

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02823

研究課題名(和文)新規スリット膜関連タンパクMAGI-2の機能解析とスリット膜形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)The role of MAGI-2 in maintenance of slit-diaphragm

研究代表者

浅沼 克彦 (ASANUMA, KATSUHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60449064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓では糸球体の足細胞(ポドサイト)にのみ発現しているMAGI-2は、血清蛋白の最終濾過バリアであるスリット膜の裏打ち部に局在し、主要なスリット膜蛋白であるNephrinとNeph1と結合していることを見つけた。また、その結合がMAGI-2の別のPDZドメインを介していることを詳細に解明した。さらに、MAGI-2の発現が、Nephrinの局在とNeph-1の局在と発現を制御していることを見出した。ヒト腎疾患においてもその障害にMAGI-2の発現量が関与していることを見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で、血清蛋白の最終濾過障壁であるスリット膜の維持にMAGI-2が重要な働きを果たしていることがわかった。また、ヒト腎疾患でMAGI-2の発現が低下していることから、MAGI-2の発現を制御することが、慢性腎臓病に対する新しいターゲットになることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We focused on the role of Membrane-associated guanylate kinase inverted 2 (MAGI-2) to investigate the mechanisms that orchestrate the localization of SD associated proteins. We found that MAGI-2 downregulation coincides with a reduced expression of SD associated proteins in a human kidney, and that a podocyte-specific deficiency of MAGI-2 in mice derogates the localization of Nephrin and Neph1. Although a deficiency of zonula occludens-1 (ZO-1) downregulated the endogenous Neph1 expression, MAGI-2 recovered the Neph1 expression at the cellular edge in cultured mouse podocytes. Furthermore, overexpression of MAGI-2 preserved Nephrin localization on cell-cell contacts. Thus, the localization of Nephrin and Neph1 in intercellular junctions is regulated mainly via the PDZ domains of MAGI-2 together with other scaffold proteins. In summary, MAGI-2 stabilizes the localization of SD backbone proteins via its PDZ domain.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 蛋白尿 ポドサイト スリット膜

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体足細胞(ポドサイト)は、血液濾過を行う糸球体の構成細胞の一つであり、高度に分化し、成熟した後は分裂し難い終末分化細胞として知られている。ポドサイトは、ボウマン嚢腔に飛び出した大きな細胞体に核やゴルジ装置が局在し、細胞体からは太い一次突起が伸び出している(*Trend Cell Biol.* 17: 428-37, 2007)。さらに、一次突起からは細い足突起が伸び、隣り合うポドサイトの足突起との間で規則的な噛み合わせを作っている。その噛み合わせの間隙の糸球体基底膜の直上には、スリット膜という血清蛋白の最終濾過障壁が存在している。電子顕微鏡による検討では、スリット膜は規則正しい篩のような構造をしており、アルブミンの大きさ以上の蛋白が尿中に漏出しないようになっていると考えられている。様々な原因によりポドサイトが障害を受けるとその特殊な構造(足突起とスリット膜)が劇的に変化し、蛋白尿が出現、最終的にはポドサイトが糸球体から脱落し、CKD 進行の第一歩となることが判明している。主要なスリット膜構成蛋白として Nephrin が同定されて以来、Neph1, FAT1, P-cadherin とスリット膜構成蛋白が次々と同定されている。また、これまでスリット膜裏打ち蛋白として多くの蛋白が同定され、それぞれの蛋白の結合や機能が解析され、足突起やスリット膜の形成維持に重要な役割を果たしていることが、遺伝子改変マウスの検討から判明している。

MAGI-2 は、PDZ domain を 6 つ、WW domain を 2 つ持つ蛋白であり、scaffolding 蛋白として脳の神経細胞の post-synaptic density で重要な役割を果たしていると考えられているが、その機能については良くわかっていない。腎臓において、MAGI-2 はポドサイトにのみ発現し、Nephrin と結合するスリット膜の裏打ち蛋白として同定されている(Lehtonen S, *et.al. PNAS.* 102.9814-9819. 2005)。これまで我々は、MAGI-2 KO マウスを作成し phenotype を検討したところ、尿が全く作られず、腎不全で 2 4 時間以内に死亡することがわかった。驚いたことに、このマウスのポドサイトは、足突起の高次構造が構築されているものの、スリット膜構造はなく、足突起間のスリット膜間隙が狭小化し tight junction 様構造となり、これが無尿の原因と考えられた(*Am J Pathol.* 184.2699-708. 2014)。このマウスの解析では、Nephrin の発現低下と局在変化が認められ、MAGI-2 が、スリット膜構成蛋白の局在を決めるのに重要であることが示唆された。成熟ポドサイトにおける MAGI-2 の役割をさらに検討するため、ポドサイト特異的 MAGI-2KO マウスを作成したところ、腎臓のポドサイトにのみ MAGI-2 が KO され、生後 8 週以降より蛋白尿が出現、20 週以内に腎不全により死亡することが判明した(*J Am Soc Nephrol.* 28. 2654-2669. 2017)。以上から、MAGI-2 は、成熟ポドサイトのスリット膜・足突起の構造維持に重要な役割を果たしていることが示唆され、MAGI-2 のポドサイトにおける役割をさらに解析することとした。

2. 研究の目的

血液濾過を行う腎糸球体の構成細胞である糸球体足細胞(ポドサイト)は、極めて特殊な構造を持ち、足突起間に存在するスリット膜は、血清蛋白の最終濾過障壁として働いている。そのため、ポドサイトが障害を受けると慢性腎臓病(CKD)は進行していく。これまで、ポドサイトに発現する分子が多数同定されているにもかかわらず、培養条件下で、ポドサイトの特殊な構造の再現に成功した研究はない。本研究では、スリット膜裏打ち蛋白である MAGI-2 の機能解析からスリット膜形成維持メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

MAGI-2-FLOX マウスを使用して、ポドサイト 特異的 MAGI-2 KO マウスと後天的 MAGI-2 KO マウスを作成し、その phenotype とスリット膜蛋白の発現と局在を検討した。MAGI-2 のスリット膜蛋白 (Nephrin, Neph-1) への直接作用を検討するために、piggyBac transposon システムと CRISPR-Cas9 システムを使用して、強発現・KO 培養ポドサイト を作成し検討した。免疫沈降法や GST-pull down 法により蛋白間相互作用を検討した。ヒト糸球体疾患における MAGI-2 の発現を千葉大学腎臓内科で行われた腎生検の残余検体を利用して検討した。

4. 研究成果

ポドサイト特異的 MAGI-2 KO マウスを用いて、スリット膜の構成タンパクである Nephrin と Neph1 の発現を検討したところ、MAGI-2 KO マウス群では、Nephrin および Neph1 のスリット膜裏打ち蛋白である CD2AP や ZO-1 の発現は保たれていたが、Nephrin と Neph1 の発現は著明に低下していた。

次に、Cre-ERT2 システムを用いて後天的ポドサイト特異的 MAGI-2 KO マウスを作成して検討したところ、前述のポドサイト特異的 MAGI-2 KO マウスと同様に、後天的 KO 群でも蛋白尿および硬化糸球体を認めた。また、Nephrin および Neph1 の発現低下についても、後天的 KO 群でも同様に観察された。以上の結果から、MAGI-2 は Nephrin と Neph1 に対して足場タンパクとして働き、スリット膜の構造維持に必須であることがわかった。

ポドサイトにおける MAGI-2 の足場タンパクとしての機能を詳細に解明するために培養ポドサイトに対して piggyBac transposon システムを用いて、培養 MAGI-2 強制発現ポドサイトを確立した。この培養 MAGI-2 強制発現ポドサイトに Nephrin を一過性過剰発現させると、Nephrin と MAGI-2 は共に細胞間接着部で共局在した。培養ポドサイトに対して CRISPR-Cas9 システムを用いて、Neph1 の足場タンパクである内在性 ZO-1 の発現を欠失させ、ZO-1 KO ポドサイトを確立した。ZO-1 KO ポドサイトでは、ZO-1 の発現が確認できないことに加えて、内在性 Neph1 の発現も有意に低下していた。そこで ZO-1 KO ポドサイトに対して、MAGI-2 を一過性強制発現させた。その結果、ZO-1 の欠失によって低下していた内在性 Neph1 の発現は、MAGI-2 の強制発現によって増加した。MAGI-2 はそれぞれ異なる PDZ 結合ドメインを通じて、Nephrin および Neph1 と結合していることが免疫沈降法により確認された。

ヒト腎疾患における MAGI-2 の発現を腎生検組織を使用して検討したところ、血液透析へ移行するリスクの高い巣状分節性糸球体硬化症および IgA 腎症の予後不良群では、MAGI-2 の発現は有意に低下し、Nephrin や Neph1 の局在も変化していた。

以上の結果から、スリット膜の構造維持のためには、MAGI-2 が足場タンパクとして機能することが不可欠であることが示された (*Kidney Int.*99: 382-395. 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Polat Onur K., Uno Masatoshi, Maruyama Terukazu, Tran Ha Nam, Imamura Kayo, Wong Chee Fah, Sakaguchi Reiko, Ariyoshi Mariko, Itsuki Kyohei, Ichikawa Jun, Morii Takashi, Shirakawa Masahiro, Inoue Ryuji, Asanuma Katsuhiko, Reiser Jochen, Tochio Hidehito, Mori Yasuo, Mori Masayuki X.	4. 巻 30
2. 論文標題 Contribution of Coiled-Coil Assembly to Ca ²⁺ /Calmodulin-Dependent Inactivation of TRPC6 Channel and its Impacts on FSGS-Associated Phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018070756	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshibayashi Mamoru, Kume Shinji, Yasuda-Yamahara Mako, Yamahara Kosuke, Takeda Naoko, Osawa Norihisa, Chin-Kanasaki Masami, Nakae Yuki, Yokoi Hideki, Mukoyama Masashi, Asanuma Katsuhiko, Maegawa Hiroshi, Araki Shin-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Protective role of podocyte autophagy against glomerular endothelial dysfunction in diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.088	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rossanti Rini, Shono Akemi, Miura Kenichiro, Hattori Motoshi, Yamamura Tomohiko, Nakanishi Keita, Minamikawa Shogo, Fujimura Junya, Horinouchi Tomoko, Nagano China, Sakakibara Nana, Kaito Hiroshi, Nagase Hiroaki, Morisada Naoya, Asanuma Katsuhiko, Matsuo Masafumi, Nozu Kandai, Iijima Kazumoto	4. 巻 64
2. 論文標題 Molecular assay for an intronic variant in NUP93 that causes steroid resistant nephrotic syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 673 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0606-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Juan, Hidaka Teruo, Sasaki Yu, Tanaka Eriko, Takagi Miyuki, Shibata Terumi, Kubo Ayano, Trejo Juan Alejandro Oliva, Wang Lining, Asanuma Katsuhiko, Tomino Yasuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Neurofilament heavy polypeptide protects against reduction in synaptopodin expression and prevents podocyte detachment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35465-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Empitu Maulana A., Kadariswantiningsih Ika N., Aizawa Masashi, Asanuma Katsuhiko	4. 巻 315
2. 論文標題 MAGI-2 and scaffold proteins in glomerulopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F1336 ~ F1344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00292.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Ayano, Shirato Isao, Hidaka Teruo, Takagi Miyuki, Sasaki Yu, Asanuma Katsuhiko, Ishidoh Kazumi, Suzuki Yusuke	4. 巻 66
2. 論文標題 Expression of Cathepsin L and Its Intrinsic Inhibitors in Glomeruli of Rats With Puromycin Aminonucleoside Nephrosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 863 ~ 877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155418791822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asao Rin, Seki Takuto, Takagi Miyuki, Yamada Hiroyuki, Kodama Fumiko, Hosoe-Nagai Yoshiko, Tanaka Eriko, Trejo Juan Alejandro Oliva, Yamamoto-Nonaka Kanae, Sasaki Yu, Hidaka Teruo, Ueno Takashi, Yanagita Motoko, Suzuki Yusuke, Tomino Yasuhiko, Asanuma Katsuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Rac1 in podocytes promotes glomerular repair and limits the formation of sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23278-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taguchi Kensei, Yamagishi Sho-ichi, Yokoro Miyuki, Ito Sakuya, Kodama Goh, Kaida Yusuke, Nakayama Yosuke, Ando Ryotaro, Yamada-Obara Nana, Asanuma Katsuhiko, Matsui Takanori, Higashimoto Yuichiro, Brooks Craig R., Ueda Seiji, Okuda Seiya, Fukami Kei	4. 巻 8
2. 論文標題 RAGE-aptamer attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced renal injury in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-21176-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ozawa Shota, Matsubayashi Masaya, Nanaura Hitoki, Yanagita Motoko, Mori Kiyoshi, Asanuma Katsuhiko, Kajiwara Nobuyuki, Hayashi Kazuyuki, Ohashi Hiroshi, Kasahara Masato, Yokoi Hideki, Kataoka Hiroaki, Mori Eiichiro, Nakagawa Takahiko	4. 巻 295
2. 論文標題 Proteolytic cleavage of Podocin by Matriptase exacerbates podocyte injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 16002 ~ 16012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013721	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Makino Shinichi, Empitu Maulana A., Naito Toshimasa, Ishii Masayoshi, Wakabayashi Hanae, Lee Chiwei, Aizawa Masashi, Asanuma Katsuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 A rare case of nephrotic syndrome associated with Dent 's disease: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 380 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-020-00491-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 La The Mon, Tachibana Hiromi, Li Shun Ai, Abe Tadashi, Seiriki Sayaka, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Takeda Tetsuya, Ogawa Daisuke, Makino Shin ichi, Asanuma Katsuhiko, Watanabe Masami, Tian Xuefei, Ishibe Shuta, Sakane Ayuko, Sasaki Takuya, Wada Jun, Takei Kohji, Yamada Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Dynamin 1 is important for microtubule organization and stabilization in glomerular podocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 16449 ~ 16463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001240RR	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Hiroyuki, Shirata Naritoshi, Makino Shinichi, Miyake Takafumi, Trejo Juan Alejandro Oliva, Yamamoto-Nonaka Kanae, Kikyo Mitsuhiro, Empitu Maulana A., Kadariswantiningsih Ika N., Kimura Maiko, Ichimura Koichiro, Yokoi Hideki, Mukoyama Masashi, Hotta Akitsu, Nishimori Katsuhiko, Yanagita Motoko, Asanuma Katsuhiko	4. 巻 99
2. 論文標題 MAGI-2 orchestrates the localization of backbone proteins in the slit diaphragm of podocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 382 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2020.09.027	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 浅沼克彦
2. 発表標題 糸球体足細胞（ポドサイト）と糸球体基底膜の濾過障壁としての役割
3. 学会等名 第51回日本結合織学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田博之、浅沼克彦
2. 発表標題 3次元診断による硬化糸球体の診断への試み
3. 学会等名 第51回日本結合織学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅沼克彦
2. 発表標題 蛋白尿の発症機序：GBM、ポドサイト
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Yamada, Shinichi Makino, Takafumi Miyake, Hideki Yokoi, Katsuhiko Nishimori, Motoko Yanagita, Katsuhiko Asanuma
2. 発表標題 Membrane-associated guanylate kinase inverted 2 coordinates slit-diaphragm proteins in podocytes
3. 学会等名 The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichi Makino, Naritoshi Shirata, Juan Alejandro Oliva Trejo, Kanae Yamamoto-Nonaka, Motoko Yanagita, Katsuhiko Asanuma.
2. 発表標題 The role of ubiquitin-proteasome system in podocytes
3. 学会等名 ISN FRONTIER (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Yamada, Shinichi Makino, Miyake Takafumi, Motoko Yanagita, Katsuhiko Asanuma.
2. 発表標題 Advanced optical clearing protocols could enable fine analysis of glomerulus three-dimensionally with confocal microscopy
3. 学会等名 ASN Kidney Week, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Yamada, Shinichi Makino, Takafumi Miyake, Motoko Yanagida, Katsuhiko Asanuma.
2. 発表標題 Optical clearing methods could visualize fine structure of podocyte and glomerulus three-dimensionally
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichi Makino, Juan Alejandro Oliva Trejo, Kanae Yamamoto-Nonaka, Motoko Yanagida, Katsuhiko Asanuma.
2. 発表標題 Dysfunction of proteasome in podocytes results in chronic kidney disease.
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山田博之、浅沼克彦	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 -
3. 書名 3. 上皮細胞障害、IgA腎症の病態と治療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------