

氏名（本籍）	井藤 奈央子（山口県）			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第	9657	号	
学位授与年月	令和 2 年 8 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	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)			
主査	筑波大学教授	医学博士	加藤 光保	
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	高屋敷 典生	
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）	金子 修三	

## 論文の内容の要旨

井藤奈央子氏の博士学位論文は、巣状分節性糸球体硬化症におけるボウマン嚢壁側上皮細胞の遊走が、傷害ポドサイトと活性化された壁側上皮細胞で MIF と SDF1 が二相性に発現することによることを示したものである。その要旨は以下のとおりである。

### <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ている。著者は、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によって、活性化PECが遊走能を獲得するという「傷害ポドサイトー活性化PEC」に存在する細胞間シグナルに関する仮説を検証することを目的として実験研究を行っている。

### <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ている (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ている。

実験2. 不死化マウスボウマン囊壁側上皮細胞 (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ている。さらに同様に刺激したmPECでのMIFとSDF1の発現も定量PCRで評価している。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ている (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ている (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に位置していることを示している。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にピークを認めている。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へと移行したことを示している。CXCR4は、病変の進行とともにCD44陽性PECに発現することを示している。CD74は糸球体内には発現がなく、ボウマン囊周囲に増加した細胞に発現していることを示している。

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することを示している。さらに同刺激mPECでのMIFやSDF1の発現も増加することを示している。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ることを示している。

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ことを記載している。

### <考察>

著者は 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ることを示している。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を考えている。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している。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

井藤奈央子氏は、巣状分節性糸球体硬化症における糸球体硬化の進行機序として、ポドサイトの傷害に応じて、ボウマン囊壁側上皮細胞が傷害された係蹄に向かって遊走し、糸球体硬化を促進する過程を実験モデルを用いて解析し、MIF と SDF1 の2種類のサイトカインが、最初は傷害されたポドサイトで一過性に発現し、これに伴って活性化した壁側上皮細胞自身が MIF と SDF1 の産生を亢進するという二相性のサイトカイン産生によって壁側上皮細胞の遊走を促すことを示した点で、意義のある研究成果を報告している。

令和2年7月13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。