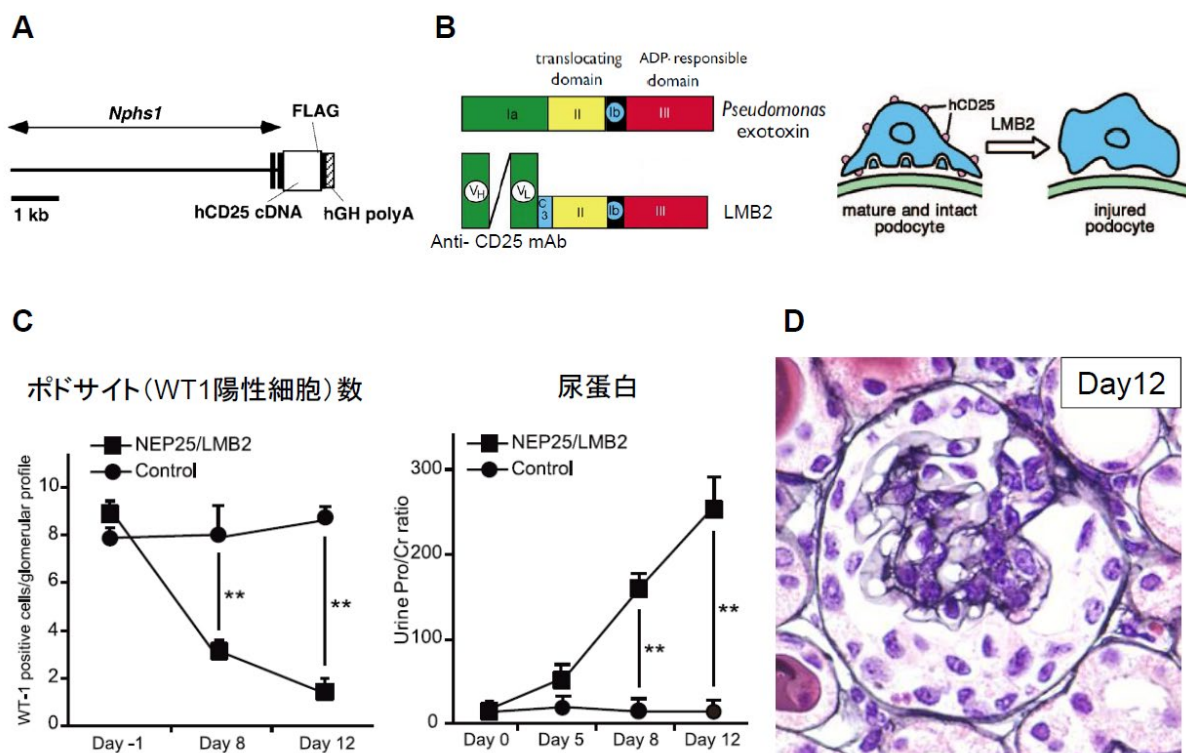
(図 6A-D) [52]。NEP25 マウスは、ポドサイト特異的タンパクであるネフリンのプロモーターを用い、ヒト CD25 を C57BL/6J マウスのポドサイトに特異的に発現させたトランスジェニックマウスであり、2005 年に松阪らによって開発された[52]。そのマウスに、緑膿菌菌体外毒素を有した抗 CD25 抗体であるイムノトキシン

(LMB2) を静注することによって、ポドサイト傷害による糸球体硬化病変を誘発することができる。このモデルは短期間に急速で激的なポドサイト傷害が進行し、組織病変としては、糸球体が虚脱し周囲に上皮細胞が増殖する、ヒトでは **collapsing FSGS** に相当する病変を呈する。この動物実験は、筑波大学遺伝子組換え実験安全委員会によって審査・承認され (Registration number: 130163)、筑波大学生命科学動物資源センターにおいて実施した遺伝子組み換え動物実験である。

NEP25 マウス (12-18 週) 40 匹を、LMB2 (2.25 ng/g BW) 投与群 (n = 20) および vehicle 投与 (control) 群 (n = 20) 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 LMB2 投与群 5 匹ずつおよび control 群 5 匹ずつを、それぞれ、LMB2 投与日を 0 日目として 0 日目、4 日目、8 日目、12 日目に 4%パラフォルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) で左室より灌流した後、腎臓を摘出した。その後、4%PFA を浸透させ固定し、パラフィン包埋して薄切後、酵素法および蛍光免疫染色

を行った。また灌流摘出した腎臓の一部は、10–20%ショ糖液でクリオプロテクション後に凍結切片を作成し、薄切後に蛍光免疫染色を行った。また、12日目まで観察したマウスについては、0日目、4日目、8日目、12日目に24時間蓄尿を行い、尿蛋白-クレアチニン比を測定した (SRL, Tokyo, Japan)。

図 6. NEP25/LMB2 マウス ([18, 52-54] より引用、一部改変)



A. NEP25 マウスは、ポドサイト特異的タンパクであるネフリン *Nphs1* のプロモーターを用いてポドサイトにヒト CD25 (hCD25) を特異的に発現させているトランスジェニックマウスである。B. 緑膿菌菌体外毒素を有した抗 CD25 抗体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のタンパク質合成を阻害し傷害する。C. NEP25 マウスに LMB2 を投与することによって、経時的にポドサイト数は減少し、蛋白尿は増加する。D. 組織所見はヒト collapsing FSGS 様病変を呈する。



### **[NEP25/LMB2 マウスへの MIF 阻害薬 (ISO-1) 投与]**

NEP25 マウス (12-18 週) 10 匹に LMB2 (2.25 ng/g BW) を投与後、MIF のトートメラーゼ活性を特異的に阻害する低分子阻害薬である ISO-1 投与群 (n = 5) と vehicle 投与群 (n = 5) にランダムに振り分けた[55]。既報告を参考に[56, 57]、ISO-1 投与群には ISO-1 (20 mg/kg BW) (ab142140, Abcam, Cambridge, UK) を、vehicle 投与群には 10% DMSO/生理食塩水を、それぞれ 0 日目より 11 日まで 1 日 1 回腹腔内投与し、12 日目に 4%PFA で左室より灌流後に腎臓を摘出した。0 日目、4 日目、8 日目、12 日目に 24 時間蓄尿を行い、尿蛋白-クレアチニン比を測定した。

### **[NEP25/LMB2 マウスへの CXCR4-SDF1 阻害薬 (AMD3100) 投与]**

NEP25 マウス (12-18 週) 10 匹に LMB2 (2.25 ng/g BW) を投与後、SDF1 の CXCR4 への結合を特異的に阻害する AMD3100 投与群 (n = 5) と vehicle 投与群 (n = 5) にランダムに振り分けた[58]。既報告を参考に[50, 59, 60]、AMD3100 投与群には AMD3100 (1 mg/kg BW) (Plerixafor, ab120718, Abcam) を、vehicle 投与群には PBS を、それぞれ 0 日目より 11 日まで 1 日 1 回腹腔内投与し、12 日目に 4%PFA で左室より灌流後に腎臓を摘出した。0 日目、4 日目、8 日目、12 日目に 24 時間蓄尿を行い、尿蛋白-クレアチニン比を測定した。

## <免疫染色法と組織学的評価法>

酵素法による免疫染色にはパラフィン包埋切片（2 μm）を用いた。パラフィン切片は、脱パラフィン後、クエン酸バッファー（10 mM, pH 6.0）または EDTA バッファー（1 mM, pH 8.0）を用いて加熱による抗原賦活化を行った。CD74 染色時のみ 0.1%プロテイナーゼ K（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）を用いた。内因性ペルオキシダーゼに対しては 3%過酸化水素水/メタノール、内因性アビジンおよびビオチンに対しては Avidin/Biotin Blocking Kit（Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）をそれぞれ用いてブロッキングした。免疫染色に用いた一次抗体については表 1 に示す。切片と一次抗体を 4°Cで一晩反応させた後、ビオチン標識二次抗体と反応させた。その後、ペルオキシダーゼストレプトアビジン（Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan）と反応後は diaminobenzidine（DAB substrate-chromogen system, Dako, Glostrup, Denmark）、アルカリホスファターゼストレプトアビジン（Nichirei Bioscience）と反応後は nitro blue tetrazolium（NBT/BCIP; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）を用いて可視化した。酵素法による免疫染色後は、PAS（Periodic acid-Schiff）+ ヘマトキシリン染色またはヘマトキシリン染色を行った。

蛍光免疫染色には主に凍結切片（7 μm）を用いた。一次抗体に対して Alexa Fluor® 488 または Alexa Fluor® 568 で標識した二次抗体（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）と反応させ、核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI; Dojindo, Kumamoto, Japan）を用いた。観察にはオリンパス共焦点蛍光顕微鏡 FLUOVIEW

FV3000 とキーエンスオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 を使用した。

PEC における CD44 発現の半定量化は、独自のスコアリングである「CD44 PEC

Score」を用い、CD44 陽性細胞がボウマン囊全周の 0%を占める場合は Score 0

(S0)、>0%かつ<50%は Score 1 (S1)、 $\geq 50\%$ は Score 2 (S2) として評価した。MIF

の糸球体内での発現は、ImageJ を用いて蛍光免疫染色切片の蛍光強度で評価した。

これらの評価、および p57 陽性細胞数 (ポドサイト数)、SDF1 陽性糸球体数の評価

には、少なくとも一切片あたり 30 個以上の糸球体を無作為に抽出して解析した。

表 1 免疫染色およびウェスタンブロットティングに用いた一次抗体

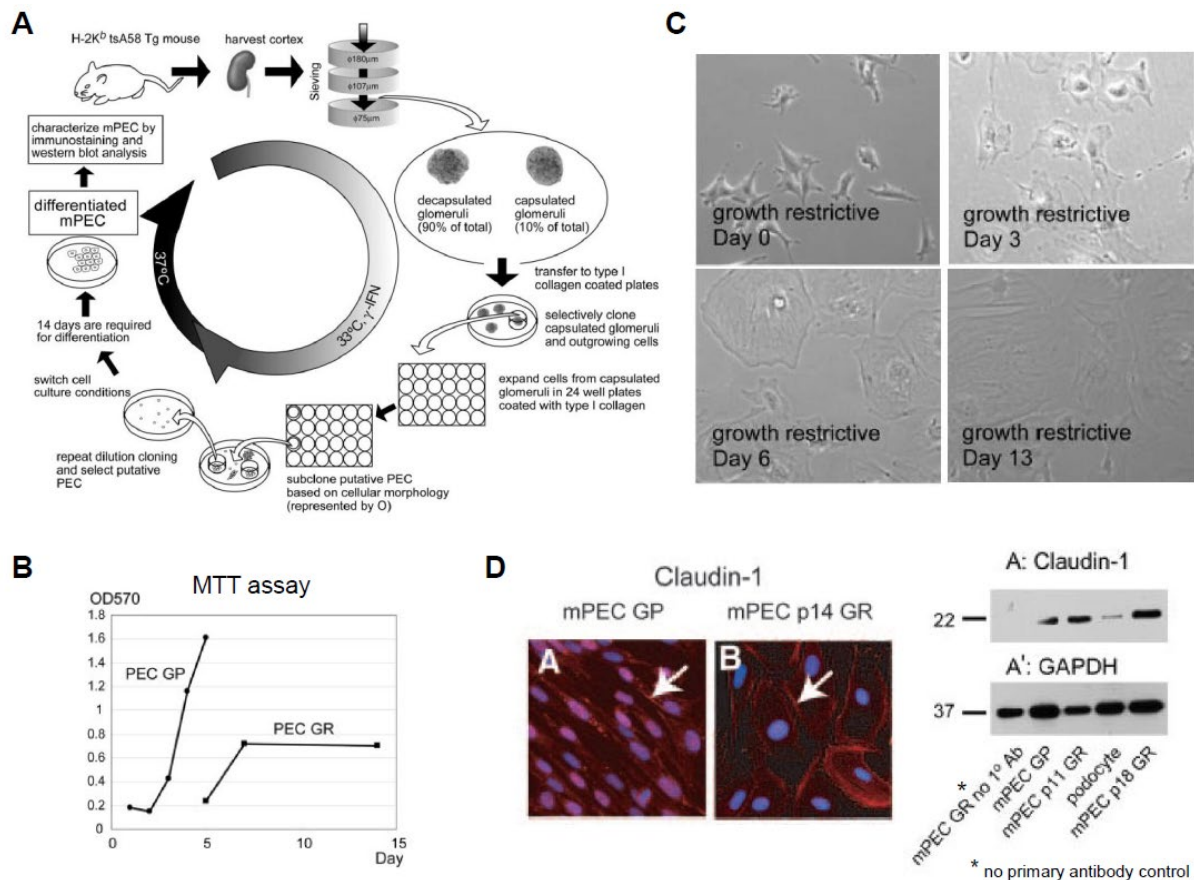
First Antibody	Catalog No.	Host species	Application	Dilution	Supplier
CD44	550538	Rat mAb	IHC, IF and WB	IHC;1:50, IF;1:25, WB;1:400	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ
p57	sc-1039	Goat pAb	IHC	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Claudin-1	51-9000	Rabbit pAb	IF	1:25	Zymed Laboratories, San Francisco, CA
PAX8	10336-1-AP	Rabbit pAb	IF	1:25	Proteintech, Rosemont, IL
MIF	sc-20121	Rabbit pAb	IF	1:25	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Nestin	MAB353	Mouse mAb	IF	1:50	Chemicon, Temecula, CA
SDF1	ab9797	Rabbit pAb	IHC and IF	IHC;1:50, IF;1:25	Abcam, Cambridge, UK
CXCR4	sc-53534	Mouse mAb	IF and WB	IF;1:50, WB; 1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
CD74	555317	Rat mAb	IHC and IF	1:50	BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ
$\beta$ -Actin	sc-47778	Mouse mAb	WB	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

IHC, immunohistochemistry; IF, immunofluorescence; WB, western blotting; mAb, monoclonal antibody; pAb, polyclonal antibody.

## ＜不死化マウスボウマン嚢壁側上皮細胞株（mPEC）を用いた *in vitro* 実験＞

本研究における *in vitro* 実験には、不死化マウスボウマン嚢壁側上皮細胞（mPEC）を使用した[61]。この細胞の培養は、温度感受性に増殖期と分化期をコントロールすることが可能であり、growth permissive state（33°C、IFN- $\gamma$  50 単位/mL 培地）では増殖、growth restrictive state（37°C、IFN- $\gamma$  非存在下）では細胞が分化して *in vivo* の PEC に近い平坦な形態を示し、claudin-1 などの糸球体内での PEC 特異的マーカーの発現も増強する（図 7A-D）[61]。I 型コラーゲンでコートした 10 cm 培養皿上で培養し、分化段階 5-7 日目の mPEC を、recombinant mouse MIF（rMIF）または SDF1 $\alpha$ （rSDF1 $\alpha$ ）（100 ng/mL 培地; BioLegend, San Diego, CA, USA）で 24 時間刺激し、以下の実験を行った。

図 7. 不死化マウスボウマン嚢壁側上皮細胞 (mPEC) ([61] より引用、一部改変)



A. 不死化マウスボウマン嚢壁側上皮細胞 (mPEC) は、H-2Kb tsA58 トランスジェニックマウスの糸球体より単離された PEC から樹立された細胞株である。この細胞は SV40 large T-antigen を有し、温度感受性に増殖期と分化期をコントロールできる。B. MTT アッセイによる細胞増殖の評価。増殖期 (growth permissive state, GP; 33°C、IFN-γ 50 単位/mL 培地) では細胞数が増加するが、分化期 (growth restrictive state, GR; 37°C、IFN-γ 非存在下) では細胞は増殖せず分化する。C. 分化期に入ると、細胞体は徐々に大きくなり *in vivo* の PEC に類似した平坦な多角形を呈する。D. 増殖期には発現が乏しい PEC 特異的のマーカークlaudins-1 は、分化期に入ると発現が増強する。

## [RNA 抽出およびリアルタイム PCR]

培養した mPEC から ISOGEN (Wako) を用いて RNA を回収した。得られた RNA の純度および濃度は NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いて測定した。得られた RNA と ThermoScript™ RT-PCR system (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) を反応させ逆転写し、c-DNA を作成した。作成した c-DNA、特異的プライマーおよび KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan) を、ABI 7300 real-time PCR system (Life Technologies) を用いて反応、発光させ測定し、定量的 PCR を行った。全てのデータは GAPDH の発現量を用いて補正を行い、 $\Delta\Delta CT$  法にて相対的発現量を算出した。定量的 PCR に使用したプライマーを表 2 に示す。

表 2 定量的 PCR に使用したプライマー

Gene		Sequence
CD44	Forward	5'-TCCGAATTAGCTGGACACTC-3'
	Reverse	5'-CCACACCTTCTCCTACTATTGAC-3'
CXCR4	Forward	5'-AGCATGACGGACAAGTACC-3'
	Reverse	5'-GATGATATGGACAGCCTTACAC-3'
MIF	Forward	5'-CCCAGAACCGCAACTACAG-3'
	Reverse	5'-GCAGCGTTCATGTCGTAATAGT-3'
SDF1	Forward	5'-GTGCCCTTCAGATTGTTGC-3'
	Reverse	5'-CTCTGCGCCCCTTGTTTA-3'
GAPDH	Forward	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'
	Reverse	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'

### [ウェスタンブロッティング]

培養した mPEC を回収し、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) バッファーおよびプロテアーゼ阻害薬 (ロイペプチン、アプロニン、PMSF) を用いてタンパクを抽出した。タンパク濃度は DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定、タンパク抽出液を 15  $\mu$ g ずつ、NuPAGE 4–12% Bis-Tris Protein Gels (Invitrogen) を用いて SDS-PAGE を行い、0.2  $\mu$ m PVDF 膜 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に転写した。4%スキムミルクまたは 1%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、PVDF 膜と表 1 に示した一次抗体を 4°Cで一晩反応させた。TBST-1 で洗浄後にホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応させた後、Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare) にて撮影した。検出した発光強度は ImageJ を用いて定量化し、 $\beta$ -actin を用いて相対的発現量を評価した。

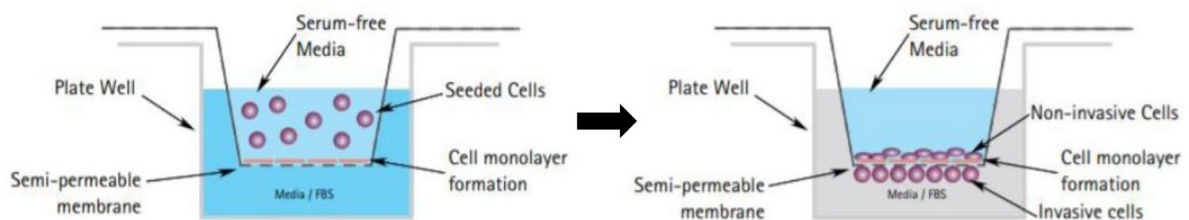
### [細胞蛍光免疫染色]

I型コラーゲンでコートしたカバースリップ上で分化培養した後、rMIF または rSDF1 $\alpha$  で 24 時間刺激した mPEC を、4%PFA で固定、50 mM グリシン/PBS でブロッキングした。細胞と一次抗体を 4°Cで一晩反応させた後、Alexa Fluor® 488 で標識した二次抗体 (Life Technologies) と反応させ、核染色には DAPI (Dojindo) を用いた。観察にはオリンパス共焦点蛍光顕微鏡 FLUOVIEW FV3000 を使用した。

## [遊走アッセイ]

Boyden chamber (6.5 mm Transwell with 8.0  $\mu\text{m}$  Pore Polycarbonate Membrane Insert, Corning, Lowell, MA, USA) を用いて遊走アッセイを行った (図 8)。チャンバー底のメンブレン底面側は、Mouse Collagen IV (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) を用いてコーティングした。rMIF または rSDF1 $\alpha$  で 12 時間刺激後の mPEC、および無刺激の mPEC (control 群) を chamber 上槽に播種 (5000 cells/chamber) し、37°C で 12 時間遊走させた。その後、メンブレンを 4%PFA で固定しクリスタルバイオレットで染色後、上槽面 (非遊走細胞) および底面 (遊走細胞) の総数をカウントし、非刺激細胞と刺激細胞で総数に有意差がないことを確認した。メンブレンの pore を通り抜け、底面側に移動した細胞のみを評価するため、メンブレン上槽側の遊走していない細胞は綿棒でふき取った後、底面側に存在する遊走した細胞を最低 5 視野カウントし、各群の平均を算出した。

図 8. Boyden chamber による遊走アッセイ



<https://www.sigmaldrich.com/japan/lifescience/techfocus/cancer/episode10.html> より引用



### [siRNA を用いた CD44 ノックダウン]

mPEC の small interfering RNA (siRNA) による CD44 ノックダウンには、Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen) を使用した。分化段階 5-7 日目の mPEC を 12well 培養皿に 60-80% confluent になるよう播種し、トランスフェクション前には培養液を RPMI から Opti-MEM I Reduced Serum Media (Life Technologies) に交換した。Opti-MEM 培養液で希釈した RNAiMAX 試薬と、Opti-MEM 培養液で希釈した siRNA を混合してインキュベート後、12 well 培養皿上の mPEC に投与し 37°C で 24-48 時間培養後、定量 PCR および遊走アッセイに用いた。CD44 siRNA の target sequence は CCUUACCCACCAUGGACCAAUGAA を使用した。

### <統計学的評価>

数値結果は平均±標準誤差で表記した。2 群間での比較は、両側 Student の  $t$  検定を使用し、 $p < 0.05$  を統計学的に有意と判定した。

## 【結果】

### *NEP25/LMB2* マウスにおける *PEC* の *CD44* の発現

LMB2 投与群のマウスでは control 群と比較し、1 糸球体あたりの p57 陽性細胞（ポドサイト）数は有意に経時的に減少し、それに伴い蛋白尿は増加した（図 9A, B）。

ポドサイト数の減少と蛋白尿の増加に伴い、ボウマン嚢に CD44 陽性 PEC が確認できる糸球体数も有意に増加した（図 9C）。糸球体に明らかな病変を認めない

NEP25/LMB2 マウスの病初期では、CD44 陽性 PEC は扁平で、ボウマン嚢の局所に発現していたが（図 9D, day 4）、病変の進行に伴い、CD44 の発現はボウマン嚢全周に広がり、CD44 陽性 PEC の細胞形態の変化、増殖および係蹄壁への遊走が認められた（図 9D, day 8 および day 12）。CD44 と PEC マーカーである claudin-1 および PAX8 で二重染色し、増加する CD44 陽性細胞の大多数が PEC であることを確認した（図 9E）。

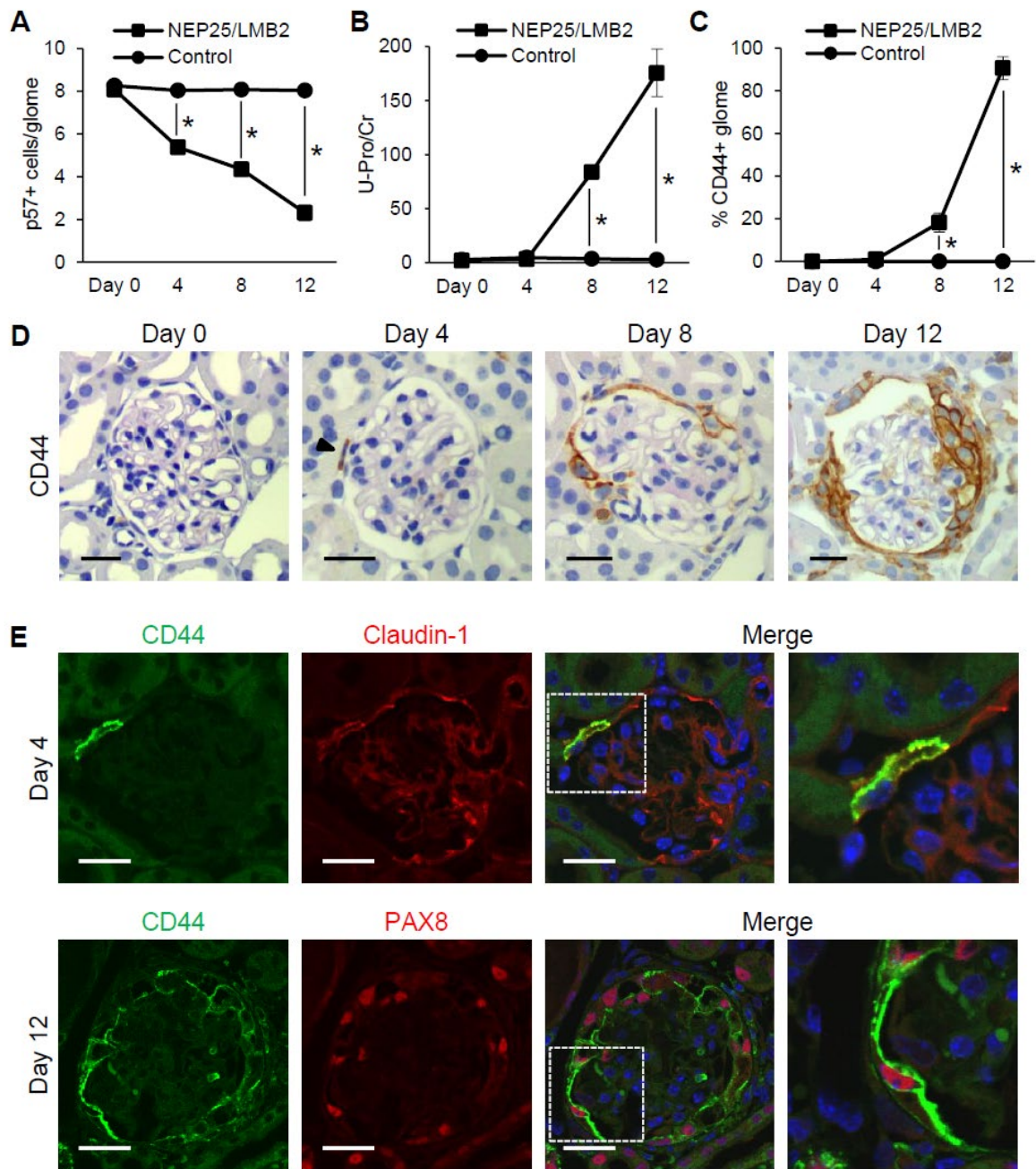


図9. NEP25/LMB2 マウスにおける PEC の CD44 の発現

A. NEP25 マウスの糸球体では、LMB2 投与群では control 群に比べ、1 糸球体あたりの p57 陽性細胞（ポドサイト）数の有意な経時的減少を認めた。ポドサイト数の減少に伴い、LMB2 投与群の尿蛋白-クレアチニン比は有意に増加し（B）、ボウマン嚢に CD44 が陽性となる糸球体の割合も有意に増加した（C）。 D. NEP25/LMB2 マウ

スの糸球体 CD44 免疫染色像の経時的変化 (PAS+ヘマトキシリン染色)。Day 4 では、CD44 陽性 PEC は扁平でボウマン囊の局所に発現していたが (矢頭)、病変の進行に伴い day 8 および day 12 では、CD44 の発現はボウマン囊全周に広がり、CD44 陽性 PEC の細胞形態の変化、増殖および係蹄壁への遊走が認められた。E. ボウマン囊の CD44 陽性細胞は PEC マーカーである claudin-1 や PAX8 と共局在を示した。

スケールバー: 20  $\mu\text{m}$  \*  $p < 0.05$

## 傷害ポドサイト近傍に位置する PEC に CD44 が発現する

ここで、PEC の CD44 発現をさらに詳細に検討するために、「CD44 PEC スコア」という独自のスコアリングを用い、CD44 の発現の広がりを分類評価した。図 10A に示すように、CD44 陽性 PEC がボウマン囊全周に占める割合によって、0%を S0、>0%かつ<50%を S1、 $\geq 50\%$ を S2 とした。このスコアを用いて糸球体を分類し、NEP25/LMB2 マウス糸球体の病変進行に伴う「CD44 PEC スコア」の推移を観察したところ、病変の進行に伴いハイスコアの糸球体が増加した (図 10B)。また、p57 と CD44 の二重染色と「CD44 PEC スコア」を組み合わせることで、個々の糸球体レベルでのポドサイト数の減少と CD44 陽性 PEC の広がりとの関係性を評価したところ (図 10C)、糸球体あたりの p57 陽性ポドサイト数は「CD44 PEC スコア」と負の相関を示した (図 10D)。さらに、傷害ポドサイトと CD44 発現初期段階の PEC との位置関係を明らかにするために、S1 陽性糸球体と p57 の二重染色を評価したところ、S1 糸球体の 67.5%において、ポドサイトが失われた糸球体基底膜の対岸近傍の PEC に CD44 が局所的に発現していることを確認した (図 10E)。

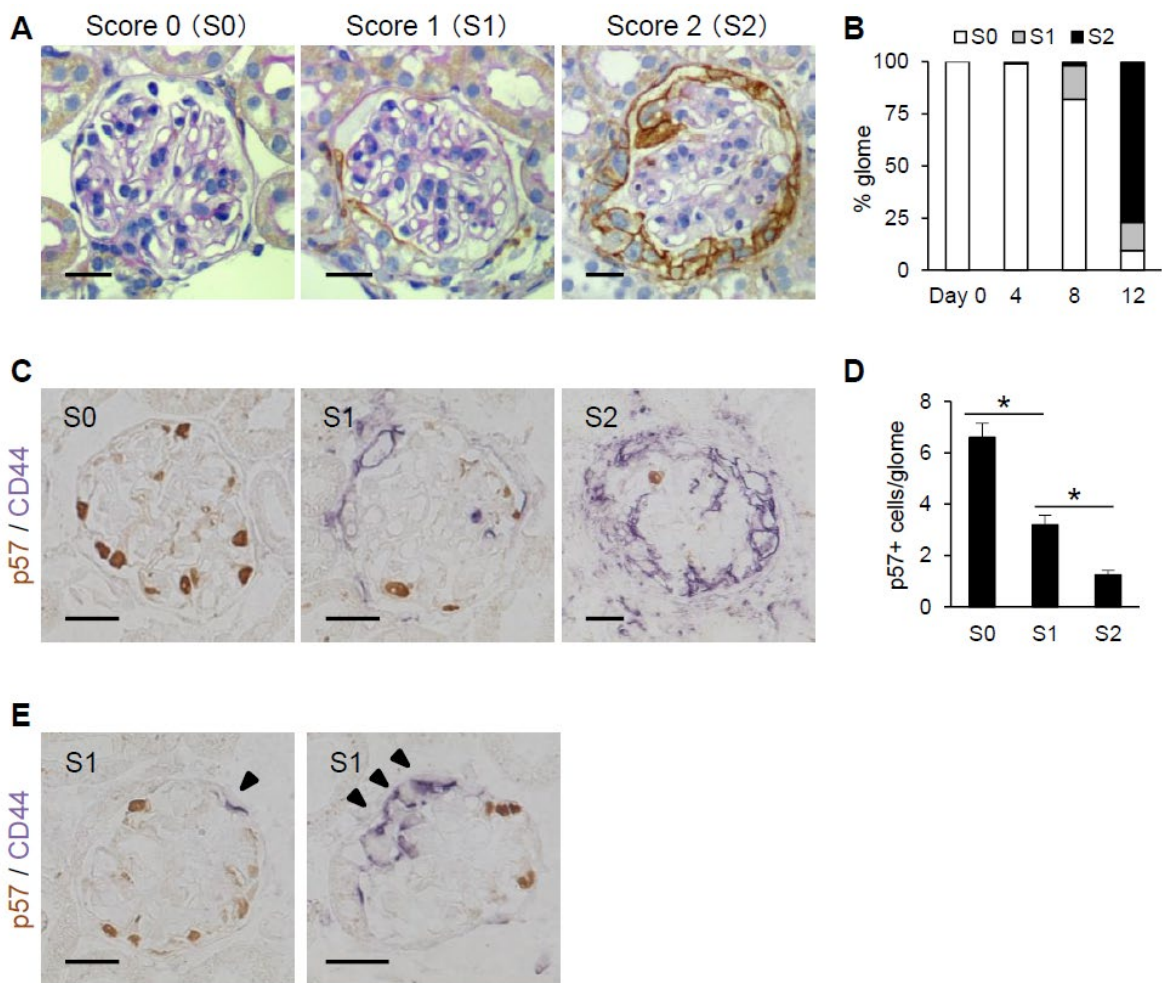


図 10. NEP25/LMB2 マウスにおける PEC の CD44 *de novo* 発現は傷害されたポドサイト近傍で始まる

A. 「CD44 PEC スコア」ごとの代表的な CD44 免疫染色糸球体像 (PAS+ヘマトキシリン染色)。 B. Day 8 から day 12 の間に、「CD44 PEC スコア」が高い糸球体の糸球体全体に占める割合が急速に増加した。 C. 「CD44 PEC スコア」ごとの代表的な p57 (茶) と CD44 (紫) の二重免疫染色糸球体像。 D. 「CD44 PEC スコア」の増加に伴い、1 糸球体あたりの p57 陽性細胞 (ポドサイト) 数は負の相関を示した。 E. S1 糸球体の 67.5%の糸球体で、p57 陽性細胞が消失している糸球体係蹄の対面近傍に位置する PEC に CD44 が局所的に発現した (矢頭)。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$  \*  $p < 0.05$

## ***MIF と SDF1 の発現はポドサイトから活性化PECに移行する***

NEP25/LMB2 マウスでは、ポドサイト傷害の進行に伴い、ポドサイトにおける MIF の発現は、day 8 まで有意に増加し、day 12 ではポドサイトの減少により低下するが、MIF 陽性 PEC は day 12 まで持続的に増加し続けることを確認した (図 11A, B)。MIF の発現局在は、病初期には Nestin 陽性細胞、すなわちポドサイトにあったが、ポドサイト傷害の進行に伴い、CD44 陽性 PEC も含めた PEC へ移行した (図 11A, C, E)。

一方、SDF1 の糸球体での発現は病初期に亢進し (図 12A, B)、その局在は主にポドサイトにあった (図 12D)。MIF と同様、SDF1 の発現もポドサイト傷害の進行に伴い、CD44 陽性 PEC も含めた PEC へ移行した (図 12A, C, E)。

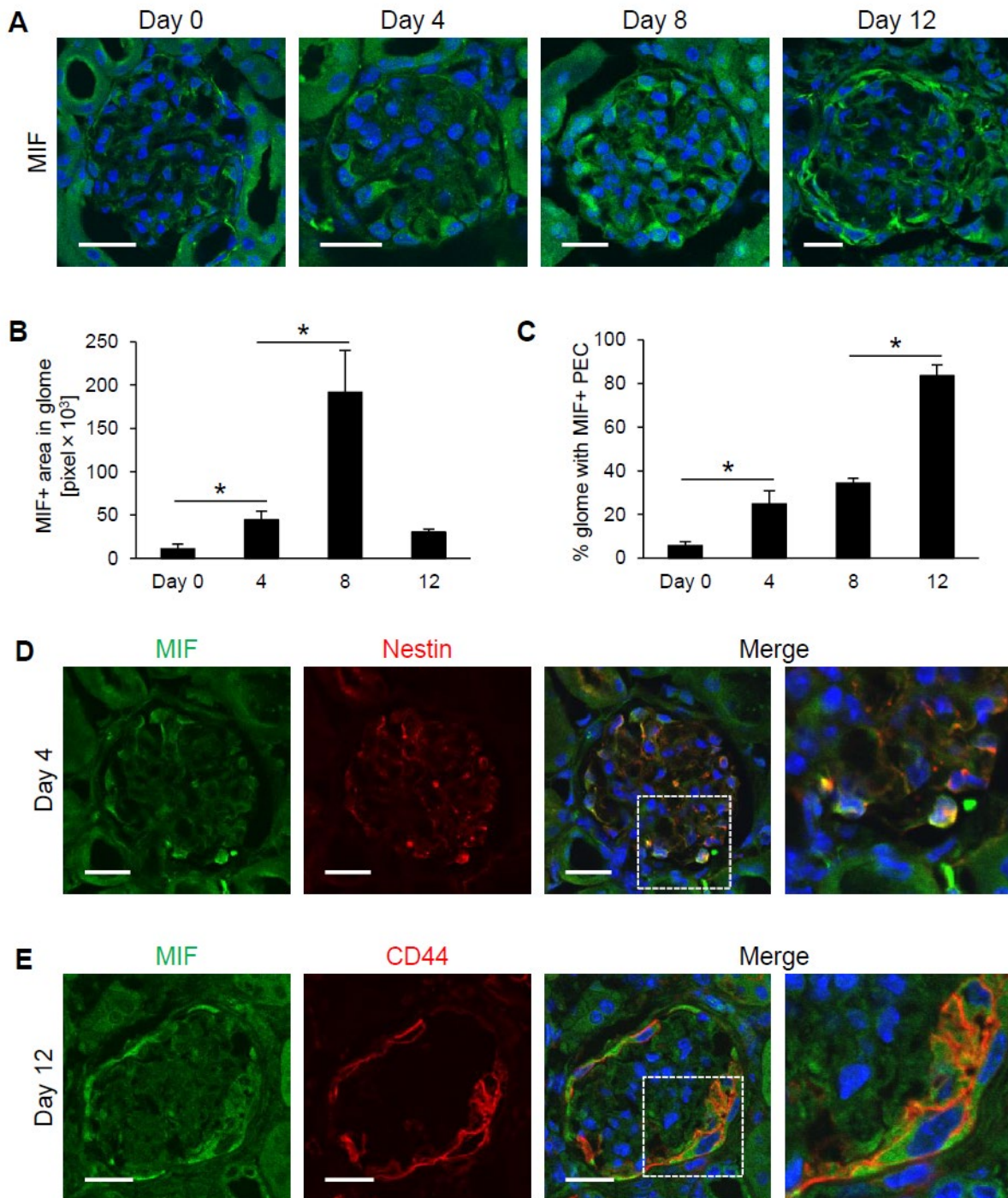


図 11. FSGS 進展に伴い MIF の発現は傷害ポドサイトから CD44 陽性 PEC へ移行する

A. NEP25/LMB2 マウスの糸球体 MIF 免疫蛍光染色像の経時的変化。MIF の発現局在は、day 0、day 4 で主に糸球体内にあるが、day 8、day 12 で次第にボウマン嚢へ



と移行した。B. ボウマン嚢を除いた糸球体内の MIF 陽性領域は、day 0 と比較し day 4、day 8 で有意に増加した。C. MIF 陽性 PEC を有する糸球体の糸球体全体に占める割合は、NEP25/LMB2 マウスの病変進行とともに有意に増加した。MIF の発現局在は、day 4 では nestin 陽性細胞（ポドサイト）にあり（D）、day 12 には CD44 陽性 PEC に移行した（E）。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$  \*  $p < 0.05$

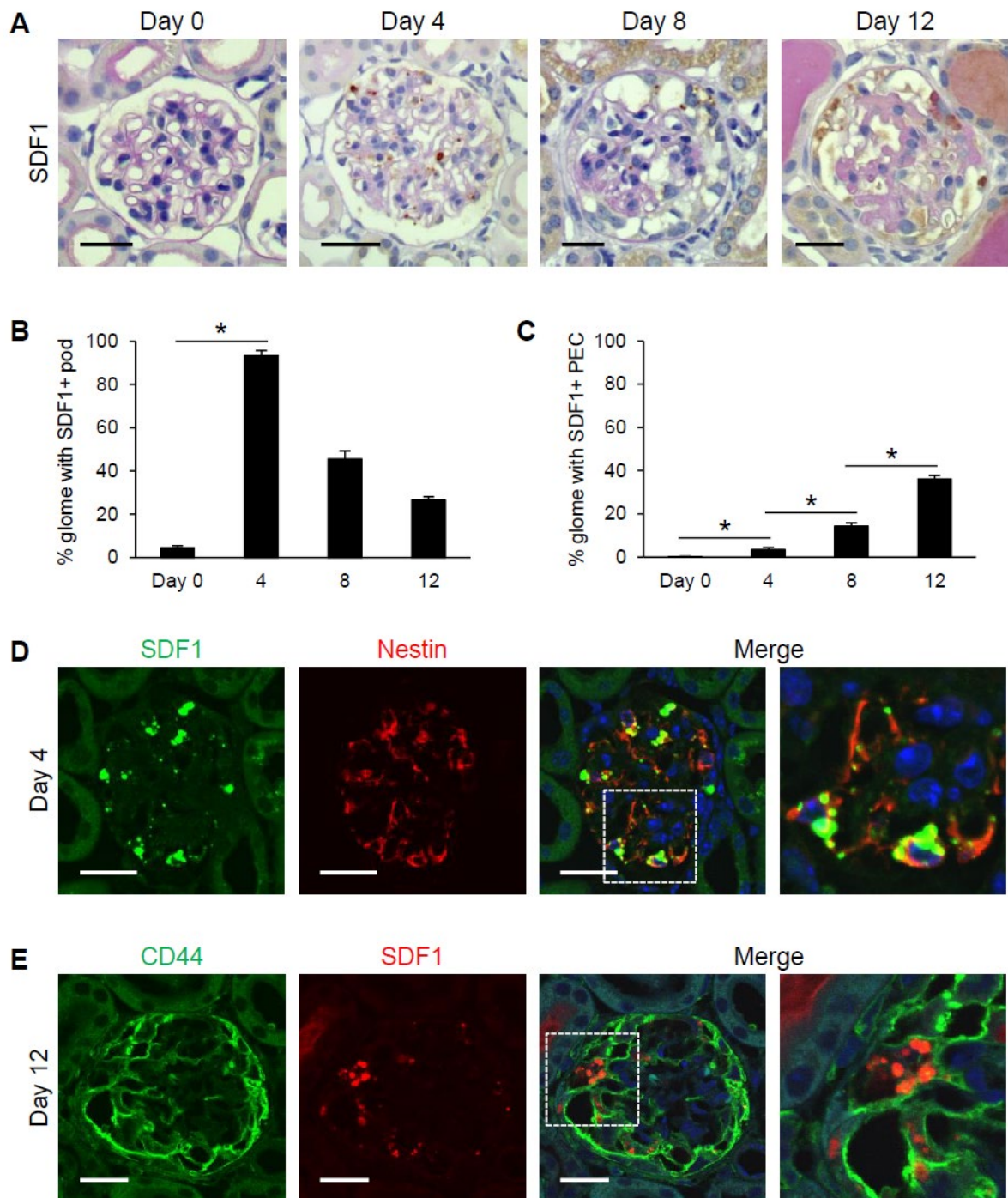


図 12. FSGS 進展に伴い SDF1 の発現は傷害ポドサイトから CD44 陽性 PEC へ移行する

A. NEP25/LMB2 マウスの糸球体 SDF1 免疫染色像の経時的変化 (PAS+ヘマトキシリン染色)。Day 0 では SDF1 は糸球体内に発現がほとんど認められなかったが、day 4

になると糸球体内での発現が増加し、day 8、day 12 で次第にボウマン嚢へと移行した。B. SDF1 陽性ポドサイトを有する糸球体の糸球体全体に占める割合は、day 0 に比較し day 4 で有意に増加した。C. SDF1 陽性 PEC を有する糸球体の糸球体全体に占める割合は、NEP25/LMB2 マウスの病変進行とともに有意に増加した。SDF1 の発現局在は、day 4 では nestin 陽性細胞（ポドサイト）にあり（D）、day 12 には CD44 陽性 PEC に移行した（E）。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$  \*  $p < 0.05$

## 活性化PECにおいてCXCR4とCD44は共局在する

CXCR4はMIFとSDF1の共通受容体であることから、NEP25/LMB2マウスにおける発現を評価したところ、正常でCXCR4は主にポドサイトに発現していたが、病変の進行に伴ってCD44陽性PECに強く発現した(図13A-C)。

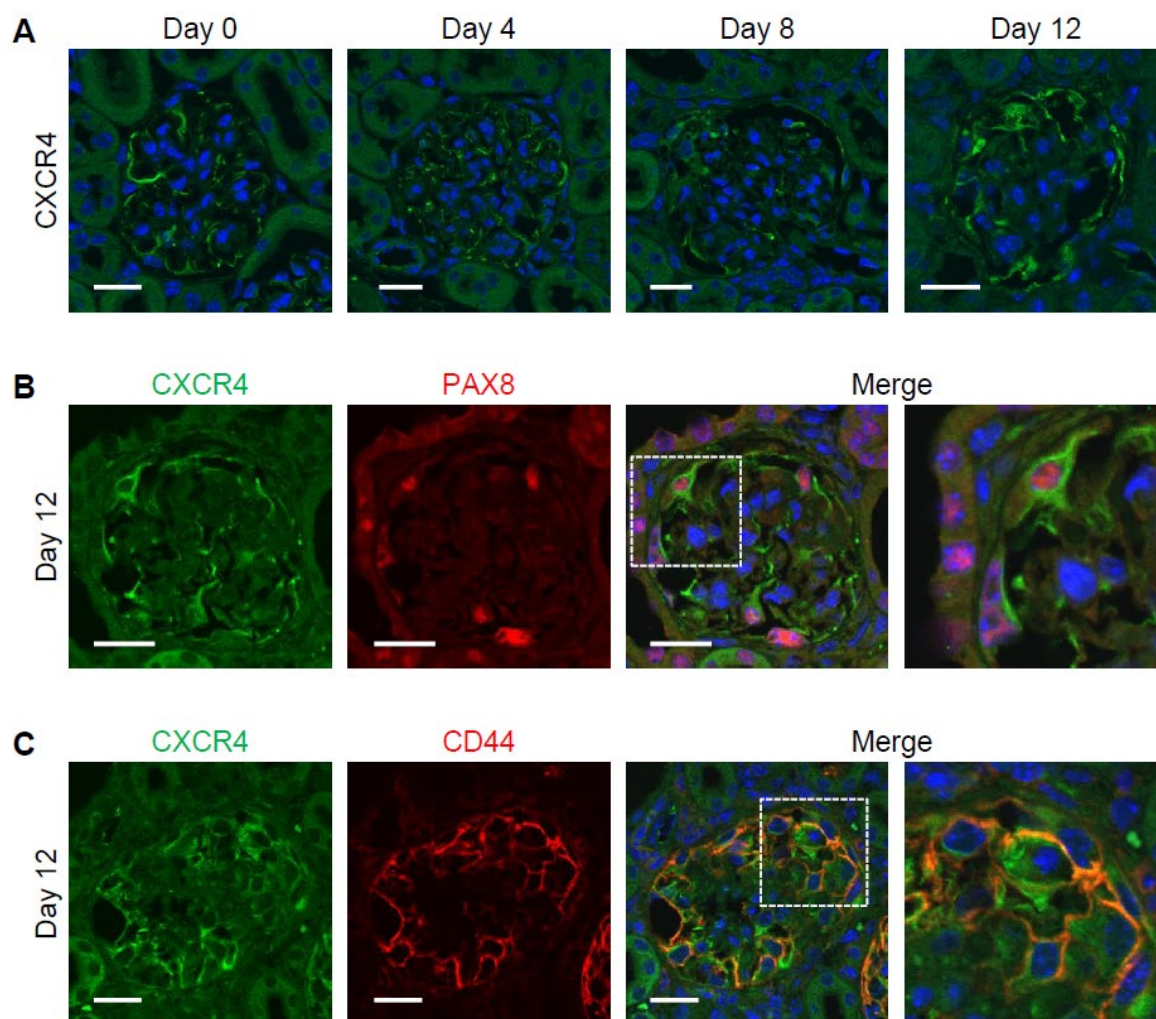


図13. CXCR4はCD44陽性PECで発現が亢進する

A. NEP25/LMB2マウスの糸球体CXCR4免疫蛍光染色像の経時的変化。CXCR4の発現局在は、day 0、day 4では主にポドサイトにある。B, C. Day 12では、CXCR4はPAX8(B)ならびにCD44(C)陽性のPECに強い発現を認めた。スケールバー: 20  $\mu$ m

## CD74 陽性細胞はボウマン嚢周囲に増加する

CD44 には MIF-CD74 シグナルの coreceptor としての機能も報告されていることから[62]、NEP25/LMB2 マウスにおける CD74 と CD44 との関連性の有無についても評価した。NEP25/LMB2 マウスでは、病変の進行とともに CD74 陽性細胞は糸球体のボウマン嚢周囲に増加し (図 14A)、それらの一部は CD44 も共発現していたが、その局在は活性化 PEC とは異なる細胞集団であった (図 14B)。

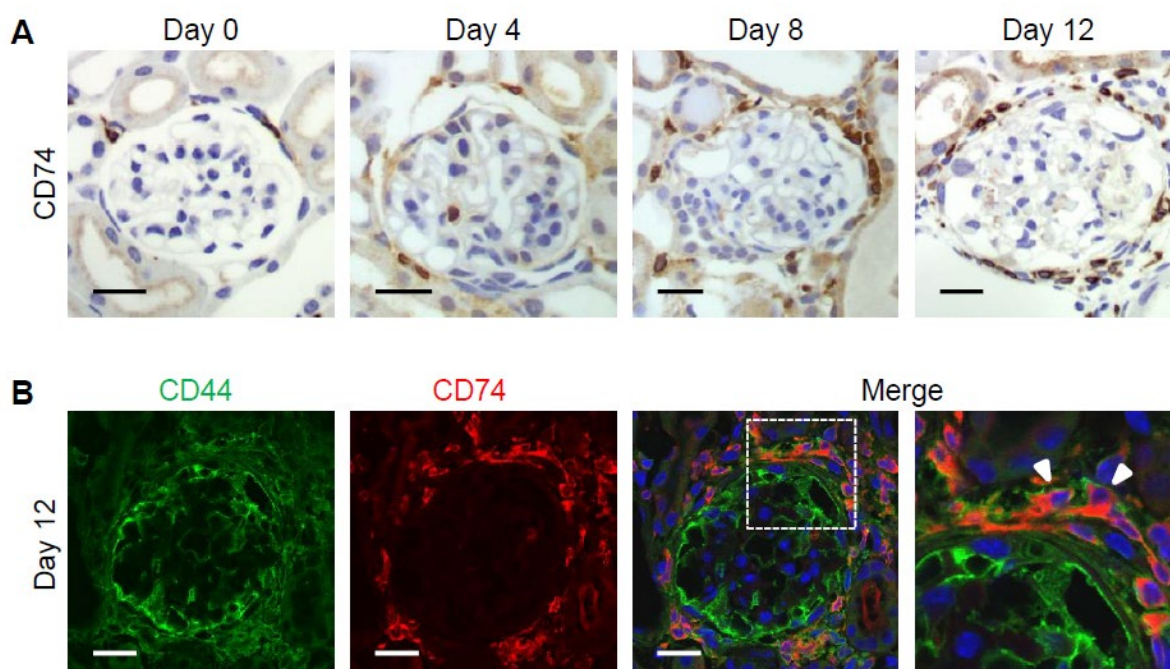


図 14. CD74 陽性細胞は FSGS の進行に伴いボウマン嚢周囲に増加する

A. NEP25/LMB2 マウスの糸球体の CD74 免疫染色像の経時的変化 (ヘマトキシリン染色)。病変の進行とともに CD74 陽性細胞がボウマン嚢周囲に増加した。B. CD74 と CD44 の二重免疫染色では、 day 12 の糸球体内に CD44 のみ発現しており CD74 の発現は認められなかった。ボウマン嚢周囲に増加する CD74 陽性細胞の一部が CD44 を発現した (矢頭)。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$

### ***MIF* と *SDF1* は *PEC* に *CD44* と *CXCR4* を誘導する**

不死化マウスボウマン嚢壁側上皮細胞 (mPEC) を用いた培養実験を行い、MIF や SDF1 が PEC に CD44 や CXCR4 の発現を誘導するか否かを評価した。recombinant mouse MIF (rMIF) または SDF1 $\alpha$  (rSDF1 $\alpha$ ) で 24 時間刺激した mPEC では、非刺激 mPEC と比較し、CD44 および CXCR4 の mRNA およびタンパクの発現が有意に亢進することを、定量 PCR、ウェスタンブロッティング、細胞免疫染色で確認した (図 15A-F)。

### ***MIF* と *SDF1* は *PEC* に *MIF* や *SDF1* を誘導する**

NEP25/LMB2 マウスの糸球体では、MIF および SDF1 の発現局在がポドサイトから活性化 PEC へ移行したことから、MIF や SDF1 が PEC に MIF や SDF1 の発現を誘導するか否かを定量 PCR で評価した。rMIF で刺激した mPEC では MIF と SDF1 両者の発現が亢進し、rSDF1 $\alpha$  で刺激した mPEC では SDF1 の発現が亢進した (図 15G, H)。

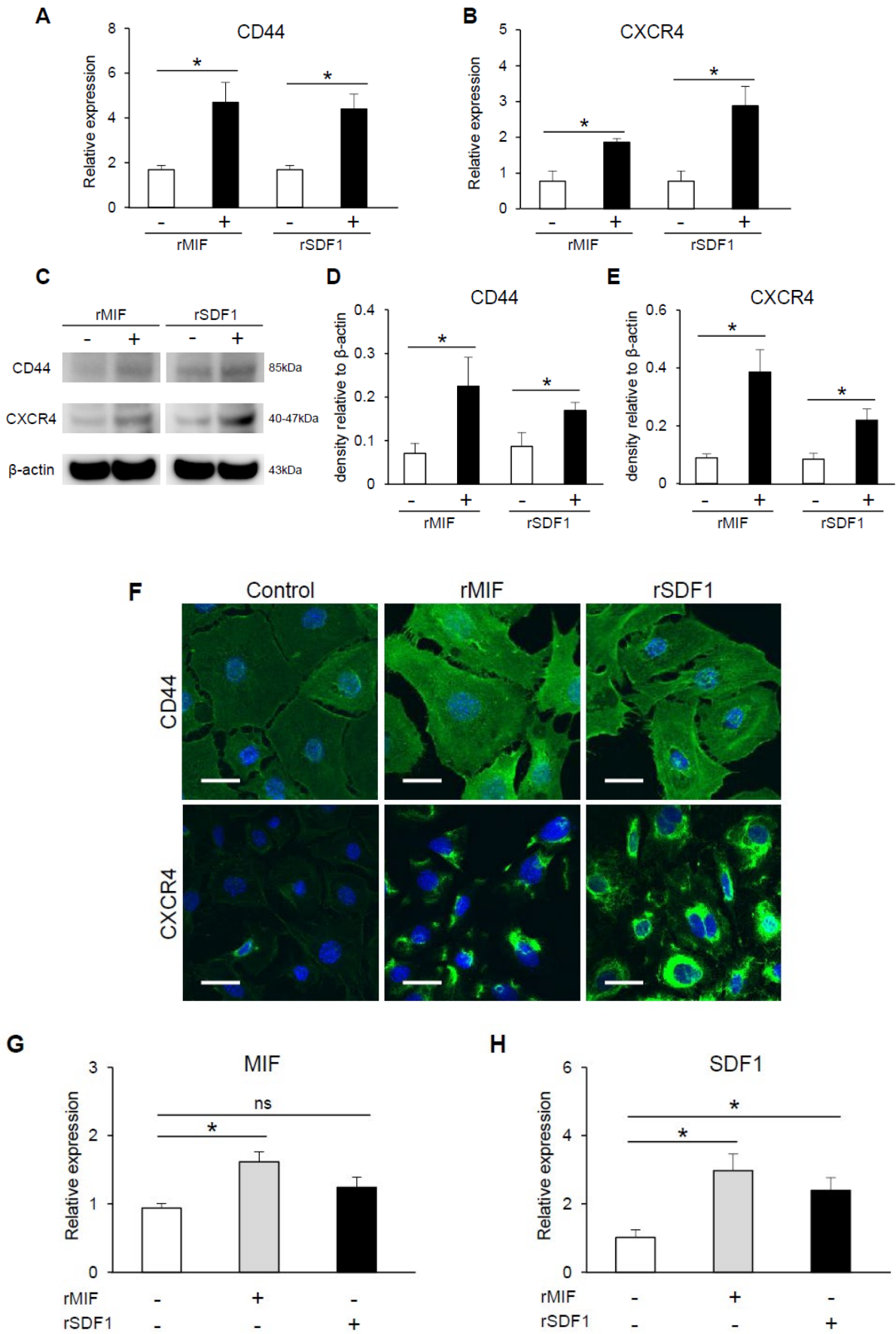


図 15. MIF と SDF1 は PEC に CD44 と CXCR4 を誘導し、MIF および SDF1 の発現も亢進させる

A, B. rMIF または rSDF1 $\alpha$  で 24 時間刺激後の mPEC では、CD44 と CXCR4 の mRNA 発現がそれぞれ有意に亢進した。C-E. rMIF または rSDF1 $\alpha$  で 24 時間刺激後の mPEC では、ウェスタンブロッティングによって、タンパクレベルでもそれぞれ CD44 と CXCR4 の発現は有意に亢進した。F. rMIF または rSDF1 $\alpha$  で 24 時間刺激後の mPEC の細胞免疫染色でも、それぞれ CD44 と CXCR4 の発現亢進を確認した。スケールバー: 20  $\mu$ m G. rMIF による mPEC の 24 時間刺激では、MIF の mRNA 発現が有意に亢進したが、rSDF1 $\alpha$  による刺激では亢進しなかった。H. rMIF および rSDF1 $\alpha$  による mPEC の 24 時間刺激によって、SDF1 の mRNA 発現が有意に亢進した。\*  $p < 0.05$



## MIF と SDF1 は CD44 を介した PEC の遊走を促進する

MIF および SDF1 で誘導された CD44 が PEC の遊走に関与しているか否かを明らかにするために、Boyden chamber を用いた遊走アッセイを行った。まず CD44 siRNA 投与により mPEC の CD44 mRNA の発現が十分に抑制されたことを確認した (図 16A)。遊走アッセイでは、非刺激 mPEC と比較し、rMIF または rSDF1 $\alpha$  で刺激した mPEC では遊走能が有意に亢進した。次に、CD44 が PEC の遊走を制御しているか否かを明らかにするために siRNA を用いて mPEC の CD44 をノックダウンしたところ、rMIF または rSDF1 $\alpha$  の刺激により亢進した遊走能は、いずれも抑制された (図 16B)。

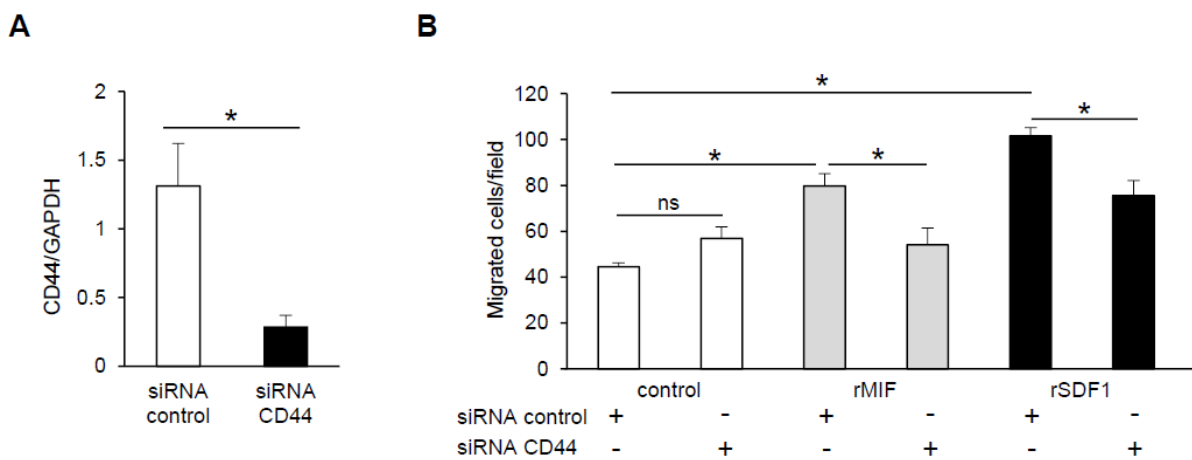


図 16. MIF や SDF1 は CD44 を介して PEC の遊走を促進する

A. siRNA を用いた CD44 ノックダウンにより、mPEC の CD44 mRNA の発現は有意に低下した。B. 遊走アッセイによる評価では、rMIF または rSDF1 $\alpha$  による刺激により mPEC の遊走能は亢進し、siRNA による CD44 ノックダウンによりその遊走能はいずれも低下した。\*  $p < 0.05$

## **NEP25/LMB2 マウスに対する MIF 阻害薬および SDF1 阻害薬の効果**

活性化 PEC の遊走に対する MIF 阻害薬および SDF1 阻害薬の効果を確認するために、MIF アンタゴニストである ISO-1 と SDF1-CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 をそれぞれ NEP25/LMB2 マウスに投与したが、蛋白尿、ポドサイト数や PEC の CD44 発現に対する明らかな有効性を確認できず (図 17A-F)、形態学的にも差を認めなかった。

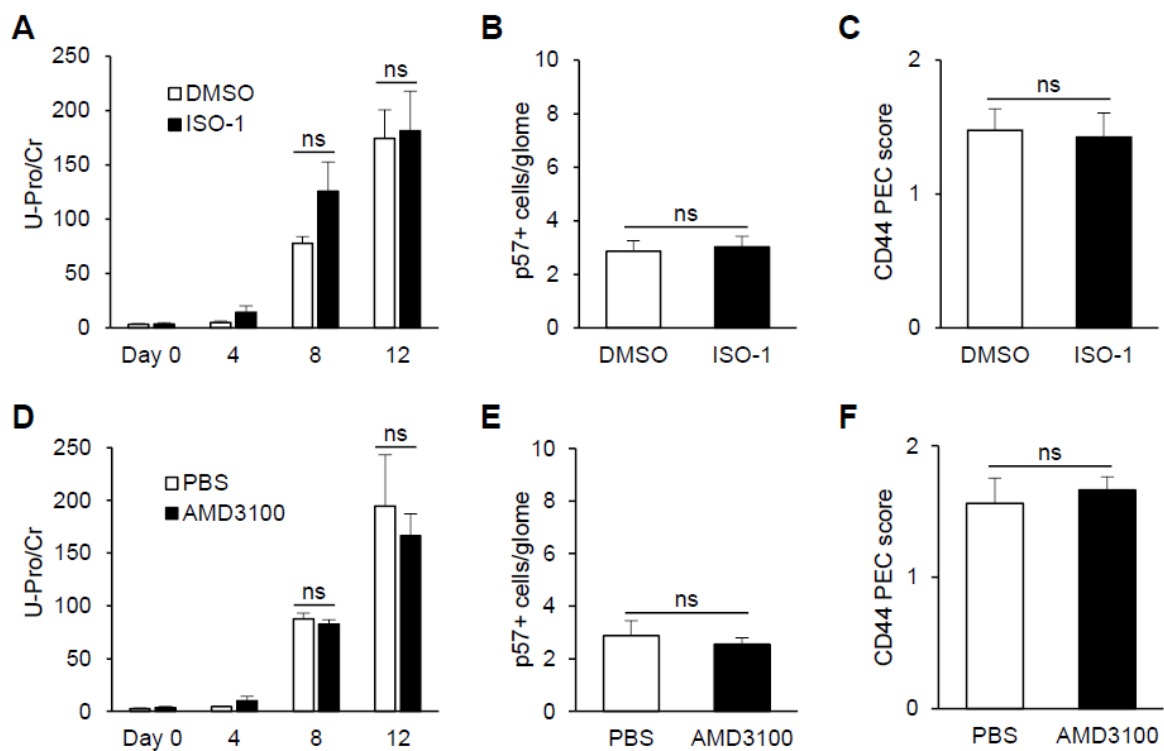


図 17. MIF 阻害薬 (ISO-1) および SDF1-CXCR4 阻害薬 (AMD3100) は

NEP25/LMB2 マウスの CD44 発現に効果を示さない

NEP25/LMB2 マウスにおいて、MIF 阻害薬 (ISO-1) (A-C) および SDF-CXCR4 阻害薬 (AMD3100) (D-F) による、尿蛋白-クレアチン比(A, D)、day 12 における p57 陽性 (ポドサイト) 数(B, E)、day 12 における CD44 PEC スコア(C, F)への有意な作用は認められなかった。

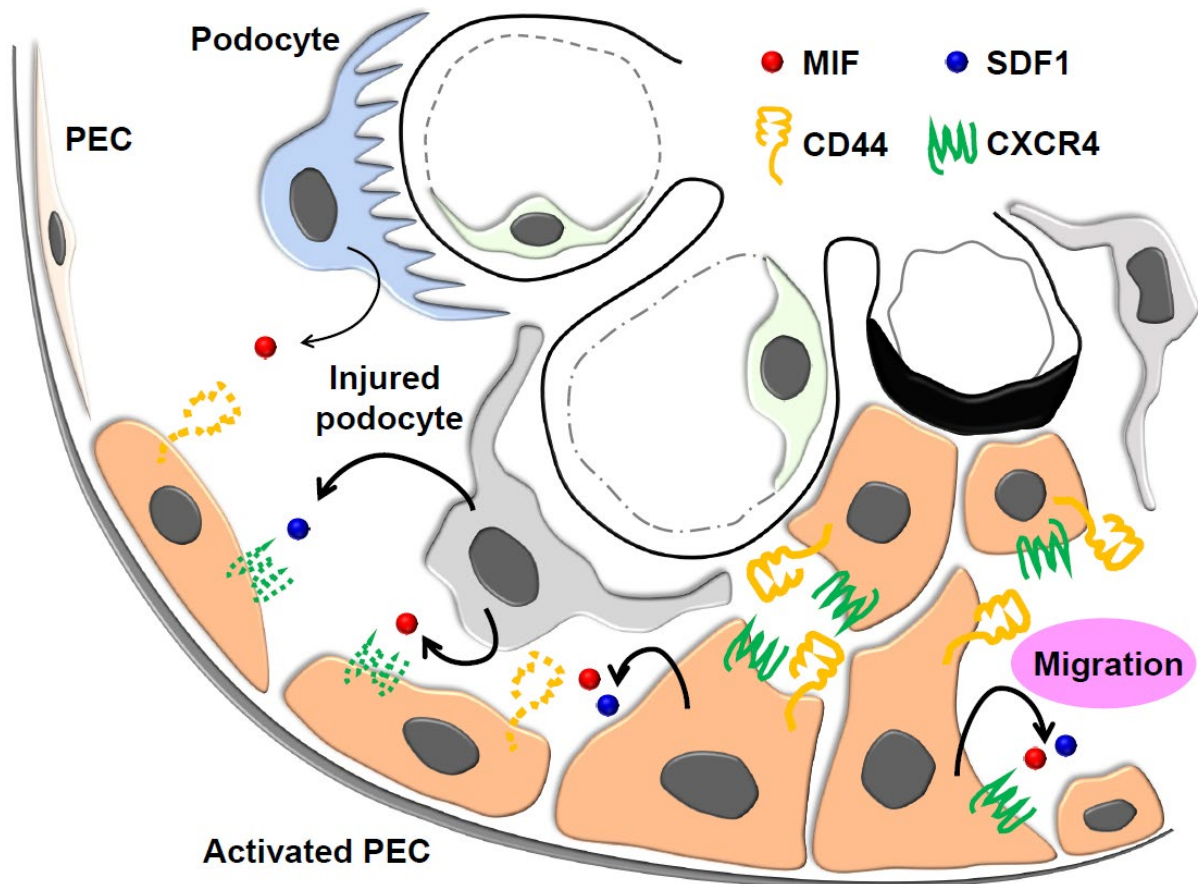


図 18. ポドサイト傷害における活性化 PEC の遊走メカニズム

傷害ポドサイトが発現する MIF および SDF1 が、対岸ボウマン囊の PEC に CD44 および CXCR4 を誘導する。PEC は形態を変化させ、傷害ポドサイトに向かって遊走し、増殖や基質産生を行う。ポドサイトが剥離した後も、活性化 PEC は自ら MIF および SDF1 を発現し遊走能を維持する。

## 【考察】

本研究における最大の関心は、ポドサイト傷害の結果、その近傍局所で始まる PEC の活性化が、傷害ポドサイトー活性化 PEC の細胞間に存在するクロストークシグナルによって誘導されているか否かである。本研究は、活性化 PEC の特徴である傷害ポドサイトに向かって遊走するという現象が、MIF や SDF1 というケモカインと CD44 および CXCR4 を介した細胞間シグナルによって誘導されている可能性を示した。

### **ポドサイト傷害により局所の PEC に誘導される CD44**

複数の既報告と同様に、NEP25/LMB2 マウスでも、ポドサイト傷害の進行に伴い CD44 陽性 PEC 数は増加した。PEC は正常では扁平な形態であるが、活性化すると腫大して立方体を呈する[26, 33]。NEP25/LMB2 マウスの病初期、つまりポドサイト傷害の初期段階では、外見上変化のない糸球体係蹄の対岸ボウマン嚢に位置する、まだ形態変化に乏しい扁平な PEC に CD44 の発現が確認された。そしてそれらの PEC の局在は、p57 との二重免疫染色によって、ポドサイトの傷害・剥離が始まる糸球体係蹄の対岸近傍であることが確認できた。これらの所見は、傷害ポドサイトから PEC へ伝わる何らかの液性因子を介したシグナルによって、活性化 PEC に CD44 の発現が誘導されている可能性を示唆するものである。そして本研究では、NEP25/LMB2 マウスを用いた *in vivo* 実験と mPEC を用いた *in vitro* 実験によって、これらの液性因子の一部が、MIF や SDF1 であることを明らかにした。

## ***MIF、SDF1* の二相性発現**

本研究の成果のもう一つの重要な点として、NEP25/LMB2 マウスの免疫二重染色によって、ポドサイト傷害の進行とともに MIF や SDF1 の発現局在がポドサイトから CD44 陽性 PEC へと移行することを初めて明らかにした。このポドサイトから PEC への MIF と SDF1 の時間的空間的な二相性の発現変化は、mPEC を用いた *in vitro* 実験で、MIF や SDF1 で刺激した mPEC 自体が MIF や SDF1 の発現を亢進させたことを示すことによって、ポドサイト由来の MIF や SDF1 が PEC へ移行した訳ではなく、PEC が MIF や SDF1 を内因性に発現したことを証明した。しかし Romoli S らは、ポドサイト傷害モデルであるアドリアマイシン腎症マウスを用いた検討で、正常糸球体ではポドサイトが発現する SDF1 によって PEC がボウマン嚢にとどまっておらず、ポドサイトが傷害されポドサイトから供給される SDF1 が減少することによって PEC が遊走すると報告している[63]。本研究の *in vivo* 実験の結果と乖離する理由は明らかではないが、NEP25/LMB2 マウスはポドサイト傷害が急速かつ激烈に進行するモデルである一方で、アドリアマイシン腎症のポドサイト傷害は比較的緩徐な進行であることから、ポドサイト傷害の性質や強度によってこれらのケモカインの発現の仕方に違いが生まれる可能性が考えられる。

## ***二相性発現による PEC の持続的な遊走***

前述のとおり、ポドサイトは終末分化細胞であり、傷害を受けて尿中に剥離しても自己増殖による濾過障壁の修復ができない[9]。したがって、ポドサイト傷害によっ

て起こる活性化 PEC の遊走は、傷害を受けた濾過障壁修復を試みようとする過程であることが推測される。傷害ポドサイト由来の MIF や SDF1 によって活性化 PEC の遊走が促進されるが、ポドサイトが尿中に剥離した後も、傷害を受けた濾過障壁に向かって持続的に活性化 PEC が遊走し続ける必要があり、MIF や SDF1 のポドサイトから PEC への二相性発現によって、PEC の持続的な遊走が維持されていると考えられる。ポドサイトと PEC は、腎発生段階や一部の FSGS の進展過程で、共通する表現型を呈することがある[64, 65]。例えば Notch1 は、腎発生段階でポドサイトと PEC の前駆細胞に一時的に発現するが[51]、FSGS の進展過程においても傷害ポドサイトと活性化 PEC に共通にして再度発現し、PEC の遊走を促進する機能を持つことを当研究室は報告している[30]。したがって、ポドサイトと PEC はお互いに共鳴し、時に共通の性質を有し助け合いながら、濾過障壁修復を試みようとしていると考えられる。

#### ***NEP25/LMB2* マウスにおける *CD74***

MIF-CD74 シグナルは細胞増殖や生存に関わるシグナルであり、CD44 は CD74 の coreceptor としての機能を持つ[62]。山崎らは、アドリアマイシン腎症マウスにリポポリサッカライドを投与して糸球体傷害を増強させたマウスでは、CD74 が CD44 陽性 PEC に共発現したと報告しており[34]、NEP25/LMB2 マウスの糸球体内でも CD74 の関与を検討したが、糸球体内には CD74 の発現を確認できなかった。しかしボウマン嚢周囲に増加した CD74 陽性細胞の一部は CD44 も共発現しており、その

機能やボウマン嚢周囲に増加する意義は興味深い。

### **CD44 を介した活性化 PEC の遊走メカニズム**

mPEC を用いた *in vitro* 実験では、MIF や SDF1 が PEC に CD44 と CXCR4 を誘導し、遊走能を亢進させ、その遊走能は CD44 阻害により低下した。さらに MIF や SDF1 で刺激された mPEC は、自らも MIF や SDF1 の発現を亢進させた。これらの結果と *in vivo* 実験の結果から、私は以下の 2 つのステップによって、ポドサイト傷害時の PEC の遊走が誘導・維持されると推察している (図 18) - 1) ポドサイト傷害が起こると、ポドサイトは MIF や SDF1 の発現を亢進させ、それらは液性因子として対岸近傍の PEC に作用し、CD44 と CXCR4 の発現を誘導、遊走を促進する、2) ポドサイト傷害が進行しポドサイトが剥離した後は、PEC が自ら MIF や SDF1 を発現することによって遊走を維持・増幅させる。そして、傷害された部分の濾過障壁に活性化 PEC の遊走が局所的に起こり、そこで活性化 PEC が細胞外基質を産生して濾過障壁の修復を試みることによって分節性の糸球体硬化が起こる。しかしこれらの過程は、糸球体硬化をもたらす様々なポドサイト-PEC クロストークシグナルの一部に過ぎないと考えられ、その他のシグナルを明らかにするべくさらなる探索が必要である。

### **NEP25/LMB2 マウスに対する MIF および SDF1 阻害**

*In vitro* 実験で得られた結果より、NEP25/LMB2 マウスに MIF 阻害薬および SDF1 阻害薬を投与し、活性化 PEC の遊走を抑制できるかどうかを評価したが、どちらの阻



害薬においても有効性を確認することはできなかった。既報告では、糖尿病性腎症モデルに SDF1 阻害薬を投与した検討で糸球体硬化やポドサイト喪失への有効性が示されており[49]、またループス腎炎モデルに MIF 阻害薬を投与した検討でも腎機能や糸球体病変の改善が認められている[56]。本研究で有効性が得られなかった理由として、用いた阻害薬の投与量は複数の既報告に基づき設定したものの、NEP25/LMB2 マウスは前述のとおり、ポドサイト傷害が急速かつ激烈に進行するモデルであることから、設定した投与量がポドサイトや PEC が産生する MIF や SDF1 を阻害するには十分な投与量ではなかった可能性がある。さらにこのモデル特有の代謝や体内動態によって、投与後に体内で失活していた可能性も否定できない。また、Notch1 の様な PEC の遊走を制御している MIF や SDF1 以外の他のシグナルによる影響の可能性も考えられる[30]。最後に、本研究では MIF と SDF1 が活性化 PEC の遊走に対して相補的に機能するか否かという点や、両ケモカインが経由する受容体について十分に検討できておらず、両者を同時に阻害しなければ有効性が得られなかった可能性もある。

### **本研究における課題と今後の展望**

本研究では、MIF や SDF1 が CD44 を介して活性化 PEC の遊走を促進している可能性を示すことができたが、受容体である CXCR4 の、活性化 PEC の遊走における役割や CD44 との関連性については検討できておらず、今後の検討課題である。また、MIF や SDF1 の傷害ポドサイトにおける発現のピークに時間差があることか

ら、この両者は PEC の遊走に関わる時相や機能が異なる可能性も考えられる。

さらに、CD44 ノックマウスにおける FSGS 病変を検討した既報告の結果からは、

CD44 は活性化 PEC の遊走のみならず増殖や基質産生にも関わっていることが推察

されるが、MIF や SDF1 にも増殖を促進する機能があることが知られており[41,

43]、この両者が CD44 を介した活性化 PEC の増殖や基質産生にも関わっているかど

うかについても検討してみたい。

## 【結語】

傷害ポドサイトに発現した MIF や SDF1 が、液性因子として対岸近傍の PEC に作用して CD44 と CXCR4 の発現を誘導し、傷害された濾過障壁に向かう、CD44 を介した活性化 PEC の遊走を促進していると考えられた。さらにポドサイトが剥離した後、PEC が内因性の MIF や SDF1 を発現し、自らの遊走を促進していると考えられた。このポドサイトと PEC における MIF と SDF1 の二相性発現が、傷害された濾過障壁の局所のリモデリングを促し、それが進展して糸球体硬化に陥ることが推測される。この新たな「ポドサイト-PEC クロストーク」のさらなる解明によって、FSGS の病態が明らかとなり、新たな治療法の開発につながる可能性がある。

## 【謝辞】

本論文は、私が筑波大学大学院人間総合科学学術院医学学位プログラム（旧人間総合科学研究科生命システム医学専攻博士課程）に在籍中の研究成果をまとめたものである。同プログラム腎・血管病理学分野教授の長田道夫先生には、指導教官として本研究実施の機会を与えていただきご指導いただいた。また、同プログラム実験病理学分野教授の加藤光保先生には学位審査委員主査として、診断病理学分野准教授の高屋敷典生先生、腎臓内科学分野准教授の臼井丈一先生、同分野講師の金子修三先生には副査として、本論文の細部にわたりご指導いただいた。東海大学医学部生体構造機能学教授の松阪泰二先生には NEP25 マウスの提供を、東京大学腎臓・内分泌内科の大瀬貴元先生および群馬大学腎臓・リウマチ内科の浜谷博子先生には不活化マウスボウマン嚢壁側上皮細胞株の提供をいただき、さらに本研究についての有益なご助言もいただいた。当研究室大学院生の引地ちひろ氏と坂本和雄先生には私とともに本研究に携わっていただき、当研究室秘書の岩崎江美氏には在学期間中に多くのご支援をいただいた。これら全ての方々に、この場を借りて心より感謝の意を表す。本研究の一部は、日本学術振興会の科学研究費助成事業による研究助成金（研究課題／領域番号：17K09685）を受けて遂行した。

## 【出典】

本学位論文では、Am J Physiol Renal Physiol. 2020 Mar 1;318(3):F741-F753. doi: 10.1152/ajprenal.00414.2019.に掲載された論文内容を、The American Journal of Physiology の規定に従って再利用している。