総 説

リウマチ性疾患におけるポドサイトの研究

梶 山 浩

Podocyte research in rheumatic diseases

HIROSHI KAJIYAMA

Department of Rheumatology and Applied Immunology, Faculty of Medicine, Saitama Medical University

(Received January 11, 2011)

summary

Podocytes are glomerular visceral epithelial cells, which function as molecular sieve with foot process (FT) and slit diaphragm (SD) spanning FT, not to allow high molecular weight protein to be filtrated through glomerular capillary loop. Pathological proteinuria is caused by disordinated tertiary podocyte structure such as disappearance of FT and/or SD, and irreversible glomerular sclerosis is caused by podocyte loss due to cell death and/or detachment from capillary wall. With recent advance of nephrological research technology such as podocyte cell culture system, genetically engineered transgenic mice with podocyte-specific regulation of gene expression, podocyte-associated biomarkers, the new isolation method of glomeruli, laser capture microdissection, multiphoton imaging and extracellular flux analyzer, new findings of pathogenesis of glomerular lesions will be expected, not only in primary glomerulonephritis, but also in secondary glomerulonephritis or glomerulopathy due to rheumatic diseases.

Key words—podocytes; podocytopenia; cell line; transgenic mouse; podocyte-associated biomarkers

抄 録

ポドサイト（腎糸球体臓側上皮細胞）は、一次突起、足突起（二次突起）、足突起間のスリット膜からなる高次構造を保ち、血中からの高分子蛋白漏出を防ぐ分子篩として機能する。ポドサイト高次構造異常は、病的蛋白尿の原因となり、糸球体係蹄壁からの脱落や細胞死によるポドサイト数の低下は、不可逆的腎機能低下の原因となる。自己免疫性疾患に併発する腎症には、ループス腎炎、顕微鏡的多発血管炎に伴う毛細血管炎（半月体形成性腎炎、腎間質毛細血管炎）、シェーグレン症候群の間質性腎炎、IgG4 関連間質性腎炎、AA 腎アミロイドーシス、強皮症腎等があり、各々、不可逆的な腎機能低下を来すが、ポドサイト障害の関与については不明な点が多い。

近年、培養ポドサイト細胞株、ポドサイト特異的遺伝子発現制御トランスジェニックマウス、ポドサイト関連バイオマーカー、新糸球体分離法、laser capture microdissection 法、multiphoton imaging, extracellular flux analyzer の登場により、ポドサイト障害機序の解析手法が飛躍的に進歩した。これらの手法により、今後、原発性腎炎におけるポドサイト障害は固より、リウマチ性疾患に於けるポドサイト障害も明らかになり、腎糸球体障害分子機序、ポドサイト障害分子機序の新知見が期待される。

はじめに

ポドサイトは腎糸球体臓側上皮細胞 (Fig. 1-3) で、糸球体内皮細胞 (Fig. 1-1)、糸球体基底膜 (Fig. 1-2) と共に、高分子蛋白の漏出を防ぐ分子篩として機能する。ポドサイトは primary process (P) から foot process (FP) と呼ばれる突起を出し (Fig. 1)、隣のポドサイトの FP と柵状にかみ合い、その FP 間に位置する slit diaphragm (SD)

(Fig. 1 上段右矢印, Fig. 1 下段模式図) を形成する。この FP-SD の構造を正常に保つ事で、尿中への病的蛋白漏出を防ぐ。様々なストレスにより糸球体性蛋白尿が出現する時、多くの場合、FP は消失、或は、その幅 (Fig. 1 上段右と下段模式図の FP の幅) が、正常なら 500–600 nm のところ、1000 nm 以上に拡大する、という構造異常を呈している。更にストレスが加わると、ポドサイトは細胞死に陥るか、尿中へ脱落すると考えられている。

腎実質障害による腎機能低下の原因は、組織学的には、二つに大別される。糸球体硬化と尿細管間質

Figure 1. Podocyte images of scanning electron microscopy and the simplified scheme of glomerular capillary wall consisting of glomerular endothelial cells, basement membrane and podocyte foot process and slit diaphragm. Images were modified and reproduced from reference (60) and (61).

線維化である。糸球体硬化に深く関連するのが、ポドサイトの細胞死、尿中への脱落によるポドサイト数の減少（podocytopenia）であり¹⁾、尿細管間質線維化では、尿細管上皮細胞の epithelial-mesenchymal transition²⁾ と腎間質線維芽細胞の増殖と線維基質産生³⁾が、病態を考える上で重要である。本稿では、近年のポドサイト研究の進歩と、そのリウマチ性疾患における腎障害機序解明への応用に関して論ずる。

I. 何故リウマチ性疾患の腎障害でポドサイト研究なのか

本題に入る前に、何故、リウマチ性疾患の腎障害においてポドサイト研究なのかを述べたい。

腎機能低下による透析患者総数は依然として増加の一途を辿っている。日本透析医学会透析調査委員会による 2009 年末の慢性透析患者に関する基礎集計によると⁴⁾、2009 年年末における透析患者総数は、290,675 人であり、新規透析導入患者と死亡数を差し引いた年間患者増加数は 1 万人前後であるので、間もなく透析患者総数は 30 万人を越す。新規導入患者総数の増加鈍化傾向や（2009 年の新規透析導入患者数は、初めて減少に転じている）、透析導入患者の平均年齢上昇には、近年の慢性腎臓病の管理、治療の進歩が反映されていると考えられるが、維持透析患者総数減少には程遠く、更なる腎機能低下の病態理解と、新規治療法の開発が求められる。

透析新規導入患者と総透析患者に於ける原疾患の

割合に於いては、新規導入患者での糖尿病性腎症 (DN) の割合が 1998 年に慢性糸球体腎炎 (CGN) を抜いて第 1 位になり、増加し続ける一方、CGN 患者の年間透析導入数は低下を続け、総透析患者に於ける割合に於いても、2009 年末の統計では CGN37.6%, DN35.1% とほぼ同等となり、間もなくこれも逆転すると思われる。また、加齢と高血圧による腎硬化症 (RS) の新規導入患者数と総透析患者数に於ける割合も増加し続けている。これら DN, CGN, RS に於いては、腎機能低下の病態に、podocytopenia が関与する報告が、既に為されている⁵⁻⁷⁾。

リウマチ性疾患に於ける腎障害として診療頻度の高いループス腎炎 (LN) と急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) も、年間それぞれ 300 人程度、450 人程度の新規透析導入があり、総透析患者数としても、2009 年末で 2335 人、2034 人で年々増加している。特にここ数年の動きとして、RPGN による新規透析患者数、総透析患者数の増加傾向が目立ち始めた。従って、DN, CGN, RS 程患者数は多くないが、LN, RPGN の腎機能低下の病態解明も同様に重要である。しかし、LN, RPGN における podocyte 障害の関与とその機序は不明な点が多い。

また最近、アフリカ系アメリカ人 (AA) の巣状糸球体硬化症 (FSGS) において、HIV 感染症によるもの⁸⁾、高血圧症によるもの⁹⁾、程度は弱いが糖尿病によるもの¹⁰⁾に関して、*MYH9* の risk allele (E1 haplotype) が有意に相関するが、LN には相関が無いと報告された¹¹⁾。この事は、ポドサイト障害 (podocytopathy) により進行する FSGS において、その障害を惹起するストレス (ウイルス感染、高血圧、高血糖 vs 免疫学的ストレス) によって podocytopathy の機序が異なる事を意味している。

また、European-ancestry population からなるコホートの検体を用いた慢性腎臓病 (CKD) の genome-wide association data の meta-analysis からは、*LASS2*, *GCKR*, *ALMS1*, *TFDP2*, *DAB2* といった、AA の解析で得られた、*MYH9* や *APOL1*¹²⁾ とは異なる遺伝子との相関が報告されており¹³⁾、腎機能低下機序は多様である事が推測される。

腎間質病変についても、異なる腎障害マウスモデルを用いた腎間質病変の検討で、その詳細な進展機序が、腎障害を起こしたストレスにより異なる事を報告しているグループもある。

以上の事から、腎障害の発症進展機序は多様であ

り、その中で、リウマチ性疾患で見られる免疫学的ストレスによる podocytopathy 発症機序を検討する事は、新たな糸球体障害機序、ポドサイト障害機序の解明と、腎機能保護を目的とした新規治療薬開発に結びつく可能性があり、重要なのではないかと考えた次第である。

次に、近年発展してきたポドサイト関連研究ツール/解析手法について御紹介する。

II. ポドサイト関連研究ツール/解析手法

1) 培養ポドサイト細胞株と糸球体分離法

培養ポドサイト細胞株は、様々な実験条件設定が可能で、且つ、増やす事が出来、実験の度に primary podocyte を分離する必要がなく利便性が高い。常に in vivo のポドサイトとの異同が議論されるが、構造や機能、発現蛋白、ストレスに対する反応等、共通点も多くあり、培養ポドサイト細胞株から多くの事を我々は学んだ (Table 1B)。以下、初期の技術から順に記載する。

腎臓を含む動物やヒトの細胞の in vitro 培養技術の開発は 1950 年に遡る。その後、培養ポドサイトを得ようとする試みは 1970 年代中頃から始まった。当時から、現在までの試行錯誤、改良の歴史が Shankland らの総論に記載されているので参考にして欲しい¹⁴⁾。

Table 1.

A)

Methods for the isolation of glomeruli	reference
Sieving method	
Sieving method + Ficoll-gradient centrifugation	(15)
Dissection and cut into small pieces and saline-rinse on the sieves without pressing with a spatula	(16)
Dynabeads method	(20)

B)

Podocyte cell lines	reference
Mouse podocyte (tsA58)	(17)
Human podocyte (tsA58)	(18)
Human podocyte (tsA58 + hTERT)	
Mouse podocyte (tsA58) (neph-pod)	(23)
Mouse podocyte (tsA58 + Pnephhrin-SEAP) (REPON)	(24)
Mouse podocyte (tsA58 + Ppodocin-rtTA) (Tet-on)	(25)
Mouse podocyte (CKD4)	(27)
Human podocyte from urine (tsA58 + hTERT)	(29)

腎臓は糸球体と尿細管間質に主に分かれる。ポドサイトは糸球体に存在するので、培養ポドサイトを得る際、最初のステップでまず重要なのは、如何に純度の高い、分離手技ストレスによる障害の少ない糸球体を得られるか、ということであった。

最初は、pore size の異なる 3 つの metal sieve を pore size が小さい順に下から重ねて、一番上の metal sieve で腎臓をすりつぶし、一番 pore size の小さい metal sieve 上に残った糸球体を回収して培養し、糸球体から這い出てきた細胞をポドサイトとして使用する、というものだった。しかし、尿細管組織、ボーマン嚢付き糸球体 (encapsulated glomeruli) の混入 (尿細管上皮細胞とボーマン嚢上皮細胞の混入)、metal sieve 上での機械的刺激による糸球体傷害とそれによる培養容器への糸球体細胞生着率の低下が、ポドサイト培養を困難にしていた。

これを回避するため、metal sieve により回収した glomeruli-rich 腎組織を Ficoll-gradient 円心法に供し、糸球体を純化する方法¹⁵⁾、や、機械的刺激を最小限にする為、ラット腎臓を細切し、250 mm pore sieve に乗せ、押し付けてつぶす事無く、生食でリンソのみ行い、最後の 75 μ m pore の sieve 上に残った糸球体を回収し、且つ、ボーマン嚢の無い糸球体 (decapsulated glomeruli) を顕微鏡目視下で選び取り、培養する方法¹⁶⁾が報告された (Table 1A)。この手法で得た細胞の形態と発現蛋白の検討から、Yaoita らは、encapsulated glomeruli から生える細胞は多くが cobblestone-type (敷石様) cell で pan-cadherin 陽性の、ボーマン嚢上皮細胞であり、decapsulated glomeruli で得た細胞は、arborized (分枝状) cell であり、WT1 と synaptopodin といったポドサイト分化マーカーを強く発現する、糸球体臓側上皮細胞、podocyte であることを報告した。

一方、変異熱感受性 SV40T 抗原 (tsA58) (33°C で活性を持ち、37°C で失活する) を導入したマウスポドサイト細胞株が 1997 年に Mundel により発表され¹⁷⁾、同様に tsA58 を導入したヒトポドサイト細胞株が 2002 年、Saleem により発表された¹⁸⁾。これらは conditionally immortalized podocyte cell lines (CIPCL) と呼ばれる (Table 1B)。前者は H-2Kb-tsA58 をもつ Immortomouse® (Charles River) の腎臓から分離された糸球体からポドサイトが得られ、後者は、無機能腎となり摘出された 3 歳児の腎組織から得られた primary podocyte へ、retroviral

vector により tsA58 を導入して作製された。ヒトポドサイト細胞株はその後、TERT 活性がマウスに比べて低い事から、tsA58 に加え、hTERT も導入された。これら tsA58 を導入した CIPCL は、33°C で増殖させ、容易に実験に必要な細胞数を得る事ができ、また、37°C では増殖を止めて再分化し、synaptopodin 等のポドサイト分化マーカーを発現し、in vivo に近い状態のポドサイトを再現できる為、多くの研究に使用され、podocytology に大きく貢献した¹⁹⁾。最近の研究に使われている培養ポドサイトは、その多くが、これら二つのどちらかである。両者共に、metal sieve を用いて糸球体を分離しポドサイトを得ており、sieving 法でもポドサイトを得る事は可能であるようだ。ただし、上記の理由から、その分離効率はそう高くない事が考えられる。

2002 年になり、Dynabeads で腎を還流し、腎を摘出し細切後、protease, DNase 処理し、metal sieve 上で腎組織をすり潰す代わりに、nylon mesh で、消化後腎組織液中の遺残物を除去。その後、磁場をかけ、Dynabeads が残る糸球体を分離するという画期的な方法が Takemoto らにより報告された²⁰⁾ (Table 1A)。この方法は、ほぼ 100% に近い糸球体を分離する事ができ、驚いた事に、ほぼ全ての糸球体が decapsulated である。また、metal sieve 上での組織傷害が無い為に、得られた糸球体の bioavailability も高い。この方法を用いて、pure な rat primary podocyte を得た報告が為された。糸球体から生える細胞はほぼ全て arborized cell-podocyte であった²¹⁾。また、Takemoto らも、2006 年にこの Beads 法を用いて成体マウスと新生児マウスから糸球体を分離し、糸球体に発現している遺伝子リストを作成 (Glombase)。Glombase の cDNA を用いて array を行い (Glomchip)、糸球体特異的、ポドサイト特異的遺伝子の発現を明らかにした²²⁾。筆者は Beads 法と Sieving 法で得られた、Immortomouse® の糸球体由来の細胞クローンでのポドサイト分化マーカー WT1 の mRNA 発現を、conventional RTPCR で比較した。Beads 法で得られた細胞クローンは全て WT1 陽性だが、Sieving 法で得られた細胞クローンは約半数が WT1 陰性であった。やはり、Sieving 法はポドサイト分離効率では劣るようである。今後、この Beads 法は、傷害度の少ない、純度の高い糸球体及びポドサイトを得る standard な方法として、Sieving 法に取って代わり、活用されていくだろう。

その後、マウスの CIPCL は、腎組織サンプルが得やすい事もあり、分化ポドサイトの SD に発現する *nephrin* と *podocin* の双方が、cell-cell contact に強く発現するマウスポドサイト細胞培養株 (*neph-pod*)²³⁾、この *neph-pod* に *Pneph*rin-secreted alkaline phosphatase (ALP) を導入した、ネフリン発現制御を培養上清中の ALP でモニターできるポドサイト培養株 (REPON)²⁴⁾、Tet-On system を導入し、分化して増殖を停止した状態で、ほぼ 100% の細胞で、目的の分子の発現を *doxycycline* (DOX) で調節する事が可能な細胞株²⁵⁾等が報告されている (Table 1B)。上記の様に糸球体分離法の進歩もあり、様々な遺伝子操作を加えたマウスからの primary podocyte culture も、project 毎に作製されている。CDK4 で transform した気管支上皮細胞の transcriptome が E6/E7 や SV40T により transform された細胞に比べて、primary culture のものに近いという報告に基づき²⁶⁾、tsA58 の代わりに CDK4 で transform したマウスポドサイト株も最近報樹立された²⁷⁾。

サンプルが入手困難である為に、ヒト CIPCL は長年 Saleem らが発表したものに限られてきた。Vogelmann らは健常人と患者の尿から得た細胞を培養し、ポドサイトの分化マーカーを発現していると報告したが²⁸⁾、Sakairi らは、健常人二人、FSGS 二人の尿から細胞を培養し、retroviral vector を用いて、tsA58 と hTERT を導入して CIPCL を作製し、各個人毎に 2 株、計 8 株のポドサイト株でのポドサイト分化マーカーの mRNA 発現を検討し、うち 6 株で *podocalyxin*、また、7 株で *nephrin* が発現、8 株全てで、*synaptopodin*、*nestin*、*CD2AP* の発現が見られたことを報告した²⁹⁾。尿中から非侵襲的に podocyte 株が樹立できれば、患者個人それぞれの podocyte 機能解析が可能になる為、注目すべき知見である (Table 1B)。

2. ポドサイト特異的遺伝子発現制御マウス

少なくとも腎臓内ではポドサイト特異的なプロモーター活性を持つものとして、1.25-kb mouse *nphs1* (*Nephrin*) promoter と 2.5-kb human *NPHS2* (*Podocin*) promoter³⁰⁾ 等が報告され、これらの下流に *LacZ* がある construct を持つ transgenic mice の検討で^{30,31)}、腎臓内でポドサイト特異的に β -galactosidase を発現することが明らかになった。以後、これらの promoter DNA 配列は、in vivo

Table 2.

TG mouse for podocyte-specific gene regulation	reference
<i>Podocin-LacZ</i>	(30)
<i>Nephrin-LacZ</i>	(31)
<i>Podocin-rtTA</i> × <i>TRE-LacZ</i>	(32)
<i>Podocin-Cre</i> × ubiquitous promoter- <i>GOI</i> ^{loxP/loxP}	(33)
<i>Podocin-rtTA</i> × <i>TRE-Cre</i> × ubiquitous promoter-gene of interest ^{loxP/loxP}	(34)
<i>Podocin-Cre</i> × ubiquitous promoter-STOP- <i>rtTA</i> × <i>TRE-GOI</i>	(35)

podocyte-specific gene regulation の為に応用され (*LacZ* が gene of interest に置換され)、マウスモデルが多数作成された (Table 2)。Shigehara らによる 2.5-kb human *NPHS2* の下流に *rtTA* を配置した construct を持つ *Podocin-rtTA* mouse (*Podocyte-specific Tet-on mouse*)³²⁾は、tetracycline responsive element (*TRE*)-gene of interest (*GOI*) の construct を持つ mouse と交配し、*Podocin-rtTA*^{+/+}-*TRE-gene of interest*^{+/+} として、*doxycycline* を投与する事で、gene of interest のポドサイト特異的発現誘導の時間的制御を可能にする。*Podocin-Cre* mouse は³³⁾、ubiquitous promoter-gene of interest^{loxP/loxP} と交配する事で、ポドサイト特異的に遺伝子をノックアウトする。更に *Podocin-rtTA* × *TRE-Cre* × ubiquitous promoter-gene of interest^{loxP/loxP}³⁴⁾、*Podocin-Cre* × ubiquitous promoter-STOP-*rtTA* × *TRE-gene of interest*³⁵⁾ 等といった、Tet-on system と Cre-loxP system の組み合わせで、ポドサイト特異的な遺伝子ノックアウトや発現誘導を、DOX 投与により時間的に制御できる。これらの動物モデルの登場により、様々な分子のポドサイトでの役割が明らかにされた。今後より多くの知見が得られるだろう。

3. ポドサイト関連バイオマーカー

現在までに、糸球体及び尿細管間質性腎障害、糸球体濾過率低下と相関する、血清及び尿中バイオマーカーが多く報告されている。そのうち、尿中ポドサイト関連バイオマーカーを Table 3 にまとめた。

1998 年、Hara らは尿沈さ中のポドカリキシン (PCX) 陽性細胞をポドサイトとしてその数 (U-pod) をカウントし、小児の糸球体腎炎の急性期に上昇する事を報告した³⁶⁾。その後、FSGS で U-pod が上昇するが、健常人、微小変化群では上昇しない³⁷⁾、microalbuminuria と macroalbuminuria のあ

Table 3.

Urine podocyte-associated biomarkers	reference
<u>Urine PCX-positive cell (U-pod)</u>	
present in acute phase of glomerulonephritis	(36)
absent in normal control, nonglomerular hematuria, minimal change nephritic syndrome and membranous nephropathy	
present in focal segmental glomerulosclerosis	(37)
present in diabetic nephropathy with microalbuminuria or macroalbuminuria	(38)
present in active lupus nephritis	(39)
cumulative number associated with chronic histological score in IgA nephropathy	(40)
<u>Urine podocalyxin (U-PCX/Cr)</u>	
glomerular disease	(41)
acute kidney injury	(42)
<u>Urine exosome expressing WT1</u>	
focal segmental glomerulosclerosis	(43)
culture supernatant of human CIPCL	(44)
<u>Urine mRNA of podocin and nephrin</u>	
lupus nephritis	(45)

る糖尿病性腎症（DN）では上昇し，normoalbuminuria と腎不全に陥った DN では上昇しない³⁸⁾，活動性の高いループス腎炎で上昇する事が明らかになった³⁹⁾．IgA 腎症患者での経時的検討では，慢性組織学的変化と，U-pod の積算値と相関があった⁴⁰⁾．

更に，ELISA により尿沈さ中の PCX 分子を定量したところ（U-PCX/Cr）（単位は $\mu\text{g/g}$ ，尿 Cr 値で補正），糸球体病変のある症例では健常人より高値であり⁴¹⁾，急性腎障害（AKI）では尿中 L-FABP の上昇が AKI 前，U-PCX/Cr の上昇は AKI 発症後に起こる事がわかった⁴²⁾．腎生検組織検体と尿検体の詳細な検討により，PCX を含む vesicle がポドサイトの microvilli から尿中へ shedding する事が，ポドサイト傷害時の U-PCX/Cr 上昇機序と考えられている^{43,44)}．現在，多施設で，各腎疾患に於いて，U-pod, U-PCX/Cr を測定する臨床研究が進行中である．

上記，PCX を含む vesicle（120 nm）と似るが，その大きさと分離法から区別される exosome（30–80 nm）も，米国 NIH/NIDDK のグループにより尿中バイオマーカーとして検討されており，驚いた事にポドサイトで転写因子として働く WT1 が患者尿中 exosome⁴⁵⁾，ヒト CIPCL 培養上清中 exosome⁴⁶⁾ から検出され，早期ポドサイト傷害と関連する可能性が示唆された．また，ラット疾患モデ

ル及びループス腎炎患者尿中 Podocin, Nephrin mRNA とポドサイト傷害との関連を示した報告も大変興味深い⁴⁷⁾．

4. laser capture microdissection, multiphoton imaging, extracellular flux analyzer

laser capture microdissection（LCM）は，1996 年に Science に発表され⁴⁸⁾，組織検体から顕微鏡的サイズで特定の部位から組織を分離することが可能となり，腎病変部の transcriptome, proteome 解析に応用されている．この技術により，最近，増殖性糸球体上皮病変や糸球体硬化部位ではポドサイトマーカーの発現は，正常糸球体糸球壁に比べ低く，一方で CD133, CD24 の stem cell marker の発現が高い事が確認され，ポドサイト増殖性に関する論争（ポドサイトが半月体や collapsing glomerulopathy の増殖性病変に関与するかどうかという議論）に大きな影響を与えた⁴⁹⁾．また，Wang らは，LN 患者腎組織浸潤リンパ球を LCM で分離し，各種サイトカインの mRNA 発現を qPCR で検討，活動性の高い LN での糸球体，腎間質局所での Th17 の関与を報告した⁵⁰⁾．

1990 年に発表された mutliphoton imaging（MI）は⁵¹⁾，複数の波長の光で蛍光を励起させ観察する advanced confocal imaging である．最近，MI による生体糸球体の time-lapse imaging が可能となり，糸球体濾過係数の算定や damaged podocyte からの蛋白濾過亢進，その後の糸球体糸球壁からの脱落，ポーマン囊上皮からの podocyte precursor cell の遊走と damaged podocyte との replacement が克明に動画で記録された⁵²⁾．ポーマン囊上皮の CD133 + CD24 + podocyte precursor の報告⁵³⁾同様，最近の podocytology における重大な知見となった．今後，様々な fluorophore と共に応用され，腎組織局所でのミトコンドリア機能⁵⁴⁾等，腎糸球体及び間質局所での生理的及び病的状態での多彩な細胞機能変化を経時的に捕らえることが可能となるだろう．

Seahorse Bioscience 社から extracellular flux analyzer（EFA）XF24（for 24-well plate）や XF96（for 96-well plate）が開発され⁵⁵⁾，培養細胞の酸素消費とプロトン産生を同時に検知することで，細胞のエネルギー（ATP）産生を担うミトコンドリア機能（好氣的代謝－酸化的リン酸化）と解糖系機能（嫌氣的代謝）を，経時的に定量することが可能になった．Abe らは世界で初めて XF24 を培養ポドサ

イトに適用し⁵⁶⁾, ATP 産生の基質として, ブドウ糖やピルビン酸の他, パルミチン酸や乳酸も利用すること, ATP 産生は主に好氣的解糖に依存しており, 嫌氣的解糖の寄与は少ないことを明らかにした. FSGS とポドサイトのミトコンドリア機能異常, 関連遺伝子異常との関連を示す報告は多く為されており, ポドサイト ATP 産生の基質 profile とともに大変興味深い所見である. この EFA のコアテクノロジーも酸素とプロトンと可逆的に反応する fluorophore である. これを上記 MI に応用すれば, in vivo の細胞代謝機能をモニター出来るかもしれない.

III. リウマチ性疾患でのポドサイト障害機序解明への応用

これらのポドサイト関連研究ツール/手法を活用して当科でリウマチ性疾患でのポドサイト障害機序解明の為に複数のプロジェクトが進行中である.

最近, Matsumoto らは, ヒト CIPCL 上清中の proteome profile を発表した⁵⁷⁾. また, HIV accessory 蛋白 Vpr の発現を分化 Tet-on podocyte に DOX 添加により誘導すると, ポドサイトの細胞死を観察する⁵⁸⁾が, 正常ポドサイトとの transcriptome の比較実験では, Vpr による傷害ポドサイトで発現が上昇及び低下する gene が多数同定された. これらの data を参考に, LN, 顕微鏡的多発血管炎 (MPA) 患者の尿, 腎組織検体中で発現が亢進あるいは減弱する分子群の検討を行っている.

また, 最近明らかになりつつある, IL17 等の LN での役割を元に, これらのサイトカインのポドサイトの形態, 細胞死, 発現分子に与える影響を解析中である. その他, 培養ポドサイト細胞死の系を用いて, ポドサイト保護的な非リボゾームペプチドの探索を行っている⁵⁹⁾.

上記でも触れたが, リウマチ性疾患に於けるポドサイト関連バイオマーカーの U-pod, U-PCX/Cr の経時的測定を, デンカ生研株式会社, 群馬大学と共同で行っている. LN ではやはりポドサイト障害の頻度が高いようだが, 重度の蛋白尿のある LN 患者でも, これらのマーカーが動かない症例, また逆に, 蛋白尿のない SLE 患者でも高値を示す場合があり興味深い. 現在, 日本の臨床の場で, より詳細な腎障害, ポドサイト障害をモニターできる手段は限られており, この研究で, LN, MPA 始め多くのリウマチ性疾患における podocytopathy の機序,

経時的变化, 治療反応性を明らかにしたい. また, 臨床で得られた podocyte に関する新知見を, ポドサイト特異的遺伝子発現制御動物モデルや培養ポドサイトを用いて確認する事で, 更に, 新知見をもたらすだろう. 今後の研究の進展を期待したい.

おわりに

日常診療に於いても, 研究に於いても, 今まで見えなかった事が見えるようにする事で, 医学の進歩に繋がることもあると思う. 今見えているものだけが医学知識の常識と捕らわれることなく, 自分が今見えていないものは何かを知ることにより常に敏感でいたい.

文 献

- 1) Lemley KV, et al. : Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int.* **61**(4) : 1475-1485, 2002.
- 2) Yang J, Liu Y. : Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol.* **159**(4) : 1465-1475, 2001.
- 3) Müller GA, Rodemann HP. : Characterization of human renal fibroblasts in health and disease : I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis.* **17**(6) : 680-683, 1991.
- 4) <http://docs.jsdt.or.jp/overview/index.html>
- 5) Pagtalunan ME, et al. : Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* **99**(2) : 342-8, 1997.
- 6) Xu L, et al. : Podocyte number predicts progression of proteinuria in IgA nephropathy. *Mod Pathol.* **23**(9) : 1241-1250, 2010.
- 7) Wang G, et al. : Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertens.* **22**(3) : 300-6, 2009.
- 8) Kopp JB, et al. : MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* **40**(10) : 1175-84, 2008.
- 9) Freedman BI, et al. : Polymorphisms in the non-muscle myosin heavy chain 9 gene (MYH9) are strongly associated with end-stage renal disease historically attributed to hypertension in African Americans. *Kidney Int.* **75**(7) : 736-745, 2009
- 10) Freedman BI, et al. : Non-muscle myosin heavy

- chain 9 gene MYH9 associations in African Americans with clinically diagnosed type 2 diabetes mellitus-associated ESRD. *Nephrol Dial Transplant*. **24**(11) : 3366–3371, 2009.
- 11) Freeman BI, et al. : The non-muscle Myosin heavy chain 9 gene (MYH9) is not associated with lupus nephritis in African Americans. *Am J Nephrol*. **32**(1) : 66–72, 2010.
- 12) Genovese G, et al. : Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science*. **329**(5993) : 841–845, 2010.
- 13) Küttgen A, et al. : New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet*. **42**(5) : 376–384, 2010.
- 14) Shankland SJ, et al. : Podocytes in culture : past, present, and future. *Kidney Int*. **72**(1) : 26–36, 2007.
- 15) Norgaard JO, et al. : A new method for the isolation of ultrastructurally preserved glomeruli. *Kidney Int*. **9**(3) : 278–85, 1976.
- 16) Yaoita E, et al. : Phenotypic modulation of parietal epithelial cells of Bowman's capsule in culture. *Cell Tissue Res*. **304**(3) : 339–349, 2001.
- 17) Mundel P, et al. : Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res*. **236**(1) : 248–258, 1997.
- 18) Saleem MA, et al. : A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol*. **13**(3) : 630–638, 2002.
- 19) Asanuma K, et al. : Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest*. **115**(5) : 1188–1198, 2005.
- 20) Takemoto M, et al. : A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol*. **161**(3) : 799–805, 2002.
- 21) Katsuya K, et al. : An improved method for primary culture of rat podocytes. *Kidney Int*. **69**(11) : 2101–2106, 2006.
- 22) Takemoto M, et al. : Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J*. **25**(5) : 1160–1174, 2006.
- 23) Schiwek D et al. : Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int*. **66**(1) : 91–101, 2004.
- 24) Yamauchi K, et al. : Screening and identification of substances that regulate nephrin gene expression using engineered reporter podocytes. *Kidney Int*. **70**(5) : 892–900, 2006.
- 25) Kajiyama H, et al. : Tetracycline-inducible gene expression in conditionally immortalized mouse podocytes. *Am J Nephrol*. **29**(3) : 153–163, 2009.
- 26) Ramirez RD, et al. : Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res*. **64**(24) : 9027–9034, 2004.
- 27) Sakairi T, et al. : Cell-cell contact regulates gene expression in CDK4-transformed mouse podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*. **299**(4) : F802–809, 2010.
- 28) Vogelmann SU, et al. : Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. **285**(1) : F40–48, 2003.
- 29) Sakairi T, et al. : Conditionally immortalized human podocyte cell lines established from urine. *Am J Physiol Renal Physiol*. **298**(3) : F557–567, 2010.
- 30) Moeller MJ, et al. : Two gene fragments that direct podocyte-specific expression in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*. **13**(6) : 1561–1567, 2002.
- 31) Wong MA, et al. : Identification and characterization of a glomerular-specific promoter from the human nephrin gene. *Am J Physiol Renal Physiol*. **279**(6) : F1027–1032, 2000.
- 32) Shigehara T, et al. : Inducible podocyte-specific gene expression in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*. **14**(8) : 1998–2003, 2003.
- 33) Moeller MJ, et al. : Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis*. **35**(1) : 39–42, 2003.
- 34) Eremina V, et al. : VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*. **358**(11) : 1129–1136, 2008.
- 35) Belteki G, et al. : Conditional and inducible transgene expression in mice through the combinatorial use of Cre-mediated recombination and tetracycline induction. *Nucleic Acids Res*. **33**(5) : e51, 2005.
- 36) Hara M, et al. : Urinary excretion of podocytes reflects disease activity in children with glomerulonephritis. *Am J Nephrol*. **18**(1) : 35–41, 1998.

- 37) Nakamura T, et al. : The urinary podocyte as a marker for the differential diagnosis of idiopathic focal glomerulosclerosis and minimal-change nephrotic syndrome. *Am J Nephrol.* **20**(3) : 175–179, 2000.
- 38) Nakamura T, et al. : Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* **15**(9) : 1379–1383, 2000.
- 39) Nakamura T, et al. : Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci.* **320**(2) : 112–116, 2000.
- 40) Hara M, et al. : Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein–Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol.* **2**(2) : 231–238, 2007.
- 41) Kanno K, et al. : Urinary sediment podocalyxin in children with glomerular diseases. *Nephron Clin Pract.* **95**(3) : c91–99, 2003.
- 42) Matsui K, et al. : Clinical significance of tubular and podocyte biomarkers in acute kidney injury. *Clin Exp Nephrol.* [Epub ahead of print], 2010.
- 43) Hara M, et al. : Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. *J Am Soc Nephrol.* **16**(2) : 408–416, 2005.
- 44) Hara M, et al. : Podocyte membrane vesicles in urine originate from tip vesiculation of podocyte microvilli. *Hum Pathol.* **41**(9) : 1265–75, 2010.
- 45) Zhou H, et al. : Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney Int.* **74**(5) : 613–621, 2008.
- 46) Zhou H, et al. : [TH-FC009] Urinary Exosomal Wilms Tumor 1 (WT-1) as a Biomarker for Glomerular Diseases, 42nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2009.
- 47) Sato Y, et al. : Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* **20**(5) : 1041–1052, 2009.
- 48) Emmert-Buck MR, et al. : Laser capture microdissection. *Science.* **274**(5289) : 998–1001, 1996.
- 49) Smeets B, et al. : Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* **20**(12) : 2593–2603, 2009.
- 50) Wang Y, Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol.* **159**(1) : 1–10, 2010.
- 51) Denk W, et al. : Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science.* **248**(4951) : 73–76, 1990.
- 52) Peti-Peterdi J, et al. : A high-powered view of the filtration barrier. *J Am Soc Nephrol.* **21**(11) : 1835–1841, 2010.
- 53) Ronconi E, et al. : Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol.* **20**(2) : 322–32, 2009.
- 54) Hall AM, et al. : Multiphoton imaging reveals differences in mitochondrial function between nephron segments. *J Am Soc Nephrol.* **20**(6) : 1293–302, 2009.
- 55) Wu M, et al. : Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**(1) : C125–136, 2007.
- 56) Abe Y, et al. : Bioenergetic characterization of mouse podocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **299**(2) : C464–476, 2010.
- 57) Matsumoto T, et al. : Proteomic analysis identifies insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 as a podocyte product. *Am J Physiol Renal Physiol.* **299**(4) : F776–784, 2010.
- 58) Kajiyama H, et al. : [F-PO1458] HIV-1 Vpr Expression Induces Apoptosis in Mouse Podocytes Via Caspase 3 Activation, 41st Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2008.
- 59) Kajiyama H, et al. : [SA-PO2999] A Genetic Approach for Generating Cyclosporin A Derivatives with Protective Effects on Podocytes. 42nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2009.
- 60) Pavenstädt H, et al. : Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* **83**(1) : 253–307, 2003.
- 61) Kriz W. : TRPC6 – a new podocyte gene involved in focal segmental glomerulosclerosis. *Trends Mol Med.* **11**(12) : 527–530, 2005.