

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591032

研究課題名（和文）新規ポドサイト膜糖蛋白 Tpbg の機能解析および新規腎炎治療の探索

研究課題名（英文）Analysis for novel role of Tpbg in podocyte in glomerulonephritis.

研究代表者

松浦 元一 (MATSUURA MOTOKAZU)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：10403734

研究成果の概要（和文）：Trophoblast glycoprotein (Tpbg) は1型膜糖蛋白の一つである。培養分化ポドサイトでは stress fiber 形成が誘導され、Vinculin との細胞二重染色から、細胞骨格変化に伴い Tpbg が focal adhesion に局在してくることが観察された。常時活性型 RhoA によって Tpbg が focal adhesion へ集積し、ROCK 阻害剤により局在が抑制された。TGF- β は RhoA を介して stress fiber を形成するが、分化ポドサイトを TGF- β で刺激したところ、アクチン骨格のリモデリングが惹起されるとともに、Tpbg が focal adhesion へ集積した。Thy1 腎炎では、メサンギウム増殖性変化に一致して、障害ポドサイト特異的に Tpbg の発現が亢進した。これらの結果より、糸球体腎炎において Tpbg の障害ポドサイトにおけるアクチン骨格制御への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Trophoblast glycoprotein (Tpbg) is one of a single pass transmembrane glycoproteins. Differentiated podocytes expresses abundant stress fiber. Tpbg was colocalized with the focal adhesion (FA) protein, Vinculin, along with stress fiber formation by immunofluorescence. Tpbg localization at the FA was induced by dominant-active RhoA in undifferentiated podocyte, and suppressed by ROCK inhibitor. In addition, TGF- β enhanced Tpbg assembly at the FA in parallel with rearrangement of stress fibers. Tpbg was upregulated in injured podocytes in accordance with the mesangial proliferation of Thy1 GN. These results suggest that Tpbg is involved in phenotypic alteration of injured podocytes by modulating actin cytoskeleton in glomerulonephritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：糸球体腎炎・糖膜蛋白・ポドサイト・Tpbg

1. 研究開始当初の背景

本邦における末期腎不全による維持透析患者は約30万人にまで年々増加し続けて

おり、原因疾患としては糖尿病性腎症が40%を占めているが、慢性糸球体腎炎による腎不全も決して減少しておらず、進行抑制は重要

な課題である。糸球体腎炎において正常糸球体が無機能な硬化糸球体へと陥り、不可逆的に腎機能障害が進行していく過程では糸球体上皮細胞（ポドサイト）の機能障害が増悪因子となることが、近年知られるようになってきた。ところが、多くの糸球体腎炎はメサンギウム細胞に増殖性変化をきたした後、二次的にポドサイトに障害が及ぶと考えられているが、その機序はほとんどわかっていない。腎炎は適切な治療により治癒することもあるが、この障害が進行あるいは修復する機構の詳細もまた不明である。

2. 研究の目的

細胞骨格のリモデリングを制御する分子 **Trophoblast glycoprotein (Tpbg)** は、これまでの報告では、5T4 という細胞表面分子に対する抗体で認識される膜蛋白として知られており、着床時受精卵の細胞膜表面に発現するアクチン蛋白として報告されていた (*Br. J. Cancer* 1988;57:239)。その後様々な癌細胞や **ES** 細胞の分化に伴い発現が亢進することが明らかにされてきており、細胞接着や細胞遊走機能を制御する **EMT** における役割が知られてきた (*Cancer Res* 2007;67:23)。最近では免疫治療ターゲット分子として注目されている。ポドサイトでの **Tpbg** による細胞骨格リモデリングの機構およびポドサイト障害修復過程の分子機構を明らかにし、同分子のポドサイトでの発現調節による細胞治療の標的分子としての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) メサンギウム増殖性腎炎モデルにおける **Tpbg** 発現動態、局在の同定：ラットメサンギウム増殖性腎炎モデルである **Thy1** 腎炎ラットを作製し、糸球体メサンギウム細胞増殖・糸球体硬化病変を惹起させる。その過程での **Tpbg** の mRNA および蛋白レベルでの発現変化を、それぞれリアルタイム PCR、Western Blot により定量化し、*in vivo* での細胞内発現局在の同定を行う。

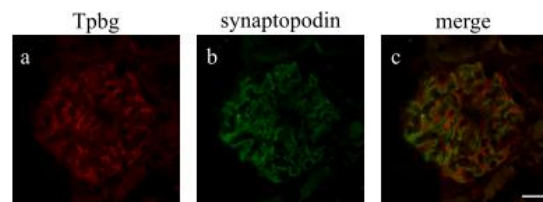
(2) **Tpbg** によるアクチン骨格リモデリング制御機構の解析、結合分子の同定：既に、培養ポドサイトでの **Tpbg** の発現は RT-PCR および Western Blot により、その局在は免疫細胞染色により確認できている。次に **TGF- β** や **ALK5** 阻害剤、**ROCK** 阻害剤投与による細胞骨格シグナル分子の活性化または抑制、また **RhoA** などの small GTPase の遺伝子導入によりポドサイト細胞骨格のリモデリングを誘導し **Tpbg** の細胞内動態を検討する。また遺伝子導入による **Tpbg** 過剰発現系または RNAi によるノックダウン系を組み合わせることで骨格リモデリングや接着・遊走などにおける **Tpbg** の機能解析を行う。

(3) ヒト腎炎組織を用いた **Tpbg** 発現解析：

本研究申請者の所属する病院で、インフォームドコンセントを取得して、これまでに腎生検を施行した患者のうち、糖尿病、腎硬化症や多発性嚢胞腎などの合併を除いた、糸球体腎炎のみのサンプルを抽出する。ヒト腎炎の組織サンプルを用いて HE 染色、PAS 染色および免疫蛍光染色などの手法により病理学的診断および重症度の評価を行う。それと同時に **Tpbg** の発現を免疫染色法により評価し、腎炎の種類や、腎機能や蛋白尿量などの臨床データ、さらには病理組織学的な重症度や進行度との相関を解析する。また、治療への反応性・予後との関連についても比較検討する。

4. 研究成果

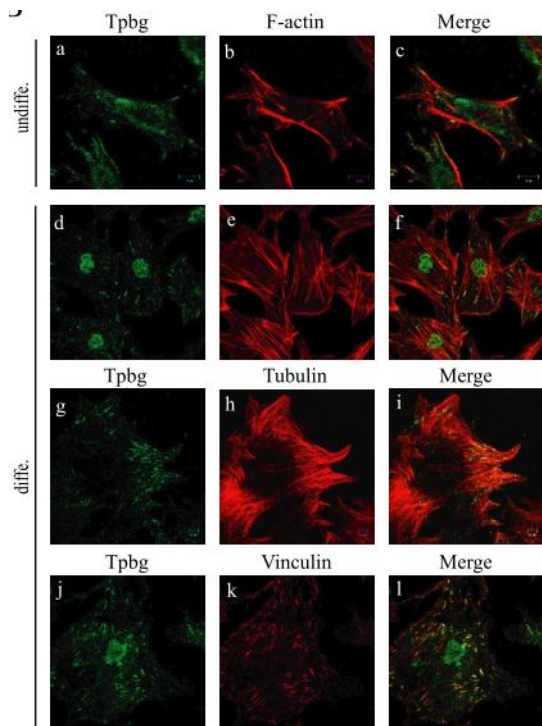
(1) **Trophoblast glycoprotein (Tpbg)** は胎生期 trophoblast や種々の癌細胞で発現する 1 型膜糖蛋白である。アクチン細胞骨格を制御し細胞の形態変化や遊走亢進などの形質変化に関与することが報告されている。糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 障害を考えるうえで、ポドサイトの極めて特異的な細胞形態・機能は注目に値するが、その特異性は細胞体から伸張する足突起と呼ばれる突起構造に



集約される。ポドサイトは足突起でのみ糸球体基底膜に接着し、また隣接ポドサイトの足突起との間にスリット膜と呼ばれる糸球体濾過障壁を形成する。さらに足突起内には豊富なアクチン線維を有しており、細胞間および基底膜間に発現する様々な膜蛋白を介して細胞外シグナルを細胞内アクチン線維に伝達している。つまり細胞外ストレスに対して足突起膜蛋白-アクチン細胞骨格シグナル経路を介した細胞応答が行われている。免疫学的手法により培養ポドサイトにおいて **Tpbg** がアクチン線維の基底膜接着装置に発現していることも明らかにした。また、**Tpbg** がラットのポドサイトに発現していることを見出した。そこで培養ポドサイトおよびラット腎炎モデル (**Thy1** 腎炎) を用いて、**Tpbg** のポドサイトにおけるアクチン骨格制御機能を解析した。

(2) 培養分化ポドサイトでは stress fiber 形成が誘導されてくる。Vinculin との細胞二重染色から、この骨格変化に伴い **Tpbg** が focal adhesion に局在してくることが観察された。さらに常時活性型 **RhoA** により **Tpbg** が focal adhesion へ集積し、**ROCK** 阻害剤により局在が抑制されることが示された。サイトカラシンでアクチン重合を阻害しても同様

の共局在が観察された。多くの細胞において TGF- β は RhoA を介して stress fiber を形成するが、培養ポドサイトにおける TGF- β の

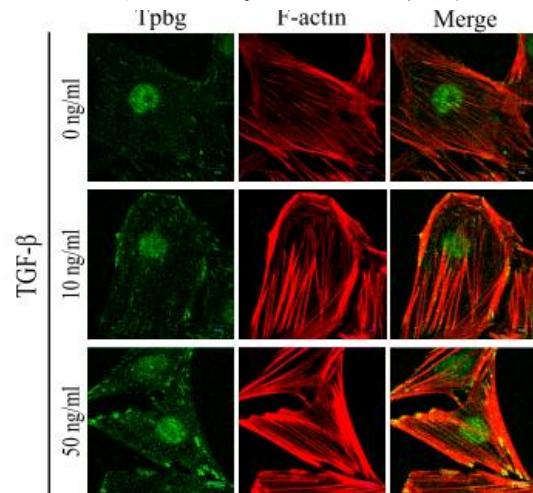


stress fiber への効果は明らかではない。そこで分化ポドサイトを TGF- β で刺激したところ、アクチン骨格のリモデリングが惹起されるとともに、Tpbg が focal adhesion へ集積してくることが観察された。この変化は ALK 5 (TGF- β 1 型受容体) 阻害剤で阻害された。以上の結果より培養ポドサイトでの TGF- β 、RhoA による stress fiber 制御に Tpbg が関与していることが示唆された。

(3) *in vivo* 解析として、Thy1 腎炎で Tpbg の発現動態を検討した。Thy1 腎炎では TGF- β 等の様々な増殖因子により糸球体細胞障害が惹起される。我々の系でもメサンギウム増殖性変化に一致してポドサイトが障害され、障害ポドサイト特異的に Tpbg の発現が亢進することが明らかになった。

(4) インフォームドコンセントを取得した腎炎患者の組織を用いた Tpbg 発現の解析を行った。これまでに腎生検を施行した患者のうち、糖尿病、腎硬化症や多発性嚢胞腎などの合併を除いた、糸球体腎炎のみのサンプルを用いた。従来の病理組織学的に硬化や癒着などポドサイトの障害が示唆される症例において、免疫組織学的に Tpbg の発現を観察すると、硬化の重症度に相関して、Tpbg の発現の増加が確認できた。しかしながら、すでに腎不全に進行した急速進行性糸球体腎炎などでは、逆に Tpbg の発現が低下しており、podocyte loss を呈するような進行した糸球体では、ポドサイトの数自体が減少しており、

その結果として、Tpbg の発現量が低下していたものと考えられた。したがって、腎炎による



るポドサイト障害とともに発現が誘導され、その発現の低下は腎予後が不良であることと連関があることが示唆された。

以上の結果より、糸球体腎炎において Tpbg が障害ポドサイトでのアクチン骨格制御に関与していることが示唆された。

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 2 件)

① Sox9 induces a chondrogenic phenotype of mesangial cells and contributes to advanced diabetic nephropathy. Kishi S, Abe H, Akiyama H, Tominaga T, Murakami T, Mima A, Nagai K, Kishi F, Matsuura M, Matsubara T, Iehara N, Ueda O, Fukushima N, Jishage KI, Doi T. J Biol Chem. 2011;286(37):32162-9、査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.244541

② Trophoblast glycoprotein: possible candidate mediating podocyte injuries in glomerulonephritis. Murakami T, Abe H, Nagai K, Tominaga T, Takamatsu N, Matsubara T, Araoka T, Kishi S, Takahashi T, Mima A, Takai Y, Kopp JB, Doi T. Am J Nephrol. 2010;32(6): 505-521.、査読有 DOI: 10.1159/000321366

[学会発表] (計 2 件)

① Trophoblast glycoprotein regulates the podocyte injuries in experimental glomerulonephritis.

Murakami T, Abe H, Nagai K, Tominaga T, Matsuura M, Kishi S, Kishi F, Yoshikawa K, Kondo N, Jeffrey Kopp, Doi T

World Congress of Nephrology 2011,
Vancouver, Canada, April 8-12, 2011.

② The Novel Function of Trophoblast
Glycoprotein (Tpbg) on Actin Remodeling in
Podocyte Injured in Experimental
Glomerulonephritis

Murakami T., Abe H, Matsuura M., Araoka T,
Kishi S, Tominaga T., Shigeta R, Yoshikawa K,
Kishi F, Takamatsu N, Takahashi T. Mima A,
Nagai K, Takai Y, Doi T

American Society of Nephrology (ASN)
Annual Meeting, Pennsylvania, U.S.A., Oct. 30,
2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 元一 (MATSUURA MOTOKAZU)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：1 0 4 0 3 7 3 4

(H21 研究分担者、H22、H23 研究代表者)

村上 太一 (MURAKAMI TAICHI)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：3 0 4 0 3 7 3 6

(H21、H22 研究代表者)

高橋 利和 (TAKAHASHI TOSHIKAZU)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：8 0 5 2 2 7 8 9

(H21 研究代表者)

(2) 研究分担者

富永 辰也 (TOMINAGA TATSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバ^イオサイエンス研究部・助
教

研究者番号：8 0 4 2 5 4 4 6