

学位論文題名

糸球体発達および糸球体腎炎における
エリスロポエチン受容体の発現

学位論文内容の要旨

背景・目的

エリスロポエチン (Epo)は造血に不可欠なサイトカインであり、赤血球前駆細胞の増殖・分化促進、アポトーシスの抑制をもたらす。Epo はその特異的レセプターである Epo 受容体(EpoR)に結合して作用するが、近年、種々の非造血臓器における EpoR の発現が明らかになり、Epo の非造血臓器に対する様々な作用が示唆されている。例えば最近、中枢神経や心筋の虚血性障害に、Epo が直接的な臓器保護効果をもたらすことが報告された。腎臓では、尿細管上皮細胞、腎癌細胞、培養メサンギウム細胞における EpoR の発現が報告され、Epo が急性腎不全における尿細管障害の回復に関与することが示唆されている。

腎糸球体は内皮細胞、メサンギウム細胞、臓側上皮細胞 (podocyte)で構成され、発生学的に特徴的な段階を経て完成するが、糸球体腎炎により一定以上の障害を来すと、進行性の硬化病変を生じ、慢性腎不全に進行する。Podocyte やメサンギウム細胞障害の発症・進展には、種々のサイトカインが関与することが知られている。本研究では、まずはじめに腎における EpoR の局在を詳細に検討したが、その結果、従来知られている尿細管上皮細胞における発現に加え、糸球体においても EpoR の発現を見出した。そこで、Epo が糸球体固有細胞の病態生理に関与する可能性を考え、糸球体発達、腎炎における EpoR 蛋白、mRNA の発現性について、免疫染色、*in situ hybridization* (ISH)によって検討し、その意義について考察した。

結果

1. 糸球体発達における EpoR 発現の検討: 糸球体発達における EpoR 発現について、新生仔-20 週齢のマウスを用い検討した。成熟腎において、糸球体 podocyte に EpoR 蛋白、mRNA の発現を認めた。齧歯類の新生仔では、各成熟段階 (初期から comma-shaped body、S-shaped body、capillary loop、maturing) の糸球体の観察が可能なことを利用し、未熟糸球体における EpoR 蛋白、mRNA の発現を検討した。Podocyte における EpoR の局在については、podocyte マーカー (WT-1、synaptopodin)に特異的な抗体を用い、連続切片および共焦点レーザーによる二重染色により確認した。EpoR 蛋白、mRNA は、まず S-shaped body stage の原始 podocyte に発現、capillary loop、maturing stage において、その発現が顕著となった。免疫電顕においても、capillary loop、maturing stage の podocyte の細胞質にコロイド粒子が確認された。
2. 糸球体腎炎における EpoR 発現の検討: 腎炎における EpoR の発現について、ヒト糸球体腎炎 66 症例 [微小変化群 (MCD) 5 例、膜性腎症 (MN) 6 例、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) 9 例、非 IgA メサ

メサンギウム増殖性腎炎 (MesPGN) 9 例、IgA 腎症 (IgAN) 20 例、膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) 7 例、ループス腎炎 (LN) 10 例を対象に検討した。正常腎では、尿細管上皮、細動脈内皮細胞に加え、糸球体において弱い発現を認めた。糸球体では、メサンギウム、内皮細胞から成る管内側、及び podocyte に EpoR 蛋白、mRNA の発現を認めた。管内側における EpoR 発現は、増殖性腎炎 (IgAN、MesPGN、MPGN、LN) のメサンギウム増殖部位に一致して認められ、統計学的にも光顕上のメサンギウム増殖重症度と有意に相関した。二重染色で、活性化メサンギウム細胞のマーカーである α -smooth muscle cell actin (α -SMA) との同時発現が認められた。管外側における発現は、FSGS および高度の増殖病変を有する係蹄の尿腔側に位置する synaptopodin 陽性 podocyte によく観察され、メサンギウム増殖、硬化およびマクロファージ浸潤と有意な相関を認めた。各腎炎における糸球体の EpoR 発現強度を、管内細胞における発現性と podocyte における発現性に分けて、統計学的に解析した。メサンギウムにおける発現は、MesPGN、IgAN において、podocyte における発現は FSGS、MesPGN、IgAN、MPGN、LN において、有意に増強していた。

考察

本研究により、腎臓においては、尿細管上皮細胞のみならず、糸球体固有細胞においても EpoR が発現され、その発現の部位と強度は糸球体の発生や病態にともなって特徴的に変化することが見出された。

マウス腎を用いた糸球体発達における EpoR 発現の検討では、未熟-成熟糸球体の podocyte に EpoR 蛋白、mRNA の発現を認めた。発現強度は、発生段階により変動し、podocyte の成熟に最も重要な段階である capillary loop stage に、その発現は強度となった。Epo は非造血臓器 (心臓、中枢神経) の発生に抗アポトーシス作用等を介し関与するという報告があり、本研究により見出された所見は、Epo が腎 podocyte の分化、機能成熟に何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。ヒト腎炎 66 例を用いた検討では、EpoR 蛋白、mRNA が、メサンギウムを含む管内細胞に加え、一部の podocyte において発現していることが確認された。増殖性腎炎におけるメサンギウム細胞増殖部位に EpoR と α -SMA の同時発現が見出されたことは、活性化メサンギウム細胞への形質転化に Epo が関与し得ることを示唆する。Epo が培養メサンギウム細胞の増殖を促す事が報告されており、本研究における所見も、Epo がメサンギウム増殖病変の発症・進展に関与する可能性を示唆する。一方、podocyte による EpoR 発現増強は、一次的な podocyte 障害を来す FSGS、および、二次性に podocyte 障害を来す重症増殖性腎炎において観察された。全てのタイプの腎炎が糸球体硬化へ進展する過程においては、podocyte 障害は最も重要な障害機転の一つで、本研究により見出された podocyte による EpoR の発現増強は、非常に興味深い。最近、Epo が抗アポトーシス作用を介し中枢神経や心筋の虚血性障害の保護に働く事が報告されている。Podocyte 障害においても、アポトーシスは重要な事象であり、実際に Epo が podocyte に対し保護効果をもたらすのか今後さらに検討が必要である。また、リコンビナント Epo は、保存期腎不全や透析患者の貧血治療に広く使用されており、糸球体腎炎進行に対する Epo の影響については、臨床的側面からも非常に重要な課題と考えられる。

結語

EpoR の発現性は、発生段階、および腎炎における糸球体の病態生理に深く関与する可能性がある。Epo は、podocyte の発生およびその障害機転において、重要な役割を有する可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 野々村 克也

学 位 論 文 題 名

糸球体発達および糸球体腎炎における エリスロポエチン受容体の発現

最近、エリスロポエチン (Epo) の受容体である Epo 受容体 (EpoR)が、種々の非造血臓器において発現している事が明らかになり、Epo の非造血臓器における様々な作用が示唆されている。腎臓では、尿細管上皮細胞、培養メサンギウム細胞における EpoR 発現が報告され、Epo が急性腎不全における尿細管障害の回復に関与する事が示唆されている。まず本研究において、腎糸球体においても EpoR の発現が認められる事を見出した。そこで、Epo が糸球体固有細胞に作用する可能性を考え、腎発達、腎炎における EpoR 発現性について免疫染色、in situ hybridization による検討を行った。糸球体発達における EpoR 発現については、マウスを用いた検討を行い、成熟腎の糸球体 podocyte に EpoR 蛋白、mRNA の発現を見出した。新生仔期発達段階にある糸球体の観察では、EpoR 蛋白、mRNA は、S-shaped body stage の原始 podocyte に発現、capillary loop、maturing stage においてその発現が顕著となった。Capillary loop stage は、podocyte の成熟に最も重要な段階として知られている。Epo が心臓や中枢神経発生に関与している報告があることから、Epo の podocyte の分化、機能成熟への直接的な影響の可能性が示唆される。次に糸球体腎炎における EpoR の発現については、ヒト腎炎 66 例 [微小変化群 (MCD) 5 例、膜性腎症 (MN) 6 例、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) 9 例、非 IgA メサンギウム増殖性腎炎(MPGN) 9 例、IgA 腎症 (IgAN) 20 例、膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) 7 例、ループス腎炎 (LN) 10 例]を対象に検討を行った。正常腎では、メサンギウム、内皮細胞からなる管内側、及び podocyte に弱い EpoR 蛋白、mRNA の発現を認めた。管内側における EpoR 発現は、メサンギウム増殖部位に一致して認められ、組織学的メサンギウム増殖重症度と有意に相関した。また活性化メサンギウム細胞に発現する α -smooth muscle cell actin

と EooR の同時発現を認めた。管外側における発現は、FSGS および高度の増殖病変を有する係蹄尿腔側に位置する podocyte によく観察され、メサンギウム増殖、硬化およびマクロファージ浸潤と有意な相関を認めた。EpoR 発現強度を各病型で解析すると、メサンギウムによる発現性は MesPGN、IgAN に、podocyte による発現性は FSGS、MesPGN、IgAN、MPGN、LN において、有意に増強していた。Epo が培養メサンギウム細胞の増殖促進に影響をあたえるという報告から類推すると、Epo は活性化メサンギウム細胞への形質転化およびメサンギウム増殖病変の発症、進展への関与が示唆される。一方、podocyte による EpoR 発現増強は、一次的な podocyte 障害により生ずる FSGS、二次的に podocyte 障害をきたす重症増殖性腎炎において観察された。Epo が抗アポトーシス作用を介し中枢神経や心筋の虚血性障害の保護に働く事が報告されており、Epo が podocyte においても抗アポトーシス作用を通して、その障害に対して保護効果をもたらす可能性が示唆される。結論として、EpoR の発現性は、腎糸球体の病態生理、特に podocyte の発生、病理に深く関与しているものと考えた。

公開発表に際し、副査の吉木教授から EpoR 発現の細胞内局在、腎炎例の尿細管における発現性などについて、次いで副査の野々村教授から全身性の Epo 発現と局所的な EpoR 発現性との関連についてなど、主査の小林教授から Epo の腎機能保護作用とメサンギウム増殖促進という腎症の増悪の2面性についてなどの質問があった。申請者は、いずれの質問に対しても文献や自らの実験結果をもとに概ね妥当な回答を行った。

本研究は、EpoR が腎糸球体の発生や腎障害の病態生理に大きく関わる分子であることを見出し、今後の臨床面への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。