

WKY ラット半月体形成性腎炎モデルにおける ボウマン嚢上皮細胞マーカーとしての PGP 9.5 の 免疫組織学的検討

武田之彦 白土 公 林 佳代 何 勁松
富野康日己

Immunohistochemical analysis of protein gene product 9.5, a new marker for parietal epithelial cells of Bowman's capsules, in anti-glomerular basement membrane (GBM) antibody induced glomerulonephritis of WKY rats

Yukihiko TAKEDA, Isao SHIRATO, Kayo HAYASHI, Jin-Song HE, and Yasuhiko TOMINO

Division of Nephrology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is expressed specifically in neuroendocrine cells and considered to be one of the neuroendocrine markers. Recently, we reported that PGP 9.5 is localized in the parietal epithelial cells (PECs) of Bowman's capsules as well as in neural tissues. In the present study, immunohistochemical analysis of PGP 9.5 as a specific marker of the PECs of Bowman's capsules, synaptopodin as a podocyte-specific marker, and ED-1 as a specific marker of monocytes/macrophages was performed in the cellular crescents in anti-GBM antibody induced glomerulonephritis of WKY rats using serial renal sections.

In the acute phase of anti-GBM antibody induced glomerulonephritis, and the expression of PGP 9.5 and ED-1 was observed diffusely in proliferating cells of cellular crescents. However, in most part of cellular crescents, PGP 9.5 positive areas did not overlap with the ED-1 positive areas. Synaptopodin was constantly detected along the glomerular tufts compressed by the crescents. In the chronic phase of this disease, PGP 9.5 was observed in the cells covering the surface of fibrous crescents or scattered within fibrocellular crescents.

Synaptopodin was partially detected in such cells. It appears that cellular crescents are composed mainly of proliferating PECs and macrophages in rat anti-GBM antibody-induced glomerulonephritis.

Jpn J Nephrol 2001 ; 43 : 20-27.

Key words : protein gene product 9.5, ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 1, parietal epithelial cells of Bowman's capsules, anti-GBM antibody induced glomerulonephritis

緒 言

Protein gene product (PGP) 9.5 は、神経細胞に特異的に発現し多量に存在する neuroendocrine marker である。ubiquitin system は、生体内で蛋白質の量的なコントロールを行い、種々の細胞の恒常性を維持している。PGP 9.5

は、ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 1 (UCHL 1) であり、生体の蛋白質分解の過程において脱ユビチキン化の役割を担っていると考えられている¹⁾。

生体内で PGP 9.5 は主として脳神経細胞に存在するが、神経細胞に比較すると微量ながら精巣や腎臓にも存在しているとの報告^{2,3)}がある。われわれは、近年 PGP 9.5 が正

常ラット腎組織において、神経組織とともに糸球体のボウマン嚢上皮細胞(parietal epithelial cells of Bowman's capsules: PECs)内に発現することを報告した⁴⁾。そのうえ、尿細管上皮細胞や糸球体メサンギウム細胞、糸球体上皮細胞(visceral epithelial cells: VECs or podocyte)などにはその発現を認めないことから、PGP 9.5はボウマン嚢上皮細胞に特異的に局在していると考えられた⁴⁾。このことは、PGP 9.5がラットにおけるボウマン嚢上皮細胞に対する数少ないマーカーの一つとして有用である可能性を示唆している。

抗基底膜抗体投与による糸球体腎炎における半月体(crescent)の形成機序は、糸球体係蹄から浸潤した活性化マクロファージより分泌されたMIF, MCP-1, IL-1, IL-6, TNF- α , FGF, PDGF, TGF- β などの種々のサイトカインや成長因子などの働きにより細胞性半月体が発現し、IV型collagen, lamininやfibronectinなどに代表される細胞外基質の産生により線維性半月体から糸球体硬化へと進行する^{5~9)}。

今回、WKYラットの抗基底膜抗体糸球体腎炎モデルを用い、細胞性半月体形成から糸球体硬化に関与する構成細胞に注目した。新たなボウマン嚢上皮細胞のマーカーとして考えられるPGP 9.5と、既存のsynaptopodin, ED-1など各細胞マーカーを用いて、半月体構成細胞を免疫組織学的に同定し検討を加えた。

対象と方法

1. 実験動物と腎炎モデルの作製

平均体重約150g(140~170g)の雄性Wistar Kyoto(WKY)ラット(Japan Charles River Laboratory Kanagawa, Japan)を実験動物として用いた。半月体形成性腎炎モデルは、既報^{9~11)}の方法に従い、WKYラットにウサギ抗ラット基底膜抗血清(5 μ l/100g体重)を尾静脈から経静脈的に投与し作製した。それぞれday 0, 3, 7, 14, 21, 28

(各群5匹)にてmetabolic cageを用い、自由摂食・摂水させ24時間尿中蛋白排泄量を測定した。対照群として正常ウサギIgG血清を投与したWKYラット(各5匹)を用いた。

腎組織の採取にあたっては、ペントバルビタール(0.1mg/100g体重)の腹腔内麻酔下で開腹し、腹部大動脈を剝離露出後、22G翼状針を用いて、逆行性に4°Cの4%パラホルムアルデヒド(PFA)で5分間の灌流固定を行った。次いで、5分間20%蔗糖液での灌流を行い腎臓を摘出した。その後、20%蔗糖液に4°C、24時間浸透させ、腎皮質を5mm角大に細切しOCT compoundにて包埋後、液体窒素を用いて急速凍結した。その後、クリオスタットにより4 μ m厚の連続薄切切片を作製した。

2. 免疫組織学的検討

ラット腎皮質組織の連続凍結切片を用い、以下の方法で免疫組織学的に検討した。一次抗体はTableに示したものをを用いたが、予備実験での所見をもとに、希釈倍率や反応時間などを決定し使用した。二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗血清(ICL/Cappel, California, USA, 正常ラット血清にて吸収済)を用い、蛍光抗体間接法による免疫組織染色を行いそれぞれの抗原の局在を蛍光顕微鏡により観察した。

結果

1. 24時間尿中蛋白排泄量

ウサギ抗ラット基底膜抗血清を投与したラット半月体形成性腎炎における24時間尿中蛋白量は、day 3よりday 28まで経時的に増加を認め、正常ウサギIgG血清を投与した対照群と比較し有意な差が認められた(* $p < 0.001$) (Fig. 1)。

2. 組織学的所見

A. 光学顕微鏡による形態学的所見

day 0に比較し、day 3では糸球体メサンギウム細胞の

Table. Primary antibodies used for immunohistochemical staining

Antibodies	Localization for positive staining	Species (clone)	Dilution	Source
PGP 9.5	parietal epithelial cell of Bowman's capsule, neuron	mouse monoclonal antibody (13C4 & 31A3)	1 : 400	Biogenesis UK
Synaptopodin	visceral epithelial cell (podocyte)	mouse monoclonal antibody (G1D4)	1 : 20	Progen Biotechnik Germany
ED-1	rat monocyte/macrophage	mouse monoclonal antibody (ED-1)	1 : 800	Serotec Ltd. UK

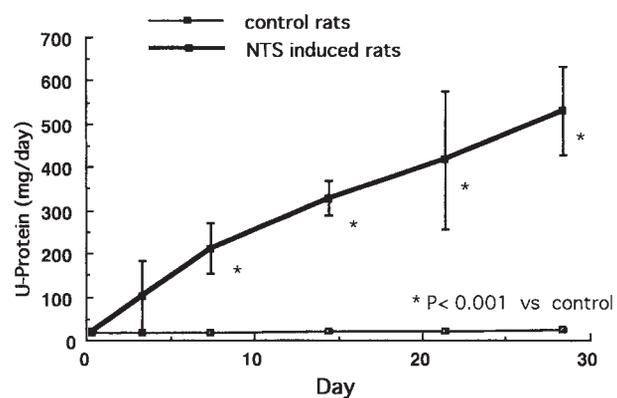


Fig. 1. 24 hr urinary protein excretion in anti-GBM glomerulonephritis of WKY rats and control rats

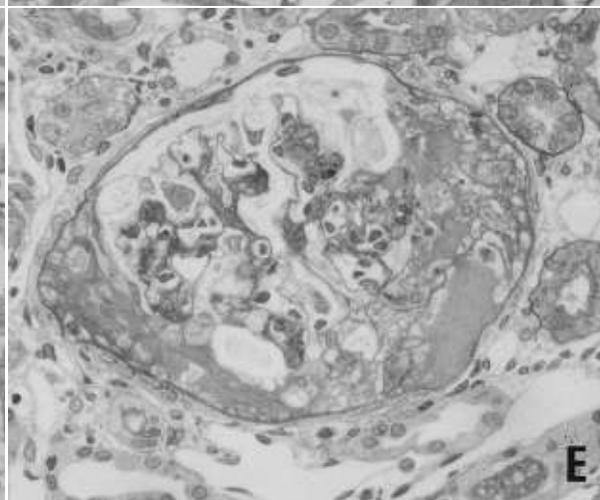
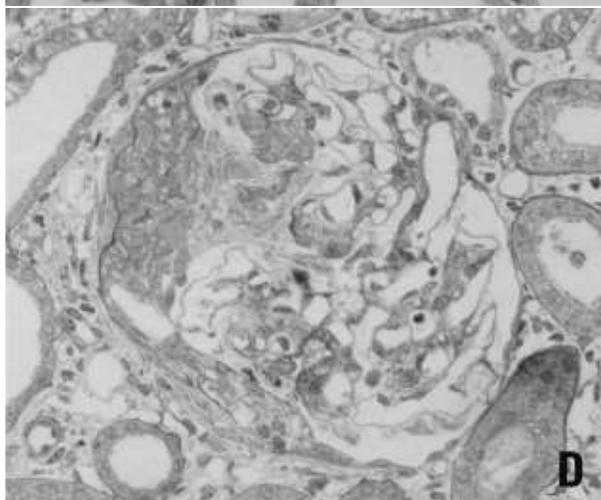
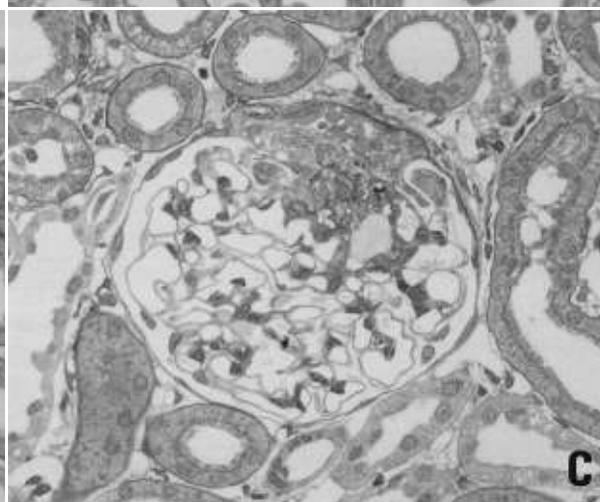
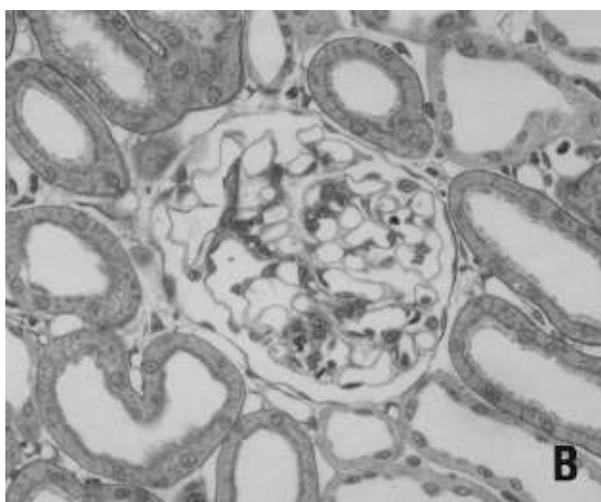
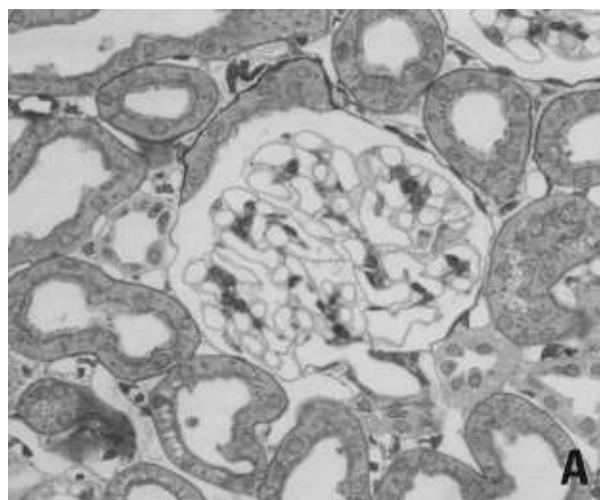


Fig. 2. Histologic findings of periodic acid-schiff staining in glomerulus of anti-GBM glomerulonephritis of WKY rats by light microscopy ($\times 360$)

A : day 0 B : day 3 C : day 7 D : day 14 E : day 28

Collapse of the glomerular capillaries with mesangial matrix and cellular infiltrations were observed on day 7 of disease. Fibrocellular crescents filled Bowman's space and destruction of the glomerular structure progressed on days 28 of disease.

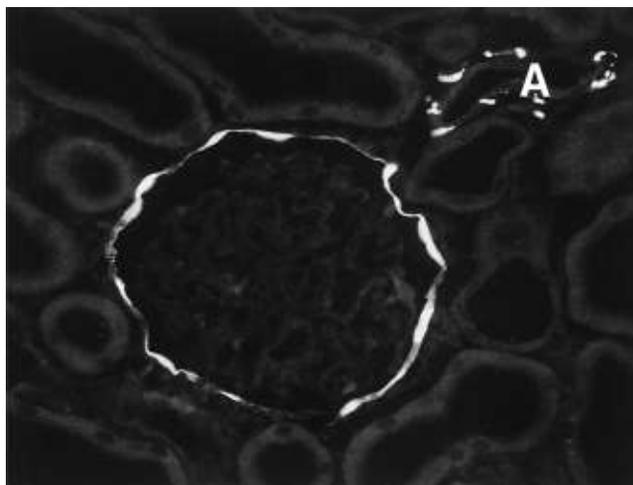


Fig. 3. Immunofluorescence staining for PGP 9.5 in the renal cortex of control rat (×360)

The expression of PGP 9.5 is localized only in parietal epithelial cells of Bowman's capsule and in nerve fibers alongside arterioles (A)

軽度の増殖が認められた (Fig. 2A, B)。しかし、明らかな糸球体係蹄外への細胞浸潤や癒着像などの変化は乏しかった。day 7 より day 14 において、細胞浸潤や糸球体係蹄のボウマン囊との癒着像が出現し、また細胞性半月体の形成も認められた (Fig. 2C, D)。

day 28 では、細胞性半月体から線維性半月体への変化が高度となり、ボウマン囊の構造は細胞線維性半月体により占居され糸球体の完全硬化像 (global sclerosis) も散見された。また、間質へのリンパ球を中心とした細胞浸潤や線維化、尿細管の萎縮などの終末期の腎組織像が認められた (Fig. 2E)。

B. 各抗体を用いた免疫組織学的所見

1) day 0 から day 3

day 0, つまり正常のラット腎組織において、PGP 9.5 は細動脈周囲に存在する神経線維に強く発現を認め、それとともにボウマン囊上皮細胞に全周性に陽性所見を示した。糸球体内や尿細管上皮細胞などの組織には陰性であった (Fig. 3)。

対して、糸球体上皮細胞のマーカーとして特異的な synaptopodin は正常な糸球体上皮細胞に局限して発現を認めた。また、マクロファージのマーカーである ED-1 陽性細胞の出現は、糸球体内や間質などには認められなかった。day 3 では、糸球体構造の著変がなく、PGP 9.5 や synaptopodin における発現分布に大きな変化はなかった。また、ED-1 陽性細胞は糸球体係蹄内に発現を認めており、軽度のマクロファージの浸潤を示唆した。

2) day 7 から day 14

day 7 から day 14 では、PGP 9.5 は、糸球体係蹄からボウマン囊へと癒着を起こした部位とその周辺の肥厚したボウマン囊上皮に発現を認めた (Fig. 4B)。対照的に、synaptopodin はほぼ正常な係蹄構造を示す部位の糸球体上皮細胞に陽性であったが、癒着部位や細胞性半月体を形成している病変部位においては発現が消失した (Fig. 4C)。また、PGP 9.5 と synaptopodin の発現は半月体形成の段階で、同一糸球体において大部分は重複して発現する領域の細胞は認められず、陽性所見の比較においては reciprocal pattern を示した。よって、陽性所見を認めた部位は、それぞれがボウマン囊上皮細胞、糸球体上皮細胞由来であると考えられた。しかし、PGP 9.5 とともに synaptopodin が発現を認める細胞も少数ながら存在した (Fig. 4A~C 矢印部分)。

また、ED-1 陽性細胞に関しても連続切片で観察したが、多くは糸球体係蹄からボウマン囊上皮側への癒着や細胞性半月体形成の病変部位に一致して発現しており、マクロファージはボウマン囊上皮細胞とともに細胞性半月体の構成細胞の一端を担っていることが示唆された (Fig. 4D)。

3) day 28

day 28 では、細胞外基質の増生により細胞性半月体から線維性半月体への変化が強くなり、糸球体硬化像が進行して、ボウマン腔は線維性半月体に占拠され、その表面や線維性半月体内に残存する細胞に PGP 9.5 は発現していた。synaptopodin は全体的には著明な発現性の低下を認め、残存する糸球体係蹄と考えられる領域にわずかに陽性所見を認めるのみであった。そして PGP 9.5 と synaptopodin がともに発現する細胞も認められたものの、糸球体構造の破壊が進行しており、形態学的にそれぞれの細胞を明確に区別するのは困難であった。

考 察

糸球体硬化の過程のなかで半月体を形成する構成細胞に関しては様々な議論がなされている。糸球体上皮細胞 (podocyte) の脱落から生じる糸球体基底膜の破綻、そこからのボウマン腔へのマクロファージの浸潤や血漿成分の漏出、ならびにマクロファージなどから産生される種々のサイトカインや成長因子 (MIF, MCP-1, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , PDGF など) の働きにより、ボウマン囊上皮細胞の増殖による細胞性半月体の形成から細胞外基質産

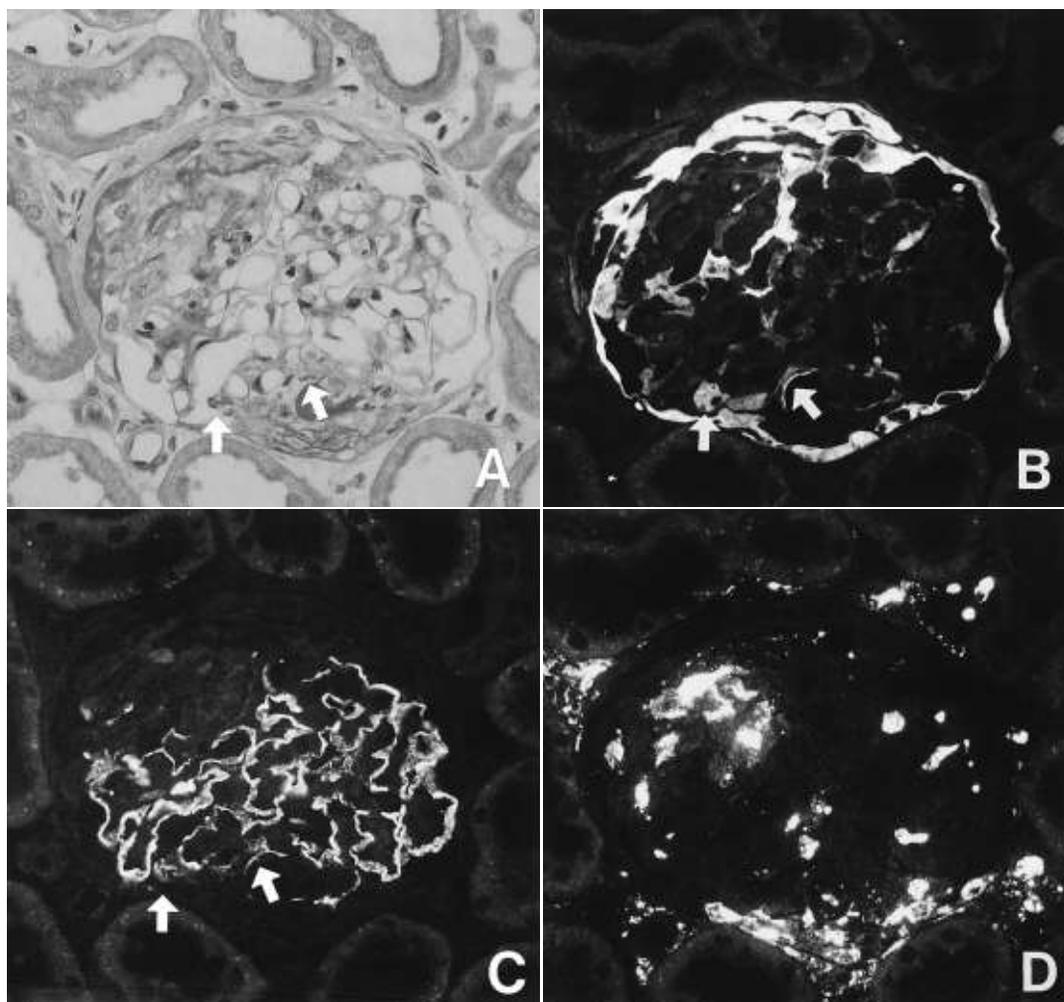


Fig. 4. Serially sectioned glomerulus on day 7 of disease

Periodic acid-schiff staining(A) by light microscopy, immunofluorescence staining for PGP 9.5(B), synaptopodin(C), and ED-1(D). The most part of proliferating cells consist of cellular crescents were positive for PGP 9.5 and ED-1. Positive cells for PGP 9.5 were almost negative for synaptopodin. But, a few cells composed of cellular crescents (arrows) were positive for both PGP 9.5 and synaptopodin.

生, 線維性半月体形成, 糸球体硬化の一連の過程に関与している。しかし, 細胞性半月体の構成細胞に関しては, マクロファージがその主座を占めるとの説⁶⁾もあり, 一定の見解は得られていない。これらの細胞の起源を同定するため, *in vivo*, *in vitro* 両者において糸球体の各々の構成細胞の特異的マーカーを用いた免疫組織学的検討はこれまで数多く報告されている。特に, 糸球体上皮細胞(visceral epithelial cells: VECs or podocyte)では, その slit diaphragm や発達した細胞骨格, 接着分子など構造上の特徴^{13,14)}や発達・形成の特徴(分化成熟した podocyte は, 分裂を停止し終末細胞となる; post-mitotic cell)などから, 細胞接着分子や細胞骨格蛋白(synaptopodin¹⁵⁾, pod-

calyxin¹⁶⁾, ezrin¹⁷⁾や中間系フィラメントである desmin, vimentin¹⁵⁾, 細胞周期規定因子である cyclin-dependent kinase inhibitor(p 27, p 57 etc.)^{19~22)}や遺伝子転写因子²³⁾(WT-1)など, 近年では, フィンランド型先天性ネフローゼ症候群より見出された slit diaphragm に存在する nephrin²⁴⁾, 細胞膜蛋白チロジリン酸化酵素である GLEPP-1²⁵⁾など数々の細胞特異性マーカーが報告されている。

一方, 対側に存在するボウマン嚢上皮細胞(parietal epithelial cells of Bowman's capsule: PECs)に対し特異的なマーカーとして用いられているのは, cytokeratin^{18,21,26~28)}である。しかし, cytokeratin には約 20 種以

上のサブタイプが存在し、また尿管上皮細胞にも発現がみられ、その組織特異性や、特にラットの腎組織においてはその再現性に難点がある。

最近われわれは、ラットにおけるボウマン囊上皮細胞の特異的なマーカーを見出した。それは PGP 9.5 であり、別名, ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 1 (UCHL 1) で、正常ラット腎組織において免疫組織学的に脈管周囲の神経細胞とともに、ボウマン囊上皮細胞内に選択的に発現することを免疫学的に検討している⁴⁾。PGP 9.5 は元来 neuroendocrine marker として知られており、脳神経細胞質内に多量に存在し、また、細胞内蛋白質の調節的分解を担っているユビキチンシステムにおいて脱ユビキチン化に作用する機能を有している¹⁾。これらがラット腎組織において神経細胞とともにボウマン囊上皮細胞に局限し発現するという事実は非常に興味深い。今回の研究では、その特性を用いて WKY ラットにおいて抗基底膜抗体による半月体形成性糸球体腎炎モデルを作製し、ボウマン囊上皮細胞のマーカーとして PGP 9.5 を用いて、既存のマーカーである糸球体上皮細胞 (VEC or podocyte) に対する synaptopodin, 糸球体病変に対して細胞浸潤の中心的役割を担う単球/マクロファージのマーカーとして抗ラット ED-1 抗体との免疫組織学的解析により、半月体形成病変におけるその構成細胞や相互の発現性について比較検討した。synaptopodin は、actin 関連蛋白でその直接的な機能は不明であるが、糸球体上皮細胞の foot process に存在する。そのため成熟、分化した糸球体上皮細胞のマーカーとして用いられ、病的な状態で正常な foot process の構造が失われると発現も低下する¹⁴⁾。

今回用いた WKY ラットにおける半月体形成腎炎モデルは、組織学的変化が比較的高度で、われわれのこれまでの報告¹⁰⁾や過去の報告例⁹⁾においても抗糸球体基底膜抗体投与直後第 1 相の変化として一過性の多型核白血球の軽度浸潤と基底膜と上皮細胞の肥厚を認め、day 1 より蛋白尿が出現している。その後 day 5 前後より第 2 相の変化として単球/マクロファージ中心の著明な細胞浸潤を伴った半月体形成が出現し、蛋白尿も増加、徐々に線維性半月体を形成し、間質の線維化から糸球体硬化の経過を辿っている。今回の検討では、day 0 つまり正常ラット腎糸球体においては PGP 9.5 は、ボウマン囊上皮細胞に、synaptopodin は糸球体上皮細胞にそれぞれ局在して発現していた。一方、ED-1 は、糸球体係蹄内や間質には陽性細胞の出現は認めなかった。day 3 では光顕的には高度な組織変化は認められなかったものの、免疫組織染色では糸

球体係蹄内においては day 0 に比較し、ED-1 陽性細胞が増加していた。その後、急性期に著明な組織変化が出現し day 7 から day 14 では、ボウマン囊上皮の癒着から細胞性半月体形成の段階で、PGP 9.5 は正常構造の領域とともに連続した癒着、半月体形成を起こした病変部位において肥厚した領域においても発現を認めた。つまり、この細胞性半月体を形成する領域の PGP 9.5 陽性細胞は、ボウマン囊上皮細胞由来と考えられ、同様に癒着や細胞性半月体の病変部位やその周囲には ED-1 陽性細胞が発現しており、ボウマン囊上皮細胞の増殖とマクロファージの浸潤が細胞性半月体の構成の中心であることが明確となった。

synaptopodin の陽性細胞は PGP 9.5 や ED-1 陽性の領域と比較し reciprocal pattern を示し、細胞性半月体や癒着部分である病変部位において陰性となり foot process などの正常の糸球体上皮細胞構造が、消失していることが示唆された。

今回選択した 3 つの抗体は、それぞれ異なる細胞特異マーカーとして用いたが、連続切片における大部分の領域では陽性部位の一致は認められなかった。この所見は、一連のマーカーにより、各々の由来がその抗体の標的細胞であることが示された。しかし、day 7 の急性期より細胞性半月体を形成している病変部位でわずかに共通の陽性細胞を認めた。

この点については、単にそれぞれ固有細胞が混在している領域なのか、過去に報告²⁹⁾されているような *in vitro* における糸球体上皮細胞のマクロファージへの形質転換のような事象が、半月体形成の一連の変化での病的環境下で両者の上皮細胞マーカーとも陽性所見を示す細胞への形質転換が起きているのかについては、不明瞭で推測の域を出ない。

われわれのラット正常糸球体における PGP 9.5 の局在における検討の中で、ラット胎児の腎組織では、nephron の発生、分化の過程のなかで comma-shaped body stage, S-shaped body stage の後期から capillary loop stage にかけての成熟、分化に伴って、ボウマン囊上皮細胞に局限していく所見を認めている⁴⁾。

形態学的に、正常なボウマン囊上皮に連続した領域の細胞に関してはボウマン囊上皮細胞由来の増殖細胞と考えられるが、細胞性半月体と正常糸球体構造の境界領域においては podocyte-specific marker も発現を認める細胞が少数ではあるが存在した。これらは糸球体腎炎などの病的環境下において脱分化し糸球体上皮細胞とボウマン囊上皮細胞との共通の細胞であるか、もしくは糸球体上皮細胞のボウ

マン嚢上皮への形質転換や、またその逆の可能性も考えられる。この所見を解明するためには、細胞周期関連蛋白や数々の specific marker の検討、他の腎炎疾患モデルでの研究などが必要である。

結 語

今回の研究では、WKY ラット半月体形成性糸球体腎炎にみられる早期の細胞性半月体の構成細胞について新たなボウマン嚢上皮細胞の特異的マーカーと考えられる PGP 9.5 と確立された他の細胞特異マーカーを用いて検討した。その結果、急性期における細胞性半月体形成は糸球体係蹄からのマクロファージの浸潤と糸球体係蹄側へのボウマン嚢上皮細胞起源の細胞増殖を主体とすることが明確にされた。

文 献

- Day IN, Hinks LJ, Thompson RJ. The structure of the human gene encoding protein gene product 9.5 (PGP 9.5), a neuron-specific ubiquitin C-terminal hydrolase. *Biochem J* 1990 ; 268(2) : 521-4.
- Trowern AR, Laight R, MacLean N, Mann DA. Detection of neuron-specific protein gene product (PGP) 9.5 in the rat and zebrafish using anti-human PGP 9.5 antibodies. *Neurosci Lett* 1996 ; 210(1) : 21-4.
- Bradbury JM, Thompson RJ. Immunoassay of the neuronal and neuroendocrine marker PGP 9.5 in human tissues. *J Neurochem* 1985 ; 44(2) : 651-3.
- Shirato I, Asanuma K, Takeda Y, Hayashi K, Tomino Y. Protein gene product 9.5, a neuron specific ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, is selectively localized in parietal epithelial cells of Bowman's capsule in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2000 ; 11 : 2381-6.
- Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994 ; 15(2) : 74-80. Review.
- Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ, Song Q, Lan HY. Modulators of crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1996 ; 7(11) : 2271-8.
- Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC. Local macrophage proliferation in the pathogenesis of glomerular crescent formation in rat anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 1997 ; 110(2) : 233-40.
- Sekiguchi M, Natori Y, Iyoyama K, Takeya M, Natori Y. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental crescentic glomerulonephritis in rats. *J Lab Clin Med* 1997 ; 129 : 239-44.
- Patey N, Lesavre P, Hallbwachs ML, Noel LH. Adhesion molecules in human crescentic glomerulonephritis. *J Pathol* 1996 ; 179 : 414-20.
- Kawasaki K, Yaoita E, Yamamoto T, Kihara I. Depletion of CD 8 positive cells in nephrotoxic serum nephritis of WKY rats. *Kidney Int* 1992 ; 41(4) : 1517-26.
- Hayashi K, Ohkura N, Miki K, Osada S, Tomino Y. Early induction of the NGFI-B/Nur 77 family genes in nephritis induced by anti-glomerular basement membrane antibody. *Mol Cell Endocrinol* 1996 ; 123(2) : 205-9.
- Hammer DK, Dixon FJ. Experimental glomerulonephritis: immunologic events in the pathogenesis of nephrotoxic serum nephritis in the rat. *J Exp Med* 1963 ; 117, 1019-34.
- Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol* 1995 ; 192 : 385-97.
- Pavenstadt H. Role of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 ; 278 : F173-9. Review.
- Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997 ; 139(1) : 193-204.
- Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984 ; 98(4) : 1591-6.
- Hugo C, Nangaku M, Shankland SJ, Pichler R, Gordon K, Amieva MR, Couser WG, Furthmayer H, Johnson RJ. The plasma membrane-actin linking protein, ezrin, is a glomerular epithelial cell marker in glomerulogenesis, in the adult kidney and in glomerular injury. *Kidney Int* 1998 ; 54 : 1934-44.
- Moll R, Hage C, Thoenes W. Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. *Lab Invest* 1991 ; 65(1) : 74-86.
- Nagata M, Nakayama K, Terada Y, Hoshi S, Watanabe T. Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage. *Am J Pathol* 1998 ; 153(5) : 1511-20.
- Shankland SJ, Hugo C, Coats SR, Nangaku M, Pichler RH, Gordon KL, Pippin J, Roberts JM, Couser WG, Johnson RJ. Changes in cell-cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996 ; 50(4) : 1230-9.
- Nitta K, Horita S, Honda K, Uchida K, Watanabe T, Nihei H, Nagata M. Glomerular expression of cell-cycle-regulatory proteins in human crescentic glomerulonephritis. *Virchows Arch* 1999 ; 435(4) : 422-7.
- Shankland SJ, Wolf G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 ; 278 : F515-29. Review.
- Pritchard JK, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Por-

- teous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990 ; 346(6280) : 194-7.
24. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCrery H, Putaala V, Routsalainen V, Morita T, nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998 ; 1 : 575-82.
25. Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins L, Holzmann LB, Wiggins RC. GLEPP-1 a, renal glomerular epithelial cell(podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 19953-62.
26. Magil AB. Histogenesis of glomerular crescents. Immunohistochemical demonstration of cytokeratin in crescent cell. *Am J Pathol* 1985 ; 120 : 222-29.
27. Guettier C, Nochy D, Jacquot C, Mandet C, Camilleri JP, Bariety J. Immunohistochemical demonstration of parietal epithelial cells and macrophages in human proliferative extra-capillary lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986 ; 409(5) : 739-48.
28. Harrison DJ, MacDonald MK. The origin of cells in the glomerular crescent investigated by the use of monoclonal antibodies. *Histopathology* 1986 ; 10(9) : 945-52.
29. Orikasa M, Iwanaga T, Takahashi H, Kozima K, Shimizu F. Macrophagic cells outgrowth from normal rat glomerular culture : possible metaplastic change from podocytes. *Lab Invest* 1996 ; 75(5) : 719-33.