

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 衣笠 哲史

本研究はネフローゼ症候群の代表的な原因疾患である微小変化型ネフローゼ症候群において、アルブミン主体の選択的蛋白尿が見られることに着目し、同疾患における糸球体内の特異的なアルブミン濾過経路の存在を検証すべく Puromycin aminonucleoside (PAN) ネフローゼラットを用いて種々の解析を行い、また NADPH oxidase 阻害剤 apocynin の効果について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. slit poreを通過可能な2nm thiocyanate gold 標識アルブミンを対照・PANラットに静注し、電顕的に直接糸球体濾過の経路を観察したところ、アルブミンは内皮・パラメサンギウム、足細胞に取り込みが認められ、スリット膜以外の濾過経路の存在が示唆された。一方、PAN ラットでは癒合した足細胞に取り込まれるアルブミンが増加していた。

2. アルブミンと特異的に結合する Evans blue 色素をヒトアルブミンに結合させ(EB-HSA)、対照・PAN ラットに静注した。光顕では PAN 腎症で糸球体の EB-HSA 取り込みの増加が示された。clearance 測定を施行し、PAN 腎症では対照に比し EB-HSA の fractional excretion が約 130 倍に亢進し ($p < 0.01$ vs. control)、蛋白尿も著明に増加した。SDS-PAGE と densitometry により PAN ラットの尿蛋白はアルブミン主体で選択性の高いことが示された。Microdissection で単離した糸球体を用い western blotting を行ったところ、PAN 腎症のラットでは EB-HSA 取り込みの増加を認めた。共焦点顕微鏡では EB-HSA は足細胞内に局在することが示された。

3. 対照, PANラットに EB-HSA を静注し、腎臓の vibratome 切片に対して Immunogold SEM 法を用いて電子顕微鏡下に糸球体でのアルブミン濾過経路を観察した。対照群では silver enhance された金粒子はスリット膜上の足突起間の間隙に少数認められた。これに対し、PAN ラットでは多数の金粒子が足細胞内の vesicle と足細胞の表面に散見された。高倍率の secondary electron モードによる観察では PAN の足細胞表面に exocytosis を想起させる多数の粒状の隆起が見られた。これらの結果よりアルブミンが足細胞に endocytosis で取り込まれ、細胞質内を通過する経路で濾過されることが考えられた。

4. PAN 腎症の機序には reactive oxygen species (ROS) が関与するとされており、これを検証した。免疫組織化学・免疫電子顕微鏡法を施行し、PAN 腎症で足細胞において NADPH oxidase の subunit である p47phox の発現が増加していることが示された。また

cerium chloride histocytochemistry 法にて、PAN ラットでは PAN 投与後 2 日目に足細胞の ROS 産生増加が示された。尿中 H_2O_2 濃度を測定したところ、PAN 静注後 2 日目で最大となり、蛋白尿や足突起癒合の出現に先行した。

5. NADPH oxidase 阻害剤 apocynin の PAN 腎症における効果に関し検討した。Apocynin 経口投与により無治療群に比し EB 標識アルブミンの fractional excretion 及び蛋白尿の有意な改善が認められた。Immunogold SEM では無治療群に比し足細胞内 vesicle と足細胞膜表面の金粒子数は有意に減少した。また apocynin は PAN ラットにおける尿中 H_2O_2 の上昇を抑制した。Apocynin がネフローゼ症候群においてアルブミンの endocytosis を抑制し、蛋白尿を減少させる可能性が示唆された。

6. 足細胞膜上に発現するアルブミン受容体である FcRn に対する抗体を用い microdissection で単離した糸球体を用いた免疫沈降法を施行したところ、PAN ラットにおいて FcRn と結合したヒトアルブミンの著明な増加が示された。これは apocynin 経口投与にて有意な減少を認めた。FcRn を介したアルブミンの特異的な濾過経路の存在が示唆された。

7. green fluorescent protein (GFP)-transgenic ラットを用い、共焦点顕微鏡でアルブミンの糸球体内動態を real-time で検討した。PAN 腎症において近位尿細管中にアルブミンが出現したのは静注後 5 分以降であった。対照において近位尿細管中のアルブミンはわずかに認められたのみであった。結果より PAN 腎症でアルブミンの大半が足細胞内を endocytosis により輸送される可能性が高いことが示された。

以上、本論文は微小変化型ネフローゼ症候群の動物モデルにおいて、免疫電子顕微鏡法を中心とした種々の解析からネフローゼ症候群の蛋白尿の発症機序として、FcRn 受容体を介して足細胞がアルブミンを特異的に endocytose し、細胞質内を通過する新たなアルブミン濾過経路の存在を明らかにした。また NADPH oxidase 阻害剤 apocynin によりこの経路が抑制され、有望な therapeutic drug であることを示した。本研究はこれまで原因不明であった微小変化型ネフローゼ症候群の病態生理の解明、新たな治療の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。