

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	金子 博司
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 596 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	微小変化型ネフローゼ症候群の病態発症機序, 診断マーカーの有用性についての検討 -ラット Puromycin aminonucleoside 腎症における各種ポドサイト機能分子の発現解析-
論文審査委員	主査 教授 山本 格 副査 教授 成田 一衛 副査 教授 河内 裕

博士論文の要旨

背景と目的: 微小変化型ネフローゼ症候群 (minimal change nephrotic syndrome: MCNS) は, 小児期ネフローゼ症候群の 70~80%を占める 1 次性ネフローゼ症候群の代表的な疾患である。約 90%はステロイド治療に反応し蛋白尿が改善することから一般的に寛解率が高い疾患と認識されている。しかし約 10%はステロイド抵抗性を示し難治性ネフローゼ症候群となる。成人では MCNS は全ネフローゼ症候群の 20~30%を占める疾患で, ステロイド抵抗性を示す割合は小児例より高くなると報告されている。難治例の早期の鑑別は重要な課題であるが未だ有用な診断法は確立されていない。最近の研究で, 多くの糸球体疾患における蛋白尿は糸球体上皮細胞 (ポドサイト) の機能異常により発症すると考えられてきている。MCNS の発症にもポドサイトの機能異常が関与していると考えられているが, その障害発症機序は十分に理解されていない。そこで申請者は, (1) MCNS の鑑別診断法, 難治例の早期診断法の確立, (2) MCNS の病態形成機序の解明に寄与することを目的として, MCNS のモデルとして多用されているラット puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症を用い, 各種ポドサイト機能分子の発現, 局在様式を免疫組織化学的手法を用いて詳細に解析した。

方法: PAN 腎症は 6 週齢の雌性 Wister ラットに 100 mg/kg 体重の 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, 5, 10 日後にそれぞれ屠殺し, 摘出した腎臓を蛍光抗体法の検討材料とした。コントロールとして上記と同用量の生理食塩水をラットに投与し同様の処置を行った。3・m に薄切した凍結切片を固定後, nephrin, podocin, NEPH1, CD2AP, ZO-1, podoplanin, synaptopodin, α 3-integrin および podocalyxin, 以上 9 つのポドサイト機能分子について糸球体における発現の検討を行う目的で単染色を行った。また, 分子間の局在様式を解析する目的で, CD2AP と nephrin, nephrin と podocin について二重染色を行った。各分子の発現変化の程度 (半定量的解析) は, 染色パターンの連続性の低下ならびに染色強度の低下が, 各糸球体において認められる領域の面積を基準に評価した。尿蛋白量は 24 時間尿を採取し 1 日尿蛋白量を表記した。

結果: 単染色における発現動態の検討で, 正常ラット糸球体では, nephrin, podocin, NEPH1, CD2AP,

ZO-1, synaptopodin および $\alpha 3$ -integrin は糸球体毛細血管壁に沿った連続的なパターンで観察された。podoplanin, podocalyxin は、より広い領域に局在しているのが観察された。

nephrin, podocin, ZO-1 は、病態誘導 5 日目、10 日目でいずれも不連続なパターンへと変化し染色強度も大きく低下した。podoplanin も同様に染色性が大きく低下した。NEPH1 および CD2AP の染色性は 5 日目でやや低下し、10 日目では大きく低下した。

各個体におけるポドサイト分子の発現変化の半定量的解析結果と尿蛋白量との関係について検討した。nephrin, podocin, ZO-1, podoplanin は、尿蛋白量 150mg/day 以上を示す個体で著明な発現変化（糸球体の 75%以上の領域で発現パターンの変化が見られる）が見られた。NEPH1, CD2AP は尿蛋白量が 300mg/day 以上を示す個体で著明な発現変化が見られた。

synaptopodin, $\alpha 3$ -integrin, podocalyxin は、いずれの時期においても発現の変化はほとんど確認されず、病態誘導 10 日目の 1 日尿蛋白量が 600 mg を超える個体においてもその発現は正常ラットと差がなかった。

二重染色での検討で、正常ラット糸球体では nephrin と podocin がほぼ一致して観察された。病態誘導 5 日目の糸球体では残存する nephrin と podocin は近傍に観察される部位が多く見られたが、10 日目では nephrin と podocin は乖離して局在している部位が多く見られた。

考察と結論：単染色における発現動態の検討で、nephrin, podocin, ZO-1, NEPH1, CD2AP の 5 つのスリット膜構成分子はいずれも病態誘導 5 日目の時点で既に発現の変化が確認されたが、その変化の程度は、nephrin, podocin, ZO-1 の 3 つの分子と NEPH1, CD2AP の 2 分子との間に明らかな差を認めた。次に各個体におけるポドサイト分子の発現変化の半定量的解析結果と尿蛋白量との関係について検討したところ、nephrin, podocin, ZO-1 は 1 日尿蛋白量が 150 mg を超える個体で著明な発現変化が見られ、NEPH1, CD2AP は 300 mg を超える個体でのみ著明な発現変化が見られた。これらの所見は、nephrin, podocin, ZO-1 の発現解析が MCNS の早期診断に有用で、NEPH1, CD2AP を合わせた解析により MCNS の病期、病勢の推測が可能であることを示している。

二重染色での検討で、nephrin と podocin の局在様式の検討を行った結果、尿蛋白量に依存して両分子の乖離が著明になることを観察した。両分子の乖離が蛋白尿の発症の要因として重要であると考えられた。今回の検討において、スリット膜構成分子以外のポドサイト機能分子である synaptopodin, $\alpha 3$ -integrin, podocalyxin は、観察期間中いずれの個体においても発現変化がほとんど見られなかったことから、PAN 腎症の病変はスリット膜部に限局していると考えられた。

MCNS の実験モデルを用いた今回の検討で、二重染色を含めた各種ポドサイト機能分子群の発現解析により、MCNS の病期、病勢の診断が可能であることが示された。

審査結果の要旨

微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) の発症にポドサイトの機能異常が関与していると考えられているが、その障害発症機序は十分に解明されていない。本研究は MCNS のモデルとして多用されているラット puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症を用い、(1) MCNS の重症度などの診断法の確立、(2) nephrin, podocin, NEPH1, CD2AP, ZO-1, podoplanin, synaptopodin, $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin の 9 つのポドサイト機能分子の発現動態の検討を目指した。

スリット膜構成分子の nephrin, podocin, ZO-1 は PAN 腎症誘導 5 日目で既に著明な染色強度の低下がみられたが、他のスリット膜構成分子である NEPH1 および CD2AP の染色性は 5 日目での変化は軽度で、10

日目で著明な低下を観察した。各個体におけるポドサイト分子の発現変化の半定量的解析結果と尿蛋白量との関係について検討した結果、nephrin, podocin, ZO-1, podoplanin は、尿蛋白量 150 mg/day の個体で著明な発現変化が見られたが NEPH1, CD2AP は尿蛋白量が 300 mg/day 以上を示す個体でのみ著明な発現変化が見られた。synaptopodin, α 3-integrin, podocalyxin は尿蛋白量が 600 mg/day を超える個体においても発現の変化は観察されなかった。二重染色での検討で蛋白尿の重症度に伴い nephrin と podocin の局在の乖離が顕著になることを観察した。

本研究により、PAN 腎症におけるポドサイト障害はスリット膜に限局していること、スリット膜変化は nephrin, podocin, ZO-1 が先行すること、nephrin と podocin の乖離が病態形成に重要であることが明らかにされた。

以上の点を明らかに点で、学位論文としての価値を認める。