

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790261

研究課題名（和文）細胞極性制御因子による糸球体疾患関連蛋白質の機能制御の解析

研究課題名（英文）Analysis of the functions of the PAR-aPKC complex in the regulation of the slit diaphragm proteins

研究代表者

廣瀬 智威 (HIROSE TOMONORI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20381668

研究成果の概要（和文）：日本の慢性腎不全による透析患者数は2009年末時点で29万人を超えており、現在でもその患者数は毎年約1万人ずつの増加傾向にある。しかし、慢性腎不全の約80%の原因となる糸球体疾患の病態・進展機序の解明は遅れている。この課題を克服するため、私は新しい観点に基づく糸球体疾患モデルマウスの樹立を進め、腎糸球体の正常機能を支える分子機構の一端を解明した。これらの成果は、糸球体疾患の分子病態解明や診断・治療法の開発に貢献できるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：The prevalence of end-stage renal disease (ESRD) in Japan have reached more than 290,000 by the end of 2009 and is still increasing by 10,000 a year. Although glomerular diseases cause about 80% of ESRD, the mechanisms of the pathophysiology and progression of glomerular diseases are still obscure. To resolve this situation, I established a new mouse line with a glomerular disease based on the disturbance in podocyte cell polarity and revealed a new aspect of the molecular mechanisms to maintain glomerular filtration function. These results would contribute to our understanding of the molecular pathophysiology of glomerular diseases and to the innovation of diagnostic techniques or medical interventions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：シグナル伝達 / 疾患モデル動物 / 糸球体疾患 / 細胞極性 / 腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

日本における慢性腎臓病患者は、当時すでに 1300 万人以上（成人約 8 人に 1 人）と言われていた。更に病態が進行した慢性腎不全による透析患者数は、2006 年末時点で 26 万人（全国民約 500 人に 1 人）以上に上っていた。現在でもその患者数は毎年約 1 万人ずつの増加傾向にあり、国民の医療費を圧迫する一因となっている。慢性腎不全の約 80%は糸球体疾患が占めることから、糸球体疾患の病態・進展機序解明は急務の課題である。しかしながら、糸球体の構造・生理機能が極めて複雑で特殊であることから、適切な実験系の確立が困難であり、分子レベルの解析は大きく遅れていた。

腎糸球体のポドサイトは腎臓の濾過機能の主役を担う細胞で、その濾過機能に最も重要な構造が糸球体濾過膜と呼ばれる特殊化した細胞間接着装置である。糸球体疾患には病態の違いから様々なタイプが存在するが、殆どの糸球体疾患において糸球体濾過膜の機能障害が深く関与することや、先天性ネフローゼ症候群の多くが、ネフリンやポドシンを代表とする糸球体濾過膜関連蛋白質の遺伝子変異に起因することが示されていた。しかしながら、糸球体濾過膜関連蛋白質同士の相互作用、及びネフリンからの細胞内シグナル伝達を調節する分子機構については未解明の点が多かった。

私は当時までに、ポドサイトにおける細胞極性制御因子 aPKC の機能解析を進め、ポドサイトの糸球体濾過膜の機能維持には aPKC が必要である事を明らかにした。更にこの aPKC の機能は、糸球体濾過膜構成蛋白質であるネフリン・ポドシンとの複合体形成によって発揮されることを示唆する実験結果を得ていた。

## 2. 研究の目的

- (1) 本研究計画の第一目標は、糸球体疾患の病態に深く関与する糸球体濾過膜の機能制御における細胞極性制御因子の役割を明らかにすることであった。前述の通り、糸球体濾過膜の構造・機能に必須のネフリンに対して、PAR-aPKC 複合体が分子間相互作用することにより、ネフリンシグナル伝達系を制御する可能性を得ていた。そこで、ネフリン・ポドシン複合体の分子間相互作用とシグナル伝達に対し、何れの段階で aPKC が関与するのかを分子生物学・細胞生物学的手法を用いて解明することにした。
- (2) 第二の目標は、本研究計画で得られた結果に基づき、糸球体疾患の新しい診断・治療法への糸口を得ることであった。ポ

ドサイトにおける細胞極性制御因子群のうち、ポドサイトの細胞極性異常を検出するために利用できるものを検索・評価することにした。このようなツールを用いれば、ポドサイトの傷害を早期に判定できる可能性があると考えた。将来的には、これらの候補の中から臨床応用可能な分子マーカーを更に厳選し、ポドサイト特異的 aPKC $\lambda$ 欠損マウスでのバリデーション、実際のヒト臨床検体を用いたバリデーションへと発展させることも想定していた。

## 3. 研究の方法

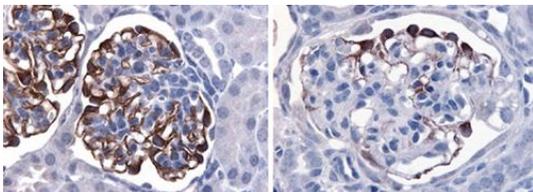
- (1) 糸球体濾過膜関連蛋白質の機能制御に対する細胞極性制御因子の役割解明
    - ① ヒト糸球体疾患モデルとしての性格付けを行うため、ポドサイト特異的 aPKC $\lambda$ 欠損マウスにおける糸球体病変の病理学的評価と腎機能の評価を行った。また、免疫電顕法によるポドサイトのアピカル膜ドメインマーカーの解析により、細胞極性異常を評価した。
    - ② ネフリン-ポドシン複合体と PAR-aPKC 複合体の分子間相互作用の詳細を解析するため、精製蛋白質を用いた結合実験により、細胞極性制御因子 PAR3 とネフリンの直接結合領域を検討した。
    - ③ aPKC による糸球体濾過膜関連蛋白質の機能制御機構を解析するため、ラット単離糸球体培養に特異的 aPKC 阻害薬を添加し、糸球体濾過膜の主成分であるネフリン、ポドシンの各細胞内画分への分布とその複合体形成を評価した。
  - (2) 糸球体疾患の病態を分子レベルで把握する新たな手法（新規診断法）の探索
    - ① ポドサイトの細胞極性制御機構解析の新たな展開を図るため、培養円柱上皮細胞を用いた細胞極性制御因子によるシグナル伝達機構の解析を進めた。
    - ② ポドサイトに細胞極性異常が生ずる糸球体疾患を探索するため、各種腎疾患モデル動物において、糸球体濾過膜関連蛋白質及び細胞極性蛋白質の挙動を解析した。
    - ③ ヒト糸球体疾患におけるポドサイトの細胞極性制御異常の可能性を探るため、様々な糸球体疾患の臨床検体を用いて aPKC の活性状態を検討し、病態との関連を比較検討した。
- ## 4. 研究成果
- (1) 糸球体濾過膜関連蛋白質の機能制御に

対する細胞極性制御因子の役割解明：

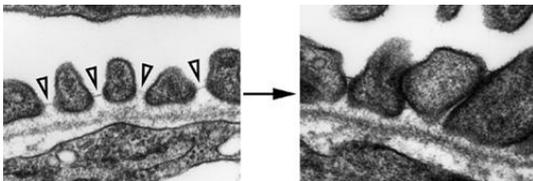
細胞極性蛋白質による糸球体濾過膜の維持機構を示す結果として、以下の結果を得た (Hirose et al., 2009)。これらの成果は新しい観点から糸球体疾患を捉える基礎となるものであり、世界の腎臓研究分野に大きなインパクトを与えただけでなく、社会的にも意義が認められて新聞各紙にて取り上げられた。

- ① 進化的に保存された細胞極性制御因子である aPKC $\lambda$  のポドサイト特異的欠損マウスは、糸球体濾過膜の機能不全に起因する巣状糸球体硬化症・腎不全に陥る。ポドサイトの細胞極性異常に基づいた、全く新しい糸球体疾患モデルマウスの樹立に成功した。
- ② aPKC $\lambda$  と共に細胞極性制御複合体を形成する主要因子である PAR3 と、糸球体濾過膜の主成分であるネフリンは直接結合する。
- ③ 正常な糸球体濾過膜を構成するために必要なネフリン・ポドシンの細胞内分布制御には aPKC $\lambda$  活性が必要である。

以上の結果は、これまで解明が進んでいなかった糸球体濾過膜の組織化に関する分子機構の一端を新しい観点から解明したものである。更に、もしポドサイトにおいて細胞極性異常を捉えられれば、糸球体疾患の早期診断、治療方針決定、治療効果判定などに有用である可能性も示唆している。



上図は生後 2 1 日目にネフリンを検出して糸球体濾過膜の状態を評価したもの。コントロールマウスの糸球体の境界でボウマン嚢に面した部分全体を覆っているスリット膜 (左) が、aPKC $\lambda$  遺伝子破壊により大部分消失している (右)。ヒト巣状糸球体硬化症と同様の病理像を呈している。



上図は電子顕微鏡による観察像。aPKC $\lambda$  遺伝子破壊により、ポドサイトの足突起の間隙に存在する糸球体濾過膜 (細い線) (左、矢尻) が消失し、足突起同士が癒合している (右)。強い蛋白尿を呈するヒトの糸球体疾患でも一般的に認められる所見である。

(2) 糸球体疾患の病態を分子レベルで把握する新たな手法 (新規診断法) の探索：

- ① PAR3 の新規結合蛋白質 ASPP2 は、上皮細胞の極性形成において PAR3 と協調的に機能する (Cong et al., 2010)。ASPP2 はポドサイトにも強く発現していることも確認したので、糸球体濾過膜維持機構を担う新たな因子である可能性が示唆される。同時に、円柱上皮細胞とポドサイトの両方に通じる普遍的な細胞極性制御機構の存在も示唆される。
- ② 横浜市立大学医学部・循環器・腎臓内科学との共同研究により、Dahl ラット (高血圧性糸球体硬化症モデル) における aPKC の活性化状態を検討したが、今のところ正常群・治療群・高血圧群との間で有意な違いは認めていない。
- ③ 国立成育医療センター・腎臓科との共同研究により、小児の各種ネフローゼ疾患症例の臨床検体において aPKC の活性化状態を検討したが、今のところ正常群・治療群・ネフローゼ群との間で有意な違いは認めていない。

(3) その他：

- ① 培養円柱上皮細胞を用いた実験により、aPKC によるアピカル細胞膜ドメイン制御についても新知見を得た (Takahama et al., 2008)。
- ② 小児の SLE 腎症 (ループス腎炎) 症例の腎糸球体ポドサイトにおける Toll-like receptor (TLR9) の発現と、腎症の活動性の相関関係について検討した。その結果、ループス腎炎の活動性とポドサイトにおける TLR9 の発現に相関性が認められた。よって、TLR9 がループス腎炎の活動性の指標となり得る事が示唆される (Machida et al., 2010)。
- ③ 細胞実験やマウスモデルにおいて、ATRAP 蛋白質はアンジオテンシン II 1 型受容体 (AT1 受容体) の機能を抑制的に制御することが示されてきた。今回初めてヒト腎臓組織 (健常サンプル、IgA 腎症サンプル) における ATRAP の発現解析や腎機能維持との相関性解析を行ったところ、IgA 腎症において ATRAP が AT1 受容体の機能を抑制的に制御し、腎保護作用を発揮している可能性が示唆された (Masuda et al., 2010)。また、アンジオテンシン II の作用によって腎臓における ATRAP の発現抑制が起こり、AT1 受容体が細胞膜上へ維持されるポジティブフィードバック機構の存在を明らかにした (Wakui et al., 2010)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Wakui H, Tamura K, Matsuda M, Bai Y, Dejima T, Shigenaga AI, Masuda S, Azuma K, Maeda A, Hirose T, Ishigami T, Toya Y, Yabana M, Minamisawa S, Umemura S. Intrarenal suppression of angiotensin II type 1 receptor binding molecule in angiotensin II-infused mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Nov; **299**(5):F991-1003. 査読有
- (2) Masuda S, Tamura K, Wakui H, Maeda A, Dejima T, Hirose T, Toyoda M, Azuma K, Ohsawa M, Kanaoka T, Yanagi M, Yoshida S, Mitsuhashi H, Matsuda M, Ishigami T, Toya Y, Suzuki D, Nagashima Y, Umemura S. Expression of angiotensin II type 1 receptor-interacting molecule in normal human kidney and IgA nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Oct; **299**(4):F720-31. 査読有
- (3) Cong W\*, Hirose T\*, Harita Y, Yamashita A, Mizuno K, Hirano H, Ohno S. (\*equally contributed). ASPP2 Regulates Epithelial Cell Polarity through the PAR Complex. *Curr Biol*. 2010; **20**(15):1408-1414. 査読有
- (4) Machida H, Ito S, Hirose T, Takeshita F, Oshiro H, Nakamura T, Mori M, Inayama Y, Yan K, Kobayashi N, Yokota S. Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Aug; **25**(8):530-537. 査読有
- (5) Hirose T, Satoh D, Kurihara H, Kusaka C, Hirose H, Akimoto K, Matsusaka T, Ichikawa I, Noda T, Ohno S. An essential role of the universal polarity protein, aPKC $\lambda$ , on the maintenance of podocyte slit diaphragms. *PLoS ONE*. 2009; **4**(1):e4194. 査読有
- (6) Takahama S, Hirose T, Ohno S. aPKC restricts the basolateral determinant PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> to the basal region. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Apr 4; **368**(2):249-55. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Cong W\*, Hirose T\*, Harita Y, Yamashita A, Mizuno K, Hirano H, Ohno S. (\*equally contributed). Apoptosis-Stimulating Protein of p53 (ASPP2) is involved in the PAR Complex

to Regulate Epithelial Cell Polarity. 第 62 回日本細胞生物学会大会、ポスター発表、大阪国際会議場、2010/5/19

- (2) Cong W, Hirose T, Yamashita A, Mizuno K, Harita Y, Kurata R, Hirano H, Ohno S. Apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) regulate epithelial cell polarity through interacting with PAR-3. 第 32 回日本分子生物学会年会、ワークショップ 4W2 (口頭発表)、横浜、2009/12/12
- (3) 廣瀬智威、佐藤大輔、栗原秀剛、日下智保、廣瀬博子、秋本和憲、松阪泰二、市川家國、伊藤秀一、野田哲生、大野茂男、腎糸球体ポドサイトの糸球体濾過膜維持の新しい分子機構：細胞極性制御系 aPKC-PAR 系の役割、第 52 回日本腎臓学会学術総会、一般演題：口演、横浜、2009/6/4
- (4) Hirose T, Satoh D, Kurihara H, Kusaka C, Hirose H, Akimoto K, Matsusaka T, Ichikawa I, Noda T, Ohno S. A New Mouse Model of Focal Segmental Glomerulosclerosis with Defective Cell Polarity in Podocytes. 第 2 回横浜市立大学・米国食品医薬品庁共催 国際学術ワークショップ、横浜、2009/3/4
- (5) 廣瀬智威、腎糸球体ポドサイトの糸球体濾過膜維持における新しい分子機構、お茶の水がん学アカデミア (招待講演)、東京、2009/2/23
- (6) 廣瀬智威、佐藤大輔、栗原秀剛、日下智保、廣瀬博子、秋本和憲、松阪泰二、市川家國、野田哲生、大野茂男、細胞極性制御蛋白質 aPKC $\lambda$  は、特殊な細胞間接着装置である腎糸球体ポドサイトの糸球体濾過膜の維持に必須の役割を担う、BMB2008—第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、シンポジウム (招待講演)、神戸、2008/12/9
- (7) 廣瀬智威、佐藤大輔、栗原秀剛、松阪泰二、秋本和憲、市川家國、野田哲生、大野茂男、A cell polarity protein, aPKC $\lambda$ , plays a critical role on the maintenance of podocyte slit diaphragm. The 7th International Podocyte Meeting、Toronto、2008/6/4 ~6

[その他]

- (1) 本研究成果に基づく発表論文のうち 2 報については、各専門誌の紹介記事で取り上げられて高く評価された。
  - ① McCarthy, N., Research Highlight—Cell Polarity: ASPP2 gets a polarity complex. *Nat Rev Cancer*, **10**:528.

(August 2010)

- ② Holzman, B. H. and Garg P., In This issue-Initial Insight on the Determinants of Podocyte Polarity. *J Am Soc Nephrol*, **20**: 683-685. (April 2009)

(2) 本研究成果の意義は社会的にも認められ、新聞紙上にて取り上げられた。

① 読売新聞 平成21年2月22日

② 科学新聞 平成21年1月23日

(3) 本研究成果は所属研究室ホームページにて適宜公開してきた。

① <http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~ohnos/news/News100708.html>

② <http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~ohnos/news/News090119.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 智威 (HIROSE TOMONORI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20381668

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：