

腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）機能維持におけるスフィンゴシン 1 リン酸受容体シグナルの役割—フィンゴリモドのポドサイト保護作用についての検討—

長谷川絵理子

新潟大学医歯学総合研究科

腎研究センター 腎分子病態分野

（主任：河内裕教授）

**Sphingosine 1-phosphate receptor signaling in podocyte.**

Eriko Hasegawa

Department of Cell Biology, Kidney Research Center,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science

(Director: Prof. Hiroshi Kawachi)

**要旨**

Sphingosine 1-phosphate (S1P)は多彩な生理活性をもつ脂質メディエーターで、その受容体である S1P receptor (S1PR)は広汎な臓器に発現しており、S1P-S1PR シグナルは細胞の生存、増殖、移動、細胞骨格再構築、細胞間接着など多くの細胞機能の制御に関与していることが報告されている。腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）は糸球体の構造維持、透過性制御に最も重要な役割を果たしている細胞と考えられているが、ポドサイト機能維持における S1P-S1PR シグナルの役割は不明である。本研究では、ポドサイトにおける S1P-S1PR シグナルの役割を解明するため、正常、並びにネフローゼ症候群モデルにおける S1P 関連分子の発現を検討した。また、S1PR の機能的アンタゴニストである Fingolimod のポドサイト保護作用についての検討を行った。正常ラット腎糸球体で S1P 合成酵素である sphingosine kinase (SK) 1, S1P の分解酵素である S1P phosphatase 1, 2, S1P lyase, S1PR1, 2, 3, 4, 5 の mRNA 発現が観察され、培養ポドサイト細胞では S1PR5 以外の S1P 関連分子の mRNA 発現が観察された。微小変化型ネフローゼ症候群モデルであるラット Puromycin aminonucleoside (PAN)誘導腎症の糸球体で S1PR3,4 の発現が亢進していることが観察された。また、培養ポドサイトに PAN を添加した系で SK1, S1PR3,4 の mRNA 発現が亢進していることが観察された。PAN 腎症ラットに Fingolimod を投与すると蛋白尿が有意に減少し、同モデルで観察されるポドサイト機能分子の発現低下が抑制された。また、PAN 添加培養ポドサイトで観察されるにアクチンフィラメントの染色性の変化が Fingolimod 処理により軽減されることを観察した。ポドサイト障害の進行に S1PR シグナルの亢進が関与していると考えられた。Fingolimod は微小変化型ネフローゼ症候群の治療薬として有用な可能性がある。

**キーワード** : Sphingosine 1-phosphate (S1P), Fingolimod, ポドサイト、微小変化型ネフローゼ症候群, PAN 腎症

## 緒言

腎糸球体毛細血管壁は、内皮細胞、糸球体基底膜、糸球体上皮細胞（ポドサイト）で構成されている。ポドサイトは高度に分化した細胞で、足突起と呼ばれる構造を持ち、足突起間はスリット膜と呼ばれる特殊な細胞間接着構造によってつながっており、蛋白透過を防ぐメインバリアーとなっている。蛋白尿は腎糸球体疾患における最も重要な症候であるだけでなく、腎機能低下をもたらす悪化因子であるとともに、心血管疾患の独立した危険因子であることが知られている。近年、ネフリン、ポドシンなどのスリット膜関連分子が同定されてきたが、スリット膜の機能異常がおこるメカニズムは未だ解明されていない。

**Sphingosine 1-phosphate (S1P)** は細胞膜を構成するスフィンゴ脂質である **sphingosine** が **sphingosine kinase 1,2 (SK 1,2)** によってリン酸化されることによって生成される多面的な生理活性をもつ脂質メディエーターである。S1P は **sphingosine phosphatase 1,2 (SPPase1,2)** によって **sphingosine** に脱リン酸化され、また **S1P lyase** により不可逆的に分解される。細胞内で合成された S1P は細胞外へ輸送され、細胞膜表面に発現する 7 回膜貫通型 G タンパク共役受容体である **S1P receptor (S1PR)** を介しシグナルを伝達する。

**S1P-S1PR** シグナルは二次リンパ組織からのリンパ球が遊走する際に重要な役割を果たしており、免疫調節機能において注目されている<sup>1)</sup>。また、**S1PR** は広汎な臓器に発現しており、**S1P-S1PR** シグナルは各臓器で細胞の生存、増殖、移動、細胞骨格再構築、細胞間接着など多くの細胞機能の制御における機能が報告されている。**S1P** は多面的な作用をもつ脂質メディエーターである。**S1P** は細胞表面に存在する G 蛋白共役受容体である **S1PR** に結合する。**S1PR** には 5 つのサブタイプがあり (**S1PR1, 2, 3, 4, 5**)、それぞれ 1 つまたは複数の G 蛋白と共役しそれぞれのシグナル経路を介して作用を発揮する<sup>2)</sup>。**S1PR** は組織、細胞によって異なるパターンで発現しており、**S1PR1,2,3** が全身の多くの組織や細胞に広く分布しているのに対し、**S1PR4** は主に血液細胞、**S1PR5** は主に神経系細胞と発現部位が限局している。この受容体サブタイプの機能や分布の違いが **S1P** の多彩な生理作用につながっている<sup>3)</sup>。全身の各臓器における **S1P** の役割が研究されているが、ポドサイトにおける役割はほとんどわかっていない。

**Fingolimod (FTY720)** は **S1P** の構造的アナログである。**S1PR2** 以外の **S1PR** に結合し細胞膜表面の **S1PR** を減少させることにより機能的アンタゴニストとして働く。**S1PR** のシグナルを抑制することで二次リンパ組織からのリンパ球の遊走を阻害し、末梢のリンパ球数を減少させることで免疫抑制作用をもち、現在多発性硬化症の治療薬として承認され、臨床使用されている<sup>4,5)</sup>。一方で **Fingolimod** は免疫細胞以外での各臓器局所の **S1P-S1PR** シグナリングの調節効果も報告されている。腎においては、**Fingolimod** が糖尿病性腎症モデルラットの蛋白尿を抑制したという報告があるが<sup>6)</sup>、作用機序の詳細は不明で、ポドサイト傷害に起因するネフローゼ症候群での検討はない。本研究では、ポドサイトにおける **S1P-S1PR** シグナルの役割の解明、**Fingolimod** のポドサイト保護効果を検討する

ことを目的として、微小変化型ネフローゼ症候群モデルであるラット Puromycin aminonucleoside (PAN)誘導腎症、培養ポドサイトを用いた解析を行った。

今回の検討で、ネフローゼ症候群モデルの糸球体において S1P 合成酵素である sphingosine kinase (SK) 1、 S1PR3, 4 の発現が亢進していること、Fingolimod が PAN 腎症の蛋白尿を低下させることを示した。ネフローゼ症候群の病態形成に S1PR シグナルの亢進が関与していると考えられ、Fingolimod は微小変化型ネフローゼ症候群の治療薬として有用な可能性があると考えられる。

## 材料と方法

### 動物実験

6週齢(体重 150-200g)の雌性 Wistar ラット (Charles River Laboratories, Japan) を使用した。本研究は、新潟大学動物実験委員会での承認を受けており、すべての動物実験は新潟大学の動物実験ガイドラインに従った。

### 培養ポドサイト

マウス培養ポドサイトの細胞株は Peter Mundel 博士(Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY)よりご提供いただき、既報の条件で培養した<sup>7)</sup>。37°Cで 21 日間培養により分化誘導させ、分化度はネフリンの発現で確認した。

### RT-PCR、蛍光抗体法

RT-PCR、蛍光抗体法は、既報に準拠して行った<sup>8)</sup>。単離糸球体、培養細胞、脳、肝組織から RNA を抽出し、定法により cDNA 合成を行い、RT-PCR での検討に用いた。

GenBank で公開されている情報をもとにプライマーを設計し、特異性を確認した後、検討に使用した。蛍光抗体法での検討は、マウス抗ラットネフリン抗体<sup>9)</sup>、ウサギ抗ラットポドシン抗体<sup>10)</sup>を用いた。

### 病態モデル、傷害ポドサイトでの検討

①PAN 腎症の作製：PAN 腎症は Wistar ラットに 10mg/body の PAN を尾静脈より単回投与することにより作製した。PAN 投与後 1 時間後、24 時間後、10 日間後に両腎を摘出し、蛍光抗体法の検討材料、糸球体での mRNA 検討材料とした。

②傷害ポドサイトでの検討：培養ポドサイトに PAN (40  $\mu$  g/ml、80  $\mu$  g/ml、120  $\mu$  g/ml) を添加後 37°C、24 時間培養し RNA 材料を調整した。

### Fingolimod の効果の検討

① PAN 腎症ラットでの検討： PAN10mg/body 投与により PAN 腎症を誘導した。

Fingolimod 1mg/kg 体重/日または溶媒を PAN 腎症誘導後連日腹腔内投与した。各群並びに正常群を 6 匹ずつ作製した。腎症誘導後 8、10 日にラットを代謝ケージに入れ、24 時間尿を採取した。尿蛋白濃度は Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて測定し、1 日尿蛋白量を算出した。10 日尿採取直後に両腎を摘出し、ポドサイト機能分子の染色性の検討を行った。糸球体における各分子の半定量的解

析は Macconi ら<sup>11)</sup>の方法に従い、以下のスコアを用いて評価した。(染色パターンの連続性の低下ならびに染色性の低下が認められる領域が糸球体の0-25%のものをスコア4、25-50%をスコア3、50-75%をスコア2、75-100%をスコア1とした。)各ラット30個の糸球体を評価した。

②PAN 添加培養ポドサイトでの検討：培養ポドサイトに溶媒または Fingolimod を終濃度  $3\mu\text{M}$  となるように加え 24 時間培養後、PAN  $80\mu\text{g/mL}$  を添加しさらに 24 時間培養した後細胞を回収した。各群並びに正常群、それぞれ 4 ディッシュ調整した。各ディッシュ 10 個以上の細胞を Rhodamine-phalloidin を用いてアクチンフィラメントの染色所見を解析した。染色所見の半定量的解析は Verderaeme ら<sup>12)</sup>の方法に準拠し、以下のスコアを用いて評価した。(スコア4、細胞の90%以上の領域で太いアクチン束が観察される。スコア3、少なくとも2本の太いアクチン束が観察され、他の領域では細い繊維束が観察される。スコア2、太い繊維束は認められないが細い繊維束が認められる。スコア1、線維束が全くみられない。)残りの細胞から RNA を抽出し、Rho シグナルの下流に位置するリン酸化酵素である ROCK1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1) の mRNA 発現を解析した。

## 結果

### 検討1：腎糸球体、ポドサイトにおける S1P 関連分子の発現

ラット腎糸球体では S1PR1,2,3,4,5 のすべてのサブタイプの mRNA 発現が認められ、培養ポドサイトでは S1PR1,2,3,4 の発現が確認されたが、S1PR5 の発現は非常に弱かった(図 1A)。腎糸球体、マウス培養ポドサイトで、S1P 合成酵素(SK1,2)、S1P 分解酵素(S1PPase1,2、S1P lyase)の mRNA 発現を認めた(図 1A)。未分化のマウス培養ポドサイトと、37°Cで21日間培養した分化培養ポドサイトにおける S1P 関連分子の発現を比較した。S1PR5 の mRNA 発現はどちらの状態のポドサイトでも検出されなかった。S1PR1 と S1PR2 の発現は、未分化と分化ポドサイトの間で差が認められなかった。S1PR3 と S1PR4 は分化ポドサイトでより強い発現が認められた(図 1B)。

### 検討2：PAN 投与による S1P 関連分子の変化

ラットに PAN 静注後、1時間、24時間、10日での S1P 関連分子の発現変化を解析した。S1PR1 と S1PR2 の mRNA 発現は PAN 投与による変化が認められなかったが、S1PR3 と S1PR4 の mRNA 発現は PAN 投与前に比して PAN 静注後 24 時間、10日のラット腎糸球体で増加していた(図 2A)。マウス培養ポドサイトに PAN ( $40\mu\text{g/ml}$ ,  $80\mu\text{g/ml}$ ,  $120\mu\text{g/ml}$ )を添加して 24 時間培養し、S1P 関連分子の発現変化を検討した。S1PR3、S1PR4、SK1 の mRNA 発現が PAN の濃度依存性に増加した。一方、S1PR1 と S1PR3 並びに S1P 関連酵素の発現は PAN 添加による変化は観察されなかった(図 2B)。

### 検討3：Fingolimod の効果の検討

#### (1) PAN 腎症モデルでの検討

PAN 10mg/body を静注して誘導した PAN 腎症をラットに S1P の機能的アンタゴニストである Fingolimod もしくは溶媒を連日腹腔内投与した。Fingolimod を投与していない PAN 腎症ラットは病変誘導 8 日目から著明な尿蛋白が出現するが、Fingolimod を投与した群では尿蛋白が抑制された(無治療群 vs. 治療群: 8 日目、103.4 ± 78.0 mg/day vs. 5.34 ± 3.35 mg/day, p=0.0117 ; 10 日目、152.3 ± 120.2 mg/day vs. 11.2 ± 3.84 mg/day, p=0.0165) (図 3A)。10 日目ラットの血液検査では、PAN 腎症ラット (無治療群) では血清総コレステロールの上昇がみられたが、Fingolimod 投与群では上昇が抑制された(157.7 ± 67.4 mg/dl vs. 85.8 ± 17.3 mg/dl, p=0.0299)。血清クレアチニン値と血清総蛋白値は PAN 腎症の誘導有無で変化がなく、Fingolimod の投与によっても変化がなかった (図 3B)。PAN 腎症ラット糸球体ではスリット膜機能分子であるネフリン、ポドシンの染色性は低下し、不連続な染色パターンとなったが、Fingolimod 投与により、染色性の変化が抑制された。(IF スコア、無治療群 vs. 治療群: ネフリン、1.78 ± 0.73 vs. 2.86 ± 0.49, p=0.0411; ポドシン, 1.52 ± 0.89 vs. 2.62 ± 0.44, p=0.045) (図 4)。

#### (2) 培養ポドサイトでの検討

培養ポドサイトに PAN を添加するとアクチン線維束の分布パターンが変化するが、Fingolimod による前処理により、PAN によるアクチン線維束の分布パターンの変化が抑制された。(アクチン染色スコア: 溶媒前処理群 vs. Fingolimod 前処理群; 1.93 ± 0.29 vs 2.85 ± 0.45, p=0.0294) (図 5)。ROCK1 の mRNA は正常培養ポドサイトではほとんど検出されない。PAN80 μg/ml による 24 時間培養で ROCK1 の mRNA 発現が亢進したが、Fingolimod 前処理により PAN による ROCK1 の mRNA 発現亢進は抑制された(図 6)。

## 考察

本研究で、S1P-S1PR シグナルが微小変化型ネフローゼ症候群の病態モデルである PAN 腎症の病態形成に関わっていると考えられ、S1P-S1PR シグナルは微小変化型ネフローゼ症候群の治療標的となる可能性があることが示された。

ラット腎糸球体とマウス培養ポドサイトで S1P 関連分子の mRNA 発現が観察された。腎皮質、糸球体における S1P 関連分子の発現パターンは検討した他の臓器と明らかな差はなく、S1PR のサブタイプがすべて検出できた。一方、マウス培養ポドサイトでは S1PR5 の発現が少なく、S1PR3 と S1PR4 の発現が優位であるという特徴をもっており、特に未分化な状態から分化ポドサイトになる課程で S1PR3 と S1PR4 の発現が優位となっていた。この特徴的なポドサイトにおける S1PR の発現パターンはスリット膜などポドサイトの特異的な機能の維持に S1P-S1PR シグナルが関わっている可能性があると考えられた。

微小変化型ネフローゼ症候群の病態モデルを誘導する薬剤である PAN 処理によりマウス培養ポドサイトでは、S1PR3 と S1PR4、並びに S1P 合成酵素の SK1 の発現が亢進していた。リガンドである S1P と受容体の双方の発現が亢進していることから PAN 処理に

よる傷害ポドサイトでは S1PR3, 4 を介した S1P-S1PR シグナルが亢進していると考えられた。PAN 腎症ラット腎糸球体で S1PR3,4 の発現亢進が観察された。リガンドである S1P の血漿中の濃度は約 200nM と高値であると報告されており<sup>13)</sup>、細胞局所における S1P-S1PR シグナルは受容体である S1PR の発現量で規定されていると考えられることから、PAN 腎症糸球体では、S1PR3,4 を介した S1P-S1PR シグナルが亢進していると考えられる。

Fingolimod は冬虫夏草の一種である *Isaria sinclairii* 由来の天然物であるイリオシンの構造変換によって得られた化合物であり、スフィンゴシンの構造アナログである<sup>14)</sup>。

Fingolimod は生体内で SK によりリン酸化され、短期的に S1PR1,3,4,5 のアゴニストとして働くが、細胞膜表面の S1PR を減少させることにより機能的アンタゴニストとして働く。本研究で、Fingolimod 投与により PAN 腎症の尿蛋白が抑制され、また血清コレステロール値上昇も抑制された。PAN 腎症（無治療群）でも血清アルブミン値の低下はみられなかったが、ネフローゼ症候群では apolipoprotein B の合成亢進により高コレステロール血症をおこすことが知られている<sup>15)</sup>。Fingolimod が高コレステロール血症を直接引き起こすという報告はみられない。Fingolimod は PAN 腎症によるスリット膜関連分子であるネフリンとポドシンの発現低下を抑制しており、Fingolimod による蛋白尿抑制効果の少なくとも一部はスリット膜の保護効果によるものと考えられる。

S1PR の 5 つのサブタイプは、それぞれ 1 つまたは複数の G 蛋白と共役しそれぞれのシグナル経路を介して作用を発揮する<sup>2)</sup>が、PAN 腎症で発現が亢進していた S1PR3 と S1PR4 は結合する G 蛋白として G12/13 を共通にもつ。Rho-ROCK 系は G12/13 シグナルの下流のエフェクターの一つである。PAN 添加培養ポドサイトにおいて ROCK1 の mRNA 発現亢進が認められ、これは過去の報告に一致する<sup>16)</sup>。Fingolimod の投与により ROCK1 の発現亢進は抑制されており、これは S1PR3,4 のシグナル阻害によると推定される。Rho-Rock 系は cofilin のリン酸化などを介してアクチン細胞骨格の制御を行っており<sup>17)</sup>、ポドサイトにおいてもアクチン骨格再重合に関与していると報告されている<sup>18)</sup>。アクチン細胞骨格はポドサイトの構造維持、足突起の維持にも重要な役割を果たしている<sup>19)</sup>。本研究で Fingolimod は PAN 刺激に対して細胞骨格維持作用を有していた。この作用は S1PR3,4 の阻害により Rho-ROCK 系の過剰な亢進を防いたことによると考えられる。

## 結論

微小変化型ネフローゼ症候群の病態モデルである PAN 腎症において S1PR3,4 の発現が亢進していることを示した。この観察は、微小変化型ネフローゼ症候群の病態形成に S1PR シグナルの亢進が関与していること示していると考えられる。Fingolimod は PAN 腎症の蛋白尿抑制効果、スリット膜機能分子の保護効果を持つことを示した。Fingolimod は微小変化型ネフローゼ症候群の治療薬として有用である可能性がある。

## 謝辞

本研究に関して、ご指導いただきました河内裕教授、福住好恭准教授に心より感謝いたします。また研究室の皆さまには貴重なご意見、ご討論をしていただき、心より感謝申し上げます。

- 1) Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG: Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427:355-360, 2004.
- 2) O'Sullivan C, Dev KK: The structure and function of the S1P1 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 34:401-12, 2013.
- 3) Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G: *Pharmacol Rev* 54:265-9, 2002.
- 4) Brinkmann V: FTY720(fingolimod) in multiple sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *BrJ Pharmacol* 158:1173-82, 2009.
- 5) Strader CR, Pearce CJ, Oberlies NH: Fingolimod (FTY720: a recently approved multiple sclerosis drug based on a fungal secondary metabolite. *J Nat Prod* 25:900-7, 2011.
- 6) Awad AS, Rouse MD, Khutsishivilli K, Huang L, Bolton WK, Lynch KR, Okusa MD: Chronic sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation attenuates early-stage diabetic nephropathy independent of lymphocytes. *Kidney Int* 79:1090-8, 2011.
- 7) Mundel P, Reiser J, Zuniga MB, Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R: Rearrangement of cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236:248-58, 1997.
- 8) Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Yaoita E, Orikasa M, Shia MA, Sakai T, Yamamoto T, Salant DJ, Shimizu F: Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric state *Kidney Int.*;57: 1949-61, 2000.
- 9) Orikasa M, Matsui K, Oite T and Shimizu F: Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J Immunol* 141: 807-814, 1988.
- 10) Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Sakai T and Shimizu F: Cloning of rat homologue of podocin: expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 14: 46-56, 2003.
- 11) Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, Plati T, Sangalli F, Longaretti L, Conti S, Kawachi H, Hill P, Remuzzi G and Remuzzi A: Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. *Am J*

- Pathol 168: 42-54, 2006.
- 12) Verderame M, Alcorta D, Egnor M, Amith K, Pollack R: Cytoskeletal F-actin patterns quantitated with fluorescein isothiocyanate-phalloidin in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6624-6628, 1980.
  - 13) Thuy AV, Reimann CM, Hemdan nYA, Graler MH: Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate. *Cell Ohysiol Biochem* 34:158-71, 2014.
  - 14) Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R, Chiba K, Hashino Y, Okumoto T: Fungal metabolites. Part11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclarii* metabolite. *J Antibiot* 47:208-215, 1994.
  - 15) Demant T, Mathes C, Gurlich K, Bedynek A, Steinhauer HB, Bosch T, Packard CJ, Warwick GL: A simultaneous study of the metabolism of apolipoprotein B and albumin in nephrotic patients. *Kiney Int* 54:2064-80, 1998.
  - 16) Shibata S, Nakase M, Fujita T: Fluvastatin ameliorates podocyte injury in proteinuric rats via modulation of excessive Rho signaling. *J Am Soc Nephrol* 17:754-64, 2006.
  - 17) Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S: Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285:895-8, 1999.
  - 18) Wang S, Chen C, Su K, Zha D, Liang W, Hillebrands JL, Goor Hv, Ding G: Angiotensin II induces reorganization of the actin cytoskeleton and myosin light-chain phosphorylation infpodocytes through rho-ROCK-signaling pathway. *Ren Fail* 38:268-75, 2016.
  - 19) George B, Holzman LB: Signaling from the podocyte intercellular junction to the actin cytoskeleton. *Semin Nephrol* 32:307-18, 2012.



## Legend

### 図 1 正常腎糸球体、培養ポドサイトにおける S1P 関連分子の発現

(A) ラットの腎組織・各臓器、マウス培養ポドサイトにおける S1P 関連分子の RT-PCR 解析。S1PR1、S1PR2、S1PR3、S1PR4、S1PR5 の mRNA 発現がラット腎糸球体で検出された。S1PR1、S1PR2、S1PR3、S1PR4 の mRNA 発現がマウス培養ポドサイトで検出されたが、S1PR5 の mRNA 発現は微弱であった。S1P 関連酵素 (SK1, SK2, SPPase1, SPPase2, S1Plyase) の発現はラット腎糸球体、マウス培養ポドサイトですべて検出された。

(B) 未分化型培養ポドサイトと分化型培養ポドサイトにおける S1P 受容体の RT-PCR 解析。未分化型培養ポドサイトと比較して、分化型培養ポドサイトの S1PR3、S1PR4 のバンド強度が強く検出された。

### 図 2 PAN 投与における腎糸球体、培養ポドサイトの S1P 関連分子の発現

(A) PAN 腎症ラット糸球体における S1P 受容体 mRNA の発現解析。PAN 腎症誘導後 24 時間、10 日後のラット腎糸球体で、S1PR3、S1PR4 の mRNA 発現の亢進が観察された。

(B) PAN 添加培養ポドサイトにおける S1P 関連分子 mRNA の発現解析。PAN 添加培養ポドサイトで S1PR3、S1PR4、SK1 の mRNA 発現が濃度依存性に上昇した。

### 図 3 Fingolimod の PAN 腎症における蛋白尿、血液生化学所見に対する効果

(A) 蛋白尿に対する効果。Fingolimod 投与群では蛋白尿が抑制された。

(B) 血液生化学所見に対する効果。Fingolimod 投与群では血清総コレステロール値の上昇が抑制された。

### 図 4 Fingolimod のスリット膜機能分子発現に対する効果

PAN 腎症(vehicle 群)でのスリット膜関連分子ネフリン、ポドシンの染色性の変化は、Fingolimod 投与により抑制された。

### 図 5 Fingolimod の培養ポドサイトのアクチン染色所見に対する効果

PAN 処理 (vehicle 群) でのアクチン染色所見の変化は、Fingolimod 前処理により抑制された。

### 図 6 Fingolimod の ROCK1 mRNA 発現に対する効果

PAN 処理 (vehicle 群) で ROCK1 mRNA の発現亢進が観察された。Fingolimod 前処理により ROCK1 の mRNA の発現増加が抑制された。

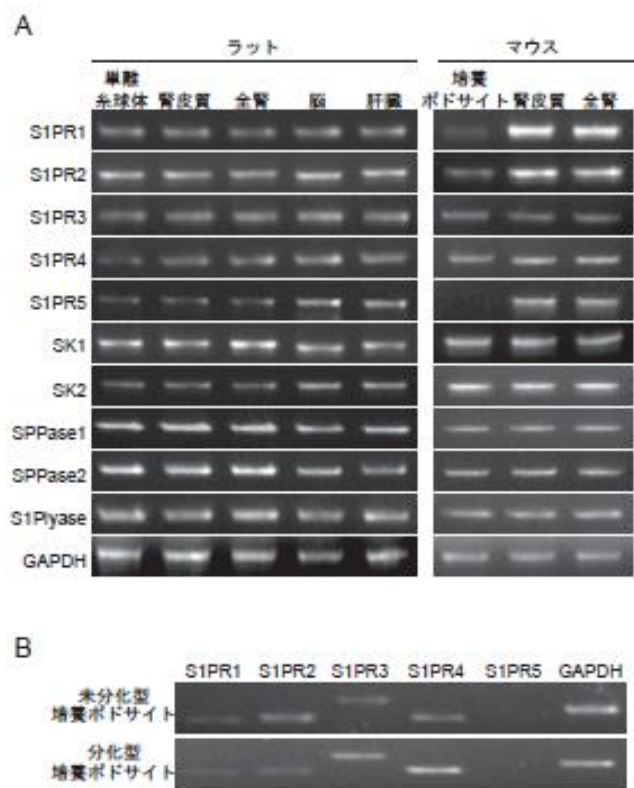
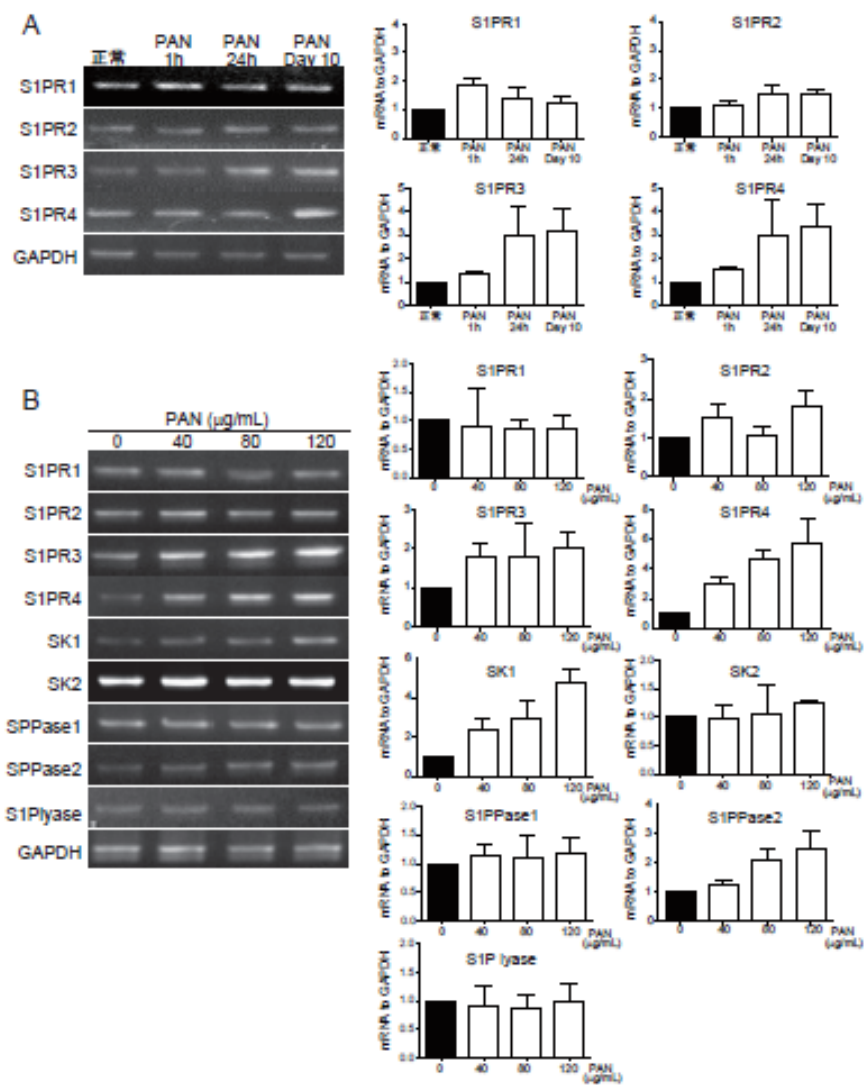
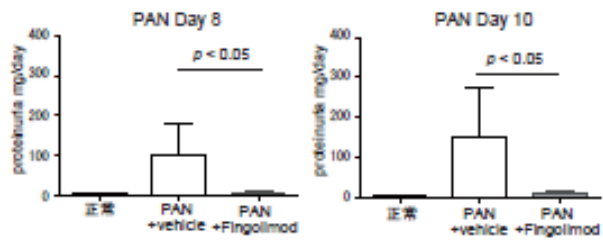


図 1



A



B

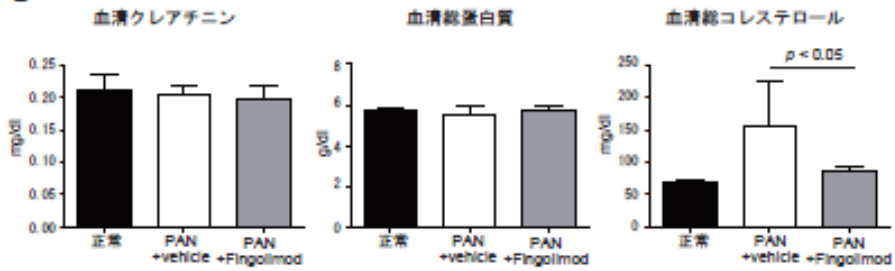


図 3

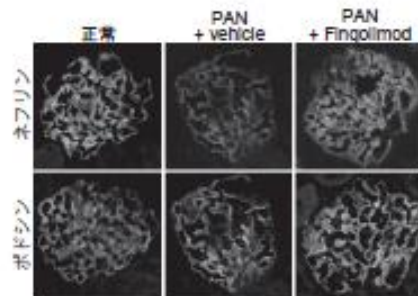


図 4

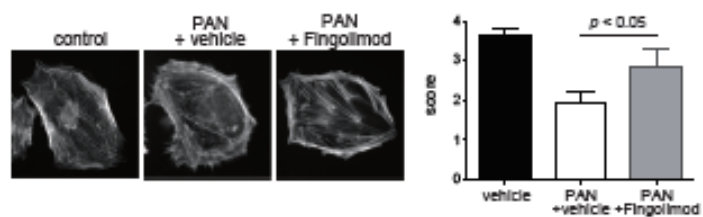


图 5

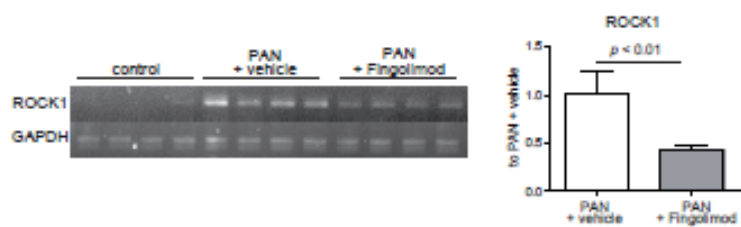


图 6