

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08233

研究課題名(和文)細胞膜輸送体に着目した新しい腎臓線維化治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of renal fibrosis molecular mechanisms focusing on membrane proteins

研究代表者

油井 直史 (YUI, Naofumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00633976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の線維芽細胞が活性化し筋線維芽細胞になる際にどのような分子が細胞膜に集積し機能するかを研究テーマとした。腎臓線維芽細胞をTGF- β 1で刺激後に細胞膜表面分子をビオチン標識法で回収し高感度銀染色を行い、刺激により明らかに増加している分子をLC-MSで解析したところMYH-9を同定した。特異的阻害剤およびノックダウンによる機能解析を行ったところSmad2/3の核集積および α SMAの増加が阻害群で鈍化していた。MYH-9は腎臓線維化に重要な分子であり、細胞活性化に際し細胞膜および核に集積する分子であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では慢性腎臓病は8人に1人が罹患しているとされ国民的疾患概念である。この進行を緩やかにし腎不全の発症を抑制することは今後の医療の最も重要な課題の一つと言える。そのためには原因疾患は何であれ共通する病態生理である腎臓線維化を治療できるようにすることが必要となる。腎臓線維化がどのような機序で進展してゆくのかを解明することが重要な一歩になる。今回腎臓の線維芽細胞が活性化する際にどのような分子が細胞膜を貫通する形で集積するかを分子生物学的手法を用いて研究しMYH-9という分子を同定し機能を解析しその重要性を細胞生物学的に示すことが出来た。今後のこの領域の研究の方向性に貢献しうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, We investigated what kind of molecules are accumulated in plasma membrane of renal fibroblasts during its differentiation into myofibroblast. We performed cell surface biotinylation assays with or without TGF- β 1 stimulation using NRK-49F rat renal fibroblast. The collected molecules are analyzed using silver-staining and LC-MS. We identified MYH-9 as a membrane protein of renal fibroblast during its differentiation. Using its specific inhibitor, blebbistatin, and lentivirus-mediated gene knockdown, its importance on α SMA production, Smad2/3 nucleus transportation are clearly demonstrated. Upon differentiation into myofibroblast, MYH-9 accumulated in plasma membrane and nucleus. By inhibition using blebbistatin, MYH-9 accumulation on plasma membrane and nucleus was blocked, and TGF- β 1 induced α SMA production, Smad2/3 nuclear accumulation were suppressed.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：腎臓線維化 細胞骨格 ミオシン アクチン 細胞膜輸送体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) による末期腎不全への進展阻止は我が国における重要な医療課題である。腎臓間質線維化は原疾患が何であろうと辿る共通した CKD の進展機序であり、末期腎不全への進行を阻止するための重要な治療標的である。間質線維化に重要な役割を果たしているのは筋線維芽細胞である。筋線維芽細胞の主な由来は2つあり1つは在来の腎臓線維芽細胞からの分化誘導、もう1つは近位尿細管細胞からの上皮間葉転換である。筋線維芽細胞は TGF- β 1 刺激により Smad3 を発現し、リン酸化 Smad3 は核において collagen 1, fibronectin, α SMA などの線維化関連分子の転写を促進する。筋線維芽細胞は高い代謝活性を持ち、細胞外からの効率的なエネルギー源の取り込みが必要であることが予想されるが、筋線維芽細胞への分化に際してどのような膜輸送体が発現し機能するのか体系的な研究はなく検討課題であった。研究代表者は今までに腎臓集合管の水チャネルである AQP2 の細胞内輸送について研究してきており、疾患を細胞膜分子で考察することで非常に理解がしやすいものになるという経験をしてきており、今回腎臓線維化という一見複雑に思える病態生理も細胞膜分子でシンプルに考えられるようになるのではないかと研究を発案した。

2. 研究の目的

腎臓間質の線維芽細胞が活性化し筋線維芽細胞へと分化する際に細胞膜上で増加、活性化する分子を同定しその機能を解析する。

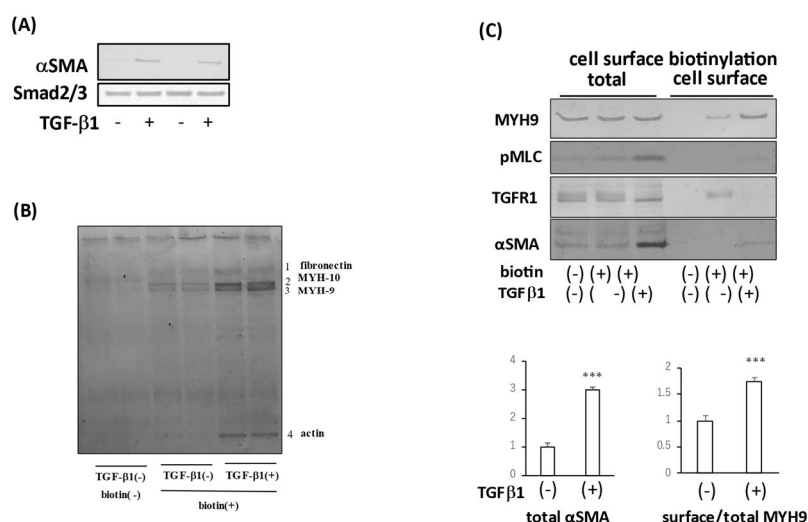
3. 研究の方法

腎臓由来の線維芽細胞 (rat NRK-49F 細胞) を培養し TGF- β 1 で一晩 (O/N) 処置し筋線維芽細胞へ分化誘導させる。細胞膜表面分子をビオチン標識法により回収し SDS-PAGE で分離し高感度銀染色を行う。TGF- β 1 刺激により明らかに増加しているバンドを切り出し LC-MS で解析し分子を同定する。特異的阻害剤などを用いてその分子の機能解析を行う。またその分子をレンチウイルスを用いたノックダウン法で阻害しさらなる機能解析を行う。

4. 研究成果

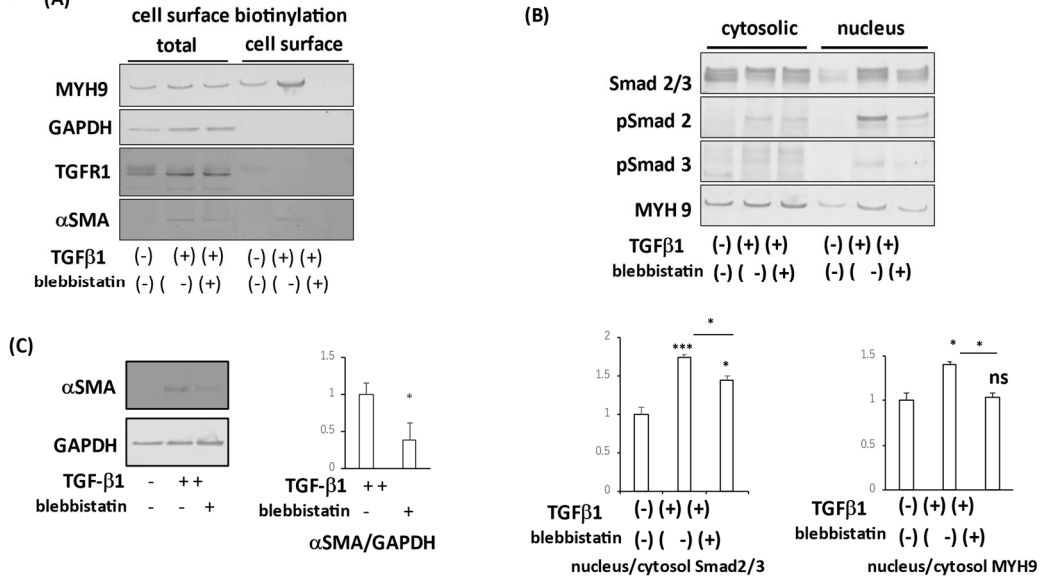
ATCC より rat NRK-49F 細胞 (normal kidney fibroblast) を購入、DMEM, 4.5g Glucose, with L-Gln and sodium pyruvate (Nacalai 08458-45) に FBS 5%、1%NEAA (非必須アミノ酸) を添加し 37 で通常のインキュベーター内で培養した。TGF- β 1 は Peprotech Recombinant Human TGF- β 1 を 0.1%BSA/PBS で 5 μ g/mL に調整し 1000x で使用 (5ng/mL) した。TGF- β 1 刺激により α 平滑筋アクチン (α SMA) が増加することが確認された (図 1, A)。次に TGF- β 1 刺激の有無に分けて細胞膜表面ビオチン標識を行いビオチン結合分子 (=細胞膜貫通分子) をア

図1



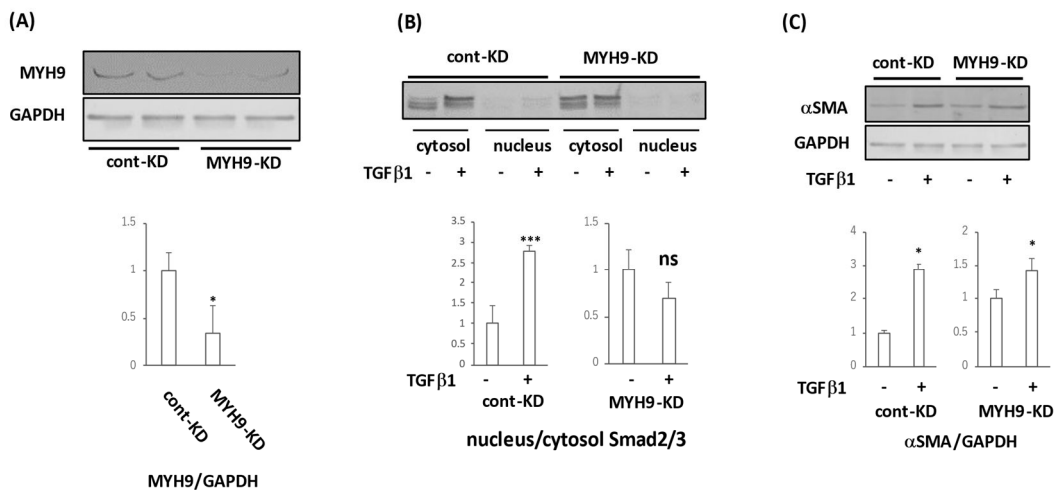
ピジンで回収し高感度銀染色を施行した (図 1, B)。TGF- β 1 刺激後に増加する複数のバンドが検出され、特に 220kD 付近で著明にシグナルが増強する分子が確認され、それを含めて LC-MS で解析したところ (図 1, B) 付記のように分子が同定された。特に最も TGF- β 1 による増強が著しい myosin-9 (MYH-9, 別名 non-muscle myosin 2A, NM2A, 本稿内では MYH-9 表記とする) に着目し特異的抗体を用いて解析した。ウエスタンブロット (図 1, C) においても TGF- β 1

図2



刺激により細胞膜表面 MYH-9 の増加が確認された (図 1 , C)。 MYH-9 は TGF- β 1 刺激により MLC のリン酸化を伴っていた。 また TGF receptor 1 (TGFR1) は TGF- β 1 刺激により細胞内に取り込まれている (図 1 , C)。 次に MYH-9 の特異的阻害剤である blebbistatin を使用し解析した。 blebbistatin 処置 (10 μ M, O/N) により TGF- β 1 刺激による MYH-9 の細胞膜集積は阻害され (図 2 , A) α SMA の増加も阻害されていることが分かる (図 2 , C)。 次に核タンパクの解析を試みた (NE-PER Nucler and Cytoplasmic Extraction Regents, Thermo, 78833)。 TGF- β 1 刺激により Smad2/3 は核に集積し核特異的にリン酸化シグナルを発している (図 2 , B)。 また MYH-9 も核で増加している (図 2 , B)。 blebbistatin 処置により MYH-9 の核集積が阻害 (図 2 , B) され、 Smad2/3 の核集積も阻害されそれぞれの核特異的リン酸化シグナルも減弱しているのが分かる (図 2 , B)。 以上より TGF- β 1 刺激により MYH-9 は細胞膜と核に移行し、その機能阻害により Smad2/3 の核への移行とリン酸化、および α SMA の増加が阻害されることが示された。 さらに MYH-9 の機能を確認するためレンチウイルスによる MYH-9 KD を行った。 6 well 上で NRK-49 細胞を培養し、 polybrane (sc-134220) 2 μ g/mL 含有 DMEM (上記組成) に交換、 control-KD lentiviral particles (sc-108080) または MYH9-KD lentiviral particles (sc-61121-V) 5 μ L を添加した。 翌日 normal DMEM に交換し 5 日間培養し puromycin (sc-108071) selection を

図3



開始し安定的 control-KD 細胞群と安定的 MYH-9 KD 細胞群を作成した。 まずはウエスタンブロットで KD を確認した (図 3 , A)。 MYH-9 KD 群では MYH-9 の発現が control-KD 群に比し明確に低いことが確認された (図 3 , A)。 MYH-9 KD 群では TGF- β 1 刺激による Smad2/3 の核移行が有意に弱まっており (図 3 , B) TGF- β 1 刺激による α SMA の増加率も減弱していた (図 3 , C)。 以上より TGF- β 1 刺激による腎臓線維芽細胞の活性化に際し、 MYH-9 が細胞内から細胞膜およ

び核に集積することが明確に示され、これが筋線維芽細胞への分化に非常に重要な分子機序であり、そのステップが阻害されると筋線維化は抑制されることが分かった。研究は始めた当初は何らかのアミノ酸トランスポーターなどが同定されることを期待して始めたので若干予想外の結果であり、MYH-9 がさらに具体的にどのように線維化に関与するかはさらなる解明が必要である。MYH-9 のみならず α SMA も TGF- β 1 刺激により細胞膜および核に集積していた。これらは結合しアクチンとして機能しているので筋線維芽細胞への分化に際し細胞膜 核輸送システムの基盤となっているものと考えられる。その一部として collagen receptor DDR1 の核輸送に MYH-9 が関与するという報告、或いは collagen remodeling に機能するといった報告があると思われる。本研究でのビオチン標識で collagen 1 は細胞膜分画から検出されていないので (not shown) MYH-9 は collagen 1 に連れて取れてきたわけではなく実際に TGF- β 1 刺激により細胞膜貫通型となったものと考えている。MYH-9 変異により様々な症候を呈することも分かっており、興味深いことに African American で進行性の non-diabetic の腎不全との関連も示唆されている。本分子の活性型変異の検討、相互作用分子群の同定、それらの遺伝子解析などの研究が進展すれば腎不全という複雑な疾患概念の理解をクリアなものにし、新しい CKD 診療の扉を開く可能性がある。今後の研究標的として興味深い分子と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yui N, Bouley R, Terlouw A, Cheung PW, Brown D.	4. 巻 23
2. 論文標題 Chlorpromazine Induces Basolateral Aquaporin-2 Accumulation via F-Actin Depolymerization and Blockade of Endocytosis in Renal Epithelial Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9041057.	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 Ando Fumiaki, Mori Shuichi, Yui Naofumi, Morimoto Tetsuji, Nomura Naohiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Sasaki Sei, Kondo Yoshiaki, Kagechika Hiroyuki, Uchida Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 AKAPs-PKA disruptors increase AQP2 activity independently of vasopressin in a model of nephrogenic diabetes insipidus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-018-03771-2	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 Hara Y, Ando F, Oikawa D, Ichimura K, Yanagawa H, Sakamaki Y, Nanamatsu A, Fujiki T, Mori S, Suzuki S, Yui N, Mandai S, Susa K, Mori T, Sohara E, Rai T, Takahashi M, Sasaki S, Kagechika H, Tokunaga F, Uchida S.	4. 巻 119
2. 論文標題 LRBA is essential for urinary concentration and body water homeostasis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2202125119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2202125119	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 油井 直史, 名和 眞希子, 内田 信一.
2. 発表標題 腎臓線維芽細胞活性化における非筋肉型ミオシン 2A の重要性
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ando, Fumiaki, Yui, Naofumi, Mandai, Shintaro, Isobe, Kiyoshi, Mori, Takayasu, Susa, Koichiro, Nomura, Naohiro, Sohara, Eisei, Rai, Tatemitsu, Uchida, Shinichi,
2. 発表標題 Derivatives of FMP-API-1/27 Robustly Activate AQP2 Water Channels Independently of Vasopressin
3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yui Naofumi, Ando Fumiaki, Sasaki Sei, Uchida Shinichi
2. 発表標題 Epithelial Depolarization Induces AQP2 Up-regulation via Non-Canonical Ser-269 Phospho-Regulation Independently of Any Hormonal and Chemical Stimulation
3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ando Fumiaki, Yui Naofumi, Nomura Naohiro, Rai Tatemitsu, Sasaki Sei, Uchida Shinichi
2. 発表標題 AKAPs-PKA Disruptors Robustly Increase AQP2 Activity Independently of Vasopressin
3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasaki Sei, Sakai Masaki, Mizumura Hiroki, Matsumoto Tomoki, Noda Yumi, Yui Naofumi, Ishibashi Kenichi
2. 発表標題 Phosphorylation of Ser261 and Dephosphorylation of Ser269 Is Important for Urinary Excretion of AQP2
3. 学会等名 American Society of Nephrology (国際学会)
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
---------	---------