

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790956

研究課題名(和文) 足細胞におけるポドシンのエンドサイトーシスを誘導する蛋白質と阻害物質の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the inhibitor with the protein to induce endocytosis of podocin in podocytes

研究代表者

日高 輝夫 (Hidaka, Teruo)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：00529414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腎臓糸球体上皮細胞である足細胞のスリット膜関連蛋白質、synaptopodinとpodocinの染色性の違いから、不可逆的な糸球体腎炎において染色領域に差異が出現する事に気づいた。このpodocinの細胞内移動はSorting Nexin 9 (SNX9) が先導していることを同定した。事実、podocinとSNX9は接着性を有することが我々の実験において証明された。種々の腎炎においてSNX9の発現を調査し、不可逆的病変とされた単状糸球体硬化症の病変や予後不良のIgA腎症の検体においてSNX9の発現が著しく増強していることが判明した。SNX9の役割について詳細な検討を進めているところである。

研究成果の概要(英文)：We noticed that the deference pattern of staining with podocin and synaptopodin, which are slit-diaphragm proteins in irreversible glomerulonephritis. We found that Sorting Nexin 9 (SNX9) lead the podocin trafficking in these nephritis. Actually, we recognized that SNX9 will appear in glomeruli only significant severe glomerulonephritis, and it connect tightly to podocin in such conditions. In biochemical examination also indicated SNX9 and podocin contact each other, and the immunofluorescence examination showed same staining pattern in irreversible glomerulonephritis. We are now continuing to research of SNX9 and podocin because of completion of our hypothesis with knocked down and over expression of SNX9 podocyte cell line.

研究分野：腎臓内科

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：podocin SNX9 synaptopodin glomerulonephritis irreversible change

1. 研究開始当初の背景

これまで、蛋白尿の出現には腎臓系球体臓側上皮細胞(足細胞)のスリット膜の異常が原因であることが多く報告されてきた。近年、これらのスリット膜関連蛋白の病的状況における細胞内輸送が注目されており、なかでも2007年Shono A.らによって報告された論文(J Am Soc Nephrol 18: 2525-2533, 2007)では、定常状態では発現していないcox sackie virus and adeno virus receptor(CAR)という蛋白質が、puromycin aminonucleoside (PA) nephrosis (PAN)の状態において、スリット膜蛋白であるポドシンと共発現し、細胞膜上のラフト構造に組み込まれることが報告された。この論文において、共発現したポドシンとCARが細胞膜上から細胞質上へ移動していることが観察されている。おそらくラフト構造に組み込まれた後、細胞質へのエンドサイトーシスが行われていることが推察されるが、そのKeyとなる分子に関しては今のところ報告されていなかった。ポドシンは構造上ヘアピン型膜貫通蛋白質であり、生理的条件下ではスリット膜に存在する。病的状態でポドシンがエンドサイトーシスを起こすには、何らかの蛋白質による誘導が必要であると考えられた。我々の今までの研究の成果から、IgA腎症の予後良好群の検体ではポドシンとsynaptopodin(synpo)は染色場所が一致し、二重染色において足細胞上での局在が一致していることをうかがわせた。一方、IgA腎症の予後不良群では、ポドシンとsynpoの染色箇所はずれが生じていて、足細胞上での両蛋白質の局在が変化していることが観察された。同様の所見はPANによる障害モデルでも光学顕微鏡において観察された。また、PAN腎炎モデルの検体を免疫電子顕微鏡の手法を用いて、局在の位置を観察するとpodocinの局在がスリット膜から足細胞の細胞質へと移動していることが確認でき、有意差をもってコントロール群と比較することができた。上記の結果

は前述したShonoらの論文と合致するものであり、ポドシンが何らかの影響を受けてエンドサイトーシスを受けていることを、ヒトの検体とラットモデルにて証明したものである。我々はyeast two hybridスクリーニングにより、ポドシンに結合する腎臓の蛋白質を多数同定した。これらの蛋白質のなかから、エンドサイトーシスにかかわる候補蛋白質を同定してゆくことにした。誘導蛋白質が明らかになれば、これらの相互作用によるポドシンの細胞内局在変化のメカニズムが解明でき、それらをブロックすることで、ポドサイト障害の進行を防ぐことができると考えている。

2. 研究の目的

腎臓系球体足細胞間に存在するスリット膜の異常は、蛋白尿を出現させ、最終的に持続的な系球体障害をきたし、不可逆性の腎障害へと移行する。我々は、足細胞障害時に、スリット膜蛋白の一つであるポドシンが足細胞内で局在変化することを腎障害モデルラットとIgA腎症の腎生検検体にて見出した。しかし、その局在を決める輸送蛋白に関しては、完全には同定できてはいない。いくつかの候補となる蛋白質から、決定的な蛋白質を同定し、その働きを抑制することができれば、足細胞の不可逆的な構造変化を防ぎ、足細胞障害の進行を抑えることが可能である。我々の目的は、現在有効な治療法が少ない足細胞障害の治療に画期的な治療法を確立し、最終的に腎臓死を防ぎ、血液透析への移行患者を減少させることにある。

3. 研究の方法

PAN腎症、IgA予後不良群における、podocinとsynaptopodin(synpo)の染色性の差異

- (1) ラットにPAを静注し、PANを発症させ、蛍光染色にてpodocinとsynpoの二重染色を行った。
- (2) 同様にヒトIgA腎症の検体を当時のIgA

腎症予後分類にしたがって 4 つに分け (予後良好群、比較的予後良好群、比較的予後不良群、予後不良群) それぞれの検体を同様に、podocin と synpo の二重蛍光免疫染色を行った。それぞれの蛍光免疫所見の差異をコンピュータのソフトウェアにより計測した。

(3) 免疫電顕：上記の検体を電子顕微鏡上で podocin の免疫電子顕微鏡像を撮影し、陽性部位の細胞内局在を調査した。

Yeast two Hybrid 法による podocin 誘導蛋白質の同定。
Podocin を bait, 対象をヒト腎臓遺伝子とした。

podocin との蛋白質間結合を証明した。

- (1) Human Embryo Kidney (HEK) 細胞を用いて exogenous coIP 法により結合を調査した。
- (2) 培養足細胞を用いて endogenous coIP を行った。
- (3) GST 融合蛋白質を用いて直接蛋白質間の結合を調査した。

PAN ラットモデル、ヒト IgA 腎症予後不良群において

- (1) 同定蛋白質と podocin の免疫二重染色を蛍光染色を用いて行う。
- (2) 同定蛋白質と podocin の免疫二重染色を金粒子を用いた免疫電子顕微鏡にて観察する。

同定蛋白質の knocked down 細胞を遺伝子導入した上でクローニングし、それらの表現形を調査する。

同定蛋白質の過剰発現モデルを遺伝子導入により作成し、それらの表現形を調査する。

4 . 研究成果

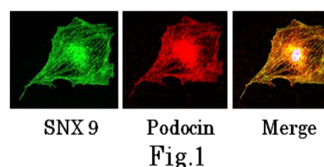


Fig.1

(1) PAN ラット腎モデルにおいては ADR 静注後 Day7, 14 において synpo と podocin の染色性のズレが確認された。synpo が隣接細胞間隙のスリット膜に残存しているのに対して、podocin は細胞質側へ偏在していることが確認できた。(2) ヒト IgA 腎症モデルにおいては、予後良好群、比較的予後良好群、比較的予後不良群においては両者の染色性の差異は確認できなかったが、予後不良群においては PAN モデル同様の差異が有意差を持って確認できた。

(3) 電子顕微鏡を利用した免疫電顕においては、podocin は PAN モデル、予後不良群 IgA 腎症においてスリット膜から細胞質側へ染色粒子が偏在していることが確認できた。

yeast two hybrid 法においては、157 種の

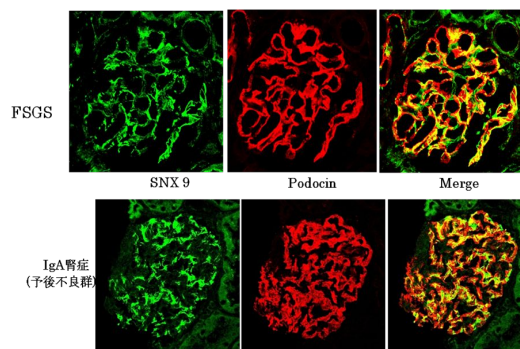


Fig.2

候補遺伝子が検出された。その中で、目的とする podocin の細胞内移動にかかわっていると考えられるものの中で、モデル動物の染色性等を評価した結果、Sorting Nexin 9(SNX9) を候補蛋白質として見出した。Sorting Nexin は現在 33 種類報告され、蛋白質の細胞内輸送にかかわっていると考えられている。SNX9 は SH3 基を N 末端に持ち 細胞膜と結合する

Yn、PX ドメイン、重合する BAR ドメインで構成されている。エンドサイトーシスのネック形成や分離に dynamin と共に働いているとされている蛋白質である。

(1)exogenous colP によると、podocin と SNX9 は完全に結合することが判明した。SNX9 の segment にて結合ドメインを検索しているが、PX-BAR ドメインの可能性が高いと判明した。

(2) 足細胞内因性蛋白質を利用して endogenous colP を施行したところ、podocin と SNX9 は結合していることが証明された。

(3)GST-融合蛋白質を用いて、蛋白質同士の直接の結合を確認したところ、両者は結合することが証明された。

培養足細胞における発現を検討したところ、十分な発現が得られた(Fig.1)。

(1)(2)蛍光染色においては、二重染色を行っている。SNX9 は細胞障害が強い状態(巣状糸球体硬化症、IgA 腎症予後不良群)でのみ発現するので、病的状況や軽度の障害では発現していない(Fig.2)。しかし発現した場合にはかなりの確率で podocin と共発現していることが判明した。免疫電顕に関しては、現在実験中であり、今後の結果を待つ必要がある。

SNX9 knocked down 細胞の作成に当たっては、現在 pSUPER system を利用してクローニングを行っているが、培養足細胞の発育が悪く、作成できていない。作成された暁には、表現系を観察し、細胞障害モデルにおける podocin の細胞内移動に関して調査を進める

予定である。

SNX9 over expression モデルを作成しているところであるが、最近足細胞における G416construct を利用したクローニングが別件で成功しており、G416-EGFP-SNX9 construct を作成したうえで、過剰発現細胞をクローニングし、表現系の観察、障害モデルにおける podocin の細胞内移動を調査する予定である。

実験動物モデルを検討したが、過去の論文で SNX9 ノックアウトマウスは異常表現系が出現せず、他の SNX group が代替的に働いているものと推察されている。特に SNX18,33 は同じように SH3 基を保持しているため、代替的に働いている可能性は十分にあるものと考えられている。

現在のところ、SNX9 が足細胞障害に対して、保護的に働いているのか、促進的に働いているのか不明である。十分に調査後、それらの進行を抑制する蛋白質の解明が進めば、今後の治療に向けた進展が望めると期待している。

クローニングの成功が遅れ、ノックダウン細胞、過剰発現細胞が得られていないため十分な評価ができていない。表現系が得られれば SNX9 が細胞障害において保護的に働いているのか、促進的に働いているかによってそれらの蛋白質の検索まで行いたいと考えている。結論が出次第、論文投稿、学会発表を行います。

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)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日高 輝夫 (HIDAKA, Teruo)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号： 00529414