

# ラット進行性腎障害モデルにおけるPC細胞由来成長因子の発現調節の検討

荒川さやか

**Progranulin (PC-cell-derived growth factor : PCDGF)** は、悪性奇形腫 PC 細胞から分離された分泌型の成長因子であり、正常組織においては性腺、乳腺、肺、消化器、脳などの上皮細胞に発現が認められている。PCDGF は乳癌、卵巣癌などの腫瘍で強い発現が認められ、腫瘍新生に関与していることが知られている。また、一部では皮膚の創傷治癒や血管新生に関与しているとの報告もある。しかし疾患腎では、その発現および調節機構は未だ解明されていない。進行性腎疾患の原因は多彩であるが、最終的に不可逆性の腎不全に至る。我々は代表的な進行性腎障害モデルである5/6腎摘ラットを用い、PCDGFと疾患腎の関連を解析した。

PCDGF mRNA 及び蛋白発現は、腎機能低下に伴い増加した。免疫染色では、shamope 群では腎臓質に PCDGF の強い発現を認めたが、皮質では極わずかな発現しか認めなかつた。しかし5/6腎摘モデルの8週の腎組織では、PCDGF は皮質の萎縮尿細管上皮細胞に強い発現を認め、*in situ hybridization* でも同様の結果が得られた。さらに、16週の腎組織では PCDGF の発現はより広範囲に認められた。慢性の腎低酸素が進行性腎疾患の一因であることから、我々は低酸素が PCDGF の発現を誘導するのかについて検討した。ヒト腎尿細管上皮細胞において、24時間の低酸素ストレス（5%，1% O<sub>2</sub>）は、PCDGF の mRNA と蛋白発現を上昇させた。

ラット5/6腎摘モデルでは、慢性腎低酸素症が PCDGF の発現を誘導している可能性が示唆された。腎障害の病期進行に伴い PCDGF の発現が増強していることから、PCDGF は進行性腎疾患の病態形成に関与しているのかもしれない。

（平成19年10月17日受理）

## Expression and Regulation of PC-cell Derived Growth Factor in a Rat Model of Progressive Renal Disease

Sayaka ARAKAWA

The PC-cell derived growth factor (PCDGF) was originally purified from teratoma tumor cells and has multiple physiological actions on cell growth, migration, and transformation. The expression of PCDGF seems to be well regulated under normal conditions but little is known about the regulatory mechanisms under various pathological conditions. Progressive renal diseases are etiologically multifactorial and can result in irreversible renal failure. In this study, we investigated

the link between PCDGF and progressive renal disease using the remnant kidney, a suitable model for the study of progressive renal disease. The presence of high PCDGF mRNA and protein levels correlated with renal dysfunction. Immunohistochemical studies showed PCDGF expression in the kidneys of sham-operated rats, which was strong in the medulla but weak in the cortex. However, in the remnant kidneys, PCDGF expression was markedly increased in tubular epithelial cells of atrophic nephrons in the cortex at 8 weeks, which was also confirmed by in situ hybridization. Furthermore, PCDGF expression further increased with wide expansion at 16 weeks. Next, we examined the effect of hypoxia on PCDGF expression in tubular epithelial cells since chronic renal hypoxemia is considered a pathogenic mechanism of progressive renal disease. Exposure of cultured human renal epithelial cells to 24-hr hypoxia (5% and 1% oxygen) increased both the mRNA and protein levels of PCDGF in these cells. Our results suggest the involvement of PCDGF in the progression of renal diseases through abnormal overexpression in cortical tubular epithelial cells in response to chronic renal hypoxemia. (Accepted on October 17, 2007) *Kawasaki Medical Journal 34(1) : 33-45, 2007*

**Key Words** ① PC-cell derived growth factor ② remnant kidney  
③ progressive renal disease ④ hypoxia

## 緒 言

Progranulin (PC-derived growth factor; PCDGF) は悪性奇形腫の PC cell line から分離された593のアミノ酸からなる分泌型の成長因子である<sup>1), 2)</sup>。PCDGFは、グリコシレーションにより 6 kDa のシスティンリッチなポリペプチドの granulin となり、組織培養で細胞増殖に関与することが知られている<sup>2)</sup>。近年の報告で、PCDGFは免疫系や、脳の海馬や小脳の特定の神経細胞に発現していることが報告されている。PCDGFの発現は多くの上皮細胞で観察されているが、皮膚、消化管及び生殖器系以外の部位での発現は強くは認められていない<sup>3)</sup>。近年、PCDGFは phosphatidylinositol 3'-kinase, mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase や focal adhesion kinaseなどを介し細胞の増殖や運動、生存に関与していくことが判明してきた<sup>4), 5)</sup>。これらの細胞に対する PCDGF の働きは、腫瘍形成、創傷治癒などを含む複数のプロセスに関与していると考えられる。また、PCDGFの過剰発現は、複数の癌細胞や腫瘍組織で観察され<sup>6)~8)</sup>、正常の上皮

細胞の増殖とは独立した細胞増殖を刺激して、腫瘍形成に関与している<sup>9)</sup>。また PCDGF は初期胚上皮や胎生期ラット視床下部の発現にも関与している<sup>10), 11)</sup>。さらに最近では、PCDGF 遺伝子の変異が前頭側頭型痴呆の原因であることが特定され、PCDGF はニューロン生存のために重要な役割を果すことが示唆された<sup>12)</sup>。皮膚創傷治癒の過程においては、PCDGF は真皮線維芽細胞と内皮細胞に発現し、創傷治癒の促進に関与している<sup>13)</sup>。PCDGF の局所投与により、皮膚創部における好中球、マクロファージ、線維芽細胞が増加し、血管新生が促進する。これらの結果は、PCDGF の発現が様々な生理学的及び病理学的な調節に関与していることを示唆する。しかし、どのような生理学的あるいは病理学的プロセスが PCDGF の発現を誘導しているかは未だ解明されていない。

5/6腎摘モデルは進行性腎疾患モデルであり、腎疾患の病態解析に用いられる。このモデルでは急激な糸球体血行力学的变化が生じ、進行性の非可逆的腎機能低下をもたらし、最終的には末期腎不全 (end-stage renal failure; ESRF) の状態に至る。この ESRF に至る過程は最終共通路<sup>14)</sup>として認知されている。複数の因子が

5/6腎摘モデルの腎機能低下に関与しているが、そのうち尿細管間質障害が最も腎機能低下に関与しているとされている<sup>15)</sup>。尿細管間質障害は機能性ネフロン数を減少させ、糸球体濾過量を低下させる。これは傍尿細管毛細血管 (peritubular capillary ; PTC) の血流低下につながり、最終的にはネフロン単位の重篤な虚血性障害を引き起こす<sup>16)</sup>。これまで ESRF に至る機序として、蛋白尿が腎尿細管間質障害の重要な因子であるとされてきたが<sup>17), 18)</sup>、近年、慢性の腎低酸素症が ESRF の進行を加速させることが判明してきた<sup>19), 20)</sup>。慢性腎低酸素症は PTC を減少させ、炎症や尿細管間質の線維化を引き起こす<sup>20)</sup>。また低酸素に対する生理的反応として、肝細胞増殖因子や、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF) などのさまざまな遺伝子発現が誘導されるが、進行性の腎機能障害を抑えるには不十分である<sup>19)</sup>。

正常な腎組織で PCDGF は、髓質の集合上皮細胞で強い発現が認められるが、皮質の尿細管上皮では極めて弱い発現を認めるのみであり、糸球体や脈管には発現が認められていない<sup>3)</sup>。PCDGF が神経や皮膚などの様々な疾患に関与するという報告があるにも関わらず、進行性腎疾患における PCDGF の発現やその役割に関しての報告は未だなされていない。進行性腎疾患における PCDGF の役割を解明するために、我々は5/6腎摘モデルにおけるその発現及び局在を解析した。さらに、培養尿細管上皮細胞を用いて低酸素と PCDGF 発現の関係についても検討を行った。

## 材 料 と 方 法

### Animals

体重250-300 g の雄性 Wistar ラットを用いた。5/6腎摘術は、まず、セボフルレン吸入麻酔下に左腎動脈の2本の分岐の結紮を行った。これにより左腎臓のおよそ2/3の領域が梗塞を起こす。1週間後に右腎を全摘出し、5/6腎摘とした。術後、2週 (n = 5)、4週 (n = 5)，

8週 (n = 5)、16週群 (n = 5) のグループに分け観察した。対照群として sham ope 群 (Control ; n = 5) を作成した。各々の屠殺前に体重と血圧の測定、および24時間蓄尿を行い、尿蛋白量を測定した。屠殺時採取した血液を用い、血清クレアチニン値 (sCr)、血中尿素窒素値 (BUN) を測定した。

なお、本研究は川崎医科大学動物実験委員会承認 (No.04-004, 2004) のもと、川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施した。

### In situ hybridization

摘出腎臓より作成した切片を、1.0 g/ml のプロテイナーゼ K (Sigma Chemical, USA) で処理後、hybridization solution で30分間 pre-hybridizatin した。その後、切片はジゴキシゲニン (Dig) ラベルした PCDGF RNA プローブ (5'-TAAAGGGGTGGGTGCCGTGGGTGAAATGC ATCGCGTGTGA-3') で55°C、18時間 hybridization を行った。0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後、HRP 標識ウサギ抗 Dig 抗体 (Dako, Japan) を添加しインキュベートした。検出は、ジアミノベンチジン (DAB ; Dako, Japan) で行った。これらの実験には、全てアンチセンスプローブおよび、センスプローブの両者を用いて行った。

### Immunohistochemistry

免疫染色は4 μm のパラフィン包埋切片を用い、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するために、メタノールと3%過酸化水素水で前処理を行った。一次抗体はポリクローナルヤギ抗 PCDGF 抗体 (Santa Cruz, USA) を100倍希釈で用い、4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体はヒストファインシンプラスティン MAX - PO MULTI キット (ニチレイ, Japan) を用いて、DAB で検出した。ネガティブ・コントロールとして、マウス IgG1 (Santa Cruz, USA) を等濃度で使用した。

## RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNA は、TRIzol (Invitrogen Japan) で腎組織、または培養尿細管上皮細胞から抽出した。Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit (Amersham Biosciences, USA) で cDNA の合成を行った。Real-time quantitative PCR は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) を用いて Applied Biosystems Sequence Detector 7700 で測定した。PCDGF の解析は、forward primer (5'-TCACACCGCGATGCATTCA-3') と reverse primer (5'-CTGCCCTGTTGGTCCTTG-3') および蛍光プローブ (5'-FAM-CCACG GGCACCCACCCCTTACT-TAMRA-3') を用いて行った。測定値は、各々のサンプルでグリセルアルデヒド-3-リン酸塩デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 発現量で補正して解析を行った。

## Immunoblot analysis

腎組織、または細胞から蛋白を抽出し、イムノプロット<sup>21)</sup>を行った。抽出した蛋白は、7.5% の SDS-PAGE で電気泳動を行い、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは、室温で 200 倍希釈のヤギポリクローナル抗 PCDGF 抗体 (Santa Cruz, USA) と、1000 倍希釈のウサギ抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (Santa Cruz, USA) でそれぞれ 1 時間インキュベートした。シグナルは ECL-plus western blotting detection system (Amersham Biosciences, USA) で発光、レントゲンフィルムへ感光させ検出した。検出したバンドは NIH Image analysis software ver. 1.61 で定量した。

## Cell culture and hypoxia conditioned assay

正常ヒト腎上皮細胞 (Cambrex BioScienc, USA) は Renal Epithelial Cell Basal Medium (Cambrex) にハイドロコルチゾン (0.5 mg/ml), ヒト上皮成長因子 (10 pg/ml), エピネフリン (0.5  $\mu$ g/ml), トリヨードサイロニン (6.5 pg/ml), トランスフェリン (10  $\mu$ g/ml), インシュリン (5  $\mu$ g/ml), ゲンタマイシン (1  $\mu$ g/ml)

及び 2 % ウシ胎児血清を添加して培養を行った。低酸素における PCDGF の発現を検討するため、成長因子を除いた無血清の培地に替え、細胞は 37°C で Normoxia, 5% O<sub>2</sub> (5% hypoxia) と 1% O<sub>2</sub> (1% hypoxia) の低酸素下で 24 時間インキュベートし、mRNA 及び蛋白質抽出をおこなった。

## Statistical analysis

分散検定を F 検定にて行い、等分散の場合はスチューデントの t 検定を、等分散でない場合はウェルチの t 検定を用いて解析した。P < 0.05 を統計学的に有意差ありとした。

## 結果

### ラット 5/6 腎摘モデルにおける腎機能障害と PCDGF の発現の関与

正常の腎皮質では PCDGF の発現は弱いが<sup>3)</sup>、PCDGF は様々な細胞の病的な状況によって誘導され得る<sup>11), 13), 22)</sup>。我々は、quantitative real-time PCR とイムノプロットにて、ラット 5/6 腎摘モデルにおける PCDGF の mRNA 発現および蛋白発現とその定量を行った。PCDGF mRNA (Fig. 1A) と PCDGF 蛋白 (Fig. 1B) は Control 群においても発現が認められたが、5/6 腎摘モデルでは時間依存性に顕著な増加が認められた。mRNA は 5/6 腎摘後 8 週では Control 群と比較して約 2.2 倍、16 週では約 2.5 倍の増加がみられた。蛋白は 8 週では約 2.5 倍、16 週では約 2.7 倍の増加がみられた (Fig. 1C)。尿蛋白量は Control 群と比較して経時的に有意な増加を認めた。また収縮期血圧、sCr, BUN も 2 週より経時的に有意な上昇を認めた (Table 1)。これらの結果より、5/6 腎摘モデルでは、PCDGF は腎機能障害に伴い誘導される因子であり、腎機能障害の進行とその発現量が相関していることが示唆された。

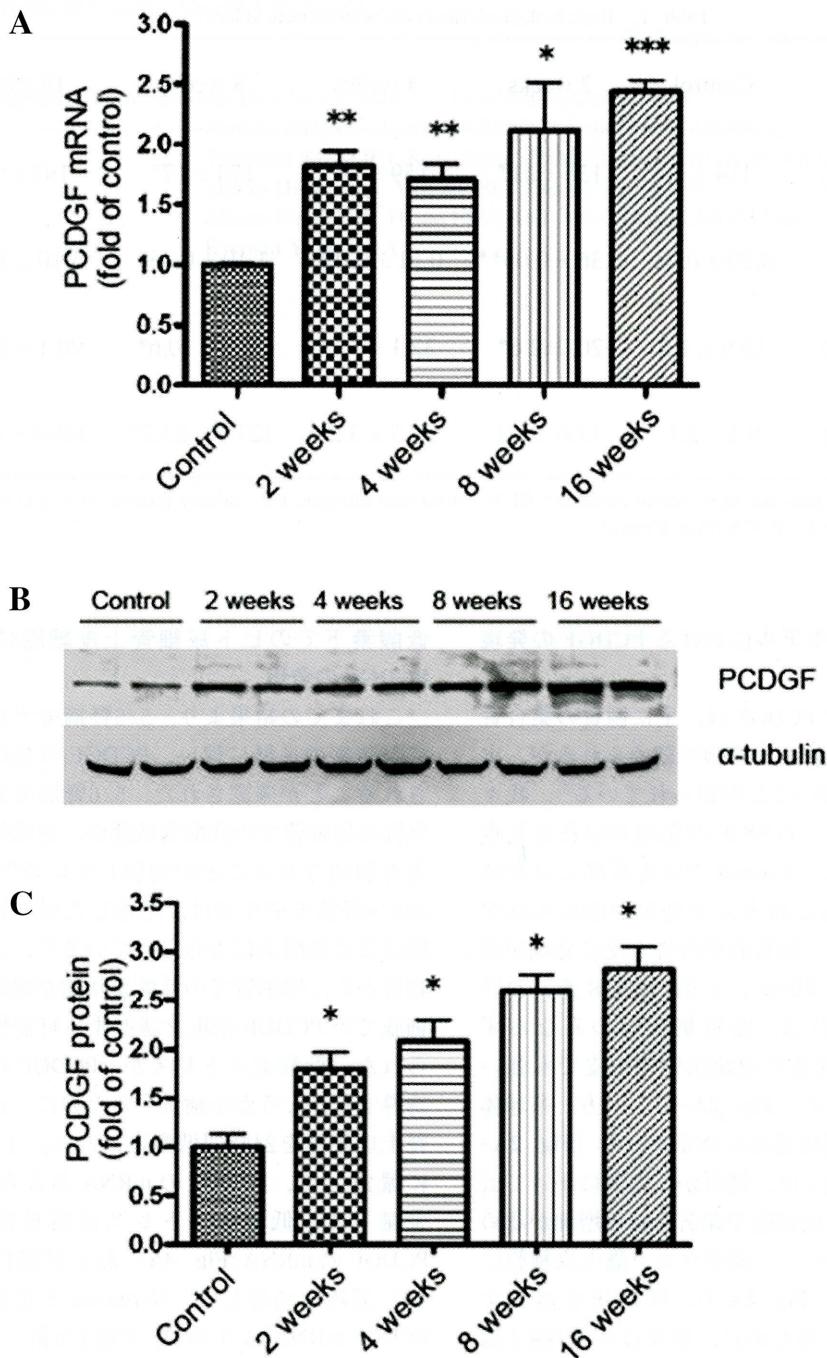


Fig. 1. Expression of progranulin is induced in the remnant kidney.

(A) Quantitative analysis of progranulin mRNA in sham-operated control and remnant kidneys at 2, 4, 8, 16 weeks after nephrectomy. Results were normalized to GAPDH and presented as Mean  $\pm$  SEM in triplicate independent experiments. \*P < 0.01 vs. Control, \*\*P < 0.05 vs. Control, \*\*\*P < 0.001 vs. Control. (B) Representative Immunoblot of progranulin in sham-operated (day 0) and remnant kidneys at 2, 4, 8, 16 weeks after nephrectomy. Each two independent results are presented. (C) Quantitative analysis of progranulin immunoblot in sham-operated control and remnant kidneys at 2, 4, 8, 16 weeks after nephrectomy. Results were normalized to  $\alpha$ -tubulin and presented as Mean  $\pm$  SEM in triplicate independent experiments. \*P < 0.01 vs. Control.

Table 1. Basic biological data in rats with remnant kidney.

	Control	2 weeks	4 weeks	8 weeks	16 weeks
SBP (mmHg)	114 ± 6	136 ± 11*	159 ± 12*	174 ± 17*	191 ± 12*
sCr (mg/dl)	0.29 ± 0.03	0.36 ± 0.05**	0.51 ± 0.09*	1.10 ± 0.43*	3.10 ± 1.00*
BUN (mg/dl)	15.9 ± 1.5	20.0 ± 2.6*	32.1 ± 5.2*	56.2 ± 10.6*	90.1 ± 37.0*
UP (mg/day)	9.1 ± 2.1	13.6 ± 5.2	39.5 ± 3.2*	127.4 ± 23.2*	326.4 ± 69.3*

SBP ; systic blood pressure, sCr ; serum creatinine, BUN ; blood urea nitrogen, UP ; urinary protein. n = 5 in each group.

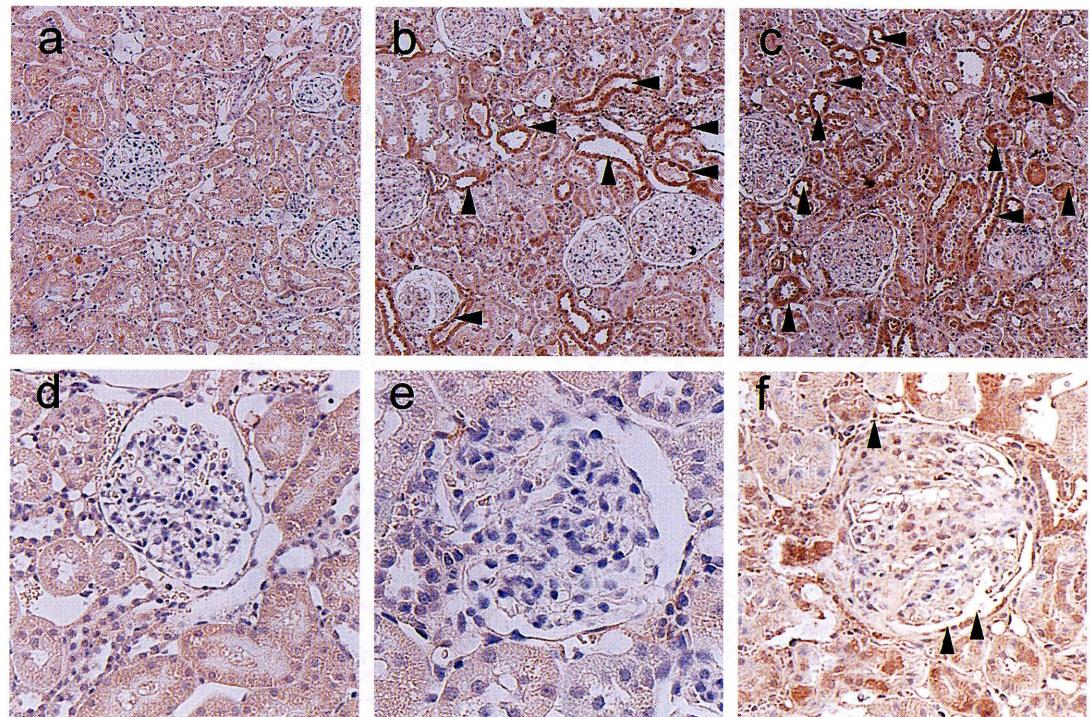
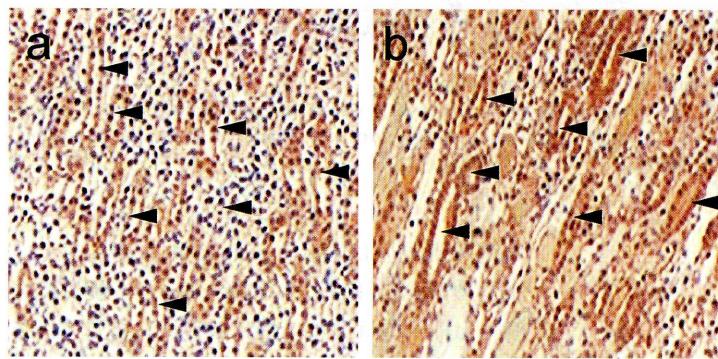
\*P < 0.01 vs. Control, \*\*P < 0.05 vs. Control.

### ラット5/6腎摘モデルにおけるPCDGFの発現の局在

正常腎組織でPCDGFは、主に髓質の集合管上皮細胞や尿細管上皮細胞で認められるが、皮質での発現は弱いことが知られている<sup>3)</sup>。我々は、5/6腎摘後のPCDGFの発現の局在を免疫染色で検討した。Controlでは皮質部では糸球体、尿細管とともにほとんど発現が認められず(Fig. 2A-a, d), 髓質の集合管上皮に発現が認められた(Fig. 2B-a)。5/6腎摘後8週における、PCDGF蛋白は、髓質集合管のみならず(Fig. 2B-b), 皮質の萎縮尿細管上皮でも強い発現が認められた(Fig. 2A-b)。一方、糸球体内にはその発現は認められなかった(Fig. 2A-e)。さらに16週では、髓質から皮質にかけて広範囲に尿細管上皮細胞で顕著な発現増加が認められ(Fig. 2A-c), 一部ボウマン嚢上皮細胞にも観察された(Fig. 2A-f)。PCDGFを誘導する細胞を特定するために、我々は5/6腎摘8週モデルでin situ hybridizationを用いてmRNAの局在を調べた。PCDGFのmRNAは尿細管上皮細胞で発現しており、特に萎縮尿細管においては著明であった。これは免疫染色の結果と一致していた(Fig. 3B)。

### 低酸素下でのヒト尿細管上皮細胞におけるPCDGFの発現

これまでの結果より、5/6腎摘モデルにおいて腎障害の進展に伴い、PCDGFの発現が誘導されることが確認された。5/6腎摘モデルでは慢性の尿細管での低酸素状態が、尿細管間質障害を加速させることが判明している<sup>19), 20)</sup>。また5/6腎摘モデルでは、萎縮した尿細管上皮細胞は常に低酸素にさらされている<sup>23)</sup>。これらの報告から、尿細管での低酸素状態が尿細管上皮細胞でのPCDGF発現を誘導する可能性を考えられた。低酸素ストレスが、PCDGFの発現を誘導するかどうかを検証するために、正常ヒト腎上皮細胞を24時間低酸素(5%, 1% O<sub>2</sub>)に暴露して、PCDGFのmRNAおよび蛋白を定量した。低酸素ストレスは用量依存的にPCDGFのmRNA(Fig. 4A)および蛋白(Fig. 4B)発現を誘導した。Normoxiaと比較して、PCDGF mRNAは5% O<sub>2</sub>で約1.6倍、1% O<sub>2</sub>では約1.9倍と有意に増加した。PCDGF蛋白も5% O<sub>2</sub>で約1.2倍、1% O<sub>2</sub>で約1.5倍と有意に増加した(Fig. 4C)。これらの結果より、尿細管低酸素状態がPCDGFの発現を促進することが確認された。

**A****B**

**Fig. 2.** Induction of progranulin occurs in tubular epithelial cells of the remnant kidney model.

(A) Immunohistochemistry images of progranulin in the cortex of sham-operated control (a, d) and remnant kidneys at 8 (b, e), 16 (c, f) weeks after nephrectomy. Arrowhead indicates positive staining of PCDGF. Original magnification ; a, b, c ; X 100. d, e, f ; X 200. (B) Immunohistochemistry images of progranulin in the medulla of sham-operated control (a) and remnant kidneys at 8 (b) weeks after nephrectomy. Arrowhead indicates positive staining of PCDGF. Original magnification ; X 400.

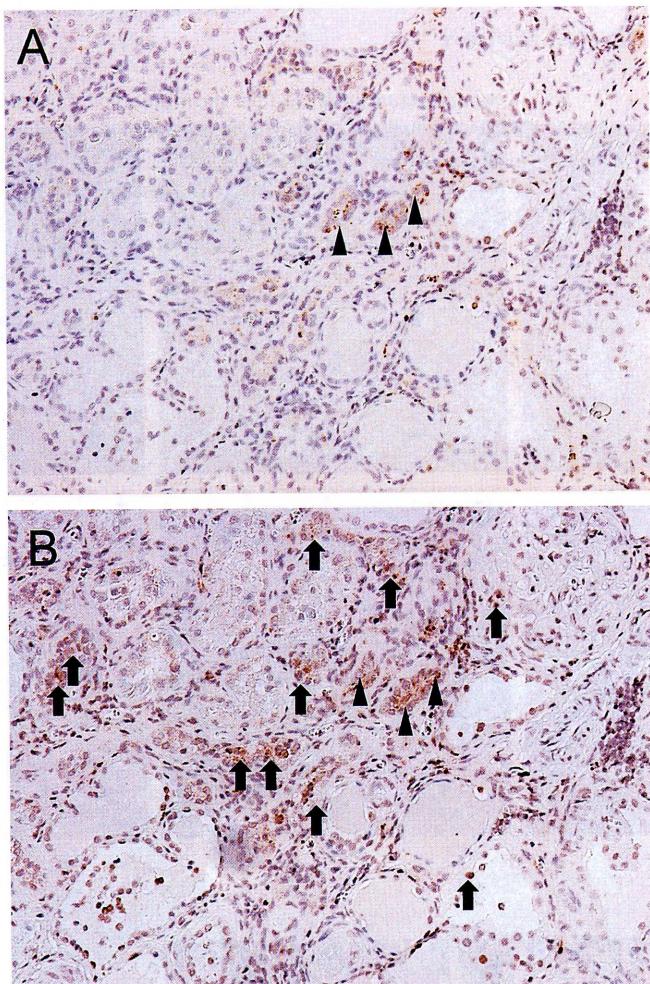


Fig. 3. Progranulin is induced in tubular epithelial cells of atrophic nephrons.

In situ hybridization of progranulin mRNA in the cortex of remnant kidney at 16 weeks after nephrectomy. Images present sense probe (A) and antisense probe (B). Original magnification, X 200. Arrowhead indicates false positive staining, and arrow indicates positive staining of PCDGF.

## 考 察

本研究において、我々は5/6腎摘モデルの腎障害進展過程で、慢性腎低酸素症がPCDGFの発現に関与することを証明した。虚血シグナルは障害の強いネフロンの近位尿細管で観察されたとの報告から<sup>23)</sup>、PCDGFの発現パターンは虚血シグナルの発現領域とほぼ一致していると考えられる。正常な腎組織ではPCDGFは髓質の尿細管上皮細胞に発現する。腎臓の解剖上、

皮質酸素分圧は約50 mmHg であるのに対し、髓質の酸素分圧は10~20 mm Hg と、髓質の尿細管上皮細胞は常に低酸素境界域にある<sup>24)</sup>。これらの事実も、低酸素ストレスがPCDGFの誘導に関与していることを示唆し、正常腎組織における髓質尿細管上皮細胞においてPCDGFの発現が強く認められたことを裏付けている。

進行性腎疾患において低酸素ストレスは様々な遺伝子発現を誘導する。これらの低酸素反応性遺伝子のうち、Hypoxia-response elements (HREs) は、cis 制御プロモーター領域で特定

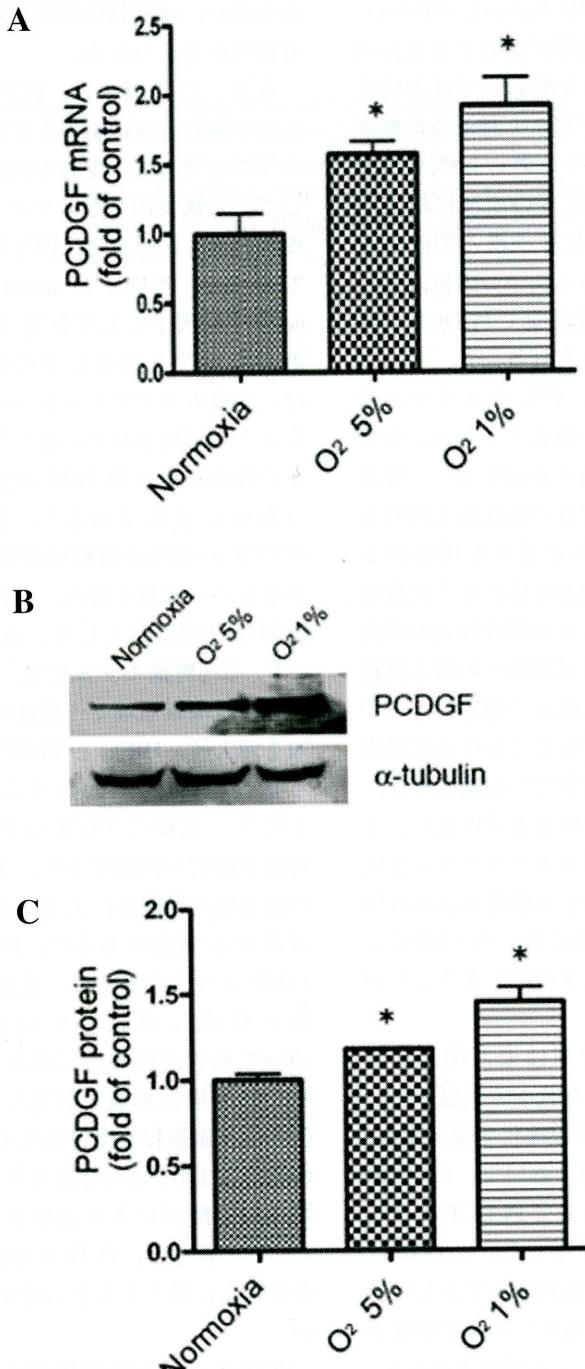


Fig. 4. Progranulin expression is increased by hypoxia in tubular epithelial cells.

(A) Quantitative analysis of progranulin mRNA in normal human renal epithelial cells exposed to normoxia and hypoxia (5 % or 1 % O<sub>2</sub>). Results were normalized to GAPDH and presented as Mean ± SEM in triplicate independent experiments. (B) Representative immunoblot of progranulin in normal human renal epithelial cells exposed to normoxia and hypoxia. (C) Quantitative analysis of progranulin immunoblot in normal human renal epithelial cells exposed to normoxia and hypoxia. Results were normalized to α-tubulin and presented as Mean ± SEM in triplicate independent experiments. P < 0.05 vs. Normoxia.

された<sup>25)</sup>。Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)は、HREsに結合する低酸素に反応する転写因子である<sup>26)</sup>。HIF-1は正常な酸素下では不活性であるが、酸素分圧の低下により様々な低酸素に反応する遺伝子のプロモーター上で、HREsと結合し、目標遺伝子の転写の増加に帰着する<sup>27)</sup>。しかし、PCDGFの転写機構の明確な証拠は現在のところ不明である。一つの仮説として、HIF-1が腎尿細管間質細胞でPCDGFの転写を調整する可能性が考えられる。

慢性の腎低酸素状態は、PTCやネフロン数の減少、血行力学的障害、酸化ストレス、間質の線維化などの多因子環境を惹起する<sup>28)</sup>。腎障害の進行過程で、尿細管間質の慢性的な低酸素がESRFに至る最終共通路と密接な関係があるとされている<sup>29)</sup>。腎低酸素症は炎症と組織線維化に関与していて、さらに尿細管間質の線維化は酸素の拡散と尿細管間質細胞への酸素供給を低下させる。これは腎低酸素の増悪につながる<sup>30)</sup>。この病的過程は、腎疾患における低酸素の悪循環と尿細管間質の線維化を加速させる。低酸素ストレスは腎線維芽細胞を活性化し、また、メサンギウム細胞の増殖とコラーゲン合成を促進する<sup>31)</sup>。またいくつかの低酸素誘導性因子は、低酸素に対して予防的に働くのと同時に、尿細管間質の線維化を促進させてしまうことが判明している<sup>32)</sup>。

PCDGFの腎における役割は未だ明らかになっていない。これに関する我々の仮説の1つは、PCDGFの発現増加が腎線維化を促進する、ということである。本研究において、5/6腎摘モデルの腎障害進行と一致してPCDGFの発現が亢進することが明らかになった。PCDGFは細胞増殖に対する強い刺激物質因子である可能性があり、皮膚創傷治癒の過程において線維芽細胞や好中球、マクロファージを増加させる<sup>13)</sup>。5/6腎摘モデルでも腎組織への線維芽細胞や好中球、マクロファージの浸潤増加が認められ、部分的に皮膚創傷治癒と類似のプロセスを示す。従って、5/6腎摘モデルにおいて、PCDGFはそれらの細胞増殖を刺激し、炎症反

応を強め、尿細管間質線維化の進行に関与する可能性が考えられる。

もう一つの仮説は、PCDGFが5/6腎摘モデルの尿細管上皮細胞の生存に寄与している、ということである。皮膚や消化管上皮細胞に発現している成長因子としてのPCDGFの働きは上皮ホメオスタシスに関与していると考えられている<sup>33)</sup>。PCDGFはautocrineまたはparacrineの成長因子として作用すると考えられ、皮膚や消化管上皮などでの強いPCDGFの発現は、組織ホメオスタシスの重要な役割を演ずることが示唆されている<sup>34),33)</sup>。実際に、いくつかの腫瘍細胞はPCDGFの過剰発現が細胞生存のために必要である<sup>34)</sup>。我々は本研究で、PCDGFの発現が萎縮尿細管上皮細胞に著明であるという結果を得た。慢性腎低酸素症は、一般的な生理反応として、血管新生を促進させる<sup>30)</sup>。5/6腎摘モデルでは、血管新生の反応として、低酸素領域で一過性の血管内皮細胞の増殖を示し<sup>23)</sup>、HIF-1とVEGFは血管新生において重要な役割を果たすことが知られている<sup>23),35)</sup>。実際にVEGFはPTCの減少と尿細管間質障害を抑制する<sup>35)</sup>。またHIF-1には、その酸素感受性機構により種々の遺伝子の発現を誘導する機能がある<sup>26)</sup>。HIF-1の活性化は、VEGFよりも生理的に、虚血に対して組織の防御と修復に貢献している<sup>36)</sup>。PCDGFはin vitroで血管内皮細胞に働き、毛細血管に類似した管腔構造形成を促進し、in vivoでも皮膚の創傷治癒過程で血管新生を促進した<sup>13)</sup>。我々の研究により、5/6腎摘モデルでは、PCDGFの発現が低酸素により誘導されることが判明した。この結果は、PCDGFが低酸素に反応して、血管新生に働くことを示唆するものかもしれない。

PCDGFの進行性腎障害における役割の確証を得るためにには、今後PCDGFの欠損モデル、或いはインヒビターを用いての検討が必要と考えられる。進行性腎疾患のESRFに至る最終共通路において、低酸素や尿細管間質の線維化は悪循環を招く重要な要因である。従って

PCDGFが腎の増悪因子であるならば、PCDGFのインヒビターは、腎疾患の治療に貢献する可能性が示唆される。逆にPCDGFに腎保護作用があるならば、PCDGF投与は腎機能改善・腎機能維持に有用であろう。

本研究からPCDGFは、5/6腎摘モデルの尿細管上皮細胞で発現が亢進していることが明らかになった。In vivoでの時間的な発現パターンは、慢性腎低酸素症がPCDGFの発現を刺激することを示唆し、in vitroでの、低酸素がPCDGFの発現を刺激したことにより確証づけられた。今回の結果によりPCDGFは腎疾患の進行において重要な役割を果たす可能性が示唆

された。PCDGFの発現制御は進行性腎疾患の進行を抑制する可能性がある。今後、ヒト腎生検組織での発現評価を含めPCDGFの機能を解明していく必要がある。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました本学腎臓内科学教室、佐藤稔講師に深甚な謝意を表すとともに、御校閲、御助言賜りました柏原直樹教授、佐々木環教授、富田奈留也准教授に深謝申し上げます。さらに実験に御協力賜りました藤本壯八先生、春名克祐先生、浪越為八先生に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- Zhou J, Gao G, Crabb JW, Serrero G : Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem* 268 : 10863 – 10869, 1993
- Bateman A, Bennett HP : Granulins : the structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol* 158 : 145 – 151, 1998
- Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A : Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem* 48 : 999 – 1009, 2000
- Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentinis B, He ZH, Baserga R : Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res* 59 : 5331 – 5340, 1999
- Monami G, Gonzalez EM, Hellman M, Gomella LG, Baffa R, Iozzo RV, Morrione A : Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex. *Cancer Res* 66 : 7103 – 7110, 2006
- Zhang H, Serrero G : Inhibition of tumorigenicity of the teratoma PC cell line by transfection with antisense cDNA for PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) . *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 14202 – 14207, 1998
- Wang W, Hayashi J, Kim WE, Serrero G : PC cell-derived growth factor (granulin precursor) expression and action in human multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 9 : 2221 – 2228, 2003
- Davidson B, Alejandro E, Florenes VA, Goderstad JM, Risberg B, Kristensen GB, Trope CG, Kohn EC : Granulin-epithelin precursor is a novel prognostic marker in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 100 : 2139 – 2147, 2004
- He Z, Bateman A : Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res* 59 : 3222 – 3229, 1999
- Diaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL : Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor) . *Dev Biol* 217 : 406 – 418, 2000
- Suzuki M, Yoshida S, Nishihara M, Takahashi M : Identification of a sex steroid-inducible gene in the neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 242 : 127 – 130, 1998
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sardovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robison T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M : Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442 : 916 – 919, 2006

- 13) He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A : Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med* 9 : 225 – 229, 2003
- 14) Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM : Hyperfiltration in remnant nephrons : a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 241 : F 85 – 93, 1981
- 15) Fine LG, Bandyopadhy D, Norman JT : Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney Int Suppl* 75 : S22 – 26, 2000
- 16) Mackensen-Haen S, Bader R, Grund KE, Bohle A : Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate. *Clin Nephrol* 15 : 167 – 171, 1981
- 17) Remuzzi G, Bertani T : Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339 : 1448 – 1456, 1998
- 18) Zaja C, Benigni A, Remuzzi G : Cellular responses to protein overload : key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13 : 31 – 37, 2004
- 19) Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ : Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13 : 806 – 816, 2002
- 20) Eckardt KU, Rosenberger C, Jurgensen JS, Wiesener MS : Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Blood Purif* 21 : 253 – 257, 2003
- 21) Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, Kashihara N : NAD (P) H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 288 : F 1144 – 1152, 2005
- 22) Lu R, Serrero G : Stimulation of PC cell-derived growth factor (epithelin/granulin precursor) expression by estradiol in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256 : 204 – 207, 1999
- 23) Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Ingelfinger JR, Adler S, Fujita T, Nangaku M : Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Lab Invest* 85 : 1292 – 1307, 2005
- 24) Brezis M, Rosen S : Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med* 332 : 647 – 655, 1995
- 25) O'Rourke JF, Dachs GU, Gleale JM, Maxwell PH, Pugh CW, Stratford IJ, Wood SM, Ratcliffe PJ : Hypoxia response elements. *Oncol Res* 9 : 327 – 332, 1997
- 26) Semenza GL : Hypoxia-inducible factor 1 : oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 7 : 345 – 350, 2001
- 27) Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL : Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 272 : 19253 – 19260, 1997
- 28) Nangaku M : Hypoxia and tubulointerstitial injury : a final common pathway to end-stage renal failure. *Nephron Exp Nephrol* 98 : e 8 – 12, 2004
- 29) Roxburgh SA, Murphy M, Pollock CA, Brazil DP : Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis--the importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. *Nephron Physiol* 103 : p139 – 148, 2006
- 30) Norman JT, Fine LG : Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33 : 989 – 996, 2006
- 31) Sodhi CP, Phadke SA, Batlle D, Sahai A : Hypoxia and high glucose cause exaggerated mesangial cell growth and collagen synthesis : role of osteopontin. *Am J Physiol Renal Physiol* 280 : F 667 – 674, 2001
- 32) Norman JT, Clark IM, Garcia PL : Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* 58 : 2351 – 2366, 2000
- 33) Xia X, Serrero G : Identification of cell surface binding sites for PC-cell-derived growth factor, PCDGF, (epithelin /granulin precursor) on epithelial cells and fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 245 : 539 – 543, 1998
- 34) He Z, Ismail A, Kriazhev L, Sadvakassova G, Bateman A : Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin)

- regulates invasion and cell survival. *Cancer Res* 62 : 5590 – 5596, 2002
- 35) Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ : Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 12 : 1448 – 1457, 2001
- 36) Elson DA, Thurston G, Huang LE, Ginzinger DG, McDonald DM, Johnson RS, Arbeit JM : Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev* 15 : 2520 – 2532, 2001