

東海大学大学院平成二十七年 度博士論文

尿管上皮細胞における
Tetraspanin-8 発現の意義

指導 深川 雅史 教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻

比留川 喬

この学位申請論文は、**Nephron Extra**に掲載された主要公刊論文を基に作成された。**Nephron Extra**に掲載された主要公刊論文の一部を学位論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開する事の承諾を得ている。

1. 総括 (Summary)

背景：IgA 腎症は我が国における最多の慢性糸球体腎炎であるものの、その発症機序は解明されていない。

IgA 腎症の発症・進展には遺伝的素因の関連が挙げられていることから、我々はこれまでに IgA 腎症患者 450 人と同数の健常者の血液サンプルを用いて、IgA 腎症感受性遺伝子の同定に努めてきた。マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド関連解析 (**genome-wide association study: GWAS**) の手法によって、候補遺伝子の一つとして **TSPAN8** が同定された。**TSPAN8** は **tetraspanin-8** と呼ばれる細胞膜表面蛋白をコードする遺伝子で、上皮細胞の遊走や浸潤過程に関わる事が知られている。これまで IgA 腎症を含めて腎疾患と

TSPAN8 の関連を報告したものではなく、本研究が初めての報告となる。

対象と方法：*TSPAN8* と IgA 腎症発症との関連を調べるために、まず *tetraspanin-8* の腎組織内における発現分布を解析した。診断目的に得られた腎生検組織のうち、IgA 腎症、抗好中球細胞質抗体関連腎炎、間質性腎炎、正常腎組織を用いて免疫組織化学染色を行った。また尿細管上皮細胞における *tetraspanin-8* 機能を解析するために、ヒト培養尿細管細胞 HK-2 に *TSPAN8* 遺伝子を導入し、細胞遊走能や浸潤能が促進されるかを検討した。さらに *TSPAN8* の組織発現を誘導する因子を解明するために、HK-2 を各種のストレス環境下で培養して、mRNA の発現量を定量評価した。

結果：ヒト腎組織において *tetraspanin-8* は一部の血管平滑筋細胞と尿細管上皮細胞に分布していた。IgA 腎症とその他の腎疾患とで発現分布に差は見られなかったものの、尿細管上皮細胞における陽性率と eGFR の間には負の相関関係が認められた。Cytokeratin-7 や Aquaporin-1, 2 といった尿細管マーカーを用いた組織染色を追加して、*TSPAN8* を発現している尿細管セグメントの多くが遠位尿細管から集合管であることも同

定された。マウスを用いた組織染色では、ヒト腎組織と同様に正常マウス腎よりも腎障害マウスで *tetraspanin-8* の発現が強く観察された。培養細胞を用いた実験では、*TSPAN8* を強制発現した HK-2 は通常 HK-2 に比べて遊走能が 2.7 倍に、浸潤能が 3.5 倍に増加していた。発現誘導の実験では、*TSPAN8* は低酸素条件で発現が促進される傾向が観察された。

結論：腎組織における *TSPAN8* の分布は IgA 腎症に特異的なものではなく、どの腎疾患においても腎障害が進展するほど尿細管上皮での発現が亢進する事が分かった。IgA 腎症患者と健常者での GWAS から導き出された感受性候補遺伝子ではあったが、*TSPAN8* の多型は、IgA 腎症発症というよりは腎疾患全般の障害進展や修復プロセスに関与している可能性が示唆された。そして尿細管上皮細胞の遊走や浸潤能を高めているという結果は、*TSPAN8* が障害された尿細管上皮の修復プロセスに関与していることを伺わせた。

2. 研究の背景 (Background and Introduction)

IgA 腎症 (IgAN) は我が国において最も頻度の高い慢性糸球体腎炎であり、約 20% の患者が末期腎不全へと至る疾患である。IgAN の発生頻度に民族間での差異が大きいことや、また家族内集積の多さから、IgAN の発症には遺伝的素因や環境因子が関わることが推測されてきた。いくつかの人種では既に、IgAN を引き起こす疾患感受性遺伝子が報告されている。我々の研究グループでも、これまでにゲノムワイドな関連解析 (genome-wide association study: GWAS) の手法を用いて疾患感受性遺伝子の同定に努め、14 の感受性遺伝子領域を同定している。今回、同定された遺伝子領域の中から、特に関連の強かった領域 12q21.1 に着目した。12q21.1 は tetraspanin-8 という膜表面蛋白をコードする遺伝子 *TSPAN8* を含んでいる。Tetraspanin ファミリーは細胞表面で様々な受容体やシグナル伝達分子と複合体を形成することで、細胞の分化や接着・遊走といった過程に関与している分子である。我々は IgAN 感受性遺伝子として同定された *TSPAN8* が、腎臓内にどのように分布していて、こういった役割を担っているのかを解析した。

a. IgA 腎症とは(発見、疫学、成因、遺伝的素因、組織所見、予後)

IgAN の疾患概念は 1968 年にフランスの Berger らによって初めて提唱された。組織学的に糸球体メサンギウム領域に IgA 沈着をきたす腎炎症例が存在することを発見し、それらの症例が臨床的には慢性的な蛋白尿と血尿を呈することを指摘した[1]。組織学的特徴を模して IgA 腎症、あるいは Berger 腎炎、mesangial IgA 腎症などと称された。その後 IgAN の疾患概念が国際的に広まると、この疾患が北米や北欧には少ない一方でフランスやイタリア、アジア地域に多く、地理的・人種的に発症頻度に違いがあることが明らかとなった。本邦では 1972 年に慈恵会医科大学の酒井紀らが最初の報告を行っている。彼らは慢性糸球体腎炎の中で、血尿と蛋白尿を持続的に呈して、Berger の提唱した IgAN と共通する所見をもつ 55 例を報告した[2]。当初 IgAN は緩慢な経過を取る良性の慢性腎炎と考えられていたが、20 年以上の経過観察から IgAN の実に

30-40%が末期腎不全へと進行する事が明らかになると、その発症機序や治療法の開発に注目が注がれることとなった[3]。

IgAN は腎生検によって病理学的に確定診断がなされる疾患である。そのため各国・各施設の腎生検適応によって発症頻度に違い生じてくると思われる。一次性糸球体腎炎における IgAN の頻度はアジア・ヨーロッパでは 20-30%、北米では 2-10%とされる。米国においては黒人の発症頻度は少なく、native American では 38%であった[4]。日本では学校や職場健診における尿所見異常を契機に発見されることが多く、診断時の年来は男女ともに 10-20 代の若者が多い。初診時の血清クレアチニン値が高値の症例や、尿蛋白が高度である症例は腎機能予後が悪いとされ、全体でも 10 年腎生存率は 74-85%であった[5]。

IgAN の成因については未だ確定したものがない。IgAN の定義はあくまで病理学的診断によるもので、腎糸球体の IgA 沈着を伴う特異的なメサンギウム病変を有していることであるが、この病変をきたす背景には環境因子や免疫学的因子の

関連が推測されている。一つの因子のみで発症するわけではなく、複数因子が重なった結果 IgAN を呈すると考えられている。具体的には、糸球体に沈着する IgA 抗体の産生には食物抗原への暴露や粘膜局所感染が関与するとされるが、そのみでは IgAN が発症するわけではない [6-8]。沈着している IgA 抗体の多くにヒンジ部分の糖鎖構造異常が見られていることから、IgA を産生する骨髄細胞レベルでの異常も関与していると考えられる。さらには糖鎖不全 IgA 抗体がメサンギウム領域特異的に沈着するのにも、解明されていない何らかの機序が必要とされている [9-10]。それゆえ IgAN は、複数の環境因子に加えて、複数の遺伝子が関与した結果発症する多因子遺伝性疾患と考えられている。

b. 感受性遺伝子の同定(過去の研究、GWAS とは、これまでの研究成果)

IgAN を発症する因子の中で、遺伝的素因は古くから注目されていた。1985 年に Julian らが

IgA 腎症の集積を認める大家系を報告したのを皮切りに、イタリアの家族性 IgAN24 家系と米国 6 家系の計約 150 名を対象としたマイクロサテライトマーカーによる連鎖解析が行われ、第 6 染色体長腕 22-23 の領域に IgAN と強い連鎖があることが報告された [11-13]。しかし、患者全てにこの遺伝子座が関連するわけではなく、検討症例の不足による統計学的パワー不足が指摘されていた。一方、多数の患者・健常者間で行う関連解析は、優れた分解能・精度を有する。本邦の中村祐輔らのグループによっても IgA 腎症の GWAS が試みられており、約 400 名ずつの IgA 腎症患者と健常者から、約 8 万個の SNP 解析を行い 4 つの新規感受性遺伝子を検出している。この研究は新規感受性遺伝子を検出した点で画期的である一方、対立遺伝子が 2 個しかない SNP の解析に依存しているために、感受性遺伝子の検出力が弱く、ゲノムワイドにも数個の感受性遺伝子のみしか検出できないといった限界が見られた [14]。

GWAS に用いられる多型マーカーとしては SNP とマイクロサテライトが知られる。前述の

研究で用いられた **SNP** では、カバー出来る連鎖不平衡が **3-50kb** と限られるため、全ゲノムを網羅するには **30-100 万** のマーカーが必要となる。つまり数万個といった数の **SNP** マーカーで検索した場合、検出に漏れが生じている可能性が高い。代わってマイクロサテライトの場合、多型となる塩基配列のパターンが多いことから、**SNP** に比べて少ない数のマーカーで全ゲノムの網羅が可能となる。マクロサテライトの連鎖不平衡は **100-200kb** である事が示されているので、全ゲノム網羅に必要なマーカーは約 **1.5~3 万** となる。本研究グループの猪子英俊らの研究室において全ゲノムのマッピングに必要な **23,465** 個のマイクロサテライトマーカーが収集され、実際にこれを用いたシステムにより、同教室でこれまでに慢性関節リウマチや尋常性乾癬の新規感受性遺伝子の同定に成果を上げている **[15]**。多因子遺伝性疾患における **GWAS** による感受性遺伝子同定の手法は、腎疾患領域においてはなじみの薄い分野であったが、近年ヨーロッパの大規模な関連解

析が行われいくつかの感受性遺伝子が同定されている [16]。

これまでに我々の研究グループでは、IgA 腎症患者 600 人と同数の健常者において、ゲノムワイドに設置された 23,465 個のマイクロサテライトマーカを用いた関連解析を行うことにより、IgA 腎症の発症・進行と連鎖する領域の解析を行ってきた（医の倫理委員会 第 091-27 号「IgA 腎症感受性遺伝子のマイクロサテライト法による検索」）。18 歳以上の時点で腎生検により確定診断された IgA 腎症患者から、文章に基づく説明と同意のもとに採血を行い、同時に年齢・性別・血清クレアチニン値・血圧などの臨床情報を収集した。東海大学病院の 250 名を含め大阪大学、新潟大学および関連病院から計 600 名の検体を収集、採取済みの健常者の DNA 検体を選択し対照とした。まず、IgA 腎症患者 150 人分と健常者 150 人分の DNA を混合させたプールを作成し、3 回の独立した関連解析を行って関連のあるマイクロサテライトマーカを絞り込んだ (pooled DNA 法)。さらに、この 3 回のスクリ

ーニングによって陽性となった 60 のマーカーに対して、スクリーニングに使用した患者健常者各 450 人の個別の DNA サンプルを用いて、マイクロサテライトとその周辺 100kb の感受性領域を再解析した。この結果、現在までに 14 の感受性領域が同定された。将来的には同定された全ての感受性領域に関して感受性遺伝子の同定を行い、その機能解析を進めるべきではあるが、時間的・人的・資金的制約により、先ずは特定の領域に焦点を当てて解析を進めることとした（医の倫理委員会 第 091-25 号「IgA 腎症感受性遺伝子の研究」）。そこで最も odds ratio の高い領域に存在した *TSPAN8* について我々はさらなる解析を進めることとした。

c. Tetraspanin-8 とは

先の GWAS において有意を示した第 12 染色体長腕に位置するマーカー周辺には、唯一、既知の遺伝子として *TSPAN8* の存在が知られている。*TSPAN8* は tetraspanin-8 と呼ばれる膜 4

回貫通型蛋白をコードする遺伝子であり、消化管や筋骨格に多く mRNA を発現している。また腎組織を含め、ヒト組織に広く分布する事が知られている。Tetraspanin ファミリーは細胞表面でインテグリンや受容体、シグナル伝達分子などと複合体を形成することで、上皮細胞の分化や接着、遊走のプロセスに関与している分子である。Tetraspanin-8 (別名 TM4SF3, Co-029) の研究は腫瘍分野で盛んに行われている。過去の報告では結腸癌や膵癌、肝細胞癌に Tetraspanin-8 が強く発現しており、腫瘍細胞の遊走や浸潤を促進する事が示されている [17-22]。近年、腎不全研究の分野においても、尿細管上皮における接着因子活性や遊走能・浸潤能の獲得は、末期腎不全への common pathway とされる腎間質線維化に関連すると言われ、注目が集まっている。ゆえに尿細管上皮の接着活性・細胞運動性の獲得については、慢性腎不全進展防止のために解明すべき重要課題と言える [23-26]。

d. 本研究で明らかにすること

Rops らは tetraspanin ファミリーの一つである CD37 が、IgA の糸球体沈着を調節する因子であると示しているが、これまで IgAN と tetraspanin-8 の関連を報告したものはない [27]。またヒト腎組織内における tetraspanin-8 の分布についても報告がない。本研究の目的は GWAS によって見出された IgAN 感受性遺伝子である TSPAN8 が、IgAN の発症や進展にどのように関与しているのかを解明する事である。そこで我々は、ヒトの各種腎疾患において tetraspanin-8 の発現分布を免疫組織化学染色で解析するとともに、培養尿細管細胞 (HK-2) に TSPAN8 遺伝子を導入して *in vitro* での機能解析を実施した。

5. 考察と展望(Discussion)

今回のわれわれの IHC 結果によって、**tetraspanin-8** のヒト腎組織における分布が、遠位尿細管から集合管上皮細胞の一部や血管平滑筋細胞に分布する事が明らかとなった。さらに、**Tetraspanin-8** の尿細管における陽性率は腎障害と一致して上昇しており、**eGFR** とは負の相関関係が確認された。しかし **IgAN** と他の腎疾患とで発現パターンに相違はなく、**GWAS** 結果から予測されていた **IgAN** の発症に関与する因子としては、疑問の残る結果であった。

そもそもわれわれが **IgAN** 感受性候補遺伝子として同定した **TSPAN8** は、450 人の健常者と同数の腎生検で証明された **IgAN** 患者の間で **GWAS** を行った結果見出された遺伝子である。対象となった **IgAN** 患者のいくらかは、腎生検が必要と判断されるような腎機能低下を有している母集団であったと推測される。ゆえに **tetraspanin-8** 陽性率が全ての腎疾患で **eGFR** と相関していたということは、**TSPAN8** の多型が腎疾患共通の障害や修復に関わる因子である可能性を示唆している。

ヒト腎組織における tetraspanin-8 の発現パターンは、マウスでも同様に観察された。正常マウスでも遠位尿細管や集合管において tetraspanin-8 を発現していたが、腎障害モデルのマウスではより強い発現が観察された。種をまたいでも同様の結果が出るということは、tetraspanin-8 が腎疾患において重要な役割を持つということを示しているかもしれない。また、tetraspanin ファミリー CD151 や CD9 では、尿細管障害を受けてもその発現が強くなることはなかった。Tetraspanin ファミリーの中でも tetraspanin-8 には独自の役割があると考えられる。

腎臓における tetraspanin-8 の役割についてはこれまでに報告はない。癌の研究分野において、tetraspanin-8 は結腸癌や肝細胞癌、膵臓癌で発現が多いことが知られている。特に tetraspanin-8 の発現が多い癌細胞ほど、腫瘍進展や遠隔転移が起きやすいこと示され、インテグリンやラミニンといった接着因子と細胞外基質との間の活性を調節しているものと考えられている [20, 21, 31, 34, 35]。加えて、Penas らは tetraspanin-8 がケラチノサイトの接着や遊走能を制御することで、創傷治癒にも関与している事を報告した

[19]。われわれの培養細胞を用いた実験でも **tetraspanin-8** を強制発現した尿細管上皮細胞において、遊走能や浸潤能が高まる事が確認されている。

一般に **eGFR** が低下する腎疾患ほど尿細管障害を受けている。しかし障害が進展していく過程において、同時にそれを防御するプログラムも組織内では働く。それゆえに **eGFR** 低下と **tetraspanin-8** 発現が逆相関していたという結果は、**tetraspanin-8** が尿細管上皮細胞の修復に関与している可能性も推測させる。つまりは障害を受けた部位の尿細管上皮細胞が新たに増殖・遊走・再上皮化する過程において、**tetraspanin-8** が関与しているのかもしれない [23]。

IHC の所見において、**tetraspanin-8** は光顕上で障害を受けていない尿細管でもその発現が確認された。この発現部位における矛盾を説明するには、**tetraspanin-8** が近傍組織からの、例えば **TGF β** のようなパラクライン・オートクライン物質によって発現を促進されるわけではなく、**eGFR** の低下によってもたらされるような **systemic factor** によっても発現を促進されているものとする [36]。これは同じ **tetraspanin** ファミリーである **CD9** において、低酸素や高浸透圧といった環境

下で尿細管上皮細胞での発現が亢進する事と似ている
[32, 33]。今回の実験では低酸素が TSPAN8 の誘導を
もたらし傾向こそ見られたものの、発現量が少なく結果
も一定しなかったため、tetraspanin-8 を誘導する決
定的な因子を同定できなかった。今後はより精密な追試
や、足場となる細胞外基質を有した環境下での誘導実験
をする事も考えている。

6. 結論 (Conclusion)

われわれの GWAS によって見出された IgAN 感受性遺伝子である *TSPAN8* について検討した。*TSPAN8* がコードする蛋白である tetraspanin-8 は、腎組織において血管平滑筋細胞や一部の尿細管上皮細胞に発現していたが、IgAN とその他の腎疾患では発現パターンに違いは見られなかった。一方で、eGFR の低い症例ほど tetraspanin-8 の発現が多くなっていることが確認された。ゆえに *TSPAN8* の遺伝子多型は、IgAN 発症に関与するというよりも、腎疾患に共通する障害や修復に関わる因子である可能性が示唆された。

Tetraspanin-8 を強制発現させた培養尿細管細胞では遊走能と浸潤能が促進されていることから、tetraspanin-8 が腎機能の低下した組織において、尿細管の修復プロセスに関与しているものと考えられた。Tetraspanin-8 を誘導する因子や、より詳細な役割の解明が待たれる。