

氏名(本籍)	井上 薫(岐阜県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第99号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	Studies on the roles of angiogenic factors in the glomeruli on the progression and recovery of anti-Thy-1 nephritis. (抗Thy-1腎炎の進行・寛解における糸球体での血管新生因子の役割に関する研究)
論文審査委員	(主査) 代田 欣二 (副査) 野村 靖夫 村上 賢 山田 隆紹

論文内容の要旨

[背景]

糸球体腎炎は、ヒトや動物の腎臓病の中で非常に重要な疾患の一つであり、その発症や進行のメカニズムは複雑である。近年、様々なサイトカインが本疾患の進行に関わっていることが示唆されており、これらサイトカインの役割を明らかにすることは、その進行のメカニズムの解明や、治療法の確立に重要であると考えられている。腎炎研究においては、従来、これらサイトカインが、その進行・進展にどのような役割を果たしているかに焦点が当てられてきたが、近年、本疾患の寛解メカニズムやそれに関わるサイトカインについても注目されつつある。そこで、著者は、障害された糸球体の再構築にとって重要と考えられる内皮細胞およびメサンギウム細胞(Mes細胞)に増殖刺激を持つとされるサイトカインの中から、血管新生因子である血管内皮増殖因子(VEGF)と線維芽細胞増殖因子-2(FGF-2)に注目した。

VEGFは、血管内皮に存在する2つの特異的レセプター、flk-1、flt-1に結合し、血管内皮細胞増殖、血管透過性亢進作用を示すサイトカインである。ヒトVEGFは、アミノ酸数が異なる少なくとも5つのアイソフォーム(VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆)、の存在が示されているが、ラットでは少なくとも3つの、ヒトよりアミノ酸が1つ少ないアイソフォーム(VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈)が存在する。一方、FGF-2は、様々な細胞での発現が認められており、高新和性レセプターFGFR-1~4に結合し、増殖因子、血管新生因子、走化性因子などとして作用する。

ラット抗Thy-1腎炎は、Mes細胞表面に存在するThy-1抗原に対する抗体を単回投与すると、メサンギウムの融解病変が生じ、次いでMes細胞を中心とした高度な細胞増殖反応が認められた後、糸球体

がほぼ元の形態に修復する寛解型腎炎モデルである。VEGFは糸球体上皮細胞、活性化、Mes細胞や浸潤白血球に、flk-1は糸球体内皮細胞、活性化Mes細胞に局在し、本モデルの糸球体再構築に関わっていることが示唆されている。特に、本モデルでは、増殖病変の主体を成す活性化Mes細胞で産生されたVEGFが、糸球体構造の修復に深く関わるとの報告がある。しかし、これまでの報告では、糸球体局所におけるVEGF、flk-1の解析は厳密に行われておらず、その役割は必ずしも明らかではない。また、FGF-2は、糸球体修復の早期に内皮細胞増殖に関わることが報告されているものの、詳しい検討は行われていない。

そこで本研究では、厳密な糸球体分離法と糸球体局所での遺伝子発現の定量的解析条件を確立し、抗Thy-1腎炎の糸球体修復におけるVEGF/flk-1およびFGF-2/FGFRの動態を明らかにし、その役割について考察した。

[第1章]

The methodological investigation for isolation of the renal glomeruli to evaluate local gene expression. (糸球体局所における遺伝子発現解析のための糸球体単離についての方法論的研究)

腎臓からの糸球体単離法として、以前から主に糸球体細胞培養のために利用されてきたSieving method (S法) や、近年、レーザーによる組織切片からの組織採取法として開発された異なる2種の方法、Laser Capture Microdissection (LCM) 法、Laser Microdissection (LMD) 法があるが、これらはmRNAの定量的解析や糸球体障害の研究にはほとんど応用されていない。そこで、本章ではこれらの方法により正常ラット腎糸球体を単離し、遺伝子発現解析までの操作、結果について比較検討した。

S法では、大きさが異なる3種のステンレスメッシュを用いて糸球体を回収した。また、新鮮凍結切片を作製し、LCMまたはLMDシステムにより、糸球体を30～1000個採取した。各々回収した糸球体を材料として、reverse transcribed-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によりハウスキーピング遺伝子であるglyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) mRNAを検出した。

その結果、S法では多くの糸球体を回収できたが、他組織の混入を回避できなかった。また、GAPDH mRNAの発現は確認されたが、全RNAの回収量は一定せず、糸球体の単離過程でRNAの変性が起こり易いと思われた。LMD法では、正確に糸球体を回収でき、50個の糸球体から高い再現性をもってGAPDH mRNA発現を検出できた。一方、LCM法では正確に糸球体を回収できたが、糸球体からのRNA抽出効率やRT-PCR法の結果もLMD法に劣っており、糸球体サンプル採取法としてLMD法が最も優れていた。

[第2章]

Detection of gene expression of VEGF and flk-1 in the renal glomeruli of the normal rat kidney using the laser microdissection system. (レーザーマイクロダイセクション法を用いた正常ラット腎糸球体における VEGF と flk-1 遺伝子発現の検出)

VEGF とその特異的レセプター flk-1 の障害糸球体再構築時における動態を知るため、本章では糸球体における VEGF/flk-1 遺伝子発現の定性的、定量的解析の条件を検討した。

正常ラット腎皮質から、LMD 法により糸球体 10～200 個を採取し、全 RNA 抽出後、RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により VEGF、flk-1、GAPDH mRNA 発現の定性的、定量的解析の条件を検討した。

その結果、糸球体 10 個以上で VEGF、GAPDH について定量的解析は可能で、100 個以上で安定したデータが得られることが明らかになった。また、flk-1 の定量的解析には、VEGF、GAPDH 解析時の 2 倍量の糸球体 200 個由来全 RNA が必要であった。

[第3章]

The role of VEGF and flk-1 on the recovery of the glomerular structure in anti-Thy-1 nephritis. (抗 Thy-1 腎炎の腎糸球体再構築における VEGF と flk-1 の役割)

第 1、2 章により確立した方法により、本章では、ラット抗 Thy-1 腎炎における VEGF、flk-1 の糸球体内での動態を検索した。

8 週齢雄の Wistar ラットにウサギ抗 Thy-1 抗体を 0.5ml/100g/B.W. 尾静脈より単回投与し、抗 Thy-1 腎炎を惹起した。対照群には、正常ウサギ血清を同量投与した。投与後 3、7、14、28、56 日に腎臓を採取し、病理組織学的検索、免疫染色による VEGF、flk-1 の局在などの検索、LMD 法による糸球体採取 (200 個/1 個体) とリアルタイム PCR 法による VEGF、flk-1 mRNA 発現の定量、*in situ* hybridization (ISH) 法による VEGF mRNA の局在検索を行った。

抗体投与後 3 日には糸球体メサンギウムに融解性変化、7 日には顕著な Mes 細胞主体の細胞増殖性変化が確認された。14 日の糸球体には増殖病変が認められるものや構造が修復されつつあるものが混在し、56 日には糸球体構造はほぼ修復されていた。免疫染色により、実験期間を通して対照群、実験群ともに VEGF は糸球体上皮細胞のみに、flk-1 は血管腔が開いている部分の糸球体内皮細胞のみに認められた。また、投与後 7 日の Mes 細胞主体の増殖病変内には VEGF、flk-1 ともに認められなかった。VEGF mRNA 発現量は、抗体投与後 3 日で対照群より有意に減少し、7 日には最低レベルを示した。その後有意な増加を示し、28 日に対照群と同レベルとなった。flk-1 の mRNA 量は、投与後 7 日に有意に減少したが、14 日には対照群と同じレベルに戻り、28 日には対照群より有意に高くなり、56 日には再び対照群と同レベルに戻った。ISH 法による観察では、VEGF mRNA は、観察期間を通して対照群、

実験群ともに糸球体上皮細胞のみに認められたが、シグナル強度の変化は認められなかった。また、Mes細胞主体の増殖病変内には発現していなかった。

以上より、本モデルの糸球体再構築において、Mes細胞にはVEGF、flk-1の発現を認めず、細胞増殖期にこれらの遺伝子発現レベルが最低であったことから、Mes細胞によるVEGFのオートクライン的作用と内皮細胞に対するパラクライン的作用はほとんどなく、VEGF発現を認めた上皮細胞とflk-1発現を認めた内皮細胞間でのパラクライン的作用が作動し、内皮細胞増殖を促進し、糸球体修復に関与することが示唆された。

[第4章]

The role of fibroblast growth factor-2 and its receptor on the recovery of the glomerular structure in anti-Thy-1 nephritis. (抗Thy-1腎炎の糸球体再構築におけるFGF-2とその特異的レセプターの役割)

VEGFと同様に、血管新生因子のFGF-2とそのレセプターについて、抗Thy-1腎炎における動態を検討した。

ラット抗Thy-1腎炎の腎サンプルを用いて、血管内皮マーカーRECA-1、FGF-2、FGFRの免疫染色を行い、糸球体における内皮細胞の変化とFGF-2/FGFRの局在を観察した。また、LMD法で採取した糸球体を用いて、リアルタイムPCR法によりFGF-2 mRNA発現を定量した。

RECA-1陽性細胞は、抗体投与後3日より糸球体構造の崩壊とともに減少し、投与後7日には増殖性病変辺縁に残存する糸球体毛細血管にわずかに認められたが、投与後14日以降にみられる糸球体の修復とともに増加し、多くの小さな血管腔が徐々に認められるようになった。形態学的に糸球体構造がほぼ修復した投与後56日には、RECA-1陽性細胞に囲まれた多くの血管腔が認められ、対照群とほぼ同様の所見を示した。FGF-2は対照群、実験群の内皮細胞、一部の糸球体上皮細胞に、FGFRは両群の糸球体内皮細胞のみに認められた。Mes細胞主体の増殖病変部にはFGF-2、FGFRともに認められなかった。FGF-2 mRNAは投与後3日に最低レベルを示し、その後有意に増加し投与後14日以降対照群と同レベルとなった。

以上より、ラット抗Thy-1腎炎においてFGF-2、FGFRは、ともにMes細胞に発現していなかったことから、VEGF同様、Mes細胞におけるオートクライン的作用と内皮細胞に対するパラクライン的作用はほとんどなく、FGF-2がメサンギウム増殖に関与する可能性が低いことが明らかになった。また、FGF-2は糸球体内皮細胞と上皮細胞に、FGFRは糸球体内皮細胞に発現し、FGF mRNAレベルが糸球体修復の早期から増加していたことから、本モデルの寛解過程においてFGF-2は内皮細胞に対しオートクライン/パラクライン的に作用してその増殖を促し、糸球体修復に関与することが示唆された。

[総括]

腎皮質からの有効な糸球体分離法と糸球体局所における遺伝子発現量の厳密な解析法を確立した。

この方法を用いて、従来の研究から血管再生、血管内皮増殖に強い作用を持つとされる VEGF、FGF-2 の抗 Thy-1 腎炎における障害糸球体の再構築に対する役割を解析し、糸球体局所におけるこれらの遺伝子発現量が、本モデルの病変の推移とともに変化することを初めて示した。また、過去の報告では、この2つの増殖因子が Mes 細胞により産生され、内皮細胞や Mes 細胞に増殖性変化をもたらすとされていたが、そうした可能性は低いことを示した。さらに、VEGF は、糸球体上皮細胞からパラクライン的に、FGF-2 はオートクライン／パラクライン的に糸球体内皮細胞に作用してその増殖を促し、糸球体再構築に役割を担うことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

糸球体腎炎は、ヒトや動物の重要な腎臓疾患の一つである。その多くは、進行性であり、経過とともに腎臓の機能が低下しやがて廃絶する。この、糸球体障害の進行には、様々な生理学的あるいは免疫学的なメカニズムが複雑に関わっているとされるが、中でもサイトカインの役割は大きいものと考えられている。したがって、これらサイトカインの役割を明らかにすることが、糸球体障害の進行のメカニズムの解明や、治療法の確立に重要であると考えられ、これまで多くの研究が行われている。一方、ヒトや動物の糸球体腎炎や実験腎炎の中には寛解するものがあり、本研究は、むしろこの寛解メカニズムを解明する事が、新たな治療法につながる事になるとの考えから着手されている。

糸球体腎炎の寛解プロセスは、病理形態学的には障害された糸球体毛細血管が修復されることと考えられることから、本研究は血管内皮細胞の増殖、血管再構築に関与する血管新生因子である血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor、以下 VEGF) と線維芽細胞増殖因子-2 (Fibroblast growth factor-2、以下 FGF-2) の糸球体修復、再構築における役割に注目している。

VEGF は、血管内皮に存在する特異的レセプター、flk-1、flt-1 に作用し、血管内皮細胞増殖、血管透過性亢進作用を示すサイトカインである。ラットでは少なくとも3つのアイソフォーム (VEGF₁₂₀、VEGF₁₆₄、VEGF₁₈₈) が存在し、腎臓における主なレセプターは flk-1 とされている。FGF-2 は、様々な細胞での発現が認められており、増殖因子、血管新生因子、走化性因子などとして高親和性レセプター FGFR に作用する。

本研究では、ラットに抗 Thy-1 抗体投与後、一旦球体構造が崩壊した後、メサンギウム細胞を主体とした細胞増殖反応が起こり、経過とともに糸球体構造が修復、再構築されるラット抗 Thy-1 腎炎を寛解型糸球体腎炎モデルとして用いている。本モデルの糸球体再構築に VEGF が関わっていることはすでに報告されており、増殖病変の主体を成すメサンギウム細胞で産生された VEGF が、糸球体構造の修復に関わることが示唆されている。しかし、これまでの報告では、糸球体局所における VEGF、flk-1 の厳密な解析は行われておらず、その役割は必ずしも明らかではない。また、FGF-2 は、糸球体修復の早期に内皮細胞増殖に関わることが報告されているものの、詳しい検討は行われていない。

そこで本研究では、まず、糸球体分離法と糸球体局所での遺伝子発現の定量的解析条件を確立し、これらの方法を用いて、抗 Thy-1 腎炎の糸球体修復における VEGF/flk-1 および FGF-2/FGFR の動態を

明らかにし、その役割について考察している。本論文は下記の4章で構成され、英文で書かれている。

第1章では、糸球体局所における遺伝子発現解析についての方法論的研究を行っている。すなわち、腎臓からの糸球体分離法として、以前から用いられている Sieving 法、組織切片からレーザーを用いて組織を採取する方法として近年開発された、Laser Capture Microdissection (LCM) 法および Laser Microdissection (LMD) 法について比較検討し、これまで遺伝子発現の定量的解析や糸球体障害の研究にほとんど応用されていなかった LMD 法が、本研究における糸球体採取法として最も優れている事を明らかにした。

第2章では、LMD 法により採取した正常ラットの腎糸球体を用い、糸球体局所における VEGF および flk-1 遺伝子発現の定性的解析、リアルタイム PCR 法による定量的解析の実験条件を検討し、VEGF、GAPDH についての定量的解析は糸球体 10 個を出発材料として行う事が可能であるが、100 個を採取して解析すれば、安定した再現性の高いデータが得られること、flk-1 については糸球体における発現量が低いため、定量的解析には VEGF、GAPDH の 2 倍の糸球体由来 cDNA が必要である事を示した。本章において行われた LMD 法による糸球体採取とそれを用いた遺伝子発現の定量化は、腎炎研究においては本研究が最初のものであり、この内容の一部は 2003 年に誌上发表されている (Inoue, K., Sakurada, Y., Murakami, M., Shirota M. and Shirota, K. : Detection of gene expression of VEGF and flk-1 in the renal glomeruli of the normal rat kidney using the laser microdissection system. *Virchows Archiv* 442: 159-162, 2003)

第3章では、Wistar ラットに抗 Thy-1 抗体 (抗 Thy-1 腎炎実験群) ないし正常ウサギ血清 (コントロール群、以下 Cr 群) を投与し、それらの腎臓について、第1、2章により確立した方法による VEGF、flk-1 遺伝子発現の定量解析、*in situ* hybridization 法による VEGF mRNA の局在検索、病理形態学的検索、免疫組織化学的検索を行い、ラット抗 Thy-1 腎炎における VEGF、flk-1 の糸球体局所での動態を抗体投与後 3 日から 56 日まで検索している。その結果、免疫組織化学的検索では、Cr、実験両群において VEGF は糸球体上皮細胞のみに、flk-1 は血管腔が開いている部分の糸球体内皮細胞のみに局在し、メサンギウム細胞主体の増殖病変内には VEGF、flk-1 とともに局在が認められない事を示した。VEGF mRNA 発現量は、糸球体メサンギウムに融解性病変が顕著に観察される抗体投与後 3 日に有意に減少し、顕著な細胞増殖病変が確認された 7 日には最低レベルとなり、その後増加し 28 日には Cr 群と同レベルに戻り、糸球体構造がほぼ修復された 56 日までそのレベルが維持されることを示した。一方、flk-1 の mRNA 量については、投与後 7 日に有意に減少したが、糸球体に増殖病変と構造修復が混在する 14 日に Cr 群と同レベルに戻り、28 日には Cr 群より有意に高く、56 日には Cr 群同レベルに戻ったことを示した。また、*in situ* hybridization 法により、VEGF mRNA は観察期間を通して Cr 群、実験群ともに糸球体上皮細胞のみに局在し、メサンギウム細胞主体の増殖病変内には発現しない事を明らかにした。

第4章では、ラット抗 Thy-1 腎炎において、FGF-2 の蛋白は、Cr、実験両群の内皮細胞、一部の糸球体上皮細胞に、FGFR の蛋白は、両群の内皮細胞のみに発現しており、メサンギウム細胞主体の増殖

病変部にはこれらの蛋白が発現していない事を示した。また、糸球体局所における FGF-2 mRNA の定量により、投与後3日にそのレベルが最低値を示すものの、その後増加し、投与後14日以降は Cr 群と同レベルとなることを明らかにした。なお、免疫組織学的検索で、本腎炎の細胞増殖病変内にはほとんど内皮細胞が存在しないことも確認している。

以上、本研究では、腎皮質からの糸球体分離法と糸球体局所における遺伝子発現量の厳密な解析法を確立し、その実験方法によって、従来の研究から血管再生、血管内皮増殖に強い作用を持つとされる VEGF、FGF-2 の抗 Thy-1 腎炎における動態を観察し、糸球体局所におけるこれらの遺伝子発現量が、本モデルの病変の推移とともに変化することを初めて示した。また、過去の報告では、この2つの増殖因子がメサンギウム細胞により産生され、内皮細胞やメサンギウム細胞に増殖性変化をもたらすとされていたが、そうした可能性は低いことを明らかにし、VEGF は糸球体上皮細胞からパラクライン的に、FGF-2 はオートクライン／パラクライン的に糸球体内皮細胞に作用し、その増殖を促すことにより、糸球体再構築に役割を担うことを示唆している。

本研究において著者は技術的な困難さを克服し、上記のような多くの新知見を見いだした。本研究の成果は、抗 Thy-1 腎炎の寛解メカニズムの解明に大きく貢献するのみならず、今後のヒトや動物の腎炎治療に示唆を与えるものとしても高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい業績と判定した。