

主論文の要旨

**A novel renal perivascular mesenchymal cell subset
gives rise to fibroblasts distinct from classic
myofibroblasts**

〔従来のMyofibroblastsとは異なる線維芽細胞に分化する
腎血管周囲間葉系細胞の新しいサブグループの同定〕

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)

湊口 俊

【緒言】

腎線維化は腎不全の進行に大きく寄与することが広く知られている。腎線維化には主に腎間質の間葉系細胞、特に筋線維芽細胞 (Myofibroblasts) が関与することが知られているが、近年の研究では Pericyte を含む血管周囲間葉系細胞 (Perivascular mesenchymal cell: PMC) が腎障害時に活性化され Myofibroblast に分化し、線維化の中心的な役割を担っていることが報告されている。PMC のマーカー分子として Gli1、Pdgfr- β 、Ng2 などが知られているが、PMC がさまざまな細胞より構成されたヘテロな細胞集団であるために、それぞれの細胞についての理解は十分ではない。

我々は、これまでに骨髄間葉系幹細胞の新規マーカーである Meflin を同定し、Meflin が心臓、膀胱組織、肺において Fibroblast に発現し、線維化を抑制する分子であることを報告している。また、腸管や骨格筋の再生にも関与していることも近年の研究より明らかになっている。しかしながら、腎臓における Meflin に関する知見は得られていない。そこで今回我々は、Meflin 分子および Meflin 陽性細胞の挙動・機能についての研究を行った。

【方法】

まず我々は、野生型マウス腎とヒト腎生検検体に対する In situ hybridization、および Meflin レポーターマウス (Meflin-CreERT2; Rosa26-LSL-tdTomato マウス) を使用して、正常腎組織における Meflin の局在を評価した。またマウス腎の透明化手法を用いて三次元的に Meflin 陽性細胞を評価した。さらに、Meflin レポーター下にジフテリアトキシシンレセプター (DTR) を発現させたマウス (Meflin-DTR マウス) にジフテリア毒素を投与して、正常腎における Meflin 陽性細胞を除去することで Meflin 陽性細胞の機能を分析した。また糸球体血管極周囲の Meflin 陽性細胞の機能を調べるために、Meflin レポーターマウスに対して減塩餌およびカプトプリル投与を行い、レニン分泌を誘導するモデルを作成した。

次に、障害腎における Meflin および Meflin 陽性細胞の挙動を調べるためにマウス腎線維化モデルとして UUO (片側尿管結紮) モデルを使用した。野生型マウスおよび Meflin レポーターマウスに対して UUO 手術を行い、経時的な Meflin の変動および Meflin 陽性細胞の挙動の変化を分析した。また、腎障害時における Meflin 陽性細胞の機能を調べるために、UUO 手術後にジフテリア毒素を投与し Meflin 陽性細胞除去を誘導したマウス腎組織を分析した。さらに、ヒト腎組織における Meflin の発現量と腎線維化の関係を調べるために、IgA 腎症患者の腎生検組織を使用して Meflin の免疫染色を行い、発現量と線維化の程度および腎予後の関係について評価した。細胞レベルでの Meflin を評価するために、ラット腎線維芽細胞 (NRK49F 細胞) を使用し TGF- β 刺激を行った際の Meflin の発現を評価した。また、NRK49F 細胞に対して Meflin を強制発現させ、TGF- β および BMP7 刺激を行った際の変化を分析した。

【結果】

野生型マウス腎とヒト腎生検検体に対する In situ hybridization、および Meflin レポーターマウスの腎組織の解析により、Meflin が主に腎臓間質および血管周囲に局限して存在することを見出した。また、マウス腎の透明化手法を用いて Meflin 陽性細胞が特に糸球体血管極周囲および輸入細動脈より中枢の動脈血管周囲に局在していることを明らかにした。Meflin-DTR マウスにジフテリア毒素を投与して正常腎における Meflin 陽性細胞を除去したところ、血管壁の著明な菲薄化、内腔の拡張、および腎組織における α -SMA、Coll1a1 の増加を認めた。また、糸球体血管極の Meflin 陽性細胞は一部がレニン分泌にも関与していることを同定した。

次に、UUO モデルを用いて腎障害時における Meflin の挙動を解析したところ、Meflin は障害早期から著明な増加を認めた。また、Meflin レポーターマウスに UUO 手術を行った実験では、Meflin 陽性細胞が腎障害発生後、徐々に血管から離脱し間質で分枝しながら増殖していくことを同定した。さらに、増殖した Meflin 陽性細胞は間質で活発なコラーゲン産生をしていることも同定した。UUO 手術による腎障害発生後にジフテリア毒素による Meflin 陽性細胞除去を誘導したマウスでは、腎組織における Coll1a1 mRNA および Col3a1 mRNA の有意な発現低下を認めた。IgA 腎症患者の腎生検検体を用いた解析においても、Meflin の発現量は腎線維化と有意に相関しており、長期的な腎予後とも有意な関連を認めた。

しかしながら、腎障害時における Meflin の発現分布は、線維化促進性 Myofibroblasts のマーカーとして知られる α -SMA とは異なる分布を示しており、Meflin 陽性細胞が従来の線維化促進性 Myofibroblasts とは異なる細胞集団であることを示唆していた。細胞実験においても、ラット腎線維芽細胞 (NRK49F 細胞) に TGF- β 刺激を行った際に、 α -SMA が上昇するのに対し、Meflin の発現は低下しており、Meflin と α -SMA の挙動が大きく異なることを確認している。同細胞に対して Meflin 分子を強制発現させた細胞では、TGF- β 刺激に対する線維化マーカーの反応が抑制され、 α -SMA および Vimentin の上昇が抑えられた。また、抗線維化作用を有する BMP7 刺激を行ったところ、Meflin 強制発現細胞において BMP7 のターゲット遺伝子である Id1 の有意な上昇を確認した。

【考察】

正常腎組織における Meflin および Meflin 陽性細胞の分析結果は、Meflin 陽性細胞が構造的にも機能的にも PMC の重要な細胞集団 (サブグループ) であることを示唆していた。また、腎障害時に Meflin 陽性細胞が血管を離脱して形態変化しながら増殖していく現象やヒト腎生検組織を用いた解析で Meflin の発現が腎線維化や腎予後と有意に関連していた点は、Meflin 陽性細胞が腎障害後の線維化形成の過程に関与していることを強く示唆していた。一方で障害腎における Meflin の発現は α -SMA とは異なる分布を示しており、Meflin 陽性細胞が従来の Myofibroblasts とは異なる線維芽細胞に分化する細胞集団であることを示唆していた。細胞実験の結果は、Meflin が分子レベルでは抗線維化作用を有することを示唆していた。

【結論】

本研究では、Meflin が腎臓における PMC の新規サブグループのマーカーになりうることを示した。腎障害時には Meflin 陽性細胞が血管周囲から離脱しながら増殖・分化するが、その分布は従来の α -SMA 陽性 Myofibroblasts とは異なっていた。Meflin は抗線維化作用を持つ分子であり、腎臓の線維化、組織修復の過程に寄与することが示唆された。