

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08235

研究課題名(和文)ポドサイトの形態形成と機能制御の基盤となる分子モーターの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular motors underlying morphogenesis and functional regulation of podocytes

研究代表者

上野 仁之 (Ueno, Hitoshi)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：30586251

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)：ポドサイトは腎臓の糸球体に存在し、血液の濾過機能を担っている。ポドサイトは一次突起から足突起を伸ばし隣合う細胞と突起を組み合いスリット膜を形成している。濾過機能にはその特殊な形態が重要である事が知られている。今回、特にポドサイトに多く発現が確認されたモータータンパクの局在を調べ、さらにその中でMyo10について機能解析を行った。Myo10はポドサイトの形成初期には発現が少なく、成熟期に多く発現しており、さらに過剰発現をするとポドサイトの細胞株で突起の伸長を複雑化が促されることが分かった。これらのことよりMyo10はポドサイトの形態形成や維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポドサイトはその特殊な形態が濾過機能に重要である事が知られている。ポドサイトは高血圧や高血糖などの過度なストレスに曝されると足突起は消失し、濾過機能を失う。さらにストレスが続くと糸球体より脱落してしまう。ポドサイトは高度に分化した細胞で増殖能が無いため残った細胞がその埋め合わせをすることになりさらに細胞にストレスがかかり悪循環に繋がる。そのためポドサイトの形態の形成と維持は腎臓の濾過機能を保つために非常に重要な機構である。本研究はMyo10が形態形成の促進を担っていることが分かり、慢性腎臓病の予防や回復の礎になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Podocytes, located in the glomeruli of the kidney, are essential for blood filtration. These cells extend foot processes from primary processes, interdigitating with neighboring cells to form a slit diaphragm, which is crucial for filtration. The unique morphology of podocytes is fundamental to their function. In this study, we investigated the localization of motor proteins highly expressed in podocytes and conducted a detailed functional analysis of Myo10. Myo10 exhibited low expression during the early stages of podocyte development but increased expression in mature podocytes. Overexpression of Myo10 resulted in promoted and complex processes in podocyte cell lines. These findings suggest that Myo10 plays a critical role in the morphogenesis and maintenance of podocytes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ポドサイト Myo10 myosin kinesin 足突起

### 1. 研究開始当初の背景

糸球体ポドサイトの障害は蛋白尿や糸球体硬化症を引き起こし、慢性腎不全 (CKD) の発症や末期腎不全への進展に深く関わる。ポドサイトは独特の形態を呈し、ボウマン嚢腔に飛び出した細胞体から太い一次突起が伸び出し、さらにそこから細い足突起が隣のポドサイトの足突起と組み合わさることで形成している。傷害刺激が加わると foot process effacement が起こり、血液濾過障壁能が低下し、蛋白尿が生じる。ポドサイトは高度に分化した細胞で、増殖・再生能を持たないため、糸球体からの脱落やアポトーシスによる喪失は CKD、糸球体硬化症の主な原因となる。このように、ポドサイトの形態を制御し保持することは、CKD の予防・治療という観点から重要である。

分子モーターは細胞骨格の上を滑走するタンパク質で、アクチン上を滑走するミオシンと、微小管上を滑走するキネシンとダイニンがある (Fig.1)。細胞骨格には方向性があり、そのため分子モーターは細胞極性に応じた輸送や形態形成などに重要な役割を果たす。キネシン・ダイニンのような微小管のモーター分子は細胞内物質輸送や細胞分裂に関係し、ミオシンは細胞運動や細胞の収縮能などに寄与する。

ポドサイトの細胞骨格として、足突起には中心部を長軸方向に走行するアクチン線維束と、それを取り囲むように膜直下に網目状に存在する cortical actin network がある。一次突起には微小管や中間径フィラメントが走行する。これらと連結する分子モーターのうち、ミオシンファミリーの MYH9 (non-muscle myosin IIA: Epstein 症候群の原因遺伝子、細胞収縮に働く) や Myo1e (細胞接着の補強に働く) の遺伝子異常により、ネフローゼ症候群や巣状糸球体硬化症を生じる (Kopp et al. Nat Genet. 2008; Mele et al. NEJM 2011)。PAN 腎症ラットで Dynein、Myo9 発現が増加する (Tojo et al. Med Mol Morphol 2017) といった報告があり、機能的重要性が示唆されるが、ポドサイトにおける分子モーターの全容や作用メカニズムについてはいまだ不明であった。

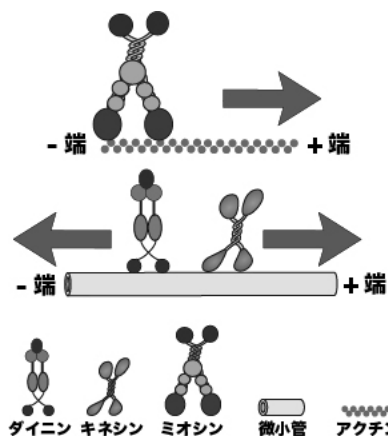


Fig.1 細胞骨格とモータータンパクの極性滑走

### 2. 研究の目的

本研究ではアクチンや微小管上を滑走する分子モーター、特にミオシンファミリーに着目し、CKD における足突起障害の分子メカニズムの解明と新規治療薬開発の礎を築くことである。本研究目的が達成されると、A) ポドサイトに発現するミオシン (Myo10 など) やキネシンの特定とその局在 (足突起先端、一次突起など) 機能 (突起伸長、アクチンを束ねる、細胞運動、物質輸送など) 制御機構が明らかとなり、足突起・一次突起障害からの回復、形態制御を促す薬剤の開発につながる。B) いまだ有効な治療法のない CKD の治療薬が開発されれば、透析を必要としない健康な長寿社会が期待される。

本研究は、大ファミリーをなすモータータンパク群のうち、ポドサイトに発現する分子の機能を解明し、モータータンパク質によってポドサイトの形態制御を目指す、という新しい試みであり、独自性に富んでいる。ポドサイトは非常に特殊な形態を有しており、その形態が濾過機能に直接関わっている細胞である。一次突起は微小管が多く、足突起はアクチンによって形成されており、その形態形成・維持にはそれぞれのモータータンパクの連携が重要であると考えられる。しかしその形態の形成機構を担うべき極性・形態形成に直接的に関わる分子については研究が非常に遅れており、アクチンの束を形成する Actinin-4 以外はほとんど調べられていない。今回特に注目している Myo10 は、足突起のように束になっているアクチン上を特異的に滑走し、さらに神経細胞の軸索や線維芽細胞の糸状突起の伸長を行っていることが報告されており、ポドサイトにおいても足突起の形成に関わっている可能性が考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糸球体ポドサイトに発現する分子モーターの同定

ポドサイトに発現する可能性のある候補分子 (Myo10, MYH9, Myo1c, Myo5C, KIF23, KIF24) について、生後 8 週のマウス腎臓の免疫組織染色を行い、発現と局在を解析した。

#### (2) 糸球体ポドサイトの成熟と損傷過程における Myo10 の発現変化の確認

Myo10 の機能を確認するために生後 0 日から生後 8 週目までのラットの腎臓を使い、Myo10 の発現の変化を確認した。また、損傷時の発現変化を見るために PAN 腎症ラットでの発現変化も確認した。

(3) ラットポドサイト細胞株 C7 内の Myo10 の局在確認

Myo10 の機能を調べるためにラットポドサイト細胞株 C7 を用い、細胞内での局在を確認した。C7 は通常 33 度 5%CO<sub>2</sub> の条件では分化しないが 37 度 5%CO<sub>2</sub> の条件下では分化し突起を伸長する。

(4) ラットポドサイト細胞株 C7 への Myo10 の過剰発現

Myo10 の機能解析のために mCherry-Myo10 とフォスファチジルイノシトールリン脂質と結合することが知られている PH domain を欠落させた mCherry-Myo10 $\Delta$ PH の過剰発現を行い、形態の変化を観察した。

(5) ラットポドサイト細胞株 C7 の突起伸長誘導における Myo10 の局在変化と発現量変化

ラットポドサイト細胞株 C7 は ROCK inhibitor Y-27632 と cAMP 分泌促進剤 Forskolin を添加する事で突起の伸長を促すことが出来る。突起の伸長促進による Myo10 の局在変化と発現量変化を確認した。

4. 研究成果

(1) 糸球体ポドサイトに発現する分子モーターの同定

今回、ポドサイトでの発現を調べるためにポドサイトのマーカーである anti-Nephrin との共染色を行った。Myo10, Myo1C, Myo5C, KIF23, KIE24 はいずれもポドサイトでの発現が確認された。いずれのモータータンパク質も細胞体に多く発現していたが KIF24 に関しては中心体と考えられるドット状の染色パターンを呈した。また、Myo10 は腎皮質にも多く発現が見られるものの糸球体ではポドサイトに多く発現していることが分かった (Fig.2)。Myo10 は神経軸索の伸長と維持、フィロポディアの伸長に関わっている事が知られており、ポドサイトでも突起の形成と維持に関わっている事が期待された。本研究はポドサイトの形態形成と維持を解析する研究のため、特に Myo10 に注目して研究を進めることにした。

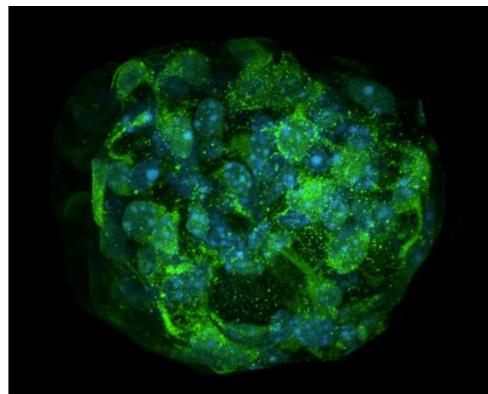


Fig.2 Myo10 の糸球体での発現 (MIP で 3D 再構成)

(2) 糸球体ポドサイトの成熟と損傷過程における Myo10 の発現変化の確認

生後 0 日齢、7 日齢及び 4 週齢、8 週齢の SD ラットの糸球体上皮細胞での Myo10 の発現確認した。0 日齢、7 日齢ではほとんど発現が見られず、畝状隆起や足突起が形成し成熟する 4 週齢、8 週齢では糸球体上皮細胞では Myo10 の発現上昇が見られる (Fig.3)。これは Myo10 が微小管を軸とした 1 次突起の形成にはほとんど関係せず、アクチンフィラメントを軸とした畝状隆起や足突起の形成に関わっている事を示唆している。B.SD ラット 8 週齢に生理食塩水 (control) 及び Puromycin aminonucleoside (PAN) 15mg/100g bw で腹腔内投与し、11 日後に固定後、染色。PAN 腎症ラットは体重の減少が見られ、Nephrin の発現量の減少が見られたが、糸球体上皮細胞における Myo10 の発現にはあまり変化は見られない。このことにより生後は足突起の存在と Myo10 の発現量は関連性がない事が分かり、Myo10 はポドサイト障害時に足突起の再生に寄与することが考えられた。

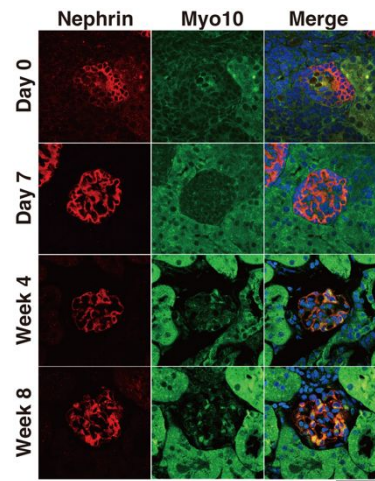


Fig.3 糸球体形成過程における Myo10 の発現変化

(3) ラットポドサイト細胞株 C7 内の Myo10 の局在確認

分化後 4 日目に固定し細胞内局在を確認した。C7 では Myo10 は主に細胞体に局在する。また突起の伸長端 (矢尻) 及び突起の分岐部 (矢印) に多く集積が見られた (Fig.4)。これらのことより Myo10 は突起の伸長や突起の分枝に関わることが示唆された。

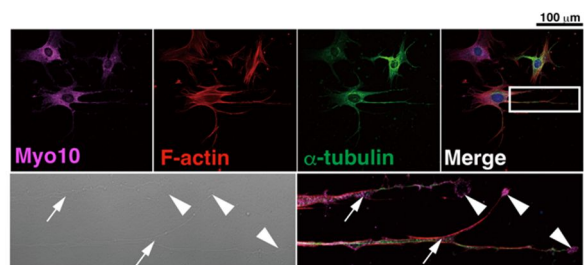


Fig.4 糸球体上皮細胞株 C7 における Myo10 の局在

(4) ラットポドサイト細胞株 C7 への Myo10 の過剰発現

Myo10 の野生型と 3 つの PH domain が欠落した配列の N 末に mCherry が連結し行い、C7 への過剰発現を確認した。まずウエスタンブロットにより Anti-Myo10 で各コンストラクトの発現確認を行った。Myo10 の過剰発現による分子局在の確認と表現型の解析を行った。Myo10WT の過剰発現により樹状様の突起を形成した。この形態変化は GFP, Myo10 $\Delta$ PH, MYH9 の過剰発現では観察されなかった (Fig.5)。Myo10DPH は短い糸状突起 (フィロポディア) の先端に集まっており局在は正常ではあるが突起の伸長能や分枝能が失われていることが示唆された。これらにより Myo10 はポドサイトにおいて突起の伸長と複雑化を促進していることが考えられた。また、遺伝子未導入の細胞株でも Myo10 の発現が確認出来た事を考えると Myo10 の発現量の増加が突起伸長と複雑化の引き金になっていることが考えられた。

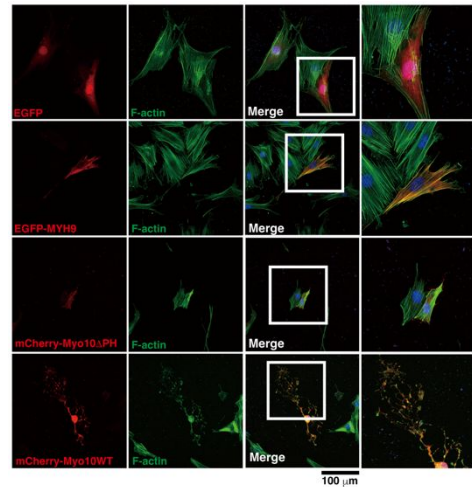


Fig.5 系球体上皮細胞株 C7 における Myo10 の過剰発現

(5) ラットポドサイト細胞株 C7 の突起伸長誘導における Myo10 の局在変化と発現量変化

分化誘導 4 日後に ROCK inhibitor Y27632 及び Forskolin を用い、Podocyte 細胞株 C7 の突起伸長を促した。突起伸長を促された細胞株では側枝を出した突起を複数伸ばした。突起伸長が促進された細胞ではストレスファイバーが消失するが、Rock Inhibitor だけでは突起は複雑に側枝を伸ばさないことが分かった (Fig.6)。Forskolin は cAMP を活性化し、微小管に影響を与えることが知られている。突起伸長が誘導された細胞では Myo10 のシグナルが増えていることが分かる。分化誘導 4 日後に ROCK inhibitor Y27632 及び Forskolin を用い突起の伸長を促進した 1 日後に細胞骨格の観察を行った。突起の形成が盛んな細胞ではストレスファイバーは消え、チュープリンの発現が増えて束状の微小管の形成が行われ、一次突起の伸長が促進されている。

ウエスタンブロットを行い関連分子の発現量を調べた。Forskolin を添加する事で Myo10 と  $\alpha$ -Tubulin の発現量が増えていることが分かった。一方で Y27632 や Forskolin の添加によって actin の発現量に影響は無かった。

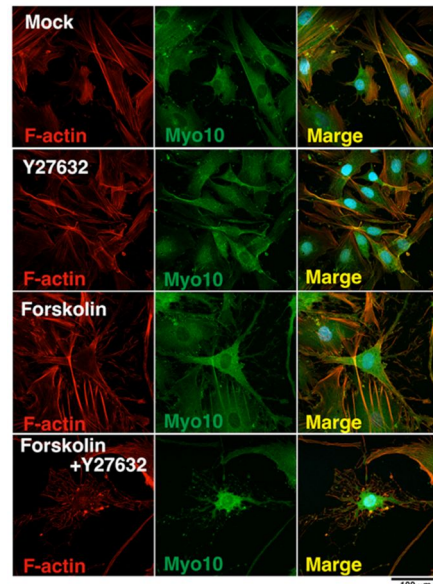


Fig.6 系球体上皮細胞株 C7 の突起伸長促進による細胞骨格と Myo10 の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野仁之、長瀬美樹
2. 発表標題 腎系球体上皮細胞の足突起形成におけるMyo10の機能解析
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 上野仁之、長瀬美樹
2. 発表標題 腎系球体上皮細胞におけるMyo10の機能解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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
研究分担者	長瀬 美樹  (Nagase Miki)  (60302733)	杏林大学・医学部・教授    (32610)	

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