

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16008

研究課題名（和文）ポドシンのエンドサイトーシスにおけるSNX9およびNPC2の役割

研究課題名（英文）SNX9 and NPC2 facilitates podocin endocytosis in the injured podocyte

研究代表者

佐々木 有（SASAKI, YU）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10790082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：糸球体足細胞の異常は不可逆性の腎障害を誘導する。不可逆的病態で足細胞のスリット膜蛋白であるポドシンがエンドサイトーシスにより細胞質へ移動していることが判明し、我々はSorting Nexin 9(SNX9)の関与を突き止めた。糸球体硬化進展メカニズムを解明するため、足細胞障害時に発現が変動する蛋白に注目し解析を行った。Rhoファミリー蛋白が足細胞の構造を維持し糸球体硬化を抑制すること、ポドサイト障害時に発現するNEFHがシナプトポディンの発現低下とポドサイトの脱落を防ぎ腎保護作用を有していること、カテプシンLとその阻害物質の発現バランスがポドサイト障害抑制に関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は足細胞の障害機序を解明し、不可逆的病態の進行阻止の創薬研究へ結びつく可能性を秘めている。糸球体硬化進展メカニズムを明らかにすることで、ネフローゼに伴う不可逆的病態形成のメカニズムを解明できると考えている。本研究は、現在有効な治療法が少ない足細胞障害の治療において新たな治療薬開発への糸口となり、最終的に腎臓死を防ぎ、血液透析への移行患者を減少させる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The irreversibility of glomerulosclerotic changes depends on the degree of podocyte injury. We identified SNX9 as a facilitator of podocin endocytosis in severe podocyte injury and demonstrated the expression of SNX9 in the podocytes of both nephropathy model mice and human patients with irreversible glomerular disease. To clarify the mechanism of glomerulosclerosis, we analyzed expression variation of proteins in podocyte injury. Our results indicated that Rho family proteins in podocytes play an important role in preventing the kidneys from developing glomerulosclerosis. We demonstrated NEFH is expressed in podocytes during the disease course and that it prevents the reduction in synaptopodin expression and detachment of podocytes. We discovered that cathepsins L levels and the absence of its inhibitors in podocytes affected by PAN nephrosis, are important factors contributing to podocyte damage and the development of proteinuria.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ポドサイト 糸球体硬化 ネフローゼ症候群 ポドシン SNX9

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群は糸球体の濾過機能が障害され、多量の蛋白尿を呈する腎疾患である。微小変化群等ではステロイドが有効であるが、ステロイド依存性や頻回再発型におけるステロイドの長期大量投与による副作用が問題となっている。一方で巣状糸球体硬化症に代表される糸球体硬化へと至るものはステロイド抵抗性であり、多くは腎不全に進行する。免疫抑制薬やLDLアフェレシス等が使用されているが、巣状糸球体硬化症の腎生存率（透析非導入率）は10年で85.3%、15年で60.1%、20年で33.5%と不良である。臨床的に蛋白尿の存在は末期腎不全への危険因子となり、腎機能低下速度は倍加する。これは蛋白尿が糸球体障害の結果として生じることに加えて、蛋白尿自体が尿管・間質障害の進展因子として作用することに起因する。したがって、ネフローゼ症候群における蛋白尿の出現機序の解明とその改善を考慮にいたした治療法は腎予後改善に重要である。

最近、糸球体上皮細胞（足細胞）とその足突起間に存在するスリット膜と呼ばれる構造が蛋白尿と密接に関連する濾過障壁機構であることを示唆する知見が飛躍的に増えている。先天性ネフローゼ症候群で判明した異常遺伝子は、ほとんどがスリット膜に存在する蛋白質の異常であり、これらの研究はネフローゼ症候群におけるスリット膜蛋白の重要性を意味する。我々のグループは、足細胞障害時に、スリット膜蛋白の一つであるポドシンがエンドサイトーシスにより足細胞内でスリット膜から細胞質へと局在変化することを、腎障害モデルラットとIgA腎症の腎生検検体にて見出した(Cell Tissue Res. 2015)。さらにyeast two hybrid法を用いて、ポドシンと接着する蛋白質の同定を行い、エンドサイトーシスの制御蛋白であるSorting Nexin 9 (SNX9) を糸球体足細胞で初めて同定した。ネフローゼを呈する糸球体腎炎は、微小変化群に認める可逆的変化から、巣状糸球体硬化症に認める不可逆的な変化を引き起こすものまで多彩である。可逆的病態では、SNX9の発現は弱くポドシンとは一致しなかった。一方、不可逆的病態においてはSNX9の発現が著しく強くなり、ポドシンと極めてよく一致することが明らかとなった。さらに発現抑制細胞において、足細胞障害時にポドシンは細胞質での発現が低下しており、SNX9は足細胞障害時にエンドサイトーシスによりポドシンの局在をスリット膜部からエンドソーム内に変化させると考えられた(Sci Rep. 2017)。

足細胞は間葉系から発生し上皮に成熟する特殊な細胞ながら神経細胞と同類の蛋白質の発現が多く、一方で貪食細胞のような食作用・抗原提示蛋白質の発現をきたす等、まだ明らかにされていないことが多い。これこそが病態解明の困難さであり、治療抵抗性にも関連している。我々は足細胞障害の機序を明らかにすることで、ネフローゼに伴う不可逆的病態形成のメカニズムを解明できると考えている。

2. 研究の目的

本研究は足細胞の障害機序を解明し、不可逆的病態の進行阻止の創薬研究へ結びつく可能性を秘めている。我々の目的は、現在有効な治療法が少ない足細胞障害の治療において新たな治療薬開発への糸口となり、最終的に腎臓死を防ぎ、血液透析への移行患者を減少させることにある。

3. 研究の方法

糸球体硬化進展メカニズムを解明するため、足細胞障害時に発現が変動する蛋白に注目し培養足細胞、実験糸球体硬化モデル、ヒトの検体の観察・解析を行い、組織学的・生化学的な評価を行った。

- (1)足細胞が障害されると foot process effacement (足突起消失) という電顕像を呈し、障害から回復すると再度足突起を形成してくる。こうした足細胞の精巧でダイナミックな構造変化には細胞骨格が重要で、その制御因子として Rho ファミリー低分子 G 蛋白質 (Rac1, RhoA, Cdc42) の役割が想定されている。足細胞の形態機能維持には RhoA と Rac1 のバランスが重要とされており、足細胞障害時の RhoA、Rac1 の解析を行った。
- (2)正常ポドサイトと ADR 誘発障害ポドサイトから RNA を抽出し、マイクロアレイアッセイを行い比較検討した。ADR 誘発時に発現が変化する分子に注目し解析を行った。
- (3)我々の研究によりポドシンは足細胞障害時に細胞膜からエンドソーム内へ局在変化することが明らかとなったが、その後リソソームへと運ばれ分解されるかは不明のままである。リソソーム内の蛋白分解酵素であるカテプシン L は腎障害時に発現が亢進しスリット膜や細胞骨格関連蛋白を過剰に分解し蛋白尿をもたらすことが知られており、実験糸球体硬化モデルにおいて解析を行った。

4. 研究成果

(1)糸球体足細胞障害の最終段階である糸球体硬化において、細胞内蛋白の Rac1 と mTOR が足細胞の構造を維持し、糸球体硬化を抑制することを報告した (Sci Rep. 2018)。Rac1 のポドサイト特異的のノックアウトマウスにおいてネフローゼ・糸球体硬化モデルであるアドリマイシン (ADR) 腎症を引き起こすと、硬化糸球体が増加し糸球体上のポドサイトの数はコントロールマウスと Rac1 ノックアウトマウスで差はないにもかかわらず、その細胞の大きさは Rac1 ノックアウトマウスでは小さくなっていった (図 1)。さらに Rac1 と細胞の大きさに関するキナーゼタンパクの mTOR との関係調べ、コントロールマウスに ADR を投与するとポドサイトにおいて mTOR の活性化が見られたが、Rac1 ノックアウトマウスでは抑えられており (図 2)、ポドサイトが障害を受けると Rac1 が存在することで mTOR が活性化され、ポドサイトの大きさが保持される分子メカニズムが明らかになった。Rac1 が mTOR とともにポドサイトの細胞の大きさを保持することで、構造を維持し糸球体硬化を抑制していることを解明し、足細胞障害の機序の一端を明らかにすることができた。

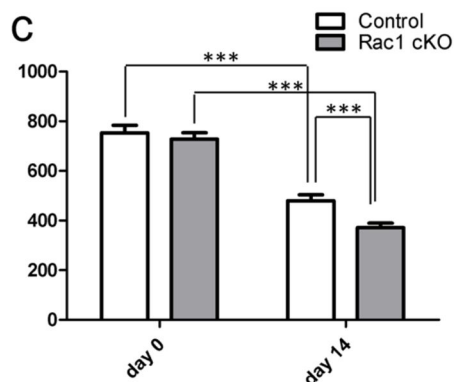


図1: ADR投与後のポドサイトの体積変化

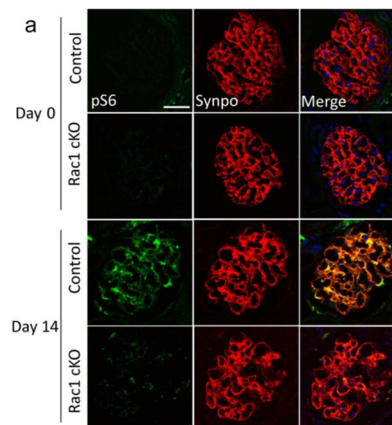
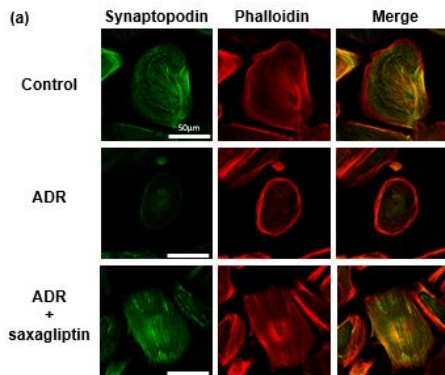


図2: ADR投与後のポドサイトにおけるmTORの活性化

(2) DPP4阻害薬がシナプトポデインの分解やポドサイトの形態機能維持を担うRhoAの発現低下を抑制することによりポドサイト障害を防いでいる可能性があることを見出した (BMC Nephrol. 2020)。



(3) ポドサイト障害に関連する遺伝子を明らかにするために、正常ポドサイトとADR誘発障害ポドサイトからRNAを抽出し、マイクロアレイアッセイを行い比較検討した。その結果、ADR誘発障害時に発現が著しく増加するneurofilament heavy polypeptide(NEFH)を同定した (Sci Rep. 2018)。NEFHはADR誘発腎炎モデルマウスと培養ポドサイトにおいて発現が亢進しており、免疫染色および免疫沈降でポドサイト特異的蛋白であるシナプトポデインと共発現していることを証明した。さらにNEFHを強発現させた培養ポドサイトではADR投与によるシナプトポデインの発現低下が抑制されていることに注目した。NEFHノックダウンにより細胞接着に関与するピンキュリンの発現が低下し、細胞外マトリックスへの接着性が低下しポドサイトの脱落がみられた (図1)。ネフローゼを呈する糸球体腎炎は微小変化群に認める可逆的な変化から、巣状糸球体硬化症に認める不可逆的な変化を引き起こすものまで多彩である。可逆的病態でNEFHの発現は弱かったが不可逆的病態においては強く発現していた (図2)。NEFHはポドサイト障害時に発現し、シナプトポデインの発現低下とポドサイトの脱落を防ぎ腎保護作用を有していることを明らかにした。

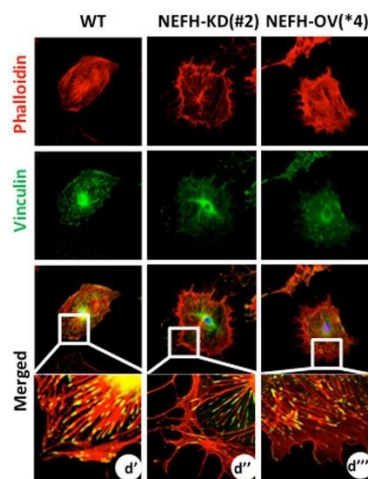


図1:NEFHノックダウン時のピンキュリンの発現

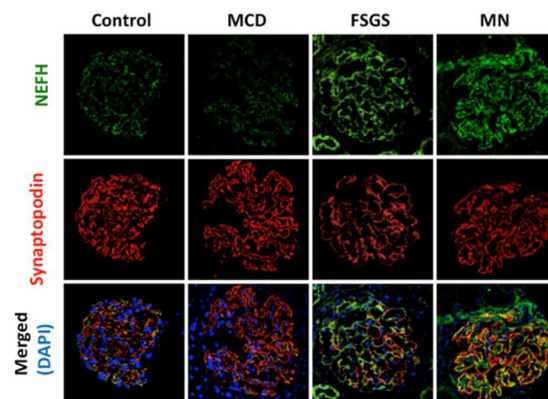
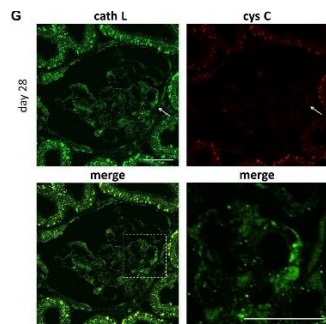


図2:ネフローゼ症候群患者におけるNEFHの発現

(4) 蛋白分解酵素であるカテプシンLは腎障害時に発現が亢進しスリット膜や細胞骨格関連蛋白を過剰に分解し蛋白尿をもたらすことが知られているが、カテプシンLとその阻害物質である

シスタチンCの発現は一致しないことを明らかにすることができた (J. Histochem. Cytochem 2018)。蛋白分解酵素とその阻害物質の分泌のバランス変化が糸球体基底膜からの糸球体足細胞の脱落だけでなく、糸球体の透過性亢進につながる糸球体基底膜分解を誘発する可能性があると考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 5061 ~ 5072
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 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 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 17157 ~ 17171
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 -

1. 著者名 Kubo Ayano, Hidaka Teruo, Nakayama Maiko, Sasaki Yu, Takagi Miyuki, Suzuki Hitoshi, Suzuki Yusuke	4. 巻 21
2. 論文標題 Protective effects of DPP-4 inhibitor on podocyte injury in glomerular diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 402 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-020-02060-9	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐々木有
2. 発表標題 Sorting Nexin 9 facilitates podocin endocytosis in the injured podocyte
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1件

国際研究集会 American Society of Nephrology	開催年 2018年～2018年
--	--------------------

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
---------	---------