

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591022

研究課題名（和文）新規素材ハニカム膜を用いた糸球体上皮細胞培養と同細胞における糖鎖付加酵素の役割

研究課題名（英文）Role of glycosylation-related enzymes in cultured podocytes using honeycomb-patterned polymer films

研究代表者

竹田 徹朗（TAKEDA TETSURO）

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：10361924

研究成果の概要（和文）：糸球体上皮細胞障害が蛋白尿の出現、腎機能廃絶につながることが判明している。その細胞表面の陰性荷電減少が糸球体障害を引き起こす可能性がある。一般に細胞は培養すると生体での形質を消失する。そこで新規バイオマテリアルであるハニカム膜上で糸球体上皮細胞を培養したところ細胞機能が向上することを確認した。糸球体上皮細胞において特定の糖転移酵素は、負荷が生じるとその発現が減少し、より生体に近似した環境ではその発現を増すことから、同細胞の陰性荷電の維持に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Glomerular epithelial cells (podocytes) play a key role in the prevention of proteinuria, are important determinants of end-stage kidney disease. Surface charge alterations of the podocyte may induce proteinuric injury. Cultured podocytes are currently being used to uncover unique functions of podocytes that can then be validated in vivo. Therefore, we examined a culture of podocytes on self-organized honeycomb-patterned films (honeycomb films). As a result, podocyte maintained their function for the mRNA expression of unique genes. In addition, we investigated the expression of glycosylation-related enzymes in cultured podocytes. We found that a honeycomb film showed higher podocyte function and angiotensin II stimulation decreased the mRNA level of these enzymes. These results suggest that glycosylation-related enzymes contribute to maintain the negative surface charge of podocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糸球体上皮細胞、ハニカム膜、慢性腎臓病、糖転移酵素

1. 研究開始当初の背景

ハイデルベルク大の Kriz らにより非分裂細胞である糸球体上皮細胞の障害が分節性糸球体硬化を引き起こし、最終的に腎機能廃絶につながるという仮説が提唱されて以来、この細胞をターゲットにした研究が増加し

ている。特に濾過障壁の担い手であるスリット膜構成分子（ネフリン、ポドシン、CD2AP、NEPH1 など）が注目されている。いずれの遺伝子変異例においても著しい蛋白尿を呈し、濾過間隙は消失する。しかし、単純にスリット膜構成蛋白の発現低下こそが蛋白尿の原因

と言い切れるのであろうか？接着阻害分子であるポドカリキシンも糸球体上皮の機能維持には重要であり、事実ノックアウトマウスの糸球体上皮は極性を失い、無尿を呈する。また、シアル酸合成酵素の一種 (GNE, UDP-GlcNAc 2-epimerase) のノックアウトマウスや C1GalT1 (Glycoprotein-N-acetyl galactosamine-3- β -galactosyltransferase) という糖転移酵素のノックアウトマウスではポドカリキシンの糖鎖不全が認められ、かつ蛋白尿と糸球体上皮細胞障害が認められている。つまり構造としてのスリット膜だけが重要ではなく、糸球体上皮の頂側を陰性荷電たらしめることも重要である証明といえる。

その中で私たちは国内外において、糸球体上皮細胞の障害に対して蛋白相互作用の解析を応用し、ポドカリキシンの細胞外ドメインの強い陰性荷電が糸球体上皮細胞の頂側に存在し、細胞内ドメインが NHERF2、エズリンといったアダプター蛋白を介して subapical のアクチン細胞内骨格と結合していることを証明した。そして、ポドカリキシンを培養細胞に強制発現させるとアクチン細胞内骨格の再分布を引き起こし、低分子量 G 蛋白質 RhoA 活性を上昇させることを見出した。

これらの研究実績を踏まえて、ポドカリキシン細胞外ドメインの陰性荷電の調節とポドカリキシンと細胞内骨格との結合の調節を検討することが podocytopathy (糸球体上皮細胞障害) を解く鍵と考えるに至った。しかしながら既存の培養系ではその調節解明に迫ることはできなかった。

連携研究者の田中らによって開発された新規バイオマテリアルであるハニカム膜は、一つの細孔が六本の支柱で支えられた微細二層構造を形成しており、細胞培養の足場として用いる際に、縦、横の規則的な孔が細胞間相互作用の誘導、栄養分、液性因子や酸素の供給、老廃物排除の働きをすることが考えられ、細胞機能向上に有益な素材として注目されている。実際にハニカム膜上で培養された血管内皮細胞の増殖能や細胞機能が向上することを報告している。

2. 研究の目的

現状の糸球体上皮細胞由来培養細胞は、生体での形質の大部分を失っている。ハニカム膜上で各種細胞を培養すると、その性質がより生体内に近づき、細胞機能が向上することを見出している。これらを踏まえ、

- (1) ハニカム膜上で糸球体上皮細胞を培養し、細胞機能が向上するか否か検討する。
- (2) この培養系を用いて陰性荷電減弱の責任となる糖転移酵素 (糖鎖付加酵素) を同定し、再び生体に戻って責任糖転移酵素の変動を

証明する。

3. 研究の方法

(1) ハニカム膜を足場とした時に培養糸球体上皮細胞は生体での形質に近づくか。

① 種々の細孔径のハニカム膜上でラット由来糸球体上皮細胞を培養し、糸球体上皮関連分子の mRNA 発現を検討した。

② 走査電子顕微鏡によりハニカム膜上のラット由来糸球体上皮細胞の形態を観察した。

(2) ポドカリキシン細胞外ドメインの陰性荷電減弱の原因となる糖鎖付加酵素の同定。

① 培養糸球体上皮細胞において、GNE や C1GalT1 が mRNA レベルで検出されるか否か検討した。

② ハニカム膜上での培養やアンジオテンシン II 添加により、その発現は増減するかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 新規バイオマテリアルであるハニカム膜上で糸球体上皮細胞を培養し、細胞機能が向上することを確認した。

① ハニカム膜上で培養した際の糸球体上皮関連分子の挙動

温度感受性ラット由来培養糸球体上皮細胞 (順天堂大学栗原准教授より供与) 3 株を用いて、細孔径の異なるハニカム膜を足場とした培養を行い、RNA を抽出し、nephrin, podocalyxin, CD2AP など糸球体上皮関連分子の遺伝子発現を real-time PCR 法にて定量化できた。

② ハニカム膜上で培養した際の形態観察

ハニカム膜を足場とした上記細胞の培養を行い、1.25% グルタルアルデヒドにて固定後、凍結乾燥した標本に導電染色を施して走査電子顕微鏡で観察し、突起形成を認めた。

③ 培養糸球体上皮細胞におけるシアル酸合成酵素 GNE と糖転移酵素 C1GalT1 の検出

上記 3 株のうち 1 株に安定して GNE と C1GalT1 が検出され、かつハニカム膜上で培養するとその発現が増強することが判明した。

(2) アンジオテンシン II 負荷による糸球体上皮細胞の陰性荷電減弱の責任となる糖鎖付加酵素の挙動を定量化した。

① アンジオテンシン II 添加により培養糸球体上皮細胞における GNE と C1GalT1 の発現は量依存的に減少した。

GNE と C1GalT1 の両糖転移酵素は糸球体上皮細胞において、負荷が生じるとその発現が減少し、より生体に近似した環境 (ハニカム

膜上での培養)ではその発現を増すことから、同細胞の陰性荷電の維持に関与していることが示唆された。さらに糸球体上皮細胞障害モデルラットを作成し、その糸球体における糖転移酵素の挙動を検討することにした。モデル作成に手間取り、その検討には至っていない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

① Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, Kabasawa H, Yamamoto-Kabasawa K, Kurosawa H, Sato H, Iino N, Takeda T, Suzuki Y, Narita I, Yamagata K, Tomino Y, Gejyo F, Hirayama Y, Sekine S, Saito A. Significance of Urinary Full-Length and Ectodomain Forms of Megalin in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 35:1112-1118. 2012. DOI:10.2337/dc11-1684, 査読有

② 竹田 徹朗: 糸球体病理所見の足細胞の foot process effacement とは (Q&A). *日本医事新報* 4538:52-54, 2011, 査読無

③ Saito A, Sato H, Iino N, and Takeda T. Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *Journal of Biomed and Biotechnol.* 2010:403272. Epub. DOI:10.1155/2010/403272, 査読有

④ Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, Soma T, Kobayashi A, Suzuki A, Kabasawa H, Takeyama A, Ikuyama K, Iino N, Nishiyama A, Thekkumkara TJ, Takeda T, Suzuki Y, Gejyo F, and Saito A. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross-talk. *Endocrinology* 150; 871-878, 2009. DOI: 10.1210/en.2008-0886, 査読有

⑤ Hosaka K, Takeda T, Iino N, Hosojima M, Sato H, Kaseda R, Yamamoto K, Kobayashi A, Gejyo F, and Saito A. Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tubule cells. *Kidney Int* 75; 1308-1315, 2009. DOI:10.1038/ki.2009.85, 査読有

⑥ 竹田 徹朗: 尿中 podocyte (ポドサイト), 尿中ポドカリキシン. *Medical Technology* 37 (6): 564-566, 2009, 査読無

[学会発表] (計5件)

① 山本 佳子, 細島 康宏, 蒲澤 秀門, 飯野 則昭, 竹田 徹朗, 鈴木 芳樹, 成一 衛, 荒川 正昭, 斎藤 亮彦. 生活習慣改善プログラムによる尿中アルブミン排泄量の減少効果. 第54回日本腎臓学会学術総会 (2011年6月15日~2011年6月17日・横浜)

② T Takeda, K Yamamoto, N Iino, I Narita, A Saito. Low calorie diet with formula food reduces albuminuria in proportion to the improvement in fractional excretion of uric acid in obese men. ISN-Nexus Symposium 2010: The Kidney and the Vascular System (2010年4月15日~2010年4月18日・Kyoto)

③ Tetsuro Takeda, Keiko Yamamoto, Noriaki Iino, Ichiei Narita, Akihiko Saito. Low calorie diet reduces albuminuria in proportion to the improvement in serum leptin level and fractional excretion of uric acid in obese men. *American Society of Nephrology Renal Week 2009* (2009年10月27日~2009年11月1日・San Diego, California, USA)

④ 竹田 徹朗, 山本 佳子, 飯野 則昭, 斎藤 亮彦, 鈴木 芳樹, 下条 文武. 肥満者に対するフォーミュラ食を用いた減量プログラムによるアルブミン尿の減少効果. 第106回日本内科学会総会・講演会 (2009年4月10日~2009年4月12日・東京)

⑤ Keiko Yamamoto, Michihiro Hosojima, Mariko Saito, Junta Tanaka, Masao Hayashi, Noriaki Iino, Tetsuro Takeda, Yoshiki Suzuki, Fumitake Gejyo, Masaaki Arakawa, Akihiko Saito. Effects of lifestyle modification with combined aerobic and resistance exercise on urinary albumin excretion in the population with metabolic syndrome. 3rd International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome (2009年4月1日~2009年4月4日・Nice, France)

[図書] (計1件)

① 川本進也, 竹田 徹朗. 日本臨床社 腎臓症候群 上 (第2版, 榎野 博史編) 2012年、向精神薬・抗痙攣薬による腎障害; 703-709.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 徹朗 (TAKEDA TETSURO)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：10361924

(2) 研究分担者

斉藤 亮彦 (AKIHIKO SAITO)
新潟大学・医歯学総合研究科・特任教授
研究者番号：80293207

(3) 連携研究者

田中 賢 (TANAKA MASARU)
山形大学・理工学研究科・教授
研究者番号：00322850