

平成 28 度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	■奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	□21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	□21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	慢性腎臓病における尿細管変性機序の解析と新規バイオマーカーの樹立	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部病理学教室 助教 萩山満 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

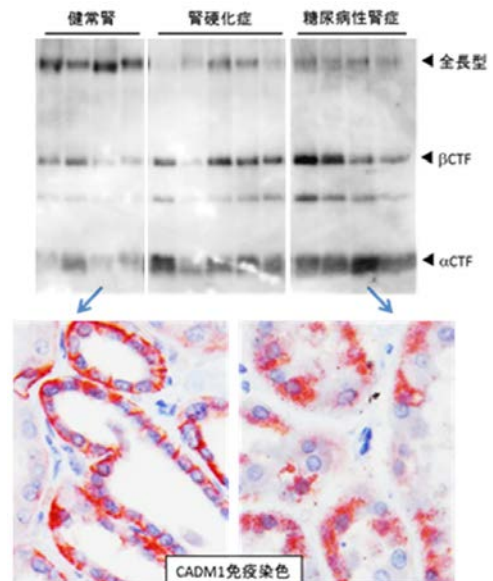
IgCAM 型接着分子 CADM1 は肺胞上皮・尿細管上皮などの細胞膜上に発現し、細胞外領域において酵素的に切断 (shedding) される。肺気腫や間質性肺炎などではこの shedding が亢進しており、肺胞上皮のアポトーシスを誘導する。種々の腎疾患では尿細管上皮の変性・アポトーシスが尿細管間質病変を惹起し、病態重篤度や予後の決定因子となる。本研究課題では、慢性腎臓病の尿細管上皮アポトーシスに CADM1 shedding が関与するか病理標本を用いて解析する。また、shedding によって尿細管上皮から尿中に放出される CADM1 細胞外断片を検出する ELISA を樹立し、CADM1 断片の尿中濃度が慢性腎臓病における尿細管変性マーカーとして有用かどうか臨床検体を用いて検討する。

2. 研究経過及び成果

IgCAM 型接着分子 CADM1 は肺胞上皮や尿細管上皮などに発現し、細胞外領域において酵素的切断 (shedding) を受ける。本研究課題では CADM1 が尿細管のアポトーシスに関与するか検討した。新鮮な尿細管間質病変を研究用に十分量採取できる機会は限られているため、Rodríguez-Rigueiro らの方法 (Proteomics, 2011) を改変してパラフィン切片から高品質な蛋白を効率的に抽出する方法を確立した。その結果、剖検・手術病理標本内の病変における種々の分子発現をウエスタンブロットにて解析可能となった。近畿大学医学部附属病院での剖検標本を用いて慢性腎臓病 (糸球体腎炎・糖尿病性腎症・腎硬化症など) における CADM1 の発現をウエスタンブロット法にて調べた。糖尿病性腎症や腎硬化症では健常腎に比べて全長型に対する shedding 産物である細胞内断片 (αCTF) の発現量が増加し、また全長型の発現低下が見られた。

糖尿病性腎症や腎硬化症において、尿細管上皮のアポトーシスが起きているか調べるため、抗 single-stranded DNA 抗体による免疫染色を行ったところ、尿細管上皮における ssDNA 陽性細胞の割合が健常腎に比べて約 2 倍増加していることを明らかにした。

CADM1 shedding 亢進による αCTF 量の増加と全長型の発現低下のどちらが尿細管上皮アポトーシスを誘導するのか検討するため、尿細管上皮細胞株である CNT 細胞を用いて実験を行った。CNT 細胞に αCTF を遺伝子導入し TUNEL 法に供したところ、TUNEL 陽性細胞の割合に変化はなかった。一方、siRNA を導入し CADM1 をノックダウンした細胞では TUNEL 陽性細胞の割合が約 3 倍増加し、ssDNA 抗体の免疫染色でも同様の結果が得られた ($p < 0.001$)。



慢性腎臓病における CADM1 shedding の亢進と尿細管上皮での局在の変化 (細胞膜上→細胞質内)

3. 本研究と関連した今後の研究計画

過去に CADM1 細胞外領域認識モノクローナル抗体を 2 種類 (3E1 と 9D2) 作製した。その一方を固相化し、他方をビオチン化することで CADM1 細胞外断片である NTF を高感度に検出するサンドイッチ ELISA を樹立し、組換え NTF を用いた予備的実験では 0.2 ng/ml 程度を測定可能下限値とする ELISA の作製に成功した。健常者と腎疾患の患者数十名から採尿し上記 ELISA で測定したところ、CADM1 shedding が亢進している糖尿病性腎症や腎硬化症では NTF 濃度が高い傾向があった。今後検体数を増やし、正確な測定値を算出する。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)