主論文の要旨

CD147/Basigin Deficiency Prevents the Development of Podocyte Injury through FAK Signaling

（CD147/ベイシジンの欠損によってFAKシグナルを介した
ポドサイト障害の進展が抑制される）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野
（指導：丸山 彰一　教授）
吉岡 知輝

【緒言】

尿蛋白は、糸球体の濾過障壁の破綻によって現れる所見であり、慢性腎臓病や心血管病の重要な進展要因である。糸球体を構成している糸球体上皮細胞（ポドサイト細胞）、血管内皮細胞や細胞外基質はサイトカインやケモカインなどを介して相互に協調し、糸球体内の恒常性を維持する。ポドサイト細胞から分泌される vascular endothelial growth factor（VEGF）は血管内皮細胞の維持に不可欠であり、また、細胞外基質はサイトカインなどの受け手として糸球体の構造維持に関与する。サイトカインや糸球体内の構成成分の変化・障害により糸球体の恒常性が維持できなくなった際、糸球体の係締壁・基底膜・ポドサイト細胞からなる微細な濾過障壁は病理学的に変化し、濾過障害、結果として尿蛋白を呈する。尿蛋白の発生を抑止している糸球体内の恒常性維持機構の解明は、腎臓疾患の新規治療法開発や増悪抑止のため、極めて有用と考えられる。

CD147/Basigin（Bsg）は、matrix metalloproteinase（MMP）を誘導する膜一回貫通型糖蛋白である。Bsg は血球、上皮細胞や内皮細胞など多様な細胞に発現し、癌細胞の転移・浸潤、精子形成、マラリア感染に対する免疫制御に関与する。腎臓領域では、腎虚血や線維化の進展過程においてサイトカイン産生を介し好中球やマクロファージの遊走を促進する一方で、ループス腎炎において、interleukin（IL）-17 を産生する T 細胞の分化・増殖の働きを抑止する事がこれまで明らかとなっている。加えて、尿蛋白を呈する急性腎障害や慢性腎疾患を有する患者において、血漿・尿中の Bsg 値が著明に増加する知見を本学の臨床研究において得ている。しかし、Bsg と尿蛋白発症・進展機序との関連は不明である。

本研究では、尿蛋白を呈する腎臓病患者の臨床検体と動物モデルを用いて、尿蛋白発症・進展における Bsg の役割について検証した。

【方法】

（1）名古屋大学医学部附属病院とその関連病院にて巣状糸球体硬化症（FSGS）と病理学的に診断された 95 症例の生検前臨床検体（血漿・尿・腎病理組織標本）を用い、血漿・尿中の Bsg 値を ELISA 法で測定、免疫染色により腎糸球体内 Bsg の局在を評価した。

（2）8−12 週齢の雄の野生型マウス（$Bsg^{+/+}$）と Bsg 欠損マウス（$Bsg^{-/-}$）にアドリアマイシン（ADR）を経静脈的に 1 回（16mg/kg・BW）投与し、ポドサイト障害による尿蛋白発症動物モデルを作成した。2 週間後に血液・尿・腎組織を採取し、病理組織学的・分子生物学的に比較検証した。

更に、血管内皮細胞障害に伴う動物モデルとして、片腎摘出後の 8−12 週齢の雄 $Bsg^{+/+}$ と $Bsg^{-/-}$ に飲水希釈（1mg/ml）した N（ω）-nitro-L-arginine methylester（L-NAME）を実験期間中毎日投与し、尿蛋白発症動物モデルを作成した。12 週間後に血液・尿・腎組織を採取し、検討をした。

（3）ヒト・ポドサイト細胞株を用い、尿蛋白を呈するポドサイト障害に関わる Bsg の

役割を検証した。

【結果】

（1）FSGS 症例における血漿・尿中の Bsg 値は、病理学的・臨床的に腎疾患を有さないコントロール群と比較して有意な高値を示した（Figure 1A, B）。血漿 Bsg 値と尿中 Bsg 値の間に有意な相関を認めた（Figure 1C）。血漿・尿中 Bsg 値ともに尿蛋白量と有意な相関を示す一方で、推算糸球体濾過量（eGFR）との相関は乏しかった（Figure 1D-G）。組織上の Bsg は、コントロール群の糸球体内で発現を示さなかったが、FSGS 症例では糸球体内の結節形成もしくはボウマン嚢との癒着部位に発現を認めた（Figure 1H）。連続切片にて β_1 integrin と Bsg 発現はボウマン嚢との癒着病変に含まれるポドサイト細胞に認められた（Figure 1I）。

（2）これまで従来法において、ポドサイトにおける Bsg 発現は確認することができなかった。本研究において初めて In situ hybridization 法とポドサイトの指標である WT-1 の免疫染色との二重染色法を用い、正常糸球体のポドサイトにおける Bsg mRNA の存在を確認した（Figure 2A）。更に、ADR 投与により誘導された障害ポドサイト細胞では、正常糸球体では見られなかった Bsg タンパクの発現を認めた（Figure 2B）。レーザーマイクロダイセクション法により糸球体のみを採取、real time（RT）-PCR を施行した。ADR 誘発ポドサイト障害を呈する尿蛋白マウスでは、非投与マウスに比して有意な Bsg mRNA 発現が増加していた（Figure 2C）。

ADR 投与 2 週間後、*Bsg*$^{-/-}$は *Bsg*$^{+/+}$に比して有意なアルブミン尿の抑制を認めた（Figure 2D）。加えて、*Bsg*$^{-/-}$はポドサイト細胞数の減少やその障害が有意に抑制されていた（Figure 2E-J）。ポドサイト障害発症に関与すると考えられる transforming growth factor（TGF）-βの糸球体内の発現は *Bsg*$^{+/+}$と *Bsg*$^{-/-}$の間に有意な差は認めなかったが、endothelin（ET）-1 発現は *Bsg*$^{+/+}$で有意な増加を示した（Figure 2K）。

血管内皮細胞障害を誘発する L-NAME の投与 12 週間後の動物モデルにおいて、ADR 誘発性ポドサイト障害を呈する動物モデルと同様に、*Bsg*$^{-/-}$は *Bsg*$^{+/+}$に比して有意なアルブミン尿の抑制を示した（Figure 3A）。*Bsg*$^{+/+}$と *Bsg*$^{-/-}$の両者に血管内皮障害は認められたが、*Bsg*$^{-/-}$はポドサイト障害が有意に抑制されていた（Figure 3B, C）。

（3）ヒト・ポドサイト細胞株において Bsg 発現を確認し、併せて著明な Bsg 発現の抑制をもたらす siRNA の実験系を確立した（Figure 4A）。TGF-βによって誘導される障害ポドサイト細胞株において、siRNA による Bsg の発現抑制はフローサイトメトリー法を用いた検証にて、有意な細胞表面上のβ_1 integrin の発現を抑制した（Figure 4B）。併せて、focal adhesion kinase（FAK）のリン酸化が抑制された（Figure 4C, D）。ポドサイト細胞の移動能を評価するために施行した検証では、Bsg 発現の抑制はポドサイト細胞の運動を有意に抑制する事が明らかにされた（Figure 4E-H）。TGF-β投与により誘導される障害ポドサイト細胞の培養上清において、ET-1 と VEGF の発現は Bsg の抑制により有意に増加が抑制された（Figure 5A, B）。更に、Bsg 発現抑制は MMP-2 の活性を有意に抑制した（Figure 5C, 5D）。

【考察】

本研究において、ポドサイト細胞障害は Bsg 発現を誘導し、β_1 integrin を介した FAK の活性化を通じてポドサイト細胞の扁平化・運動能を促進し、尿蛋白を誘発することを明らかにした。

これまでにも、尿蛋白の増悪とポドサイト細胞上のβ_1 integrin から始まる FAK シグナル伝達経路の関係性は幾つかの先行研究で報告されてきた。この過程において、アクチン骨格の再構成による細胞形態変化や運動能の亢進が主に関与すると考えられている。EMMPRIN（extracellular MMP inducer）とも称される Bsg は、悪性疾患において MMPs の誘導と共に Bsg 産生の促進がβ_1 integrin-FAK 経路の賦活化を誘導し、癌の進展・転移を促進する。ポドサイト細胞障害においても同様に、Bsg は一連の経路を活性化し、ポドサイト細胞の運動能亢進や形態変化を誘導すると考えられた。

更に、糸球体内皮細胞とポドサイト細胞の細胞間応答に関わる ET-1 や VEGF の産生についてもまた、ポドサイト細胞上の Bsg の関与が示唆された。ポドサイト細胞由来の ET-1 や VEGF の過剰な血管内皮細胞への刺激はミトコンドリア障害を伴う隣接した血管内皮への細胞障害を誘発する。最終的にはポドサイトの形態変化やアポトーシスを呈し、アルブミン尿・蛋白尿を誘発すると考えられる。

ポドサイト細胞は、腎疾患の原因に関わらず多様な刺激やストレスを受容する。これらの刺激によりポドサイト細胞上の Bsg はβ_1 integrin-FAK 系を介して MMP を誘導し、また MMP 自体も更なるポドサイト細胞障害を誘発する TGF-β産生を促すという悪循環を形成する。一連の過程において生じるポドサイト細胞の形態変化や運動能異常はポドサイト細胞数の減少とポドサイト細胞から産生される恒常性維持に不可欠な ET-1 や VEGF の発現バランスを維持できなくなり、糸球体内皮細胞障害をもたらす。その結果、糸球体内恒常性の破綻につながるという機構が推定された（Figure 6）。

【結論】

ポドサイト細胞障害により誘導された Bsg は、β_1 integrin を介した FAK の活性化を通じてポドサイト細胞の扁平化・運動能を促進し、尿蛋白を誘発する