

## 論文の内容の要旨

論文題目 糸球体上皮細胞障害におけるアドレノメデュリンの保護的作用

指導教官 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 日野 雅予

アドレノメデュリン (adrenomedullin, AM) は 1993 年 Kangawa, Kitamura らにより発見されたアミノ酸 52 残基よりなるペプチドで、副腎、心血管、肺、腎その他多くの臓器で産生され、降圧作用のほか利尿作用、ホルモン分泌調節作用など様々な生理作用を有し、さらに抗炎症、抗酸化作用、apoptosis を含めた細胞増殖・分化に関する作用などを有することが報告されてきた。これらの作用は主に臓器・細胞保護的に働くものである。一方 AM 産生刺激となるものとしては炎症、酸化ストレス、低酸素などがある。すなわち概して言うと、AM は細胞障害性の刺激により産生が上昇し、それらの刺激を打ち消す作用を有しているといえる。また AM 受容体は、受容体本体 calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) と修飾的な受容体蛋白である receptor-activity-modifying protein (RAMP)2, もしくは RAMP3 との複合体であり、これらも様々な臓器で発現している。

腎機能を低下させる多くの糸球体疾患は、進行期において当初の原因にかかわらず類似した糸球体硬化像を示し、糸球体硬化を進行させる共通の機構の存在が示唆される。近年様々な糸球体疾患や動物モデルにおいて、糸球体硬化に

先行して糸球体上皮細胞の障害が起きることが形態的に観察されてきた。これらことから、Rennke や Kriz らは糸球体上皮細胞の障害が、糸球体硬化症の一次的な原因であると提唱した。

糸球体上皮細胞(足細胞・podocyte)は高度に分化した細胞であり糸球体基底膜を外側から覆い、その概観からタコ足細胞とも呼ばれる。血中蛋白濾過に際し最終的なバリアー機能を果しており、糸球体上皮細胞の障害は高度の蛋白尿を引き起こす。蛋白尿は、慢性腎不全の進展因子であるのみならず、心血管病の独立した危険因子であることが示されてきており、蛋白尿が生じる主因として、糸球体上皮細胞障害が着目されてきている。

一方腎臓保護作用を有するアドレノメデュリン (AM) の糸球体上皮細胞における役割はこれまでほとんど検討されてこなかった。その理由の一つは、腎臓全体に占める足細胞の割合は少なく、AM の発現は細胞数の多い尿細管にはっきりと見られるため、足細胞への注目度が低かったことが挙げられる。もう一つは、足細胞はいったん分化すると増殖しないため、これまで継代培養が出来なかったことにある。そのため、均一な条件での細胞を揃えることが困難であり、AM を含め足細胞障害による病態解明の実験が十分に出来なかった。しかし 1997 年 Mundel らは継代可能な糸球体上皮細胞株を樹立し、細胞障害機序についてのアプローチが容易となってきた。われわれもこの細胞株を Mundel より分与を受け、実験を行うこととした。

これまでわれわれの教室では主に AM ノックアウトマウスを用い、AM の臓器保護効果について多数報告してきたが、今回我々は培養糸球体上皮細胞を用い、糸球体上皮細胞障害の機序、ならびに AM の保護作用の有無を特に酸化ストレス、アポトーシスの観点から検討することとした。

#### (1) 培養糸球体上皮細胞での AM の発現とその変化

腎臓での AM およびその受容体の発現は、これまで尿細管での報告が主であり、糸球体におけるそれらの発現の報告は一定していない。また、糸球体上皮細胞における報告は殆どない。その理由の一つは腎臓全体における糸球体および糸球体上皮細胞の細胞数の割合が極めて少ないこと、および先にも述べたように糸球体上皮細胞の培養が困難で発現の有無の検討がこれまで困難であったことがある。そこで、われわれはまず、今回用いた Mundel らが樹立した糸球体上皮細胞に AM、および AM 受容体が発現しているかを RT-PCR 法で確認することとし、培養糸球体上皮細胞に AM、CRLR および RAMP2, 3 が発現していることを示した。

また、AM の産生刺激について、これまで他の細胞では酸化ストレスや低酸素および炎症が因子となると報告されてきたが、今回用いた細胞についても、それらの刺激により AM 発現が上昇するか否かを、RIA による培養上清の蛋白濃度を測定し

約 2.2-3.5 倍、AM の遺伝子発現の変化について定量 PCR 法を用いて検討し約 4.5-8.9 倍と、AM の亢進を示した。

(2) puromycin aminonucleoside (PAN) による糸球体上皮細胞の障害機序と AM によるその保護的作用

動物における puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症は、微小変化型ネフローゼ症候群もしくは巣状糸球体硬化症のモデルとなる。PAN による糸球体上皮細胞障害の機序に関してはこれまで多くの報告がなされているが、活性酸素の関与を示唆したものが多く、また apoptosis を示したものも多い。われわれもまた、Mundel 作成の糸球体上皮細胞が PAN により活性酸素および apoptosis を生じているかを検討することとした。まず酸化ストレスについては、蛍光色素 CM-H<sub>2</sub>DCFDA による活性酸素検出を行い PAN 刺激により約 1.5 倍、活性酸素による DNA 障害で増加する 8-OHdG (8-hydroxy-deoxyguanosine) の培養上清中の濃度を測定し約 3.2 倍、Western blotting による nitrotyrosine 検出での増加を示した。apoptosis については、Hoechst33342 による apoptosis 細胞の計数および caspase-3 活性の検出による apoptosis の確認を行い、PAN により apoptosis が増悪する (約 22 倍) ことを示した。

糸球体上皮細胞の障害マーカーおよび障害シグナルとしては、これまで障害によりその構成分子蛋白である nephrin や podocin, synaptopodin などが低下するとの報告がなされているが、障害の種類や経過時間などで、発現の傾向が変化するため、汎用できるマーカーが少なかった。ごく最近、抗原提示細胞表面で共刺激因子として発現している分子 B7-1 について、糸球体上皮細胞の障害の際に発現が増強され、また B7-1 ノックアウトマウスでは糸球体障害が軽減されたという報告がなされ、糸球体上皮細胞の障害マーカーおよび障害シグナルとしての B7-1 の有用性が着目されている (Rieser J et al., 2004)。そこで、PAN 刺激で B7-1 が増加するかを検討し、B7-1 の遺伝子発現が約 2.8 倍に上昇することを示した。

上述したように、PAN による腎障害の機序は、酸化ストレスの関与が大きいとされている。そこでわれわれは、酸化ストレスを抗酸化剤により抑制したときに、細胞障害マーカーである B7-1、および酸化ストレスで増加する AM の発現が減少するか否かを検討することとした。酸化ストレスの産生部位としては、細胞膜の NADPH oxidase およびミトコンドリアで発生する酸化ストレスが重要である。そこで、抗酸化剤の実験についてこの 2 系統を抑制する抗酸化剤を用いることとした。定量 PCR により mRNA 発現を見たところ、細胞障害マーカー B7-1、および AM はいずれもミトコンドリア系抗酸化剤を加えることで抑制された。

また、これも上述したように PAN による腎障害の機序は、一部は酸化ストレスを介した apoptosis によるとされている。そこで、抗酸化剤を加えたときに apoptosis

が抑制されるかを調べることにした。そして apoptosis が抗酸化剤により抑制されることが示され (control :  $0.24 \pm 0.16\%$ , PAN :  $5.30 \pm 0.05\%$ , antimycinA:  $0.22 \pm 0.01\%$ , DPI:  $0.08 \pm 0.10\%$ , apocynin:  $1.83 \pm 0.13\%$ )、酸化ストレスを介するものであることが示唆された。

AM は酸化ストレスにより産生が刺激され、産生された AM は抗酸化剤として作用すると考えられる。それでは PAN による糸球体上皮細胞障害の機序のである酸化ストレス、および酸化ストレスを介した apoptosis を内因性 AM が抑制しているのだろうか。それを確認するため AM の受容体拮抗剤である CGRP8-37 を添加し、酸化ストレスについては蛍光色素 CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用い、apoptosis については Hoechst33342 染色により、酸化ストレスおよび apoptosis が増悪するか否かを検討することとした。そして CGRP8-37 により、PAN 単独時よりも酸化ストレスが約 2.5 倍、および apoptosis が約 3.9 倍増悪することを示した。

以上まとめると

1. AM およびその受容体は、培養糸球体上皮細胞に発現している。
2. この AM 発現は、PAN を含む細胞障害刺激により亢進する。
3. PAN による apoptosis・細胞障害マーカー B7-1 およびその際の AM 発現亢進は、抗酸化剤で抑制されることから、酸化ストレスを介するものと考えられる。
4. AM 受容体拮抗剤は、PAN による酸化ストレスならびに apoptosis を増強することから、内因性 AM は酸化ストレスを抑制することにより抗 apoptosis 的に作用する。すなわち、AM は糸球体上皮細胞においても細胞保護的な役割を有することが示唆される。