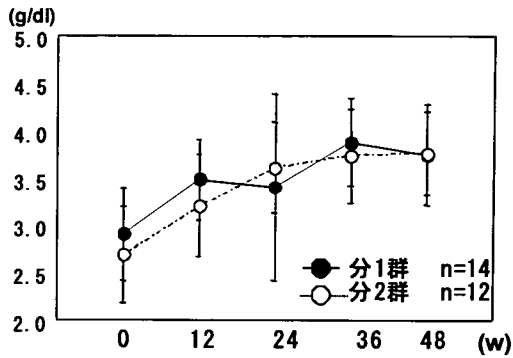


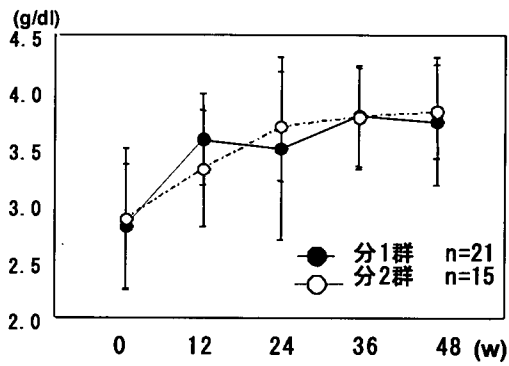
膜性腎症



分1群 性別 男:女=7:7
 年齢 50.6±14.4歳(平均±SD)

分2群 性別 男:女=7:5
 年齢 56.9±6.9歳

膜性腎症+FGS

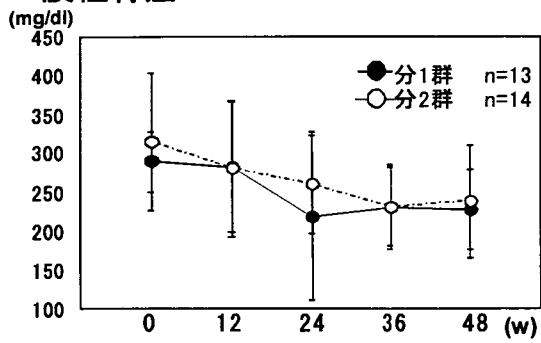


分1群 性別 男:女=10:11
 年齢 47.7±15.9

分2群 性別 男:女=8:7
 年齢 56.7±11.6

図7 PSLとCyA併用療法における血清アルブミンの群間比較

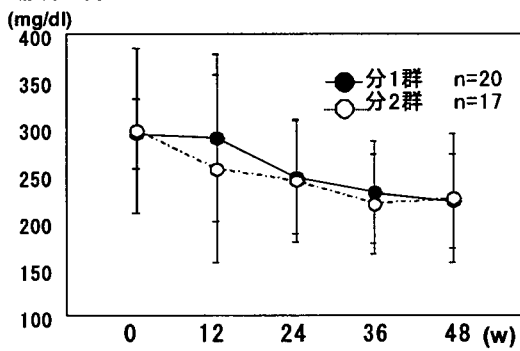
膜性腎症



分1群 性別 男:女=7:6
 年齢 50.4±15.0歳(平均±SD)

分2群 性別 男:女=9:5
 年齢 55.6±7.9歳

膜性腎症+FGS



分1群 性別 男:女=10:10
 年齢 47.4±16.2

分2群 性別 男:女=10:7
 年齢 55.6±11.7

図8 PSLとCyA併用療法における血清総コレステロールの群間比較

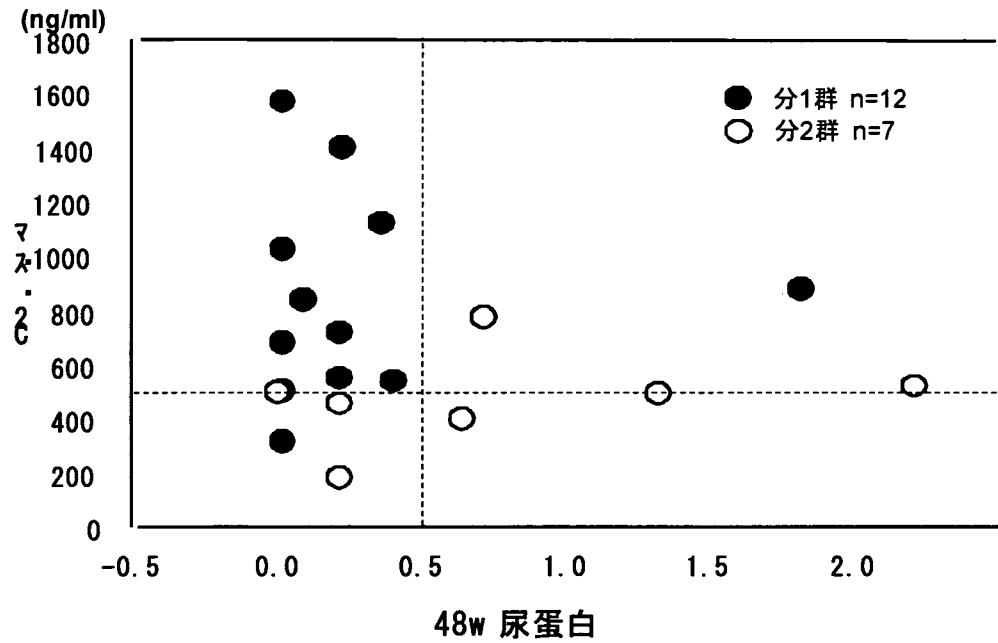


図9 PSLとCyA併用療法における48週後の尿蛋白と平均C2値

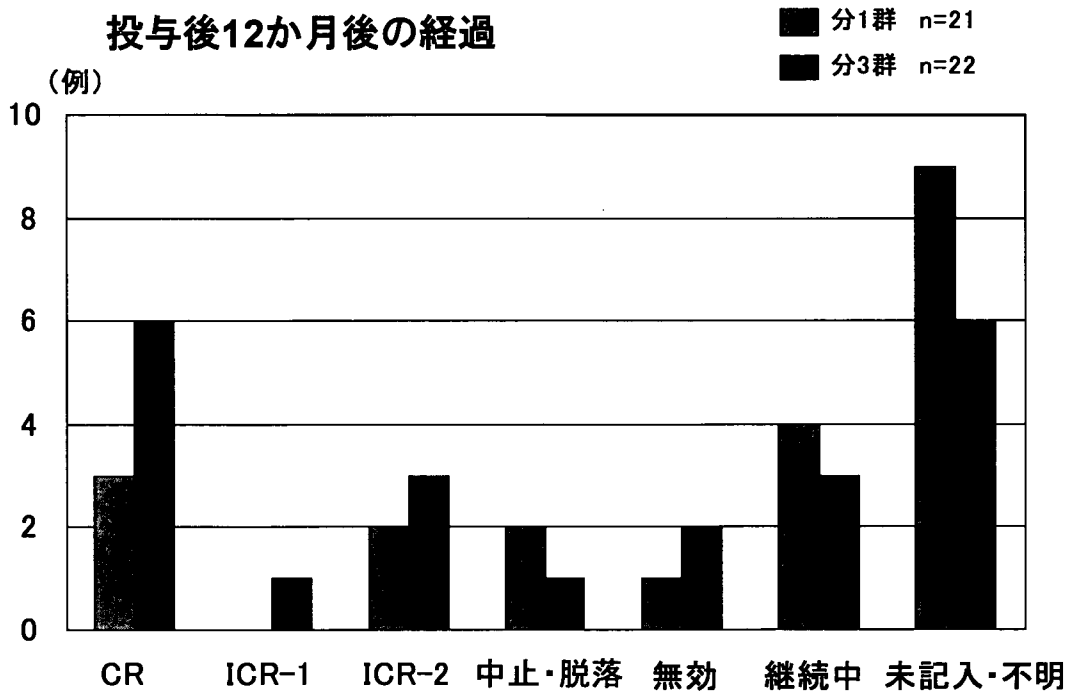


図10 PSLとMZR併用療法における膜性腎症登録症例の現況

表3 PSL+MZR併用療法継続中の症例

継続中

分1群 4例 開始より 2ヶ月 1例
 3ヶ月 2例
 6ヶ月 1例

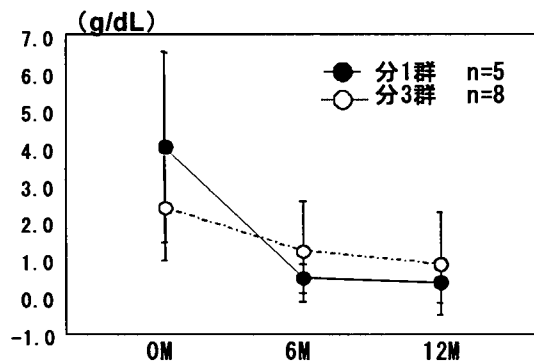
分3群 3例 開始より 2ヶ月 1例
 3ヶ月 2例

中止・脱落

分1群 2例 効果不十分あるいは全く認められない 1例
 合併症の発現(3M) 1例

分3群 1例 合併症の発現(2M) 耳鳴り 1例

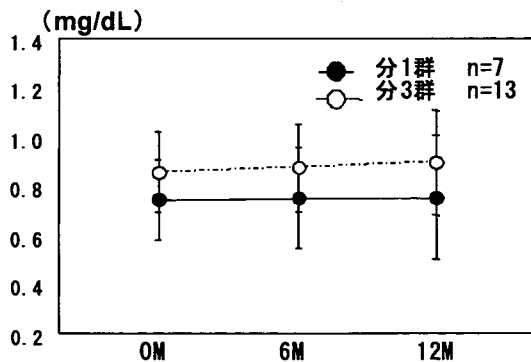
尿蛋白



分1群 性別 男:女=3:2
 年齢 51.0±11.4歳(平均±SD)

分3群 性別 男:女=5:3
 年齢 62.1±6.7歳

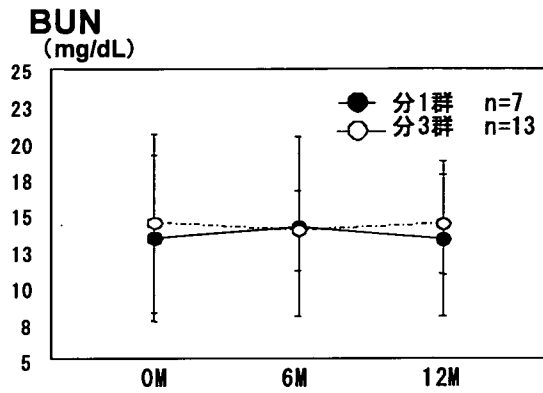
血清クレアチニン



分1群 性別 男:女=5:2
 年齢 54.3±11.1歳(平均±SD)

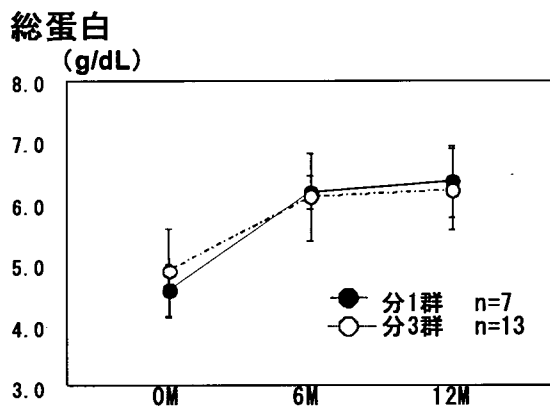
分3群 性別 男:女=10:3
 年齢 59.6±7.1歳

図11 PSLとMZR併用療法における尿蛋白と血清クレアチニンの群間比較



分1群 性別 男:女=5:2
 年齢 54.3±11.1歳(平均±SD)

分3群 性別 男:女=10:3
 年齢 59.6±7.1歳

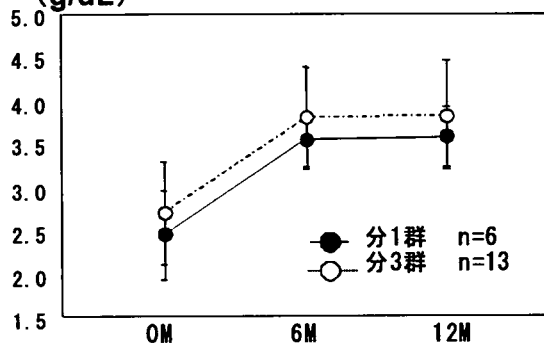


分1群 性別 男:女=5:2
 年齢 54.3±11.2歳(平均±SD)

分3群 性別 男:女=10:3
 年齢 59.6±7.2歳

図12 PSLとMZR併用療法におけるBUNと血清総蛋白の群間比較

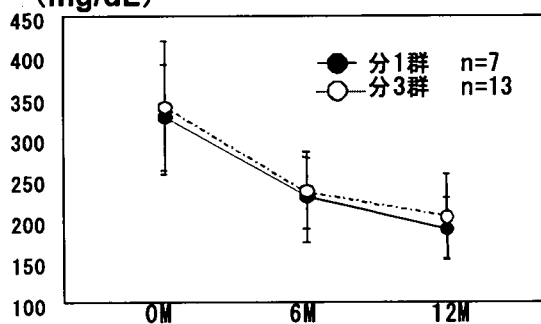
血清アルブミン
(g/dL)



分1群 性別 男:女=5:1
 年齢 57.5±7.7歳(平均±SD)

分3群 性別 男:女=10:3
 年齢 59.6±7.1歳

総コレステロール
(mg/dL)



分1群 性別 男:女=5:2
 年齢 54.3±11.1歳(平均±SD)

分3群 性別 男:女=10:3
 年齢 59.6±7.2歳

図13 PSLとMZR併用療法における血清アルブミンと血清総コレステロールの群間比較

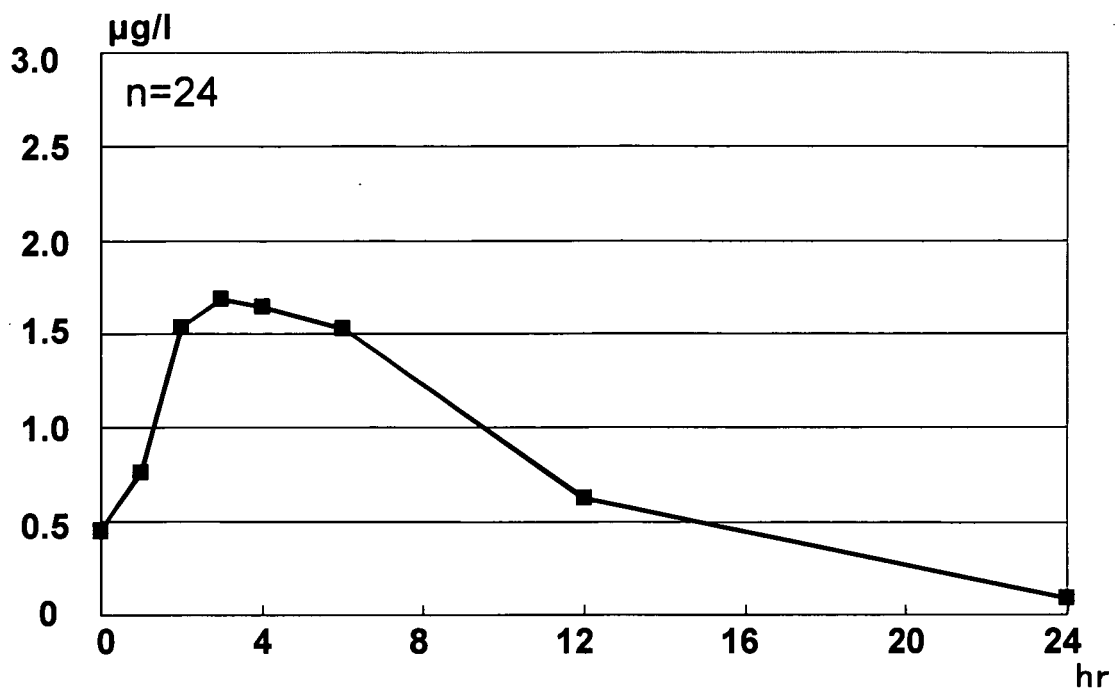


図14 ミゾリピン平均血中濃度曲線

表4 ミゾリビンの至適投与量

$$C2 = 1.24 - 0.02 \times GFR(MDRD) + 0.55 \times MZR(mg/kg)$$

$$|R|=0.56$$

Tmax: C2 = 2 (μg/l)とすると

$$MZR(mg/kg) = (0.02 \times GFR(MDRD) + 2 - 1.24) / 0.55$$

CKD stage	GFR(ml/min)	MZR(mg/kg)
1	≥ 90	4.65
2	60-89	3.56
3	30-59	2.47
4	15-29	1.92
5	<15	-

表5 シクロスポリン使用・腎生検アンケート調査

1) 使用症例数	428例 (31例/施設)	
2) 投与量	1.5mg/kg (MCNS)(ときに3mgまで) 2~3mg/kg (MGN, FSGS)	
3) 投与期間	6ヵ月	2施設
	12ヵ月	2施設
	24ヵ月	6施設
	25ヵ月以上	7施設
	不明	1施設
4) 腎生検症例	52例(8施設)	
5) 腎生検目的	腎機能障害疑い、長期使用のため	
6) CyA腎症診断例	34例	平均投与期間 43ヵ月
軽微	9例	27ヵ月
軽症	20例	47ヵ月
中等症	4例	22ヵ月
重症	1例	120ヵ月

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「ループス腎炎における糸球体病変に対するフラクタルカイン発現および
CD16 陽性単球浸潤の関与」

研究協力者 岩野 正之

奈良県立医科大学第1内科講師

共同研究者 中谷公彦, 吉本宗平, 椎木英夫, 斎藤能彦

奈良県立医科大学第1内科

研究要旨

ループス腎炎に対するフラクタルカイン(Fkn)とCD16陽性単球(CD16+Mo)浸潤の関与についてヒト腎生検標本を用いて検討した。対象はSLEと診断され、腎生検を施行しえた96例である。WHOループス糸球体腎炎の分類により、対象を3群（WHOI/II/IV）に分類し、腎糸球体でのFkn発現とCD16+Mo浸潤の程度を免疫組織学的手法およびLCMとreal-time PCR法を用い検討した。Fkn発現とCD16+Mo浸潤はWHOIV型で有意に上昇していた。またFkn発現の程度とCD16+Mo浸潤数は有意な正相関を示した。ループス腎炎、特に管内増殖型糸球体腎炎の進展にFknおよびFknを介し浸潤したCD16+Moが関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ループス腎炎、特に管内増殖型糸球体腎炎(ループス腎炎 WHOIV型)では、糸球体内への炎症細胞浸潤が著明であり、炎症細胞浸潤がループス腎炎の増悪因子である。糸球体内への炎症細胞浸潤には様々な接着分子やケモカインが関与していることが示唆されている。今回、ケモカインの一つであるフラクタルカイン(Fkn)に焦点を当て、ループス腎炎の発症・進展に対する関与について検討する。また、フラクタルカインのターゲット細胞と報告されているCD16陽性単球(CD16+Mo)の糸球体内への浸潤とループス腎炎の病像との関係についても検討する。

B. 研究方法

対象は、当科でSLEと診断され、腎生検を施行しえた96例である(男性15例,女性81例,平均年齢 34.05 ± 13.5 歳)。対象をWHOループス糸球体腎炎の分類に従いI型(9例),II型(45例),IV型(42例)の3群に分類した。糸球体内Fkn発現は、抗ヒトFkn抗体(R&D社)で免疫染色を施行し、その発現程度を評価した。さらに、Laser capture microdissection (LCM)法を用い、糸球体病変でのFknのmRNA発現量をreal-time PCR法で定量解析した。糸球体内CD16+Mo数は、抗ヒトCD16抗体(DAKO社)で免疫染色を施行し、陽性細胞数を測定した。さらに、腎生検時

の臨床検査所見と糸球体内 CD16 陽性細胞数との相関を検討した。

(研究の倫理面への配慮)

腎生検の際には、血清および病理検体を研究目的に使用する可能性を説明し、書面で同意を取得した。研究内容に関しては、本学 IRB にて承認されている。

C. 結果

1. ループス腎炎での Fkn 発現

Fkn は糸球体メサンギウム域および係蹄壁で発現が認められた。また発現の程度は、WHO I 型や II 型に比し有意に IV 型で高かった。LCM による Fkn mRNA 発現量の解析でも IV 型で発現量は有意に高かった。しかし、II 型は、I 型に比し Fkn 発現の有意な上昇は認められなかった。

2. ループス腎炎での糸球体内 CD16+Mo 数

糸球体内の CD16+Mo は、WHO I 型や II 型に比し、IV 型で有意に増加していた (WHO I/II/IV: 0.67 ± 0.42 , 1.08 ± 0.78 , 3.5 ± 4.33)。

3. 糸球体内 Fkn 発現と CD16+Mo 数との相関

糸球体内での Fkn 発現の程度と CD16+Mo 数は有意な正相関を認めた ($r=0.32$, $p=0.03$)。

4. 糸球体内 CD16+Mo 数と臨床検査所見との相関

糸球体内 CD16+Mo 数は蛋白尿 ($r=0.29$, $p<0.01$)、血清抗 DNA 抗体価 ($r=0.17$, $p=0.01$)、Immune complex (IC) ($r=0.29$, $p<0.01$) と有意な正相関、また血清補体価 ($r=-0.34$, $p<0.01$)、血清アルブミン値 ($r=-0.27$, $p<0.01$) とは有意な負相関を示した。

D. 考察

Fkn は、膜結合型蛋白と可溶性蛋白と 2 種類の性格を持つことで接着分子としての機能も有する新しいケモカインである。腎炎との関連も多く報告されている。今回、ループス腎炎に対する Fkn の関与を明らかにした。ループス腎炎、その中でも管内増殖型糸球体腎炎 (WHO IV 型) に対する Fkn の関与が示唆された。単球の中で CD16+Mo は、proinflammatory cytokine をより強く産生し、炎症の key molecule として作用するとして注目されている。さらに、最近、CD16+Mo は、Fkn レセプターをより強く発現することで、Fkn により遊走されやすいことが報告された。今回、我々は、ループス腎炎での CD16+Mo 浸潤についても検討した。WHO IV 型で糸球体内への CD16+Mo 浸潤数が有意に多く、さらに Fkn 発現と CD16+Mo 浸潤は有意な正相関を示した。また、糸球体内の CD16+Mo 浸潤数は SLE の活動性と有意な正相関を示した。つまり、ループス腎炎では、管内増殖型糸球体腎炎の発症・進展に対し、Fkn を介した CD16+Mo の浸潤が関与する可能性が示唆された。今後は、動物実験モデルを用い、糸球体病変に対する CD16+Mo や Fkn の経時的な関与を解析するとともに、Fkn がループス腎炎の治療ターゲットとなり得るかを検討する必要がある。

E. 結論

ループス腎炎、特に管内増殖型糸球体腎炎で Fkn の発現が有意に高かった。また、糸球体内 CD16+Mo は、管内増殖型腎炎で有意に増加しており、Fkn を介した CD16+Mo の浸潤がループス腎炎の進展に

関与する可能性が示唆される。

Involvement of fractalkine in proliferative
lupus nephritis

F. 健康危険情報

第 48 回日本腎臓学会学術総会, 2005 年

特記事項はない

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

1) 中谷公彦, 吉本宗平, 藤井博司, 寺田美穂,
岩野正之, 椎木英夫, 能勢真人, 斎藤能彦
ループス腎炎におけるフラクタルカインの
関与

第 46 回日本腎臓学会学術総会, 2003 年

2) K. Nakatani, S. Yoshimoto, H. Fujii, M.
Terada, M. Nagasaki, M. Iwano, H. Shiiki, Y.
Saito, M. Nose

Contribution of fractalkine expression to the
development of experimental lupus nephritis

World Congress of Nephrology(WCN)
International Society of Nephrology

17th congress, 2003.

3) 吉本宗平, 中谷公彦, 浅井修, 赤井靖宏, 西
野俊彦, 椎木英夫, 岩野正之, 能勢真人, 斎藤能
彦

ループス腎炎における CD16 陽性細胞の糸
球体病変への関与

第 47 回日本腎臓学会学術総会, 2004 年

4) 吉本 宗平, 中谷 公彦, 浅井 修,
長谷川 均, 岩野 正之, 原田 幸児, 赤
井 靖宏, 西野 俊彦, 椎木 英夫, 能勢
真人, 斎藤 能彦

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「糸球体硬化の進展における FSP1 陽性ポドサイトの意義」

研究協力者 岩野 正之

奈良県立医科大学第 1 内科講師

共同研究者 山口通雅、鮫島謙一、中谷公彦、齋藤能彦

奈良県立医科大学第 1 内科

研究要旨

ポドサイトにおける fibroblast-specific protein 1 (FSP1) の発現が糸球体硬化の進展に関与するか否かを検討した。微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)38 例、巣状糸球体硬化症(FSGS) 31 例、糖尿病性腎症(DMN)109 例を対象とした。糸球体内 FSP1 および尿細胞中 FSP1 の発現を免疫染色法で検討した。FSP1 mRNA の局在および糸球体内発現量も検討した。FSP1 陽性ポドサイトは、MCNS に比し FSGS および DMN で有意に増加していた。分節状硬化病変や結節性病変を呈する糸球体では、FSP1 陽性ポドサイト数が増加したが、全節状硬化病変では FSP1 陽性ポドサイトは認められなかった。結節性病変を呈する糸球体では、FSP1 陽性ポドサイトの基底膜からの剥離が認められた。さらに、尿中ポドサイトの 80%以上が FSP1 陽性であった。ポドサイトにおける FSP1 の発現が EMT を惹起し、基底膜からのポドサイト剥離を誘導し、糸球体硬化の進展に関与することが示唆された。

A. 研究目的

ポドサイト障害が糸球体硬化の進展に関与することが、多くの基礎的検討から証明されている。また、糖尿病性腎症や IgA 腎症では、ポドサイト数の減少が糸球体病変の進展に関与することが示唆されている。さらに、様々な腎疾患において、尿中に検出されるポドサイト数と疾患活動性に関連があることが報告されている。以上より、ポドサイトの基底膜からの剥離が糸球体硬化の進展と関与することが示唆されている。本研究では、ポドサイトの剥離に Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT) が関与するか

否かを検討する目的で、EMT のマーカーの一つである fibroblast-specific protein 1 (FSP1) のポドサイトにおける発現を検討した。

B. 研究方法

対象は、当科に入院あるいは通院中の微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)38 例、巣状糸球体硬化症(FSGS) 31 例、糖尿病性腎症 109 例である。腎生検パラフィン切片を用いて、FSP1 とコラーゲン・タイプ IV の発現を 2 重免疫染色で検討した。腎生検凍結切片を用いて、FSP1 とシナプトポジンの

発現を2重免疫染色で検討した。MCNSとFSGSに対しては、Laser capture microdissection (LCM)法を用い、糸球体病変でのFSP1 mRNAの発現量をreal-time PCR法で定量解析した。また糖尿病性腎症患者を対象に、全例から随時尿を採取し、尿中細胞をサイトスピンでスライドグラス上に固定後、FSP1とポドカリキシンの2重染色を実施した。

(研究の倫理面への配慮)

研究内容は、本学IRBにて承認されている。全患者から研究参加に対する書面による同意を取得している。

C. 結果

1. MCNSとFSGSにおけるFSP1の糸球体内発現

MCNSの糸球体内にはFSP1陽性細胞がほとんど認められなかった。FSGSでは、糸球体基底膜の外側にFSP1陽性細胞が認められ、シナプトポジンとの2重染色から、FSP1陽性細胞はポドサイトであることが明らかになった。

FSP1陽性細胞数は、分節状硬化病変のある糸球体において有意に多かった。

LCMとreal-time PCR法での定量的解析から、FSGSにおける糸球体内FSP1 mRNA発現量はMCNSに比して有意に高いことが明らかになった。

2. 糖尿病性腎症におけるFSP1の糸球体内発現

糖尿病性腎症においても、FSP1とシナプトポジンとの2重染色からFSP1陽性ポドサイトが認められることが確認された。びまん性病変の進展や結節性病変の出現と

ともにFSP1陽性ポドサイト数は増加した。結節性病変を複数認める糸球体では、FSP1陽性ポドサイトの基底膜からの剥離が認められた。また、全節性硬化病変を呈する糸球体では、FSP1陽性ポドサイト数が有意に減少した。

糖尿病性腎症患者の尿中には、FSP1陽性ポドサイトが認められ、臨床病期が進むにつれて、尿中FSP1陽性ポドサイト数は有意に増加した。また尿中ポドサイトの86%がFSP1を発現していた。

D. 考察

FSGSの硬化病変を呈する糸球体や糖尿病性腎症の結節性病変を有する糸球体で、FSP1陽性ポドサイトが増加していることから、これらの病変の出現にFSP1陽性ポドサイトが関与することが示唆される。また、糸球体から剥離したFSP1陽性ポドサイトが認められることと尿中にFSP1陽性ポドサイトが検出されることから、FSP1陽性ポドサイトは基底膜から剥離しやすいと考えられる。FSP1の発現は細胞運動能を活発にするなどの線維芽細胞様変化に関与することから、EMT様の変化がポドサイトに生じた結果、ポドサイトが糸球体基底膜から剥離したと推測される。

E. 結論

ポドサイトにおけるFSP1の発現がEMTを惹起し、基底膜からのポドサイト剥離を誘導し、糸球体硬化の進展に関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項はない。

G. 知的所有権の出現登録状況

なし。

H. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

1) 鮫島謙一、中谷公彦、吉本宗平、浅井修、原田幸児、木村久仁子、山口通雅、赤井靖宏、西野俊彦、椎木英夫、岩野正之、斎藤能彦

巣状糸球体硬化症における糸球体内 FSP1 陽性細胞の役割

第 49 回日本腎臓学会学術総会

2006 年

2) 岩野正之、山口通雅、豊田雅夫、木村久仁子、原田幸児、赤井靖宏、吉本宗平、浅井修、中谷公彦、西野俊彦、鈴木大輔、久保篤史、金内雅夫、斎藤能彦

糖尿病性腎症の進展における FSP1 陽性ポドサイトの意義

第 49 回日本腎臓学会学術総会

2006 年

3) 山口通雅、岩野正之、久保篤史、木村久仁子、原田幸児、中谷公彦、吉本宗平、浅井修、西野俊彦、赤井靖宏、金内雅夫、斎藤能彦

糖尿病性腎症の臨床病期と尿中 FSP1 陽性ポドサイトの関連について

第 49 回日本腎臓学会学術総会

2006 年

4) Yamaguchi Y, Iwano M, Toyoda M, Nakatani K, Kimura K, Akai Y, Harada K, Suzuki D, Kanauchi M, Neilson EG, Saito Y.

Podocyte expression of fibroblast- specific

protein 1 in diabetic nephropathy of type 2 diabetes.

The 39th Annual Meeting of the American Society of Nephrology.

2006 年

5) Samejima K, Nakatani K, Iwano M, Yoshimoto Y, Asai O, Sakan H, Yamaguchi Y, Kimura K, Harada K, Akai Y, Shiiki H, Neilson EG, Saito Y.

Podocyte expression of fibroblast- specific protein 1 (FSP1) is a valuable tool for early diagnosis of focal segmental glomerulosclerosis .

The 39th Annual Meeting of the American Society of Nephrology.

2006 年

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「間質線維化の進展における HIF-1 α の関与」

研究協力者 岩野正之
奈良県立医科大学第1内科・講師
共同研究者 木村久仁子、山口通雅、斎藤能彦

研究要旨

Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α)は低酸素応答で中心的役割を果たす転写因子であるが、間質線維化との関連を証明した報告は少ない。われわれは、HIF-1 α が間質線維化の進展に直接的に関与するか否かを明らかにするために、尿細管上皮細胞特異的に HIF-1 α 遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス(HIF-1 $^{-/-}$ マウス)および HIF-1 α の分解に重要である von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL)遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス(VHL $^{-/-}$ マウス)を作製し、各種実験腎炎における腎病変を検討した。さらに、HIF-1 α インヒビター(YC-1)を用いて、腎間質線維化に対する新しい治療法の開発を試みた。本研究から、尿細管上皮細胞における HIF-1 α の発現は間質線維化進展に重要な役割を果たすことが示された。また、HIF-1 α の活性抑制は間質線維化の新しい治療法として期待される。

A. 研究目的

間質線維化の進展には、慢性低酸素状態が関与すると考えられている。低酸素応答で中心的役割を果たす Hypoxia-Inducible Factors (HIF)の中で腎臓での発現が確認されているのは HIF-1 と HIF-2 である。HIF は 20% O₂ 条件でユビキチン・プロテオソームシステムを介して分解される α サブユニットと恒常的に発現している β サブユニットから構成される転写因子であり、その下流には血管形成、嫌気性解糖、細胞増殖やアポトーシスに関与する多くの遺伝子群が存在する。腎臓では虚血再還流モデルなどの急性低酸素モデルで、HIF が腎保護的に働くことが報告されているが、慢性腎臓病

(CKD)の進展に重要である慢性低酸素状態における HIF の役割は明らかではない。尿細管上皮細胞では、HIF-1 が主たる低酸素応答因子であることが知られている。HIF-1 の下流には epithelial-mesenchymal transition (EMT)を促進する遺伝子群が存在することも報告されていることから、HIF-1 が間質線維化を誘導する可能性も考えられる。本研究では、間質線維化の進展における HIF-1 の役割を明らかにするために、尿細管上皮細胞特異的に HIF-1 α 遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス(HIF-1 $^{-/-}$ マウス)および HIF-1 α の分解に重要である von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL)遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウス

(VHL^{-/-} マウス)を作製し、各種実験腎炎における腎病変を検討した。

B. 研究方法

1. Cre-loxP システムを用いて、尿細管上皮細胞特異的に HIF-1 α 遺伝子を欠損させたマウス (HIF-1^{-/-}) と VHL 遺伝子を欠損させたマウス (VHL^{-/-}) を作製した。これらのマウスに一側尿管結紮 (UUO) モデルおよび 5/6 腎摘モデルを作製し、腎病変を経時的に検討した。
2. HIF-1^{-/-} マウスとコントロールである HIF-1^{+/+} マウスから尿細管上皮細胞の初代培養系 (HIF-1⁻TEC と HIF-1⁺TEC) を確立した。両細胞を低酸素下 (1%O₂) に培養し、EMT 関連因子の発現を検討した。さらに、細胞運動能を cell scratch assay を用いて検討した。
3. 8 週齢 C57/BL6 マウスに UUO モデルを作製した。一側尿管を結紮した翌日から連日、HIF-1 のインヒビターである YC-1 (30 μ g/g) あるいは vehicle を腹腔内投与し、10 日目に sacrifice し、腎病変を検討した。

C. 結果

1. HIF-1^{-/-} マウスとコントロールである HIF-1^{+/+} マウスに UUO モデルを作製した。尿管結紮後 8 日目に sacrifice し、腎病変を比較した。HIF^{-/-} マウスでは、間質線維化面積が有意に減少しており、FSP1 陽性線維芽細胞数も有意に減少していた。

VHL^{-/-} マウスと VHL^{+/+} マウスに 5/6 腎摘を施行して 20 週後に腎病変を比較した。VHL^{-/-} マウスでは VHL^{+/+} マウスと比較して、尿細管間質の FSP1 陽性線維芽細胞数が有意に増加し、I 型コラーゲンの蓄積も高度

であった。また、VHL^{-/-} マウスでは有意な尿蛋白の上昇と軽度の腎機能低下が認められた。さらに、高齢 (60 週齢以上) VHL^{-/-} マウスの腎臓では、間質線維化の進展が認められた。

2. HIF-1⁺TEC を 1%O₂ 下に培養すると、細胞形体が紡錘形に変化し、上皮系細胞マーカーである ZO-1 の発現低下と間葉系細胞マーカーである α SMA と FSP1 の発現上昇が認められた。さらに、細胞運動能に関する lysyl oxidase の発現亢進も認められ、scratch assay における細胞運動能の亢進も検出された。HIF-1⁻TEC を用いた場合は、1%O₂ 下で培養しても、上記のような現象は認められなかった。

3. YC-1 の投与により、一側尿管結紮モデルに認められる FSP1 陽性細胞の増加および間質線維化は有意に抑制されていた。

D. 考察

尿細管上皮細胞における HIF-1 α 遺伝子発現を欠損させることで間質線維化の進展が抑制され、VHL 遺伝子を欠損させて HIF-1 α の発現を安定化することで間質線維化が悪化したことから、HIF-1 は間質線維化進展の主誘因となると考えられる。また、培養系の実験から、HIF-1 は epithelial-mesenchymal transition (EMT) を介して線維化の誘導に関与することが示唆される。

E. 結論

尿細管上皮細胞における HIF-1 α の発現は間質線維化進展に重要な役割を果たすことが示された。HIF-1 α の活性抑制は間質線維化の新しい治療法として期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 知的所有権の出現登録状況

なし。

H. 研究発表

1. 論文発表

1) Higgins DF, Kimura K, Iwano M (他 10名). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 117(12):3810-3820, 2007

2) Yoshimoto S, Nakatani K, Iwano M (他 9名). Elevated levels of fractalkine expression and accumulation of CD16⁺ monocytes in glomeruli of active lupus nephritis. *Am J Kidney Dis.* 50(1):47-58, 2007

3) Higgins DF, Kimura K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle*, in press.

2. 学会発表

1) 木村久仁子、岩野正之、山口通雅、原田幸児、中谷公彦、久保篤史、赤井靖宏、金内雅夫、斎藤能彦

近位尿細管上皮細胞特異的 VHL 欠損マウスを用いた間質線維化の検討

第 50 回日本腎臓学会学術総会

2007 年

2) 岩野正之、山口通雅、木村久仁子、原田幸児、中谷公彦、赤井靖宏、久保篤史、金内雅夫、斎藤能彦

糖尿病性腎症の進展におけるポドサイトの epithelial-mesenchymal transition (EMT) の関与について

第 50 回日本腎臓学会学術総会

2007 年

3) 木村久仁子、岩野正之、斎藤能彦
シンポジウム；慢性腎疾患進行の低酸素機序：間質線維化の進展における HIF-1 α の役割

第 37 回日本腎臓学会西部学術大会

2007 年

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「各種蛋白尿関連因子がヘパラン硫酸硫酸転移酵素群の発現とヘパラン硫酸プロテオグリカンのN-硫酸化部位に与える影響」

研究協力者 佐藤博、中山謙二、杉浦章、名取泰博*
東北大学病院腎・高血圧・内分泌科、*国立国際医療センター

研究要旨

ヘパラン硫酸 (HS) プロテオグリカン (PG) はその側鎖硫酸基により糸球体基底膜の荷電選択性を規定している。この硫酸化はHS硫酸転移酵素群に制御されるが、蛋白尿関連メディエーター刺激がこれら酵素発現に与える影響を培養ラット糸球体上皮細胞で検討したところ、IL-13、IL-10およびアンジオテンシンIIにより硫酸転移酵素の一つNDST-1の発現が減少し、さらにIL-13ではHSPGのHS側鎖数を変化させることなくHSのN-硫酸化部位を減少させることが確認された。NDST-1を介したHSの硫酸化部位の変化がcharge barrierの破綻に寄与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヘパラン硫酸 (HS) プロテオグリカンはその側鎖硫酸基により糸球体基底膜において荷電選択性を規定している。この硫酸化は、硫酸化されていない2糖繰り返し構造に対する N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 (NDST-1)によるグルクロン酸の脱アセチル化および硫酸化から始まり、C5-epimerase、2-O-sulfotransferase (2-OST)、6-OST、3-OSTの順に酵素反応が進行して硫酸化が行われる。また、蛋白尿に関連するメディエーターとしてTh2サイトカイン、アンジオテンシンII (AII) などが知られているが、これらとHS硫酸化機構が何らかの相互作用を有することが想定されている。我々はすでにラットネフローゼモデルにおいてHS硫酸化のkey enzymeであるNDST-1およびN-硫酸化HSが減少することを報告している

が (J Lab Clin Med, 2004)、今回、その機序の詳細を明らかにするために、蛋白尿発現に関わる各種メディエーター刺激によるNDST-1の発現、およびHS鎖のN-硫酸化部位の変化を検討した。

B. 研究方法

培養ラット糸球体上皮細胞 (Yamabe H, et al: Nephrol Dial Transplant, 8: 519, 1993) に、ラットIL-13、IL-4、IL-10、およびアンジオテンシンII (AII) 等をメディウム添加して刺激し、一定時間後にRNAおよび蛋白を抽出しNDST-1発現の変化を定量的RT-PCRおよびWBにて測定した。さらにN-硫酸化部位を認識する10E4抗体を用いて免疫細胞染色および半定量的解析を施行した。

C. 結果

IL-13 刺激 24hr 後の NDST-1 mRNA 発現は用量依存性に低下した (IL-13 10ng/ml で $73.2 \pm 7.8\%$ of control、 $p < 0.05$)。IL-10、A II の刺激でも 4hr で NDST-1 mRNA 発現低下が見られたが IL-4 および TNF- α 、LPS、IL-1 beta では変化を認めなかった。

NDST-1 蛋白発現も IL-13、IL-10、A II の刺激で減少した。

HS 側鎖の N-硫酸化部位を認識する 10E4 抗体での免疫細胞染色を行ったところ、control では細胞周囲、細胞外基質への強い染色がみられたが、IL-13、IL-10、A II の刺激で染色性の低下が認められた。酵素抗体法を用いた半定量解析にて、IL-13 刺激で優位に 10E4 抗体の染色性が低下した (コントロール群: 8.15 ± 2.61 vs. IL-13 群: 4.88 ± 2.67 , $P < 0.01$)。さらに、ヘパリチネース消化後の露出抗原である不飽和ウロン酸残基を認識する 3G10 抗体での半定量解析では染色性の低下を認めず、HS 側鎖数への影響はなかった。

D. 考察

今回の結果から IL-13、IL-10 等の Th2 サイトカインおよび AII が、NDST-1 の発現を減少させ、さらに IL-13 で HS 側鎖数に変化を与えずに N-硫酸化部位を減少することが示された。NDST-1 は硫酸転移酵素群の律速酵素であり、引き続きおこる他の硫酸化部位の減少も考えられた。

E. 結論

IL-13、IL-10 等の Th2 サイトカインおよび AII による蛋白尿発現に、NDST-1 による HS 硫酸化部位の減少が関与する可能性が

示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的所有権の出現登録状況

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Nakayama K, et al.: Altered expression of NDST-1 messenger RNA in puromycin aminonucleoside nephrosis. J Lab Clin Med, 143: 106-114, 2004

2. 学会発表

杉浦章、他：ヘパラン硫酸硫酸転移酵素の蛋白尿関連サイトカインによる発現変化。第 48 回日本腎臓学会学術総会、横浜、2005

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

腎疾患患者における頸動脈壁弾性特性の測定
—「高精度超音波ドプラ法」の有用性—
研究協力者 佐藤博、杉浦章、伊藤貞嘉
(東北大学病院 腎・高血圧・内分泌科)

研究要旨

慢性腎不全は心血管イベントのリスクファクターとして認識されている。本研究では、腎不全時の動脈硬化病変を評価する目的で、新しく開発された高精度超音波ドプラ法を用いて慢性腎不全患者の頸動脈壁弾性特性を計測し、動脈硬化の程度を評価した。その結果、本法によって計測される弾性特性 E_r は、腎機能 (eGFR) の低下とともに高値を示し、多変量解析でも唯一 eGFR が E_r と有意に相関した。eGFR < 30ml/min 以下の群における原疾患別の検討では、 E_r 値は慢性腎炎群に比較して糖尿病性腎症群で有意に高値を示した。本手法を用いることで早期の動脈硬化病変や腎不全特有の石灰化病変を描出することが可能であった。慢性腎不全患者の血管病変の評価に際し、高精度超音波ドプラ法による弾性特性の計測が非常に有用と考えられた。

A. 研究目的

透析患者の多くが心血管イベント (CVD) で死亡することが以前から知られていたが、その前段階である保存期腎不全においても腎機能障害の進行とともに CVD が増加することが明らかとなり、動脈硬化病変管理の重要性が指摘されている。評価法として従来から頸動脈エコーで計測される内中膜複合体厚 (IMT) が有用とされてきたが、壁肥厚のない早期病変や中膜石灰化等が評価できない欠点があった。近年東北大学で開発された高精度超音波ドプラ法 (位相差トラッキングエコー) は、超音波を利用して一心拍

中の血管壁微小領域の厚み変化 (0.2 μ m の精度で検出) と血圧から弾性特性 (E_r) を測定し、動脈壁の組織性状 (硬さ・軟らかさ) を非侵襲的かつ定量的に診断するシステムである (Kanai H, et al. *Circulation*, 107: 3018-20, 2003)。これを用いて慢性腎不全患者における頸動脈壁の弾性特性について研究した。

B. 研究方法

2003 年からの 3 年間に当科入院した 70 名 (男 42 名、女 28 名) の腎疾患症例を対象に (平均年齢 58.4 歳、原病は糖尿病 54%、慢性糸球体腎炎