様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　６ 月 １９ 日現在

機関番号：１２３０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５９１１８０
研究課題名（和文）糸球体バリアー機能におけるチロシンリン酸化脱リン酸化経路の解析

研究課題名（英文）Tyrosine phosporylation and de-phosphorylation in glomerular barrier function

研究代表者
野島　美久（NOJIMA, YOSHIHISA）

群馬大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：９０２０１６９９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,900,000円、（間接経費）　1,170,000円

研究成果の概要（和文）：SIRPaは、脱リン酸化酵素SHP-1/SHP-2の結合部位を細胞質内に有する膜貫通蛋白であり、糸球体上皮細胞にも発現する。我々は、細胞質内領域を欠失する変異型SIRPaを発現する変異マウスを用い、糸球体上皮細胞におけるSIRPaの役割を解析した。SIRPa変異マウスでは光学顕微鏡で明らかな腎形態異常を認めなかったが、電子顕微鏡にて上皮細胞形態異常が確認され、腎機能障害と軽微なアルブミン尿が出現した。アドリアマイシンを投与すると、野生型マウスは抵抗性を示したが、SIRPa変異マウスでは大量の蛋白尿と糸球体硬化症が誘導された。以上より、SIRPaは糸球体バリアー機能を担うことが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）：SIRPa is a transmembrane protein with tyrosine phosphorylation sites in its cytoplasmic region where two tyrosine phosphatases, SHP-1/SHP-2, bind to in a phosphorylation-dependent manner, and is expressed by podocytes. We examined the role of SIRPa in podocytes using knock-in mice expressing mutant SIRPa that lacks a cytoplasmic region. While there was no morphological abnormalities in the kidneys of the SIRPa-mutant mice on light microscopy, electron microscopic examination revealed abnormal podocytes with irregular major processes and wider and flattened foot processes in the SIRPa-mutant mice. Impaired renal functions and slight albuminuria were demonstrated in the mutant mice. In addition, adriamycin injection induced massive albuminuria along with focal glomerulosclerosis in the SIRPa-mutant mice, while their wild-type counterparts were resistant to adriamycin. These data indicate that SIRPa is involved in the regulation of podocyte structure and function as a filtration barrier.

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：糸球体上皮細胞　チロシン脱リン酸化　SIRP-α　蛋白尿

１．研究開始当初の背景

糸球体上皮細胞はその形態から「足細胞」とも呼ばれ、多数の枝別れする突起（足突起）が互いに絡み合う特異な形態を呈する。糸球体上皮細胞は基底膜とインテグリンで接着する一方、隣り合う足突起間にはスリット膜という特殊な細胞間接着装置が発達している。1990年代末に至り、スリット膜に局在する蛋白がバリア機能の維持に決定的な役割を演じていることが明らかにされ、スリット膜の研究は腎臓病学の最もホットなテーマとなった。

先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子（*NPHS1*）として同定された nephrin は、スリット膜に局在し、細胞外に免疫グロブリン様構造を有する膜蛋白である（J Am Soc Nephrol 10:2440, 1999)。nephrin以外にも、neph-1、CD2AP、podocinなどのスリット膜構成蛋白が存在し、それらの発現や機能異常がネフローゼ症候群の原因になることが遺伝子改変マウスや先天性疾患の解析により明らかにされた。さらにnephrin はその後、シグナル伝達分子として機能することが報告された（J Clin Invest 116:1346; Nature, 440:818)。nephrin の細胞質側には、Src ファミリーキナーゼFynによってリン酸化されると、Src homology 2 (SH2) ドメインを持つアダプター蛋白Nckに結合するモチーフが存在する。このリン酸化依存的なnephrin-Nck 間の結合が足突起を裏打ちするアクチン骨格の再編成に必要であることが示されたのである。以上の一連の研究成果から、糸球体バリア機能のメカニズム解明にリン酸化カスケードの解析という新しい突破口が開かれた。

SIRP-αはSHPS-1とも呼ばれ、非受容体型のチロシンフォスファターゼであるSHP-1およびSHP-2の基質として同定された受容体型の膜蛋白である。細胞内にはチロシンリン酸化領域(ITIM)があり､ここにSH2を持つSHP-1もしくはSHP-2が結合する。このドッキング機能によりこれらの脱リン酸化酵素を細胞膜近傍に呼び寄せて活性化する働きを持つ。SIRP-αは骨髄系細胞や神経細胞に強く発現する。研究代表者は研究協力者の的崎博士とともに、マクロファージや樹状細胞に発現するSIRP-αの機能を解析し、免疫応答や免疫病態に果たす役割に関して多くの業績を挙げてきた。そのツールとなったのが、細胞内領域を欠損してSHP-1/2と結合できない変異型 SIRPαを発現する遺伝子改変マウス（SIRP-α変異マウス）である。こうした免疫担当細胞における SIRPα分子の機能を解析する一方で、SIRPαが糸球体上皮細胞のスリット膜にも局在することを我々は見出した。

２．研究の目的

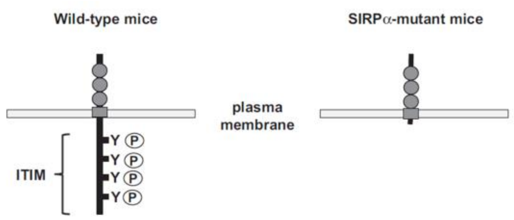
SIRP-α変異マウスにおける腎糸球体の構造と機能を解析し、糸球体バリア機能におけるSIRP-αの役割を明らかにする。

３．研究の方法

①使用したマウスとアドリアマイシン腎症の誘導

細胞質内ドメインを欠失する変異型SIRP-α（図１）を発現する遺伝子改変マウスは協力研究者の的崎らにより既に樹立されており（EMBO J 19:6721, 2000)、本研究ではこれを用いた。SIRP-α変異型マウス（Mu）と野生型マウス（WT）に対し、腎臓の片方を摘出（片摘）した1週間後に、尾静脈よりアドリアマイシンを10mg/kg投与し、アドリアマイシン腎症を誘導した。

図１．野生型及び変異型 SIRP-αの構造



②病理組織学的解析

摘出したマウスの腎臓は､4%パラフォルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋、４μmに切り出してPAS染色を行った。免疫組織学的解析に際しては、４μm 切片を脱パラフィン後、各種の一次抗体を反応させ、ビオチン化二次抗体とVECSTAIN ABC reagentで増感し、発色させた。

免疫蛍光抗体法では、摘出直後に凍結し-80℃で保存した検体を用いた。４μmに薄切した切片はメタノール/アセトン（1:1）で固定し、各種の一次抗体とFITC標識の二次抗体で染色した。

免疫電子顕微鏡観察においては、４μm の凍結切片に一次抗体である抗 SIRP-α抗体を反応させ、洗浄後に金粒子を結合させた二次抗体を反応させた。切片はその後、1%グルタルアルデヒドで固定し、超薄切片を作成して電子顕微鏡にて観察した。

③糸球体数と糸球体硬化の定量

PAS 染色した光学顕微鏡画像をViefinder（ver. 3.0.1: Pixera）に取り込み、Adobe Photoshopで解析した。100個以上の糸球体をカウントし、1mm^{2}当たりの糸球体数を算出した。

アドリアマイシン腎症における糸球体硬化の程度を以下のように半定量化した。0, 25%; 2, 25-50%; 3, 50-75%; 4, 75%。各マウスにつき､50個以上の糸球体の硬化度を評価し、糸球体当りの平均硬化度を算出した。

④足突起の計測

透過型電子顕微鏡にて糸球体上皮細胞の足突起の形態変化を定量的に解析した。ランダムに選んだ 5 つの糸球体それぞれにつき、５つの係蹄壁を選択。全部で 25 個の係蹄壁

について糸球体基底膜 10μm 長当りの足突起の数を数え、平均値を求めた。

⑤尿と血清の解析

メタボリックケージで飼育するマウスで 24 時間蓄尿し、アドリアマイシン投与後 2 週から 10 週にかけて解析した。アルブミン尿は ELISA キットで測定。血清及び尿のクレアチニンは Hitachi 7180 自動分析器と JCA-M8000 自動分析器で測定した。

⑥ウエスタンブロット

マウスの腎臓および分離した糸球体から 1%Triton を含むバッファーで蛋白を抽出。蛋白濃度を調整後、7.5%の SDS-PAGE で電気泳動した。引き続きゲル内の蛋白を電気的に Immobilon-P 膜に転写し、各種の抗体でブロットをした。

⑦免疫沈降法

分離糸球体から抽出した蛋白を、抗 SIRP α 抗体が結合する protein-G-Sepharose beads で免疫沈降させ、それを SDS-PAGE で展開、Immobilon-P 膜に転写し、各種の抗体でブロットをした。

⑧糸球体の分離

糸球体の分離はマグネットビーズ法で行った。

４．研究成果

①SIRP-αはマウス糸球体上皮細胞に発現する。

SIRP-αの細胞質内ドメインを認識する抗体で野生型（WT）および変異型（Mu）マウスの腎臓を染色した結果を図２に示す。SIRP-αは野生型マウスの糸球体に発現され、その染色パターンは上皮細胞に一致した。一方、変異型マウスでは染色されなかった。

糸球体上皮細胞特異抗原であるシナプトポジンとの二重染色を行うと､SIRP-αはそれと重なり合って染色されることから（図３）、SIRP-αは上皮細胞に発現していることが確認された。

さらに、免疫電子顕微鏡観察においても、SIRP-αが糸球体上皮細胞の細胞膜に発現していることが確認された（図４）。

図２．野生型および変異型マウス糸球体における SIRP-αの発現

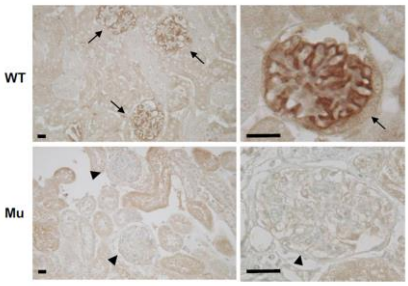


図３．SIRP-αとシナプトポジンの2重染色

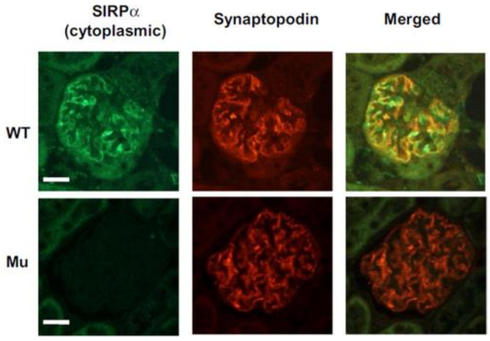
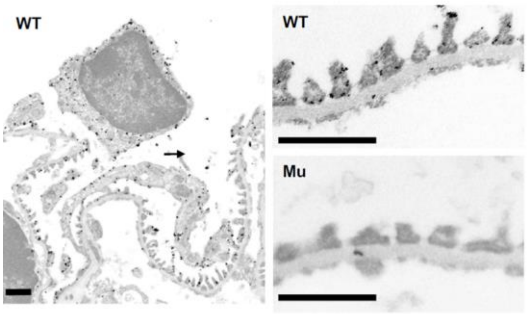


図４．SIRP-αの免疫電顕像

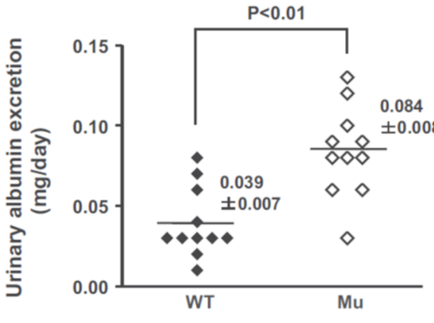


②SIRP-α変異型マウスでは蛋白尿の増加と腎機能の低下が観察される。

8週令における SIRP-α変異型マウスでは野生型マウスに比べて蛋白尿が微量ではあるが有意に増加していた（図５）。

また、野生型マウスと変異型マウスでは、収縮期血圧（98.3±2.5 vs 106.5±2.6 mmHg, P<0.05）、血液尿素窒素（28.88±0.90 vs 39.65±3.01 mg/dl, P<0.01）、クレアチニンクリアランス（0.26±0.03 vs 0.16±0.01 ml/min, P<0.01）に有意の差が認められた。

図５．８週令における野生型マウスと変異型マウスの蛋白尿



③光学顕微鏡レベルでは SIRP-α変異型マウスの腎臓は形態異常を示さない。

PAS 染色による光学顕微鏡的観察では、SIRP-α変異型マウスの腎臓には明らかな形態異常は観察されなかった（図６）。また、単位面積当たりの糸球体数、糸球体当りの上皮細胞数（WT-1 陽性細胞数で評価）において、野生型マウスとの間に有意な差は認めら

れなかった。
　さらに、上皮細胞に発現されるネフリン、ポドカリキシン、シナプトポジン、ビメンチンなどの蛍光抗体法による発現パターンも、野生型マウスと変異型マウスで明らかな差は認められなかった（図７）。

図６．野生型マウスと変異型マウス腎臓のPAS染色像（Bars=40μm）

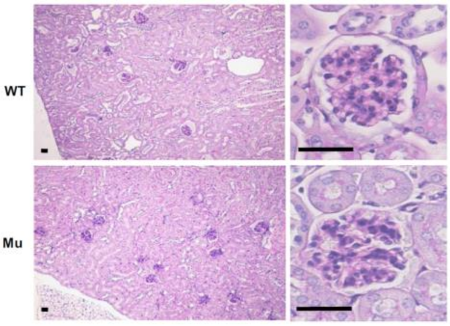
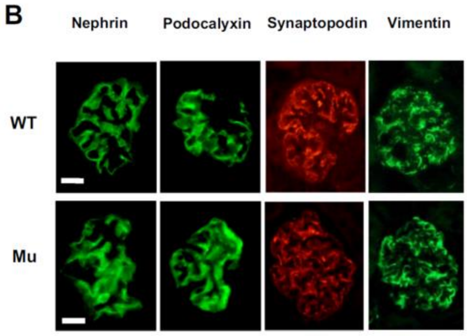


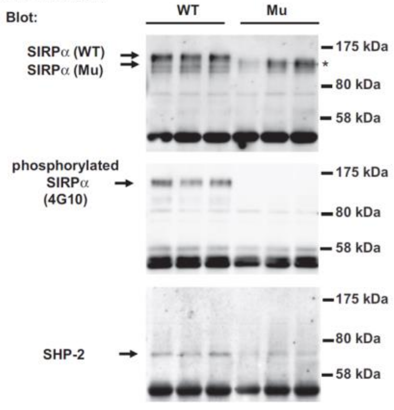
図７．野生型マウスと変異型マウスの糸球体特異抗原の発現パターン



④野生型マウスに発現される SIRP-αはチロシンリン酸化され、SHP-2 と結合している。

　分離した糸球体の蛋白抽出液から SIRP-α を免疫沈降し、チロシンリン酸化を調べたところ、野生型マウスの SIRP-αはリン酸化されているが、変異型マウスの SIRP-αはリン酸化を受けていなかった。また、野生型に発現される SIRP-αは SHP-2 と結合していることが免疫共沈降法で確認された(図８)。

図８．免疫沈降法による解析



⑤電子顕微鏡による SIRP-α 変異型マウスの糸球体上皮細胞の形態異常

　8 週令における野生型マウスおよび変異型マウス糸球体の透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡の写真を図９および図１０に示す。変異型マウスでは野生型マウスに比べて糸球体足突起の平坦化が認められる。糸球体基底膜 10㎜ 長当りの足突起の数を調べたところ、8 週令の変異型マウスでは野生型マウスに比べて有意に少なかった（33.4±0.8 vs 22.9±1.4, P<0.01）。

図９．透過型電子顕微鏡像

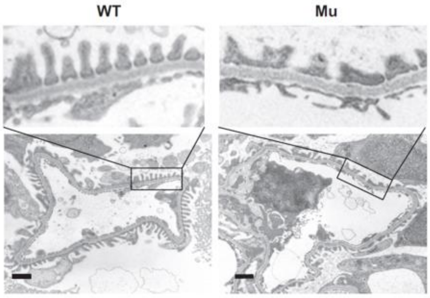
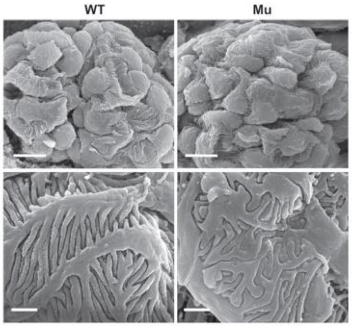


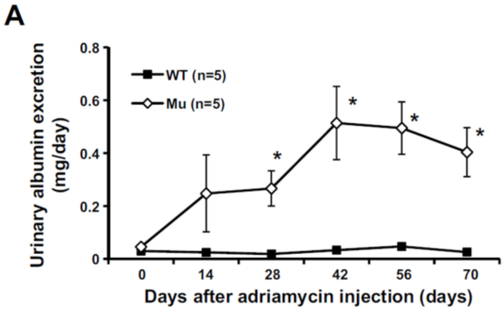
図１０．走査型電子顕微鏡像

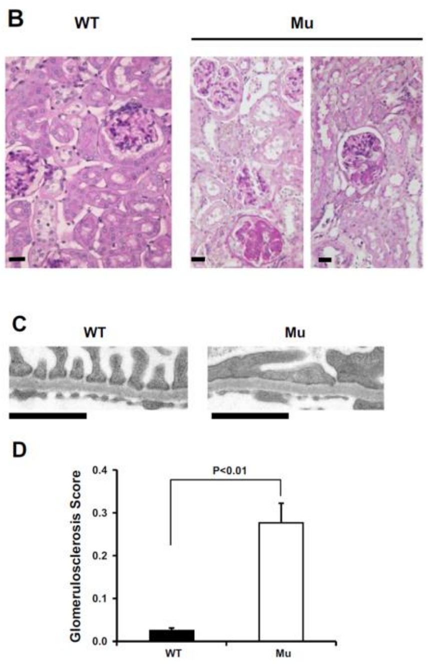


⑥SIRP-α変異型マウスでは、アドリアマイシン投与により大量の蛋白尿が誘導される。

　片腎を摘出したマウスにアドリアマイシンを投与すると、野生型マウスに比べて SIRP-α変異型マウスでは大量の蛋白尿が誘導された（図11A)。アドリアマイシン投与後70日後の変異型マウスでは、糸球体硬化と糸球体足突起の融合が観察された（図11B、C）。糸球体硬化と硝子化の程度をスコア化すると、野生型マウスと変異型マウスでは有意の差が認められた（図11D)。

図１１．アドリアマイシン腎症





⑥結論
　以上の結果から、SIRP-αはマウスの糸球体上皮細胞に発現され、上皮細胞の形態と機能の維持に重要な役割を演じていることが明らかにされた。このことから、糸球体のバリア機能を蛋白のチロシンリン酸化・脱リン酸化系が制御していることが推察された。

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　１件）
Takahashi S, Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Hamatani H, Watanabe M, Ikeuchi H, Kaneko Y, Maeshima A, Aoki T, Ohnishi H, Matozaki T, Nojima Y. SIRPα signaling regulates podocyte structure and function. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F861–F870, 2013.

〔学会発表〕（計　１件）
高橋哲史、廣村桂樹、浜谷博子、加藤麻衣、坂入徹、池内秀和、前島明人、黒岩卓、青木武生、大西浩史、的崎尚、野島美久　SIRPαシグナル経路の遮断は糖尿病性腎症を増悪させる。第 54 回日本腎臓学会学術集会　2011 年 6 月 17 日、横浜

〔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
　野島　美久（NOJIMA YOSHIHISA）
　群馬大学・大学院医学系研究科・教授
　研究者番号：90201699

(2)研究分担者
　　　　　　　（　　　）

　研究者番号：

(3)連携研究者
　　　　　　　（　　　）

　研究者番号：