

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17744

研究課題名（和文）蛋白尿の発生におけるポドサイト脱チロシン化 -チューブリンの意義

研究課題名（英文）Key roles of podocyte detyrosinated alpha-tubulin in the development of proteinuria

研究代表者

谷村 智史 (Tanimura, Satoshi)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60794352

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、蛋白尿を伴う腎疾患における微小管 チューブリンの脱チロシン化の変化の検討を目的として行った。腎臓において脱チロシン化 チューブリンは主としてポドサイトに発現し、アドリアマイシン腎症や高脂肪食負荷の腎疾患モデルにおいて発現低下が認められた。また、培養ポドサイトを用いて、チューブリンの脱チロシン化はPTEN/AKT/GSK3 シグナル経路による制御を受けていることが示された。以上の結果より、蛋白尿を伴う腎疾患におけるポドサイト障害に微小管 チューブリン脱チロシン化の変化が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、腎臓における役割が不明であった微小管脱チロシン化 チューブリンが主として糸球体ポドサイトに発現しており、その発現は蛋白尿を発生する腎疾患において減少し、ポドサイト細胞内でPTEN/AKT/GSK3 シグナル経路による制御を受けていることを示したものであり、現在、直接的にポドサイトを標的とした腎疾患の治療法がない中で、蛋白尿を伴う腎疾患の機序の一部を解明し、微小管 チューブリンの脱チロシン化が新たな治療標的となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the changes in detyrosination of α -tubulin in the kidney from proteinuric disease models. Detyrosinated α -tubulin was mainly expressed in podocytes in the kidney, and its expression was significantly reduced with podocyte injury in adriamycin nephropathy and high-fat diet proteinuric mice models. In addition, in vitro experiments showed that the expression of detyrosinated α -tubulin was regulated by PTEN/AKT/GSK-3 pathway in cultured immortalized podocytes. Taken together, this study suggests the involvement of α -tubulin detyrosination in proteinuric kidney diseases with podocyte injury.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：蛋白尿 ポドサイト 微小管 翻訳後修飾

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 chronic kidney disease (CKD) は、末期腎不全への進行とともに心血管疾患の発症の危険因子となることが知られており、その患者数は本邦でも 1300 万人以上と推計されている。末期腎不全から透析療法を要する患者数は未だ増加しており、更に心血管疾患の患者数の増加にも寄与していることを考えると、CKD の進展を抑制する治療の開発が急務である。CKD では腎機能低下に加えて、近年、蛋白尿の増加も独立して、末期腎不全と心血管疾患のリスク増加に関連することが証明されている。蛋白尿の発生は、糸球体毛細血管係蹄における蛋白質に対する濾過障壁構造の破綻であると考えられる。原発性糸球体疾患に伴う蛋白尿は、ポドサイトのスリット膜構成蛋白質の構造・機能的な変化を伴うような、ポドサイトへの免疫学的傷害が主たる機序として主張される一方、早期の糖尿病性腎症や肥満に伴う蛋白尿では、糸球体の過剰濾過が主たる病態であり、二次的にスリット膜の構造的変化が起こると考えられる。

ポドサイトは細胞体からタコ足と呼ばれる特有の一次突起を伸ばし、そこには更に足突起と呼ばれる二次突起を持つ。この二次突起は隣接するポドサイトの足突起との間でスリット膜を形成して濾過障壁の一部となるが、細胞骨格はアクチンフィラメントから構成されるため可変性があり、蛋白尿の存在下では足突起同士が可逆的に融合する。一方、一次突起の細胞骨格は主として微小管から構成されるため構造的に安定で、ポドサイトの細胞体と足突起の間の物質輸送にも重要である。ポドサイト一次突起を構成する微小管では、神経細胞の神経突起と同様に、その構成蛋白である α -チューブリンが高度に脱チロシン化されている。このようなチューブリンの翻訳後修飾は、神経細胞では突起構造の維持や軸索輸送に必須ではあるが、ポドサイトにおける生理学的役割とポドサイト障害に伴う変化は未だ報告されていない。近年では心筋細胞の脱チロシン化 α -チューブリンは mechanotransduction に関与し、細胞の stiffness を高めることが報告されており、ポドサイト一次突起の脱チロシン化 α -チューブリンも糸球体係蹄への過剰な圧負荷に対する障壁として機能し、過剰濾過に伴う蛋白尿の発生過程では脱チロシン化が抑制される可能性がある。

チューブリンの翻訳後修飾は、微小管関連蛋白質 microtubule-associated protein (MAP) との相互作用に影響されることが知られており、神経細胞で発現豊富な MAP である Tau 蛋白質はポドサイトにも発現している。Tau のリン酸化は glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) の活性化により促進され、 α -チューブリンの脱チロシン化の減少と関連する。アドリアマイシンによるポドサイト障害では GSK-3 活性化と Tau リン酸化が起こることが報告されている。一方、がん抑制遺伝子として知られる PTEN はポドサイトにも発現し、AKT の不活化を介して他の様々な細胞で GSK-3 活性を上流より負に制御することが証明されているため、PTEN/AKT/GSK-3 経路はポドサイト一次突起の α -チューブリン脱チロシン化の制御機構である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、CKD の主要な進行因子である蛋白尿の発生過程においてポドサイトの微小管を構成するチューブリンのチロシン化/脱チロシン化の関与について尿蛋白を発生するマウスモデルにおいて検討し、その制御機構としての PTEN/AKT/GSK-3 経路の役割について培養ポドサイトを使用して解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 尿蛋白を発生する動物モデルにおけるポドサイト微小管 α -チューブリンの脱チロシン化の変化の検討

尿蛋白を発生する複数のマウスモデルにおいてポドサイト微小管の脱チロシン化 α -チューブリンの変化を腎組織の免疫蛍光染色により定量的に評価する。以下のようにマウスモデルを作成し、実験に使用する。

A) アドリアマイシン腎症モデル

高度の蛋白尿を発生する動物モデルとしてアドリアマイシン腎症マウスモデルを使用する。8 週齢の雌性 BALB/c マウスにアドリアマイシン 15mg/kg を尾静脈より注入し、1 週間後に蓄尿を行って腎臓を摘出し、生理食塩水を尾静注した対照マウスと比較検討する。

B) 高脂肪食負荷モデル

糸球体過剰濾過を引き起こすマウスモデルとして高脂肪食負荷による肥満マウスを使用する。雄性 C57BL/6J マウスに 6 週齢より 60kcal%の脂肪含有量を含む高脂肪食を摂取させて肥満モデルを作成する。対照の雄性 C57BL/6J マウスには 10kcal%脂肪含有量の低脂肪食を摂取させ、16 週齢で蓄尿を行って腎臓を摘出し、高脂肪食群と低脂肪食群の間で比較検討する。

C) 早期糖尿病性腎症モデル

自然発症の糖尿病マウスである C57BL/6Cr 系統の雄性 Akita マウス及び対照の野生型マウスを使用し、16 週齢で蓄尿を行って腎臓を摘出し、野生型マウスとの間で比較検討する。

(2) ポドサイト微小管 α -チューブリンの脱チロシン化の制御における PTEN/AKT/GSK-3 経路の関与の検討

RPMI-1640 培地 (10%FBS + ITS を含む) を用いて、ヒト由来不死化ポドサイト細胞株を 33 で培養して増殖させ、37 で 1 週間分化させた後、PTEN/AKT/GSK-3 経路を修飾する薬剤を投与し、脱チロシン化 α -チューブリンの発現について Western blot により評価した。PTEN の

阻害にはVO-Oh pic (0、0.2、1 μ M ; 5時間インキュベート)を、GSK-3 の阻害にはTDZD-8 (0、1、5 μ M ; 24時間インキュベート)あるいは炭酸リチウム (0、20、100 μ M ; 8時間インキュベート)を用いた。

4. 研究成果

(1) 尿蛋白を発生する動物モデルにおけるポドサイト微小管 α -チューブリンの脱チロシン化の変化の検討

アドリアマイシン腎症のマウスモデルは、対照マウスと比較してWestern blotにより高度の尿中アルブミン排泄が確認された。光学顕微鏡上は糸球体に明らかな構造的異常を認めなかったが、電子顕微鏡ではポドサイト足突起の融合が広範囲に認められた。また、ポドサイト一次突起における微小管の配列も不整となっていた。脱チロシン化 α -チューブリンに対する抗体を用いた免疫蛍光染色では、対照マウスの腎組織において糸球体内、特にポドサイトに特異的な染色性が認められた。この染色性はアドリアマイシン腎症マウスにおいて著明に減少しており(図1) アドリアマイシンによるポドサイト傷害がポドサイト微小管の α -チューブリンの脱チロシン化を抑制することが確認された。

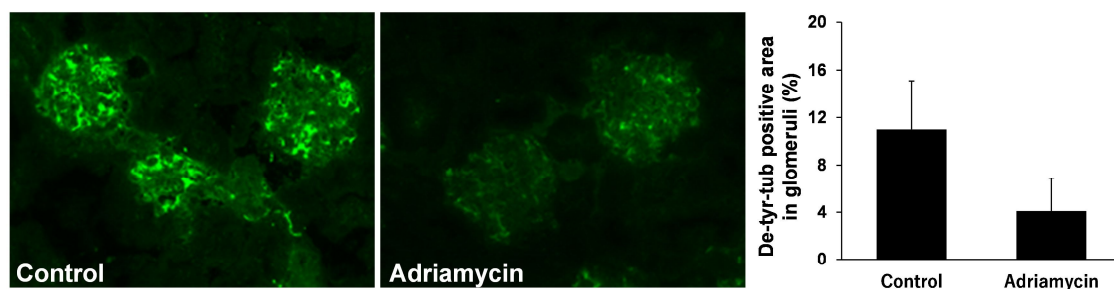


図1 アドリアマイシン腎症におけるポドサイト脱チロシン化 α -tubulinの変化

次に、高脂肪食負荷による肥満マウスを用いた検討を行った。高脂肪食負荷マウスは、低脂肪食を摂取したマウスと比較して著明な体重増加を示し、腎組織では光学顕微鏡上、有意な糸球体肥大が認められたが、他に明らかな変化は認められなかった(図2)。高脂肪食負荷マウスでの尿中アルブミン排泄の増加は、アドリアマイシン腎症モデルに比べると非常に小さいものであったが、免疫蛍光染色による糸球体内の脱チロシン化 α -チューブリン陽性面積は、低脂肪食を摂取したマウスと比較して有意に減少しており(図2) 高脂肪食による糸球体への血行動態的負荷がポドサイトの α -チューブリン脱チロシン化の抑制につながることが示唆された。一方、糖尿病モデルマウスであるAKITAマウスを用いた検討においては、AKITAマウスが野生型マウスと比較して明らかな高血糖を呈したものの、尿中アルブミン排泄の増加は統計学的に有意ではなかった。また、AKITAマウスでは糸球体肥大の傾向も有意ではなかった。免疫蛍光染色による糸球体内の脱チロシン化 α -チューブリン陽性面積は、野生型マウスと比較してAKITAマウスで有意な減少は認められなかった。以上の結果から、高脂肪食負荷による糸球体への血行動態的負荷は、アドリアマイシン腎症と同様にポドサイト α -チューブリン脱チロシン化の減少につながるが、有意な尿蛋白の増加を伴わない糖尿病マウスでは脱チロシン化の減少は起こらず、ポドサイトの α -チューブリン脱チロシン化減少はポドサイト障害の指標である可能性が示唆された。

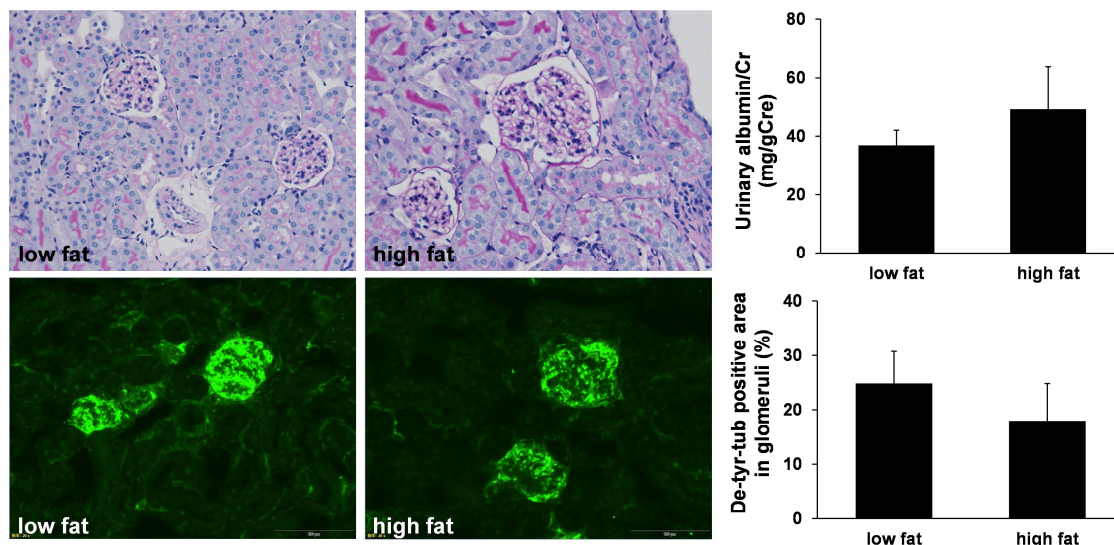


図2 高脂肪食負荷マウスにおけるポドサイト脱チロシン化 α -tubulinの変化

(2) ポドサイト微小管 -チューブリンの脱チロシン化の制御における PTEN/AKT/GSK-3 経路の関与の検討

ヒト由来不死化ポドサイト細胞株は、33 培養下の未分化（増殖）状態では -チューブリンの脱チロシン化を示さず、37 培養下の分化状態では -チューブリンの高度な脱チロシン化を示した。

分化した培養ポドサイトへの PTEN 阻害薬 VO-OHpic の投与は、AKT のリン酸化（活性化）を引き起こし、AKT の下流で制御される GSK3 のリン酸化（不活化）が促進された（図 3）。このため、ポドサイトにおいて、PTEN/AKT シグナル経路は GSK3 の作用を制御することが示された。

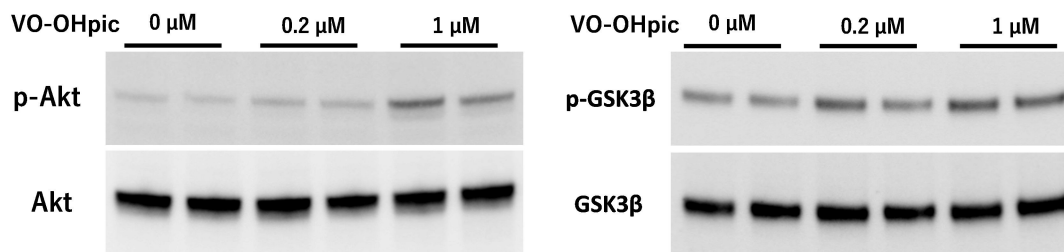


図3 PTEN阻害薬による培養ポドサイトでのAKT活性化とGSK3β不活性化

次に、培養ポドサイトにおいて GSK3 が -チューブリンの脱チロシン化を制御するかを検討するために、分化した培養ポドサイトへの GSK3 阻害薬の投与を行った。GSK3 阻害薬である TDZD-8 は分化した培養ポドサイトにおいて GSK3 の活性だけでなく、GSK3 の蛋白質発現を減少させた。更に、TDZD-8 の投与は脱チロシン化 -チューブリンの発現を著明に減少させた。一方、GSK3 の活性を抑制する塩化リチウム(LiCl)の投与は、GSK3 のリン酸化（不活化）を促進した（図 4）。この GSK3 のリン酸化（不活化）は、 -チューブリン脱チロシン化の増加を引き起こした（図 4）。以上の結果から、ポドサイトにおける GSK3 の活性（発現量ではなく）は、微小管 -チューブリン脱チロシン化を負に制御することが示された。

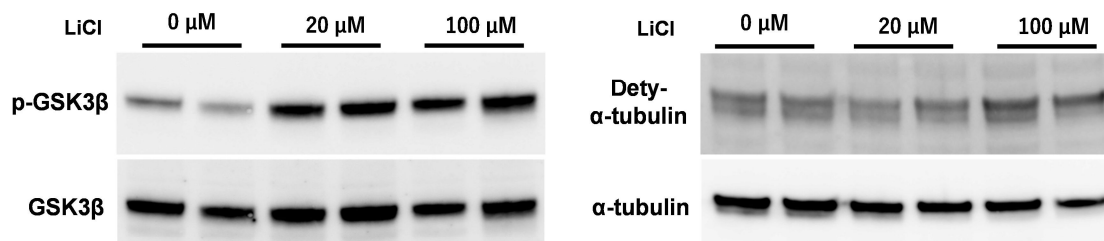


図4 培養ポドサイトでのGSK3β不活性化による脱チロシン化α-チューブリンの変化

これらの研究結果から、尿蛋白を発生する動物モデルにおいて、ポドサイト障害は微小管 -チューブリン脱チロシン化の減少につながり、この -チューブリンの変化は、尿蛋白とともにポドサイト障害の指標となることが示された。GSK3 の活性化は、ポドサイト障害に関連することが報告されているが、ポドサイト微小管 -チューブリンの脱チロシン化は、PTEN/AKT シグナル活性化による GSK3 の不活化に伴って促進されることが証明され、このシグナル経路がポドサイト障害の治療標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	田邊 克幸 (Tanabe Katsuyuki)		

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