

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09606

研究課題名(和文)系球体構造維持に関わるポドサイト細胞間接着分子の同定

研究課題名(英文) Intercellular junctional molecules of podocytes maintaining glomerular structure

研究代表者

矢尾板 永信 (YAOITA, EISHIN)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00157950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の系球体は血液から尿を濾し出す場所であり、腎が機能するための大本となっている。尿を濾し出すためには高い濾過圧が必要であり、腎系球体の最外層を覆っている系球体上皮細胞(その特異な形から足細胞またはポドサイトと呼ばれる)には、その圧負荷に耐えうる構造が必要である。本研究では、ポドサイトの細胞間接着装置に注目し、これまでに報告されている分子のみでは不十分と考え、EMARS法という抗体を用いた網羅的な質量分析法を行い、新たなポドサイトの細胞間接着分子を見つけようと試みた。その結果、初めてCelsr1というカドヘリンスーパーファミリーに属する巨大分子が存在することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎臓の重要な役割は、尿を作ることによって生命維持に不可欠な体液の恒常性を保つことである。血液から原尿を濾し出す場が腎系球体であり、ポドサイトはその高い濾過圧に耐えなければいけない。我々は、これまでに報告されている細胞間接着分子だけでは、圧負荷に耐える構造として不十分であると考えている。本研究は、新たにCelsr1という分子が存在することを示し、学術的にも意義があると考えられる。慢性腎臓病の主な原因にポドサイト傷害がある。そのため、ポドサイトの圧負荷を含むストレスに耐える機序を理解することは、ポドサイト障害を防ぎ、慢性腎臓の伸展を防ぐうえで社会的な意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Visceral epithelial cells of renal glomeruli, referred to as podocytes, form the outermost layer of the glomerulus. Podocytes bear the tensional forces generated in the glomerular capillary wall to produce the bulk flow of the glomerular filtrate. Not only podocytes per se but also their intercellular junctions (ICJs) should be physically stable against the tensional forces. We hypothesized that previously reported molecules are not enough for the tensional forces. In this study, applying a recently developed method termed enzyme-mediated activation of radical source (EMARS), we performed an in-depth mass spectrometry (MS)-based proteome analysis to find new molecules involved in ICJs of podocytes. Consequently, we have found that cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (CELSR1) is expressed at cell-cell contact sites of podocytes.

研究分野：実験病理学

キーワード：ポドサイト EMARS 細胞間接着分子 培養細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体濾過は腎機能の要であり、その原動力は糸球体にかかる高い血圧である。この圧力によって、糸球体の最外層の糸球体上皮細胞(ポドサイト)は大きな力学的負荷(張力)を受け、ポドサイト傷害の原因ともなっている。細胞自体に加えポドサイトの細胞間接着装置もこの負荷に耐えうる構造でなければいけない。いままでに見つかっている分子群だけでは、ポドサイトの強固な結合を説明できず、未だ同定されていない細胞間接着を引き起こす分子群が存在するとの仮説を立てている。近年、膜タンパクの細胞外ドメインに対する抗体を用い、この抗原の近傍にある細胞膜表面の分子群を網羅的に標識する Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)法が開発された。この方法は、本来、培養細胞で確立されたものであるが、単離糸球体と細胞膜表面抗原に対する抗体を用いることによって、ポドサイトにも応用可能であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 腎糸球体の傷害機序を理解するために、ポドサイト同士を結び付ける細胞間接着装置の構成分子を同定し、糸球体の構造がどのように維持されているのかを明らかにする。

(2) ポドサイト機能・傷害を検証できるアッセイ系を確立するために、より生体内の形質を保った培養系の確立を行う。

3. 研究の方法

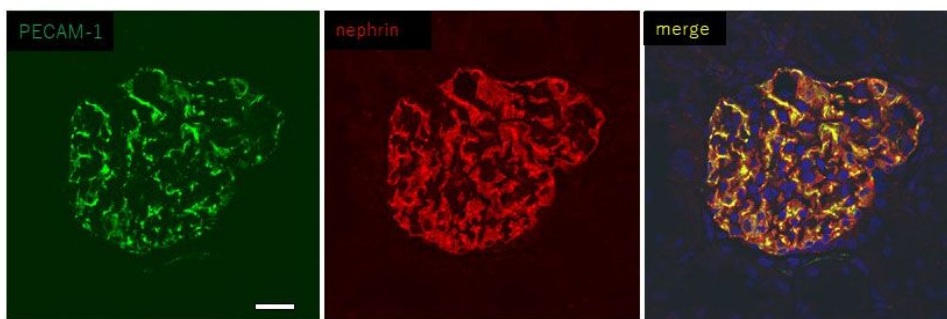
(1) ポドサイト間を結び付ける細胞間接着分子を同定するため、ポドサイトの細胞間接着部位に存在する nephrin の細胞外抗原に対する抗体(5-1-6)を用いて、Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)反応を行う。これにより、ラット単離糸球体表面がポドサイト細胞間接着部位を中心に fluorescein 化され、抗 fluorescein 抗体を用いた免疫沈降により、fluorescein 化タンパク質の回収が可能となる。この回収物を質量分析装置で網羅的に解析する。遺伝子定量、免疫染色などで候補分子の検証を行う。

(2) 生体内の形質に近い培養系を確立するため、ラットの糸球体初代培養を用い、細胞外基質、ヘパリン、硫酸デキストランなどの高硫酸化多糖体、ビタミン A 誘導体の影響を調べる。

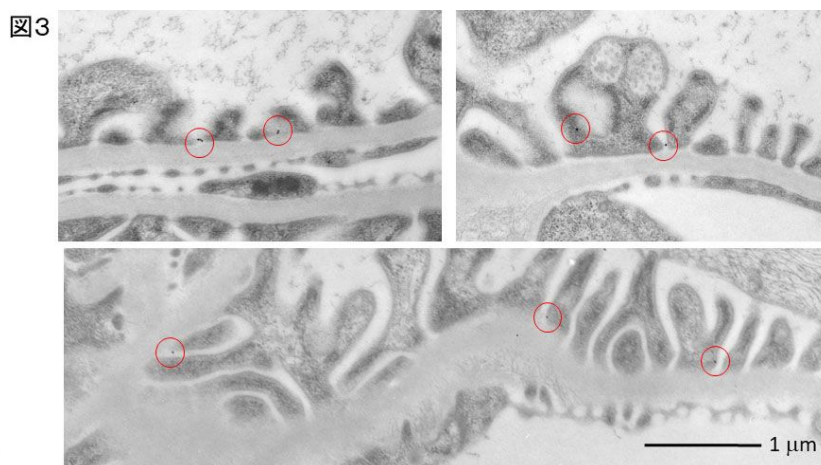
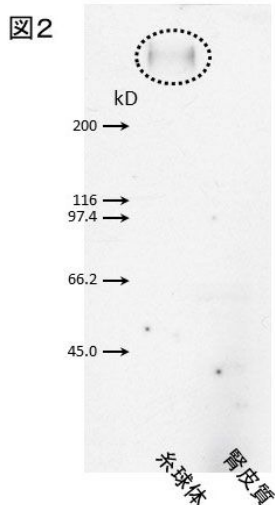
4. 研究成果

(1) EMARS 法による細胞間接着分子の同定: EMARS 法によって得られたサンプルから 562 のタンパク質が同定された。この中には、nephrin に加え、これまでにポドサイトの膜タンパク質として報告されてきた podocin、Neph1、Junctional adhesion molecule A、Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog、Ephrin B1、Crb20、protein tyrosine phosphatase、receptor type O、podocalyxin、Thrombospondin type I domain-containing 7A が含まれ、スリット膜近傍のタンパク質が本方法によって選択的に濃縮されているのが明らかとなった。さらに、新たな細胞接着分子として、Pecam1 と Celsr1 が見つかった。Pecam1 は、内皮細胞の接着分子として報告されているが、特異抗体を用いた蛍光抗体法でラット腎臓での局在を調べると、糸球体外の血管では内皮細胞に特異的に染色されていたが、糸球体内についてはポドサイト特異的な局在を示し、nephrin と局在が一致したため、ラットではポドサイトの細胞間結合に関わっていると考えられた(図 1)。Celsr1 は、カドヘリンスーパーファミリーに属する巨大分子で、単離糸球体での Western blot でも分子量 200kD を遥かに超える大きな分子として検出された(図 2)。やはり、蛍光抗体法で nephrin と局在が一致し、免疫電顕でポドサイトの細胞間接着部位に存在することが明らかとなった(図 3)。

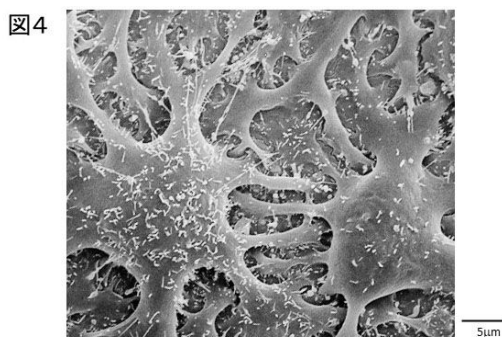
図 1



Bar: 25 μ m



(2) 特異なポドサイトの形質を示す培養系の確立：ポドサイトは四方に細胞突起を伸ばす特異的な形をしているが、これまでに培養系で再現できなかった。しかし、ラットポドサイトの初代培養細胞を用い、laminin 上で、高硫酸化多糖体、ビタミン A 誘導体の添加下で培養することで、細胞突起形成が可能となり(図4)、様々なポドサイト特異な遺伝子も高発現させることが可能となった。残念ながら、この培養系では、Celsr1 の発現が十分ではなかったが、ポドサイトの様々な反応のアッセイ系として役に立つことが示された。



以上のことから、ポドサイトの細胞間接着分子として新たに Pecam1 と Celsr1 を見出した。また、生体の形質に近いポドサイトの培養系も確立できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Horikawa A, Yoneda T, Yaoita E, Yamaguchi K, Shigenobu S, Kuramochi M, Yamate J, Inui T, Ishibashi O, A novel splicing variant of small nucleolar RNA host gene 4 is a podocyte-selective non-coding RNA upregulated in response to puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury, J Biochem, 査読有、165 巻、2019、447-454、doi: 10.1093/jb/mvy118.

Yaoita E, Yoshida Y, Nameta M, Takimoto H, Fujinaka H, Induction of interdigitating cell processes in podocyte culture, Kidney Int, 査読有、93 巻、2018、519-524、doi: 10.1016/j.kint.2017.06.031

瀧本裕基、腎系球体スリット膜に関連した膜タンパク質の網羅的解析の試み：ラットポドサイトにおける PECAM-1 の発現、新潟医学会雑誌、査読有、131 巻、2017、690-704、<http://hdl.handle.net/10191/50448>

〔学会発表〕(計 4 件)

大山富三、吉田豊、矢尾板永信、培養におけるポドサイトとポウマン囊上皮細胞の比較、第 61 回日本腎臓学会学術総会、2018 年 6 月、新潟

矢尾板永信、深津俊介、吉田豊、瀧本裕基、培養ポドサイトの細胞突起誘導と発生の共通

性、第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017 年 5 月、仙台

Eishin Yaoita, Yutaka Yoshida, Hiroki Takimoto, A high degree of sulfation of heparin triggers differentiation of cultured podocytes、アメリカ腎臓学会 2017、2017 年 11 月、アメリカ合衆国、ニューオーリンズ

瀧本裕基、河内裕、吉田豊、矢尾板永信、EMARS 法を用いたポドサイトの細胞間接着装置の網羅的解析、第 59 回日本腎臓学会学術総会、2016 年 6 月、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉田 豊
ローマ字氏名：(YOSHIDA, yutaka)
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学総合研究科
職名：客員研究員
研究者番号(8桁)：40182795

研究分担者氏名：小谷 典弘
ローマ字氏名：(KOTANI, norihiro)
所属研究機関名：埼玉医科大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：90342782

(2)研究協力者

研究協力者氏名：瀧本 裕基
ローマ字氏名：(TAKIMOTO, yuki)

研究協力者氏名：行田 正晃
ローマ字氏名：(NAMETA, masaaki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。