

令和 6 年 4 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17257

研究課題名（和文）傷害糸球体のポドサイトに作用する血小板分子CLEC-2の効果

研究課題名（英文）Effects of the platelet CLEC-2 on podocytes of injured glomeruli

研究代表者

田中 景子（Tanaka, Keiko）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：80794370

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）：Podoplaninはポドサイトに強発現するが、その内因性結合分子である血小板CLEC-2の作用はこれまで不明であった。正常時、ポドサイトは血小板から隔絶されているが、基底膜傷害時に血小板CLEC-2がポドサイトに作用すると考えられた。リコンビナントCLEC-2を作製し、*in vitro*および*in vivo*実験を行った。CLEC-2は、ポドサイトに結合し介在蛋白ERMの脱リン酸化により、Podoplaninからアクチンを乖離させ、アクチン線維の分断・収縮を起こした。その結果ポドサイトは形態変化をおこし、遊走能を獲得すると判明した。またポドサイト傷害時に尿中血小板が検出されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、古くから知られていたポドサイトタンパク質Podoplaninの知られざる新たな機能を解明し、ポドサイトが糸球体濾過バリア破綻を伝えるCLEC-2のセンサーを備えているという事を明らかにした。このことは今後ポドサイト保全の新しい治療ターゲットにつながる可能性がある。また今まで顧みられなかった尿中血小板に、蛋白尿や血尿とは異なる新たな診断的価値を与える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Podoplanin (PDPN) is strongly expressed on podocyte cell membranes; the endogenous ligand for PDPN is CLEC-2 expressing on platelets. Podocytes are normally sequestered from CLEC-2, but when glomerular barrier is injured, podocytes gain access to CLEC-2. We tested the effect of CLEC-2 on podocytes *in vitro* and *in vivo*. Cultured podocytes treated with Fc-CLEC-2 showed that CLEC-2 induced dephosphorylation of ERM proteins. Treated podocytes also showed dissociation of F-actin filaments from PDPN, F-actin degradation, detachment, and round morphology. Normal mouse kidneys were perfused with FLAG-CLEC-2. CLEC-2 induced dephosphorylation of ERM and widening of foot processes of podocytes. Platelets were detected by immunostaining for CD41 in the urine of mice with podocyte injury. These findings suggest that when platelets leak from injured glomeruli, platelet-derived CLEC-2 may act on PDPNs on podocytes, causing morphological changes and detachment, further exacerbating podocyte injury.

研究分野：腎臓病学

キーワード：ポドサイト 血小板 CLEC-2 Podoplanin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含むほとんどの動物種のポドサイトは、細胞膜に極めて強く Podoplanin を発現するが、その機能は十分わかっていない。申請者等は、抗 Podoplanin 抗体をマウスに投与すると、Serpine1 mRNA の著増とポドサイト足突起の退縮が誘導されることを見出した。Podoplanin の内因性結合分子は、主に血小板に発現する C-type lectin like receptor-2 (CLEC-2) である。正常時、ポドサイトは糸球体基底膜により血小板から隔絶されているが、基底膜傷害時に血小板や血漿中の可溶性 CLEC-2 がポドサイトに作用することが考えられた。これらの背景のもとに、申請者等は、CLEC-2 は腎傷害時にポドサイトの Podoplanin に作用し、形態変化を起こさせ、傷害ポドサイトに影響を与えるという仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

本研究では、*in vitro* および *in vivo* で CLEC-2 が Podoplanin を介してポドサイトに与える影響を解明し、CLEC-2 の傷害ポドサイトへの影響を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

まず、*in vivo* および *in vitro* 実験に使用する CLEC-2 リコンビナントタンパクを多量作製した。予備実験で作製した可溶性 Fc-CLEC-2 タンパクは、サイズが大きく (約 60kDa) さらに多量体を形成するため、正常糸球体基底膜を通過できなかった。このため、小分子の Strep-FLAG タグ CLEC-2 (約 30kDa) の作製を準備した。

### (1) CLEC-2 の培養ポドサイトへの影響とその作用機序の解明

初代培養ポドサイトで検討した。培養ポドサイトに Fc-CLEC-2 (10 µg/mL) を添加し 1 時間後の細胞形態、アクチン線維の変化を観察し、また細胞接着能と遊走能を評価した。また、Podoplanin とアクチンを繋ぐ ERM タンパクのリン酸化状態やその分布変化を評価した。

### (2) CLEC-2 の *in vivo* ポドサイトへの影響

正常マウスに Strep-FLAG タグ CLEC-2 (5 µg/g 体重) を投与し、1 時間後に糸球体ポドサイトへの接着を確認した後、ポドサイトの RNA 発現と走査電顕像の変化を評価した。抗 Podoplanin 抗体を投与した時と同様に、ポドサイトで Serpine1 mRNA が著明に増加し、電顕像でポドサイトの足突起消失が観察されると予想した。

### (3) ポドサイト傷害と、尿中血小板もしくは尿中 CLEC-2 の相関関係

ポドサイト傷害モデルマウス (NEP25) において、傷害誘導後に尿中血小板が検出されることを免疫染色などで確認した。また、尿中 CLEC-2 は、ELISA (CLEC1B elisa kit, MyBioSource) での測定を予定した。血小板は赤血球より小サイズであるため、尿中血小板や尿中 CLEC-2 は尿潜血より軽微な傷害で検出され、ポドサイト傷害の程度をより早期に反映するマーカーになりうることを期待した。

## 4. 研究成果

### (1) CLEC-2 の培養ポドサイトへの影響とその作用機序の解明

培養ポドサイトも *in vivo* ポドサイトと同様に Podoplanin を強発現しており、Fc-CLEC-2 を添加すると、アクチン線維の分断を伴う細胞突起の退縮、細胞接着能の低下と運動能の亢進が認められた (図 1)。それに伴い、ERM 蛋白の脱リン酸化が Western blot で確認された。また培養ポドサイトでは Ezrin よりも、抗 Moesin 抗体による免疫染色で Moesin の局在が観察できたが、Fc-CLEC-2 刺激により Moesin が細胞突起周辺から細胞質全体に広がることを確認した。これらの結果から、Podoplanin が CLEC-2 に刺激されると、Podoplanin とアクチンを繋ぐ ERM 蛋白が脱リン酸化され、Podoplanin-ezrin-アクチン複合体

がそれぞれ乖離することにより、アクチンが脱重合し、ポドサイトが形態変化すると考えられた。

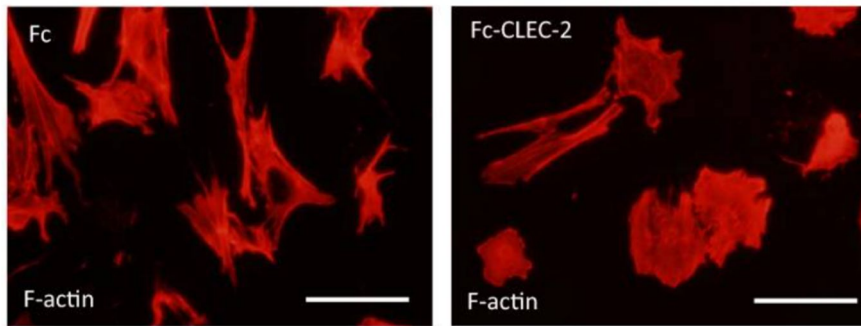


図1 . Keiko T, et al. Sci Rep. 2022 より引用

### (2) CLEC-2 の *in vivo* ポドサイトへの影響

正常マウスに Strep-FLAG タグ CLEC-2 を投与し 1 時間後に評価すると、抗 Podoplanin 抗体を投与した時と同様に、糸球体で Serpine1 mRNA が約 2.5 倍に増加し、電顕像でポドサイトの足突起退縮が観察された(図 2)。糸球体の pERM と Podocalyxin の二重染色では、リン酸化 ERM がポドサイトにおいて減少しており、糸球体 Lysate の Western Blot において ERM 蛋白の脱リン酸化が確認できた。以上の結果から、*in vivo* ポドサイトにおいても CLEC-2 の刺激により、ERM 蛋白の脱リン酸化と同時にポドサイトの形態変化がおこることを確認した。この *in vivo* ポドサイトの変化は *in vitro* ポドサイトの変化より軽度であり、生体内では血小板 CLEC-2 は多量体形成している可能性があること、また傷害ポドサイトでは、細胞骨格維持に関連する Podocalyxin や Nephtrin が先に発現低下し、ポドサイト傷害の進行に伴って Podoplanin の効果が発揮される可能性があると考えられた。

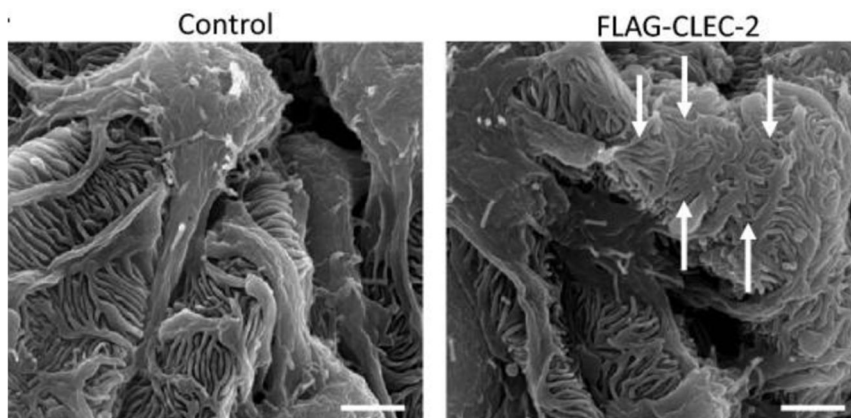


図2. Keiko T, et al. Sci Rep. 2022 より引用

### (3) ポドサイト傷害と、尿中血小板もしくは尿中 CLEC-2 の相関関係

ポドサイト傷害モデルマウス (NEP25) において、傷害誘導後に尿中赤血球とともに血小板が検出されることを、尿沈査の CD41 免疫染色で確認した。また正常マウスから回収した血小板を Dil で蛍光ラベルし、NEP25 マウスに投与すると、ポドサイト傷害時に Dil-血小板が尿中に漏出していることを確認した。これらは、腎傷害時にポドサイトと血小板が接触していることを裏付けている。また、ELISA キットで尿中 CLEC-2 測定をこころみたが、尿中 CLEC-2 を認識する特異度に欠けており測定不可能であった。市場では特異度の高い抗マウス CLEC-2 抗体が存在しない現状である。ポドサイト傷害度と尿中血小板の関係性を明らかにするため、今後別の血小板マーカーに注目し新たな研究テーマにつなげる予定である。今回得られた研究成果について論文発表した (Keiko T, et al. Sci Rep. 2022)。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamamoto Kazuyoshi, Okabe Masahiro, Tanaka Keiko, Yokoo Takashi, Pastan Ira, Araoka Toshikazu, Osafune Kenji, Udagawa Tomohiro, Koizumi Masahiro, Matsusaka Taiji	4. 巻 323
2. 論文標題 Podocytes are lost from glomeruli before completing apoptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F515 ~ F526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajprenal.00080.2022	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 Tanaka Keiko, Tanaka Masafumi, Watanabe Nobuo, Ito Masatoshi, Pastan Ira, Koizumi Masahiro, Matsusaka Taiji	4. 巻 12
2. 論文標題 C-type lectin-like receptor (CLEC)-2, the ligand of podoplanin, induces morphological changes in podocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-022-26456-9	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 Tanaka Keiko, Sugiyama Hitoshi, Morinaga Hiroshi, Kitagawa Masashi, Kano Yuzuki, Onishi Yasuhiro, Mise Koki, Tanabe Katsuyuki, Uchida Haruhito A., Wada Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 Serum sCD40L and IL-31 in Association with Early Phase of IgA Nephropathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2023 ~ 2023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm12052023	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Keiko Tanaka, Taiji Matsusaka
2. 発表標題 C-type lectin-like receptor (CLEC)-2, the ligand of podoplanin, induced dynamic change of F-actin filaments in podocytes
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Tanaka, Taiji Matsusaka
2. 発表標題 Dach1 is essential for maintaining normal podocytes.
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keiko Tanaka, Taiji Matsusaka
2. 発表標題 Dach1 is essential for maintaining normal podocytes.
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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