

論文の内容の要旨

題目 : Podocyte injury induced by albumin and its underlying
mechanisms

和訳 : アルブミンによる糸球体足細胞障害とその分子機序

指導教員 : 藤田敏郎 教授

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

吉田 成孝

【背景・目的】

蛋白尿は糸球体腎炎の主要な徴候であると同時に、腎障害進展のリスクファクターとしても重要である。のみならず、蛋白尿の存在は心血管系イベント発症の独立した危険因子であり、生命予後に大きなインパクトを持つことが近年明らかにされてきた。従って蛋白尿の発症・進展の機序を解明し、これを予防することは患者の生命予後改善はもちろんの事、逼迫する医療費の逓減にも重要な役割を果たしうる。

蛋白尿の腎障害性に関しては、従来漏出蛋白の尿細管間質に対する障害性を通して理解されてきた。即ち、糸球体から漏出したアルブミンやその結合脂質などが尿細管上皮により再吸収され、種々のサイトカインの放出やアポトーシスを引き起こし、尿細管上皮自体の障害と周囲間質の炎症性変化を惹起することが、尿蛋白による腎障害の機序と考えられてきた。

糸球体係蹄壁は3層の構造、即ち篩のような穴(fenestrae)の開いた糸球体内皮細胞、基底膜、上皮細胞から成り、これらが正常においては大きさ・荷電による濾過障壁を形成するため、一日 150-180L に達する糸球体濾過液中にはアルブミンなどの蛋

白漏出は極めて少ない。この濾過障壁に破綻が生じると尿管腔に蛋白が漏出し蛋白尿となる。

腎糸球体上皮細胞(足細胞、以下ポドサイト)は糸球体基底膜の外層に位置し、細胞体から足突起と呼ばれる多数の突起を伸ばし隣接するポドサイトの足突起と相互に噛み合う形で特殊な細胞間接着装置(スリット膜)を形成し、糸球体濾過障壁において重要な構成因子と考えられている。

ポドサイトは複雑な構造を持ち高度に分化した細胞であるため、原則として分裂・増殖することができない。そのため障害により一度失われると補充されることはなく、この不可逆な変化が糸球体喪失につながる変化となることが言われている。実際に種々の臨床研究や実験モデルにおいて、糸球体中ポドサイト数の減少や尿中ポドサイト排泄が、尿蛋白の増加や腎障害の進展の予測において高い診断的価値を有することが言われている。

ポドサイトは糸球体糸球壁の最外層であるため、その細胞体は尿管腔側に存在し、正常状態においては尿細管上皮同様蛋白に曝されない。しかるに糸球体濾過障壁の破綻により蛋白が漏出した時には、その蛋白に最初に曝される細胞となる。しかしながら漏出した蛋白が尿細管上皮同様にポドサイトに障害性を発揮するかに関しては、現在までのところ明らかとなっていない。そこで私は漏出蛋白の主要な構成因子であるアルブミンがポドサイトに過剰に暴露された際に、ポドサイトに生じる障害とその分子機序に関して *in vitro*・*in vivo* の系を用いて検討を行った。

【方法】

In vitro: Mundel 等の確立したマウス培養糸球体上皮細胞を分化型で使用し、エンドトキシンプリー脱脂ウシ血清アルブミン(BSA)を負荷した。アクチン線維の再構成やアポトーシスによりその障害を評価、ウェスタンブロッティング・リアルタイム RT-PCR によりその分子機序を検討した。

In vivo: 1 g/100 g BW2 日間のラット腹腔内アルブミン投与モデルを使用した。投与アルブミンの漏出・取り込みを蓄尿・免疫組織化学にて確認し、ポドサイトへの影響を、免疫組織化学・電子顕微鏡・ウェスタンブロッティングなどを用いて検討した。

【結果】

結果 1. BSAはポドサイト障害を惹起する。

負荷 BSA はポドサイトに取り込まれ、アクチン線維の再構成を惹起した。またアポトーシスを惹起していることが Hoechst33342 染色、Caspase-3, 7 染色、TUNEL 染色、DNA Ladder アッセイにより確認された。TUNEL 陽性細胞の計数による定量で、BSA によるポドサイトのアポトーシスは時間・用量依存的に生ずることが明らかとなった。

結果 2. BSAによるポドサイト障害にはTGF- β 1 とp38 MAPKが関与する。

通常アポトーシスを惹起する内因・外因性のアポトーシス関連蛋白の発現は、本モデルでは顕著な変化を認めなかった。一方で TGF- β 1 の発現とその下流である Smad 2/3 のリン酸化、及び p38 MAPK のリン酸化は、アクチン線維再構成やアポトーシスの出現に先立って有意な変化を認めた。また中和抗体による TGF- β 阻害や、SB203580 による p38 MAPK の阻害は BSA によるポドサイトのアクチン線維再構成やアポトーシスを有意に抑制した。

結果 3. ラット腹腔内アルブミン投与はポドサイト障害を惹起する。

アルブミン投与ラットは体重・血圧等の変化をきたすことなく、有意な蛋白尿増加を認め、免疫染色により投与 BSA の糸球体細胞による Uptake が確認された。ポドサイトに対する影響としては糸球体細胞のアポトーシス増加、ネフリン染色の減少を認め、電子顕微鏡による観察では足突起癒合・消失やポドサイト細胞体の空胞変性などを認めた。また糸球体分画によるウェスタンブロッティングにより TGF- β 1 の発現増加と p38 MAPK のリン酸化亢進も認めた。

【考察】

アルブミンの尿細管上皮への障害作用は広く研究されており、近年ポドサイトでもその取り込みとアクチン線維の再構成が示された。In vivo のアルブミン投与モデルは古くより腎障害モデルとして知られているが、ポドサイトへの影響はこれまであまり評価されていない。今回の結果はアルブミンによるポドサイト障害、なかでもアポトーシス作用を in vitro と in vivo の双方で示した点で新規の知見である。

TGF- β は腎障害において重要な障害因子として知られ、尿細管間質のみでなく、ポドサイトにおける発現上昇もいくつか報告されているが、その作用は主に炎症・線維化促進性として認識されてきた。しかし他臓器・疾患ではアポトーシスや細胞周期への影響が知られており、今回の結果はポドサイトにおいても TGF- β がアポトーシス促進を介して障害性に働くことを示した。TGF- β に比すると p38 MAPK の腎障害へのかかわりを示した報告は少ないが、ポドサイトを含めいくつか散見される。尿細管上皮やポドサイトにおいて少数ながら TGF- β による障害に p38 MAPK が関わっているとする報告もあり、Schiffer 等は p38 MAPK 阻害により TGF- β によるアポトーシスが抑制されたと報告している。私も TGF- β が p38 MAPK のリン酸化を亢進させることと、TGF- β によるアポトーシスが SB203580 で一部阻害されていることを確認しており、TGF- β がこの系の上流と考えられた。

アポトーシスが腎疾患において果たす役割は種々の疾患・実験モデルで示されており、TGF- β の関連が指摘されているものもある。ポドサイト数の減少は腎障害

進展に強い関連のある予測因子として臨床研究・実験モデルで注目されつつある。ポドサイトの減少は以前は主にネクロシスや基底膜から尿中への脱落によって説明されてきたが、近年はアポトーシスの存在も指摘されてきている。私のモデルにおいてはアポトーシスの関連蛋白として一般的な内因・外因性蛋白には有意な変化を認めず、**TGF- β** と **p38 MAPK** を介したアポトーシスを認めた。

上述のようにポドサイトの障害は蛋白尿の発症に重要な役割を果たす。今回私が示したように、アルブミンによるポドサイト障害が生じるとすると、尿管腔に漏出した蛋白は、アルブミンによるポドサイト傷害を介して更なる蛋白漏出を促すこととなる。すなわち、何らかの機序で一旦生じた蛋白漏出が、漏出アルブミンのポドサイトへの障害を介して維持・増強される悪循環の存在する可能性を私の結果は示していると考ええる。

【結論】

私はアルブミンによるポドサイト障害とそれにおける **TGF- β** と **p38 MAPK** の関与とを *in vitro*・*in vivo* で示した。**TGF- β** や **p38 MAPK** を介したこの過程を阻害することは腎障害の維持・進展を抑制する一助となりうると思われる。