

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	若松 彩子
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 687 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 23 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	Role of Calcineurin (CN) in kidney glomerular podocyte: CN inhibitor ameliorated proteinuria by inhibiting the redistribution of the CN at the slit diaphragm (腎糸球体上皮細胞におけるカルシニューリンの役割について -カルシニューリン阻害薬はスリット膜にあるカルシニューリンの局在変化を抑制することにより蛋白尿を改善する-)
論文審査委員	主査 教授 神吉 智丈 副査 教授 成田 一衛 副査 教授 福住 好恭

博士論文の要旨

【背景】カルシニューリン (calcineurin:CN) はCa/カルモジュリン依存性のセリン/スレオニン脱リン酸化酵素であり、触媒サブユニットのCNAとCa結合サブユニットのCNBからなっている。CN阻害薬はステロイド抵抗性のネフローゼ症候群などに使用されるが、CNの主な基質である Nuclear factor of an activated T cell (NFAT) の活性化を抑制することによりIL-2やIL-4などのサイトカイン産生を抑制し効果を示すと考えられてきた。近年、CN阻害薬が糸球体上皮細胞(ポドサイト)に直接作用することにより蛋白尿抑制効果があることが報告されたが、ポドサイトにおけるCNの役割、CN阻害薬投与の薬効機序は十分に解明されていない。

【目的】ポドサイトにおけるCNの機能を解明することを目的として、正常、並びにスリット膜障害モデルであるラット抗ネフリン抗体(anti-nephrin antibody:ANA)腎症モデルにおけるCNの発現動態を解析した。またANA腎症モデルでのCN阻害薬であるタクロリムスの投与による効果、CNの発現変化を検討した。【方法】正常ラット、ヒト、出生直後のラット糸球体切片をCNA抗体で蛍光免疫染色(IF)をおこなった。さらに各種糸球体細胞マーカー抗体、抗ネフリン抗体、抗ZO-1抗体、抗ポドカリキシン抗体、抗インテグリン α 3抗体との二重蛍光免疫染色を行った。正常ラット単離糸球体でのCNA α 、 β のmRNA発現をRT-PCR、蛋白発現をWestern Blot(WB)法にて解析した。CNAとネフリン、ZO-1との関係を検討するため正常ラット糸球体切片でDuolink法、単離糸球体材料で免疫沈降を行った。ANA腎症モデルを作成しポドサイトにおけるCNAの発現変化をIF、RT-PCR法にて解析した。続いてANA腎症モデルにタクロリムスを投与し、蛋白尿抑制効果、CNAの発現変化をIF法にて検討した。最後に臨床症例でCNA染色の検討を行った。

【結果】正常ラット、ヒト糸球体切片のIFにてCNAはポドサイトに線状に観察された。正常ラット単離糸球体、マウス培養ポドサイトでのRT-PCRでCNA α 、 β の発現を認め、WB法にて約60kDaにCNAの発現を認めた。二重染色では、CNAはネフリンおよびZO-1と共染色を認め、毛細管形成期糸球体の分化途上の

ポドサイトでも CNA はネフリンと共染色を認めた。CNA とネフリンの結合を正常ラット糸球体切片で Duolink 法にて検討したところ陽性反応を認め、両分子が 40 nm 以内に近傍に位置することを確認した。単離糸球体 lysate を用いて CNA 抗体で免疫沈降を行ったところネフリン、ZO-1、ポドシンの発現を認めた。ANA 腎症モデル 5 日目の糸球体切片で CNA の染色性は半定量的な検討で有意に低下し不連続な塊状のパターンに変化していた。二重染色では CNA とネフリン、ZO-1 が共染色される部分が減少し乖離していた。また、CNA α の mRNA 発現の有意な低下を認め、Real-time PCR でコピー数の低下を確認したが、CNA β は有意な変化を認めなかった。ANA 腎症 1 時間モデルで CN 活性を測定したところ上昇を認めた。タクロリムスを ANA 腎症モデルに投与したところ 3 日目で有意に蛋白尿を抑制した。5 日目の糸球体切片での CNA、ネフリンの半定量的な染色性の検討ではタクロリムスは有意に染色性の低下を抑制していた。ANA 腎症 1 時間モデルのタクロリムス投与、非投与群では FITC 抗マウス抗体の染色を同様に認めた。臨床症例の検討として 10 歳男児（ステロイド抵抗性微小変化型ネフローゼ症候群）の腎生検切片で IF を行ったところ、ポドカリキシンは正常糸球体と比較し変化がなかったが、CNA は染色性の低下を認めた。

【考察】本研究では正常ラット、ヒト糸球体にて CNA がポドサイトに発現しており、ネフリン、ZO-1、ポドシンと結合体を形成しスリット膜構成分子の一つであると考えられた。スリット膜構成分子である ZO-1 には CN の結合モチーフの LXVP 配列が存在している。ZO-1 は NEPH1 と結合し、NEPH1 はネフリンと結合していることが報告されており、CN は ZO-1 や NEPH1 を介してネフリンと結合していることが想定される。ANA 腎症モデルでは糸球体での CN 活性が上昇しており、蛋白尿の出現や CNA、ネフリンの染色性の低下を認め mRNA の解析から CNA α が関与していると考えられ、これらはタクロリムスを投与することで抑制された。ANA 腎症モデルでタクロリムス投与、非投与群で FITC 抗マウス抗体の染色は差がないことから、両群で ANA のポドサイトへの結合量に差がないことが確認されている。タクロリムスは ANA 結合により誘導されるネフリン、CNA の局在変化、CN の活性化を抑制することでスリット膜障害を防ぎ蛋白尿を抑制していると考えられた。臨床症例においてスリット膜での CN の発現を評価することは CN 阻害薬の感受性を知る重要なマーカーとなりえると考えられる。

審査結果の要旨

糸球体上皮細胞（ポドサイト）におけるカルシニューリン（Calcineurin:CN）の役割は不明な点が多い。申請者は、正常およびスリット特異的障害モデルである抗ネフリン抗体腎症糸球体でのカルシニューリン触媒ユニット（CNA）の局在、発現動態、蛋白尿における CN 阻害薬（tacrolimus : Tac）の効果について検討した。

正常ラット、ヒト糸球体の抗 CNA 抗体による蛍光免疫染色で CNA はポドサイトのスリット膜近傍に局在していた。抗 CNA 抗体による免疫沈降ではネフリン、ZO-1、ポドシンとの結合がみられた。抗ネフリン抗体腎症の糸球体では CN 活性が上昇しており、蛋白尿の出現や CNA、ネフリンの染色性の低下、染色パターンの変化を認め CNA α の mRNA が低下していた。Tac を抗ネフリン抗体腎症モデルに投与したところ有意に蛋白尿を抑制し、CNA、ネフリンの染色性の低下を抑制した。

すなわち、CNA はスリット膜部に発現し、ネフリン、ZO-1、ポドシンと結合性を有しスリット膜構成分子の一つであると考えられた。抗ネフリン抗体腎症で、CN 活性の上昇、ネフリン、CNA α の発現変化を認め、蛋白尿発症に関与していると考えられた。また Tac は抗ネフリン抗体の結合により誘導される CN の活性化を抑制しスリット膜障害を防ぎ蛋白尿を抑制していることを示唆した。以上より本論文は CN の糸球体構造および機能維持における新たな役割を明らかにした点で、学位論文の価値があると判断した。