

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 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790991

研究課題名（和文） 蛋白尿制御機構としての糸球体上皮細胞極性制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Analysis of the maintenance mechanism of slit diaphragm, essential structure for glomerular filtration in kidney

研究代表者 張田 豊 (HARITA YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10451866

研究成果の概要（和文）：

糸球体上皮細胞の接着装置であるスリット膜の構造、およびその下流のシグナル伝達系に対して PAR-aPKC システムがどのような役割を持つのかについて検討した。その結果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を非常に早いスピードで行っていること、また PAR-aPKC の活性がスリット膜蛋白質の膜発現を制御し、特に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。この成果はスリット膜を形成、維持するメカニズムの一端を明らかにするものである。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed how the Par-aPKC polarity complex is involved in the maintenance of slit diaphragm structure, the intercellular junctional complex responsible for the glomerular filtration barrier, and in the downstream signaling pathway. We found that slit diaphragm components are rapidly endocytosed and exocytosed and PAR-aPKC regulates exocytosis of Nephtrin. This result unravels the mechanism of formation and maintenance of slit diaphragm, which is necessary for the prevention of proteinuria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：

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

1. 研究開始当初の背景
 上皮細胞では接着構造を境に頂端面側と基

底膜側に膜構造が分けられており、その極性を PAR-aPKC 複合体と呼ばれる分子群

が制御している。また最近複数のグループが糸球体上皮細胞の極性の異常が蛋白尿を来すことを相次いで報告した。とくに aPKC を糸球体上皮細胞特異的にノックアウトさせたマウスでは蛋白尿が出現し、さらには糸球体硬化病変を来すことから、この細胞において PAR-aPKC 系が蛋白尿の抑制には必須であることも判明した。

2. 研究の目的

蛋白尿およびネフローゼ症候群の発症機序の解明を目的として、PAR-aPKC システムがもつ糸球体上皮細胞の形態維持メカニズムを *in vitro* および *in vivo* での総合的な検討を行う。

aPAR-aPKC 複合体はスリット膜と結合することが報告されているため、スリット膜の構造とその機能に対して PAR-aPKC システムがどのような役割を持つのかについて検討を行う。

3. 研究の方法

糸球体上皮細胞の極性制御の破綻と、それらが蛋白尿／ネフローゼ症候群発症という臨床像に関与する機序を調べるため、生化学的、分子生物学的、さらに腎臓病学的領域を横断的にカバーする研究を行った。おもに PAR3-aPKC 複合体によるスリット膜複合体シグナルの制御機構の解析を行い、新たに明らかになったスリット膜維持メカニズムが蛋白尿発症と関連する下についてノックアウトマウスを用いた *in vivo* における検証を行った。

4. 研究成果

糸球体上皮細胞の接着装置であるスリット膜の構造、およびその下流のシグナル伝達系に対して PAR-aPKC システムがどの

ような役割を持つのかについて検討した。まず単離糸球体を用いた実験により、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を非常に早いスピードで行っており、ターンオーバーしていることを突き止めた。この系に 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、特に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。この成果はスリット膜を形成、維持するメカニズムの一端を明らかにするものである。

また aPKC がスリット膜の維持に深く関わることが明らかになったことから、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大量の蛋白尿を来す。染色および生体内で膜表面ラベルしたサンプルを用いた解析により、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いおり、*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 活性が必要なことが明らかになった。現在蛋白尿発症時の aPKC 活性の変化について解析を進めており、今回明らかになったメカニズムがネフローゼ患者における病態発生とどのように関係しているのかについて更なる検討を行う。

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 11 件)

1. Hattori S, Kanda S, Harita Y: Tyrosine kinase signaling in kidney glomerular podocytes. *J Signal Transduct.* 2011;31785, 2011
 2. 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(11):1824-351, 2011
 3. Kurihara H, Harita Y, Ichimura K, Hattori S, Sakai T. SIRP-alpha-CD47 system functions as an intercellular signal in the renal glomerulus. *Am J Physiol Renal Physiol.* Sep;299(3):F517-27, 2010
 4. 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(15):1408-14, 2010
 5. Sekine T, Konno M, Sasaki S, Moritani Sm 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.* 2010 Jul;78(2):207-14, 2010
 6. 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(6):1785-95, 2010
 7. 張田豊:「上皮細胞極性が制御する糸球体濾過バリアー」*Annual Review腎臓*, 113-118, 2012
 8. 神田祥一郎、張田豊: Ca^{2+} シグナル異常によるPodocyte傷害メカニズム—新たな蛋白尿治療の開発に向けて—。日本小児腎臓病学会雑誌 24(2): 13-23, 2011
 9. 張田豊:「ネフローゼ症候群」小児科レビュー、48-51, 2010
 10. 張田豊:「蛋白尿はなぜ出るのか」小児科臨床ピクシス、123-128, 2010
 11. 張田豊:「プロテオミクスによる腎組織タンパク質解析—糸球体上皮細胞スリット膜リン酸化シグナル解析を例に—」*日本腎臓学会誌* 52 (4): 470-474, 2010
- [学会発表] (計 13件)
1. 張田豊: 蛋白尿-ポドサイトロジーが迫るその本質 - 第17回 Rokko Nephrology Research Forum、神戸、2011, 10月11日
 2. 張田豊: 蛋白尿の分子メカニズム. 第11回静岡小児腎臓病学術講演会、焼津、2011年7月16日
 3. 張田豊: プロテオミクス: スリット膜リン酸化シグナルの解析. 第33回腎臓セミナー、東京、2011年8月11日
 4. 佐藤大輔、張田豊、大門主税、栗原秀剛、廣瀬智威、大野茂男: 限外濾過膜としてのスリット膜のターンオーバーのメカニズム. 第100回東京腎生理集談会、東京、2011年9月10日

5. 佐藤大輔、張田豊、大門主税、栗原秀剛、廣瀬智威、大野茂男：スリット膜のターンオーバー制御を担う分子機構の解明：aPKC-Par複合体を介したnephrinの細胞膜局在変化. 第54回日本腎臓学会学術集会、横浜、2011年6月15-17日
6. Sato D, Harita Y, Daimon C, Kurihara H, Hirose T, Ohno S: Molecular mechanism regulating the turnover of nephrin: The role of cell polarity regulator, aPKC-PAR complex. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, June 2-4, 2011
7. Kanda S, Harita Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, Hattori S. Development of TRPC6 inhibitor –antagonistic role of Nephrin peptide on TRPC6 activation- The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, June 2-4, 2011
8. Kanda S, Harita Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, Hattori S. Toward the practical use of Nephrin peptides as a TRPC6 inhibitor. American Society of Nephrology. Philadelphia, USA, Nov 8-13, 2011.
9. Harita Y, Podocyte Signal Transduction. Congress of International Pediatric Nephrology Association. New York, USA, Aug 31, 2010
10. Harita Y, Kanda S, Sekine T, et al. Phosphorylation-mediated signaling in glomerular podocyte and its implication in the pathogenesis of proteinuria. Pediatric Academic Societies Annual Meeting. Vancouver, Canada, May 2, 2010
11. Kanda S, Harita Y, Sekine T, et al. Phosphorylation-dependent membrane insertion and activation of TRPC6 is regulated by a balance between

Nephrin and PLC-g1 6th Asian Society for Pediatric Research. 台北。Apr. 17. 2010

12. 張田豊、松長敦子、鶴見晴子、他：新規スリット膜構成分子SIRP-alphaはNephrinと結合し、そのリン酸化を負に制御する. 第53回日本腎臓学会学術集会、神戸、2010年6月17日
13. 神田祥一郎、張田豊、関根孝司 他：ネフローゼ症候群発症におけるTRPC6活性化メカニズムの解析 第53回日本腎臓学会学術集会、神戸、2010年6月17日

〔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

張田 豊 (HARITA YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10451866

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：