

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 25 年 8 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390204

研究課題名(和文) シグナル伝達解析およびプロテオーム解析によるネフローゼ症候群発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification of the pathogenesis of nephrotic syndrome by analyses of signal transduction and proteome

研究代表者 五十嵐 隆 (Igarashi Takashi)

独立行政法人国立成育医療研究センター・総長

研究者番号：70151256

研究成果の概要(和文)：

腎糸球体の上皮細胞接着装置であるスリット膜は尿を産生する際の濾過バリアーとして働く。小児ネフローゼ症候群に対しての特異的治療の確立を目指し、スリット膜構成分子に着目し、ネフローゼ症候群発症機序についての分子レベルでの解析を行った。その結果、(I)スリット膜の膜発現を制御するダイナミクスの重要性、(II)スリット膜の新たな構成分子とその機能、(III)スリット膜シグナルにおけるカルシウムシグナルの分子メカニズムの重要性、(IV)ネフローゼ症候群発症におけるスリット膜および糸球体上皮細胞機能分子の変化、を明らかにした。本研究の成果は特発性あるいは遺伝性のネフローゼ症候群の発症機序解明の端緒となる。

研究成果の概要(英文)：

Slit diaphragm, an intercellular junction between renal glomerular epithelial cells (podocytes), is essential for the permselectivity in glomerular ultrafiltration. To establish specific therapy for pediatric nephrotic syndrome, we focused on the structure and function of slit diaphragm (SD) and investigated the pathogenic mechanism of proteinuria and nephrotic syndrome. We revealed (I) the importance of dynamics of slit diaphragm turnover in the maintenance of slit diaphragm, (II) the novel component of slit diaphragm, (III) the mechanism of intracellular calcium concentration by slit diaphragm signaling, and (IV) the changes of expression of functional proteins in podocytes of nephrotic patients. Our data provide new molecular insights into the formation and maintenance of SD and its dysfunction in hereditary and idiopathic nephrotic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器学

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体の濾過障壁はスリット膜とよばれる糸球体上皮細胞間の接着構造により形成される。Nephrin や Neph1 などの膜蛋白からなるスリット膜構造は限外濾過のサイズバリアーとして機能する。また、球体上皮細胞の形態、分化、生存などの機能を制御するシグナル複合体として機能している。なかでも Src ファミリーチロシンキナーゼ (SFK) が大きな役割を果たし、その際に Nephrin, Neph1 が SFK の基質となる。

2. 研究の目的

ネフローゼ症候群の特異的な治療標的とするには Nephrin を中心とするスリット膜におけるシグナル伝達の解明が重要と考え、以下の検討を行った。(I) プロテオミクスによる網羅的解析を含めたスリット膜ダイナミクスの検討、(II) Nephrin のリン酸化制御メカニズムの検討、(III) Nephrin リン酸化シグナルの下流の Ca^{2+} シグナルのメカニズムの解明、(IV) 糸球体上皮細胞の変化がネフローゼ症候群と関連するについての検討。

3. 研究の方法

(I) プロテオミクスによる網羅的解析を含めたスリット膜ダイナミクスの検討

糸球体を単離し、その膜表面に発現している蛋白をプロテオミクス技術を用いて新規の上皮細胞膜蛋白質の同定を試みた。

(II) Nephrin のリン酸化制御メカニズムの検討

Nephrin がスリット膜構成因子と複合体を形成するかどうか免疫沈降を用いて解析した。その結果 Nephrin が SIRP α と結合することを見だし、その結合が

Nephrin のリン酸化に影響を与えるかを培養細胞の共発現系を用いて解析した。また SIRP α の発達腎における発現および先天性ネフローゼ症候群を含む小児疾患での発現を解析し、その役割を検討した。

(III) スリット膜リン酸化シグナルの下流の Ca^{2+} シグナルのメカニズムの解明

Nephrin のリン酸化と関連し、TRPC6 (家族性巣状糸球体硬化症の原因の一つ) がリン酸化を介して Nephrin と結合することを見いだした。その結合様式の詳細を変異体を用いて明らかにした。また TRPC6 の膜発現制御とそれによる Ca^{2+} シグナルの制御にリン酸化と Nephrin との結合がどのように関与しているかについて蛋白定量および細胞内 Ca^{2+} 濃度測定により解析した。

(IV) ネフローゼ症候群患者における糸球体上皮細胞の変化の解析

先天性ネフローゼ症候群および後天性巣状糸球体硬化症などの糸球体疾患患者の腎組織を用いて糸球体上皮細胞機能分子の発現パターンの変化を免疫染色にて解析した。

4. 研究成果

(I) プロテオミクスによる網羅的解析を含めたスリット膜ダイナミクスの検討

スリット膜蛋白質がエンドサイトーシスとエクソサイトーシスにおいて速い速度でターンオーバーしていることを明らかにした。糸球体上皮細胞の接着装置であるスリット膜の形成において細胞極性制御因子 PAR-aPKC システムが重要である。PAR-aPKC システムを抑制する実験により、PAR-aPKC の活性がスリット膜蛋白質の膜発現を制御し、スリット膜蛋白質のエクソサイトーシスに関わることを明らかにした。

糸球体上皮細胞特異的 aPKC ノックアウトマウスを用い、その糸球体において PAR3 や aPKC の発現、Nephrin の発現を免疫染色および免疫電顕で評価した。このノックアウトマウスは生直後より蛋白尿を呈する。染色および生体内で膜表面ラベルしたサンプルの解析により、このマウスでは Nephrin の発現が細胞膜から乖離し、細胞質内にとどまっております。in vivo においても aPKC の機能不全がスリット膜複合体の膜輸送を阻害し、蛋白尿を来す事を示唆する。スリット膜構造を維持し、蛋白尿発症を防ぐために aPKC 活性化が必要なことを明らかにした(現在投稿中)。

(II) Nephrin のリン酸化制御メカニズムの検討

(i)先天性ネフローゼ症候群における SIRPα の発現

ヒト腫瘍隣接部位の健常腎、IgA 腎症、Alport 症候群小児例、及び先天性ネフローゼ症候群患者における SIRPα の発現を解析した。ヒト腫瘍隣接部位の健常腎、IgA 腎症、Alport 症候群においては SIRPα の発現は足突起のパターンを示し Nephrin と共局在した。一方で CNS 2 症例では Podocin は ZO-1 と共局在し両者の発現は比較的保たれていたが、Nephrin は確認できず、SIRPα は著明に低下し、Neph1 も対照群と比し減少していた。このことから、SIRPα と Nephrin の発現は Nephrin の発現に依存することが明らかになり、CNS 発症においてスリット膜複合体形成不全が存在することが明らかになった。

(ii)SIRPα は Nephrin と複合体を形成する

SIRPα は podocin, TRPC6, Nephrin とは結合がなかったが、Nephrin と細胞内で結合することが明らかになった。またその結合の機能として、SIRPα を共発現した際に Nephrin のリン酸化が減弱することも見いだし、SIRPα は Nephrin リン酸化に対して

負に働くことが示唆された。

SIRPα は Nephrin などのスリット膜複合体と密接な関わりを持ち、Nephrin のリン酸化の修飾に関与する可能性が示された。(Kajihō Y, et al. FEBS J. 2012; 279:3010-21)

(III) スリット膜リン酸化シグナルの下流の Ca²⁺シグナルのメカニズムの解明

(i)TRPC6 活性化機構の解明

TRPC6 が Src ファミリーチロシンキナーゼによるリン酸化を受け、細胞内領域の Y284 のリン酸化が細胞膜の活性化に必須であることを明らかにした。

プロテオミクス解析により TRPC6 Y284 に特異的に結合する蛋白質として PLC-γ1 を同定した。さらに、PLC-γ1 のリン酸化 TRPC6 への結合がその膜移行に必要であることが示唆された。

(ii)TRPC6 のチャネルを制御する Nephrin

TRPC6 はスリット膜の構成成分であることから、TRPC6 のリン酸化とスリット膜との関わりについて検討し、スリット膜主要構成成分である Nephrin がリン酸化 TRPC6 と特異的に結合することを明らかにした。またこの結合に必要な Nephrin の細胞内領域のアミノ酸を同定した。

PLC-γ1 と Nephrin が TRPC6 の同じチロシン残基(Y284)に競合的に結合し、Nephrin が TRPC6-PLC-γ1 結合を阻害することで TRPC6 の膜移行を抑制するメカニズムが明らかになった。

(iii)TRPC6 チャネル活性を抑制する Nephrin Peptide の開発

TRPC6 との結合部位の Nephrin 細胞内領域のペプチドが Nephrin と同様に TRPC6 を抑制的に制御する可能性を検証した。

TRPC6 との結合部位からなる Nephrin ペプチドとそれに加えその前後の複数のペプチド、および結合部位の逆配列のペプチドを

細胞内に導入し、TRPC6 の膜移行への影響を解析した。その結果 2 種類のペプチドにおいて TRPC6 の膜移行が抑制された。

(iv)FSGS 患者の TRPC6 変異の活性化メカニズム

FSGS で報告されているいくつかの TRPC6 変異(P112Q、R895C、E897K)ではチャネル活性が増大するが、活性の変わらない変異(N143S、S270T、K874X)も存在する。PLC- γ 1 と Nephtrin による TRPC6 の制御機構の解明により、FSGS を起こす TRPC6 変異は特異的な制御機構に障害が生じた結果 TRPC6 の過剰な活性化を生じることを明らかにした。(Kanda S, et al. *Mol Biol Cell* 22:1824-351, 2011, Hattori S, et al. *J Signal Transduct* 2011:31785, 2011)

(IV) ネフローゼ症候群患者における糸球体上皮細胞の変化の解析

MYH9 の変異による Epstein-Fechtner 症候群の腎病変を解析し、糸球体上皮細胞の形態変化が著しいことを見いだした(Sekine T, et al. *Kidney Int* 78: 207-214, 2010)。これは糸球体上皮細胞における MYH9 が特異的な細胞形態の形成・維持に重要な役割を果たすことを示唆する。そこで腎形成時と各種ネフローゼ症候群患者の腎組織における MYH9 を含む糸球体上皮細胞関連蛋白の発現を検討した。

腎移植ドナー腎(健常腎)、微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症患者における糸球体上皮細胞機能分子の発現(Nephtrin, Neph1, synaptopodin, podocin, ZO-1, Glepp1, MYH9)を蛍光染色で評価した。このうち MYH9 を除く分子においてはいずれも明らかな染色像の変化を認めなかった。しかし巣状糸球体硬化症および一部の微小変化型ネフローゼ症候群患者において MYH9 の染色パターンが著しく低下していた。

MYH9 の発現をラットのネフローゼ症候

群モデル(PAN 腎症)を用いて解析した。ネフローゼの病態を示す 11 日目に糸球体上皮細胞の MYH9 の発現が著明に低下していた。

以上より、MYH9 発現変化が糸球体硬化症発症と緊密な関連があることが示唆された。(現在投稿中)

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 68 件 : 英文論文のみを示す)

Zhang Y, Yoshida Y, Nameta M, Xu B, Taguchi I, Ikeda T, Fujinaka H, Mohamed SM, Tsukaguchi H, Harita Y, Yaoita E, Yamamoto T: Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 25:1785-95, 2010

Sekine T, Konno M, Sasaki S, Moritani S, Miura T, Wong WS, Nishio H, Nishiguchi T, Yoshinari M, Tsuchiya S, Matsuyama T, Kanegane H, Ida K, Miura K, Harita Y, Igarashi T, Hattori M, Horita S, Saito H, Kunishima S: Renal manifestations, progression and pathological findings in patients with R702 mutations in MYH9. *Kidney Int*. 8:207-14, 2010

Cong W, Hirose T, Harita Y, Yamashita A, Mizuno K, Hirano H, Ohno S: ASPP2 regulates epithelial cell polarity through the PAR complex. *Curr Biol*. 20:1408-14, 2010

Kurihara H, Harita Y, Ichimura K, Hattori S, Sakai T: SIRP- α -CD47 system functions as an intercellular signal in the renal glomerulus. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F517-27, 2010

Morita T, Ashida A, Fujieda A, Hayashi A, Meda A, Ohta K, Shimizu M, Sekine T, Igarashi T, Tamai H, Wakiguchi H: Four cases of postrenal renal failure induced by renal stone associated

with rotavirus infection. Clin Nephrol 73: 398-402, 2010

Mizuno Y, Tsuchida S, Kakiuchi S, Ishiguro A, Goishi K, Kamei Y, Kanamori Y, Yamazaki Y, Sekine T, Igarashi T: Case report: Prenatal intervention for severe anterior urethral valve. Pediatr Inter 52: e92-e95, 2010

Sekine T, Konno M, Sasaki S, Moritani S, Miura T, Wong WS, Nishio H, Nishiguchi T, Ohuchi MY, Tsuchiya S, Matsuyama T, Kanegane H, Ida K, Miura K, Harita Y, Hattori M, Horita S, Igarashi T, Saito H, Kunishima S: Patients with Epstein-Fechtner syndrome owing to *MYH9* R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease. Kidney Int 78: 207-214, 2010

Ishiguro A, Sekine T, Kakiuchi S, Nishimura R, Goishi K, Tsuchida S, Ohtsu H, Igarashi T: Skin and subcutaneous blood flows of very low birth weight infants during the first 3 postnatal days. J Matern Fetal Neonatal Med 23: 522-528, 2010

Mizuno Y, Tsuchida S, Kakiuchi S, Ishiguro A, Goishi K, Kamei Y, Kanamori Y, Yamazaki Y, Sekine T, Igarashi T: Case report: Prenatal intervention for severe anterior urethral valve. Pediatr Inter 52: e92-e95, 2010

Morita T, Ashida A, Fujieda M, Hayash A, Maeda A, Ohta K, Shimizu M, Sekine T, Igarashi T, Tamai H, Wakiguchi H: Four cases of postrenal renal failure induced by renal stone associated with rotavirus infection. Clinical Nephrol 73:398-402, 2010

Sekine T, Konno M, Sasaki S, Moritani S, Miura T, Wong WS, Nishio H, Nishiguchi T, Ohuchi MY, Tsuchiya S, Matsuyama T, Kanegane H, Ida K, Miura K, Harita Y, Hattori M, Horita S, Igarashi T, Saito H, Kunishima S: Patients with Epstein-Fechtner syndromes owing to *MYH9* R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease. Kidney Int 78: 207-214, 2010

Suzuki M, Paesschen WV, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, Legius E, Riant F, Jonghe PD, Li Y, Sekine T, Igarashi T, Fujimoto I, Mikoshiha K, Shimadzu M, Shohara M, Braverman N, Al-Gazali L, Fujita T, Seki J: Defective membrane expression of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. Pnas 107: 15963-15968, 2010

Tasaki S, Nagasaki M, Kozuka-Hata H, Semba K, Gotoh N, Hattori S, Inoue J, Yamamoto T, Miyano S, Sugano S, Oyama M: Phosphoproteomics-based modeling defines the regulatory mechanism underlying aberrant EGFR signaling. PLoS One 5:e13926, 2010

Hattori S, Kanda S, Harita Y: Tyrosine kinase signaling in kidney glomerular podocytes. J Signal Transduct 2011:31785, 2011

Kanda S, Harita Y, Shibagaki Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, Hattori S: Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC- γ 1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. Mol Biol Cell 22:1824-351, 2011

Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, Motoki T, Akaike M, Nishio C, Higashida M, Mikasa H, Nakaya Y, Takanashi S, Igarashi T, Kitagawa T, Sata M: Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. J Am Coll Cardiol 58: 248-255, 2011

Hirata Y, Soekia T, Yamadaa H, Shiotac A, Shimabukuroc M, Sakaid Y, Nakayamae M, Matsumotoe K, Igarashi T, Sata M: A synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301, ameliorates ventricular remodeling after acute myocardial

infarction via upregulation of HGF in rat. *Biomedicine & Aging Pathology* 1: 90-96, 2011

Ikeda H, Shiojima I, Oka T, Yoshida M, Maemura K, Walsh K, Igarashi T, Komuro I: Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol* 31: 1054-1065, 2011

Mizuno Y, Takahashi K, Igarashi T, Saito M, Mizuguchi M: Congenital infection-like syndrome with intracranial calcification. *Brain & Develop* 33: 530-533, 2011

Nakamura Y, Awa S, Kato H, Ito YM, Kamiya A, Igarashi T: Model combining hydrodynamics and fractal theory for analysis of in vivo peripheral pulmonary and systemic resistance of shunt cardiac defects. *J Theoret Biology* 287: 64-73, 2011

Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia* 25: 1-3, 2011

Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia* 25: 382-384, 2011

Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T: Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain & Develop* 33: 353-356, 2011

Takita J, Chen Y, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: Aberrations of NEGR1 on 1p31 and

MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Science* 102: 1645-1650, 2011

Shirakabe K, Hattori S, Seiki M, Koyasu S, Okada Y: VIP36 protein is a target of ectodomain shedding and regulates phagocytosis in macrophage Raw 264.7 cells. *J Biol Chem* 286: 43154-43163, 2011

Katsumata Y, Kawaguchi Y, Baba S, Hattori S, Tahara K, Ito K, Iwasaki T, Yamaguchi N, Oyama M, Kozuka-Hata H, Hattori H, Nagata K, Yamanaka H, Hara M: Identification of three new autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus using two proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics*, 10: M110.005330, 2011

[学会発表] (計 35 件)

[図書] (計 2 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: ポリペプチド

発明者: 神田祥一郎、張田豊、服部成介、五十嵐隆、井上貴文

権利者: 国立大学法人東京大学, 学校法人北里研究所, 学校法人早稲田大学

種類: 特願

番号: 2010-174155

取得年月日: 2010/08/03

国内外の別: 国内

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 隆 (IGARASHI TAKASHI)

(独) 国立成育医療研究センター・総長

研究者番号: 70151256

(2) 研究分担者

服部 成介 (HATTORI SEISUKE)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号: 50143508

張田 豊 (HARITA YUTAKA)

東京大学・医学部付属病院・講師

研究者番号: 10451866