

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08223

研究課題名(和文) 糸球体内皮・上皮細胞のカベオラを介するアルブミンの細胞透過の抑制による新規治療法

研究課題名(英文) New therapeutics to inhibit the caveolae mediated intracellular trafficking pathway of albumin in glomerular endothelial and epithelial cells

研究代表者

森山 能仁 (Moriyama, Takahito)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20439821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでアルブミン尿の新機序としてカベオラを介する糸球体内皮細胞内の通過経路を報告してきた。

本研究にて、糸球体上皮細胞のアルブミンの細胞内通過経路としてカベオラエンドサイトーシス後にアクチン、エンドソーム、ライソソームが関与し、エキソサイトーシスすることを証明し、更に電子顕微鏡でアルブミンの細胞内通過経路を観察した。

またカベオラが細胞内へ進入する際ダイナミンが関与することから、ダイナミン阻害効果のある選択的セロトニン再取り込み阻害薬セルトラリンの糸球体上皮・内皮細胞へのアルブミン取り込み抑制効果、ピューロマイシン投与ネフローゼ症候群モデルマウスにてアルブミン尿減少効果を証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアルブミン尿の機序として内皮細胞における fenestrae や上皮細胞の足突起間の gap など細胞間経路が考えられ、糸球体上皮・内皮細胞の細胞内通過経路に関する研究はほとんどされていなかったが、本研究により新機序として細胞内通過経路が証明され、更に薬剤によるネフローゼ症候群モデルマウスのアルブミン減少効果を証明できたことから、新たな慢性腎臓病の治療薬への発展につながる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)： We have reported the caveolae mediated intracellular trafficking pathway of albumin in glomerular endothelial cells.

In this study, we proofed albumin endocytosis through caveolae, transcytosis related with actin, endosome, and lysosomes, and then exocytosis, in glomerular epithelial cells as the intracellular trafficking pathway of albumin. Moreover, we observed the intracellular trafficking pathway of albumin by the electron microscope.

Since dynamin was related with caveolae internalization into cytoplasm, we used selective serotonin reuptake inhibitors, sertraline which had inhibitory effect of dynamin, and proofed its inhibitory effect of albumin internalization through caveolae into glomerular epithelial and endothelial cells, and the effect to reduce albuminuria in puromycin induced nephrotic syndrome modeled mice.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：カベオラ カベオリン-1 糸球体上皮細胞 糸球体内皮細胞 エンドサイトーシス トランスサイトーシス エキソサイトーシス 細胞内通過経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛋白尿は種々の慢性糸球体腎炎における腎死の surrogate marker として重要であり、蛋白尿そしてその主要因子であるアルブミン尿の発現を抑えることが治療のターゲットであることから、アルブミン尿の発現に関して様々な研究がこれまで報告されてきた。アルブミンの糸球体透過に関しては糸球体内皮細胞、基底膜、上皮細胞の3層が主に関与するが、糸球体内皮細胞に関しては隔膜のないフェネストラ(小孔)を通過するため濾過障壁の役割をなさないと考えられてきており、また糸球体上皮細胞に関しては主に足突起の間に存在するスリット膜の異常に伴いアルブミンは細胞間隙を通過し、アルブミン尿は発現すると考えられてきた学術的背景があった。しかし、実際にはネフローゼ症候群を呈するような病態では上皮細胞の足突起は融合しスリット膜を有する細胞間隙は消失し、内皮細胞は腫大しフェネストラは狭小化している糸球体疾患も多い。そこで、細胞内を通過するような新たなアルブミンの経路が糸球体内皮細胞、上皮細胞ともに存在するのではないであろうかという学術的「問い」が生じ、さらにこの細胞内通過経路を遮断することでアルブミン尿を減少させることが可能であれば、新たな慢性糸球体腎炎の治療となる可能性が生じる背景があった。

2. 研究の目的

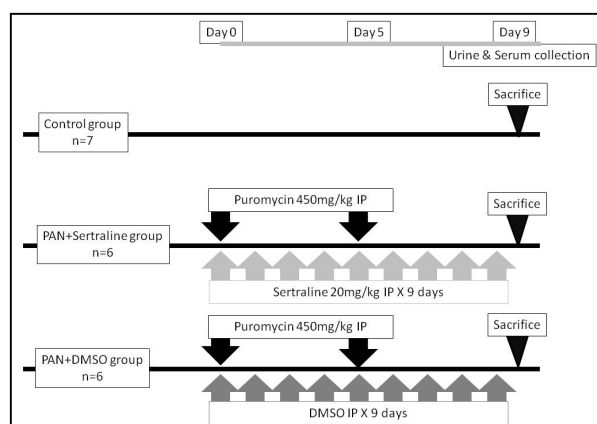
これまで我々は糸球体内皮細胞のカベオラの発現がアルブミン尿と関連し、実際にカベオラを介し内皮細胞内にアルブミンが取り込まれ、その後細胞骨格に沿わず移動しエンドソームに到達後、その他のオルガネラはバイパスし反対側から排泄されるという、アルブミンのカベオラ通過経路を明確にした。本研究はこれまでの研究の継続性と更なる発展性を重視し、糸球体係蹄のもう一つの構成細胞である糸球体上皮細胞における細胞内通過経路の存在を確認し、さらにこれら細胞のカベオラ通過経路を抑制することによる in vitro の研究におけるアルブミンの細胞内取り込み、in vivo の研究におけるアルブミン尿の減少効果を明確にし、糸球体腎炎によるアルブミン尿とカベオラの関わりを確実なものとし、今後の新たな治療に発展させることを目的とするものである。

3. 研究の方法

糸球体上皮細胞のカベオラ介在性通過経路として、糸球体内皮細胞と同様にカベオラ阻害薬である methyl beta cyclodextrin (MBCD) で前処理した後にアルブミンと incubate しアルブミンの取り込みが阻害されるかどうかを western blotting 法 (WB) と immunofluorescence 法 (IF) にて比較した。また細胞内の通過経路として細胞骨格であるアクチン、微小管、細胞内オルガネラであるエンドソーム、ライソソーム、プロテアソーム、ゴルジ体、小胞体と Alexa Fluor 488 bovine serum albumin (AF488-BSA) と二重染色を行い IF で確認した。更にアルブミンに免疫金染色を行い電子顕微鏡でアルブミンの細胞内通過を直接観察した。

次にカベオラ経路を阻害する薬剤として、カベオラが細胞膜から切り取られ細胞内へ進入する際 dynamin が関与することに着目し、dynamin 阻害効果のあるセロトニン再取り込み阻害である Sertraline を使用した。In vitro study として糸球体内皮細胞、上皮細胞を Sertraline で処理した後にアルブミンを加え細胞内の経時的な取り込みを未処理の細胞と WB と IF にて比較した。ピューロマイシン (Puromycin aminonucleoside: PAN) 腹腔内投与によるネフローゼ症候群モデルマウスを作成し、セルトラリンの投与にてアルブミン尿減少効果が得られるかどうかを調べ、更に腎臓の病理組織所見を解析した (図 1 プロトコール)。

図 1. Protocol of Sertraline treatment for PAN induced nephrotic mice.



4. 研究成果

糸球体上皮細胞のアルブミンの細胞内通過経路を調べた実験では、容量依存的に MBCD の前処置でカベオリン-1 の発現が低下し、それに伴いアルブミンの取り込みも低下することが WB、IF にて確認された (図 2)。

また、免疫染色法において AF488-BSA はカベオリン-1、Fc レセプターと共染色されたがクラスリンとは共染色しなかった。また細胞骨格ではアクチンと共染色し微小管とは共染色しなかった。オルガネラでは微小管、エンドソーム、ライソソームと共染色されたが、小胞体、ゴルジ体とは共染色しなかった(図 3)。更に電子顕微鏡にてアルブミンのカベオラを介するエンドサイトーシスからトランスサイトーシス、エキソサイトーシスが確認できた(図 4)。これらの結果より糸球体上皮細胞においてアルブミンのカベオラ介在性エンドサイトーシス後、トランスサイトーシスとしてアクチンに沿って異動するが微小管は関与せずエンドソームへ到達し、ライソソームに一部異動し分解を受けるが、残りはプロテアソームでの分解や、ゴルジ体、小胞体で修飾を受けることなく、最終的に反対側にエキソサイトーシスされることを明確にした。

図 2. Inhibitory effect of MBCD on albumin endocytosis into Podocytes through Caveolae (Lt: WB, Rt: IF)

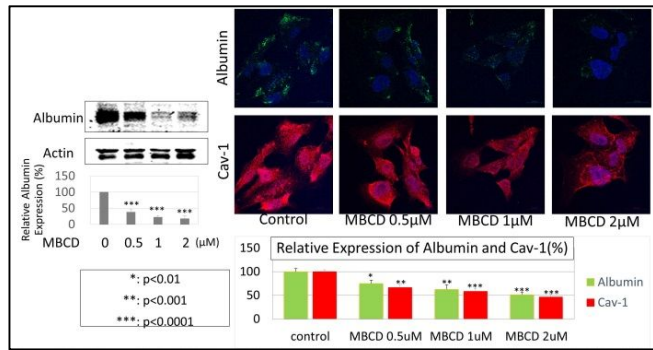


図 3. Colocalization of AF488-BSA with Cav-1, FcR, clathrin, each organelle or cytoskeletons

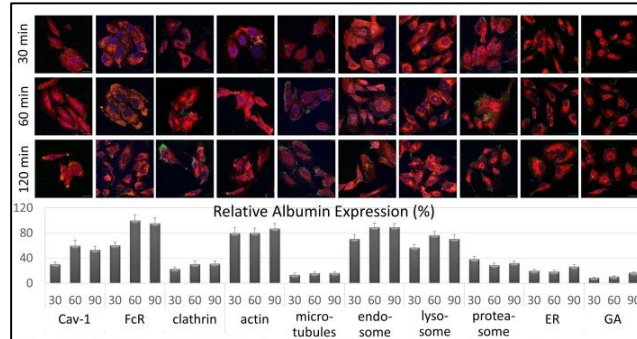
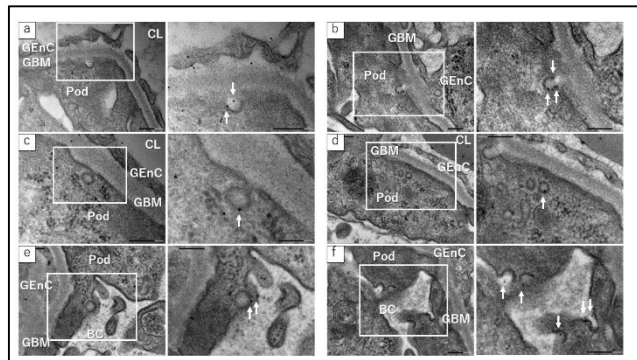
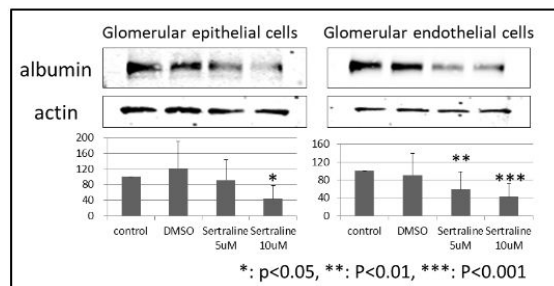


図 4. The immunogold-labelled albumin particles observed in caveolae of the podocytes in nephrotic syndrome modelled mice (a-f). Arrows: immunogold-labelled albumin. Pod: podocytes, GEnC: glomerular endothelial cells, GBM: glomerular basement membrane, CL: capillary lumen, BC: Bowman's capsule. The scale bars indicate 200nm without C right panel (100nm).



Sertraline のアルブミンの細胞内取り込み抑制に伴うアルブミン尿減少効果を調べた実験では、5, 10µM の Sertraline で 60 分間処理後にアルブミンを加え、更に 60 分後のアルブミンの取り込みを WB で測定したところ、10µM の Sertraline で処理した糸球体上皮細胞、5, 10µM の Sertraline で処理した糸球体内皮細胞で未処理の細胞と比較してアルブミンの発現は有意に低値であった(図 5)

図 5. Effect of Sertraline to interfere of albumin endocytosis into glomerular epithelial and endothelial cells through caveolae



また経時的变化を IF で評価したところ、カベオリン-1 の発現は変わらないが(図 6)、15, 30, 60, 120 分後のアルブミンの取り込みは経時的に増加したが、Sertraline 処理にてどの時間帯においてもすべて低下傾向を認めた(図 7a, b)

図6. Caveolin-1 expression in glomerular epithelial and endothelial cells after Sertraline treatment

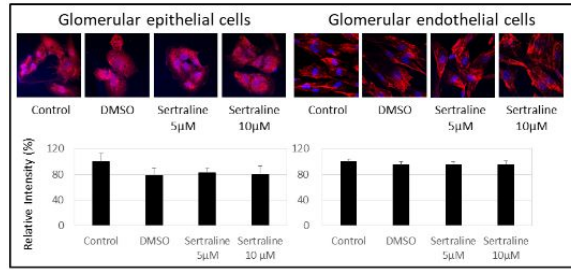


図7a. Effect of Sertraline to interfere of albumin endocytosis into glomerular epithelial cells through caveolae

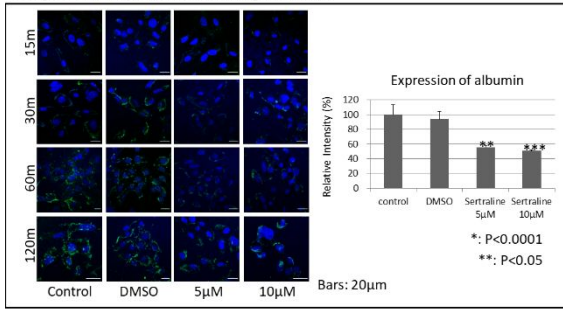
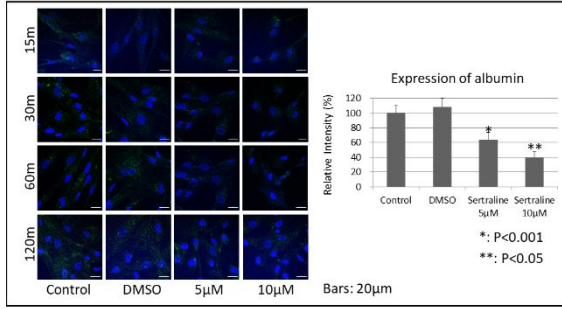


図7b. Effect of Sertraline to interfere of albumin endocytosis into glomerular endothelial cells through caveolae



また、ネフローゼ症候群モデルマウスを用いた実験では day9 の正常コントロール群のアルブミン尿 $0.02\text{g/g} \cdot \text{Cre}$ に対して DMSO 投与群は $0.12\text{g/g} \cdot \text{Cre}$ ($P=0.0027$)と有意に上昇しているのに対し、Sertraline 投与ではピューロマイシン投与にも関わらず $0.02\text{g/g} \cdot \text{Cre}$ ($P=0.17$)と正常コントロール群と同等に抑制されていた(図8)。また、腎系球体組織所見においては電子顕微鏡では Sertraline 投与群も DMSO 投与群と同様にピューロマイシン投与により内皮細胞の腫大、上皮細胞の融合を認め(図9) IF ではカベオリン-1 の発現も同等に認め、その発現は正常群より有意に上昇していた(図10)。これらの結果より Sertraline によってカベオラの発現ではなく、カベオラの細胞内への取り込みが抑制されたことにより、アルブミン尿の減少効果が得られたと考えられた。

図8. Comparison of amount of albuminuria at day-9 after treatment among three groups

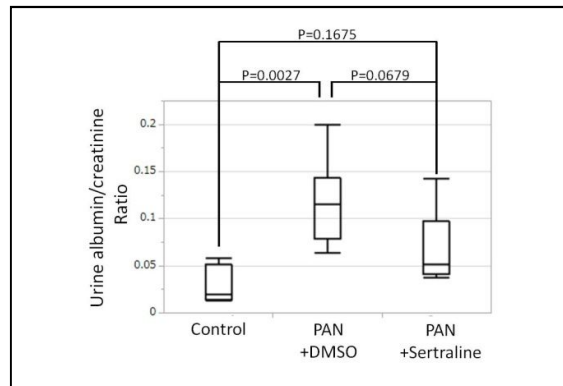


図9. Comparison of electric microscopic findings at day-9 after treatment among three groups

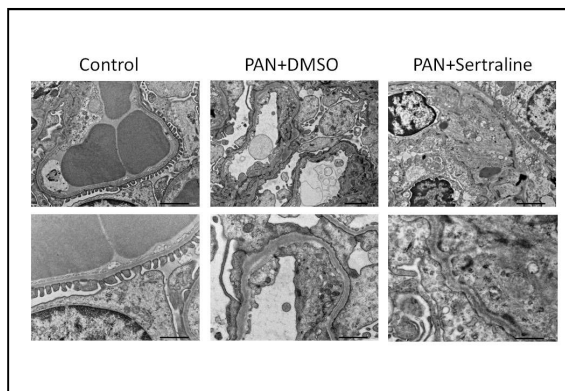
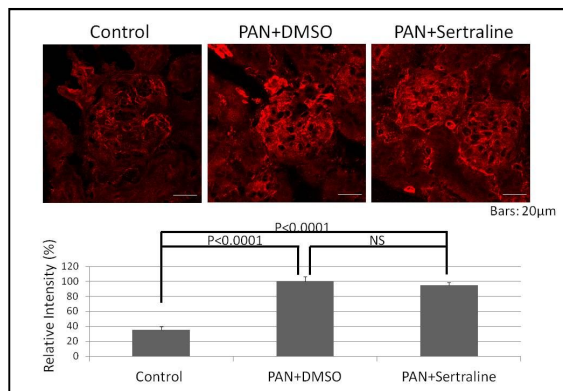


図10. Comparison of Cav-1 expression on immunofluorescence findings at day-9 after treatment among three groups



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Moriyama T, Hasegawa F, Miyabe Y, Akiyama K, Karasawa K, Uchida K, Nitta K.	4. 巻 574
2. 論文標題 Intracellular trafficking pathway of albumin in glomerular epithelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 97-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.043.	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 該当する

1. 著者名 森山能仁、唐澤一徳、長谷川文雄、内田啓子、新田孝作	4. 巻 40
2. 論文標題 ゲニステインによるアルブミンの糸球体内皮・上皮細胞取り込み抑制効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 東京女子医科大学総合研究所紀要	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) なし	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 Moriyama Takahito, Karasawa Kazunori, Hasegawa Fumio, Uchida Keiko, Nitta Kosaku	4. 巻 50
2. 論文標題 Sertraline Reduces Albuminuria by Interfering with Caveolae-Mediated Endocytosis through Glomerular Endothelial and Epithelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 444 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000503917	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 森山能仁、唐澤一徳、内田啓子、新田孝作	4. 巻 39
2. 論文標題 アルブミンの糸球体上皮細胞の細胞内通過経路	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 東京女子医科大学総合研究所紀要	6. 最初と最後の頁 48 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Takahito Moriyama, Kazunori Karasawa, Kosaku Nitta	4. 巻 195
2. 論文標題 The Role of Caveolae on Albumin Passage through Glomerular Endothelial and Epithelial Cells: The New Etiology of Urinary Albumin Excretion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Contrib Nephrol	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000486929	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 森山能仁、唐澤一徳、内田啓子、新田孝作	4. 巻 38
2. 論文標題 Sertralineによる糸球体内皮・上皮細胞のカベオラ経路阻害に伴うアルブミン尿減少効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 東京女子医科大学総合研究所紀要	6. 最初と最後の頁 40-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Moriyama Takahito, Nitta Kosaku
2. 発表標題 Intracellular trafficking pathway of albumin in glomerular epithelial cells
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahito Moriyama, Kazunori Karasawa, Kosaku Nitta
2. 発表標題 The effect of sertraline on reduction of albuminuria due to the inhibition of caveolae pathway through glomerular endothelial and epithelial cells.
3. 学会等名 Kidney Week 2018, American Society of Nephrology, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山能仁、唐澤一徳、新田孝作.
2. 発表標題 セルトラリンによる糸球体内皮・上皮細胞のカベオラ経路阻害に伴うアルブミン尿減少効果.
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------