

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390054

研究課題名(和文)腎糸球体スリット膜TRPC6複合体の機械刺激受容伝達とその破綻の分子機構の解明

研究課題名(英文) Exploration of the mechanisms underlying normal glomerular filtration function and its pathologic disruption via the TRPC6-slit diaphragm protein complex-mediated mechano-signaling

研究代表者

井上 隆司 (Inoue, Ryuji)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：30232573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：TRPC6チャネルを含む蛋白質-細胞骨格複合体を介したCaシグナル伝達が、腎スリット膜の濾過機能の制御やその破綻した病態に果たす役割を解明することを目的とし、スリット膜構成分子の最小発現系、分化足細胞で形成させた疑似スリット膜を用いた研究を行った。その結果、TRPC6-podocin-(nephrin)-アクチン骨格によるスリット膜複合体における受容体刺激・機械刺激によるCa流入が、腎スリット膜の拡散障壁機能の生理的制御に重要であり、家族性巣状糸球体硬化症の遺伝子変異・炎症時にはこのCa応答が過剰になっているため、障壁機能の破綻を引き起こしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To explore the precise physiological and pathophysiological implications of the slit diaphragm complex including a canonical member of transient receptor potential (TRP) channel TRPC6, in regulating the glomerular filtration function, we carried out detailed analysis with a minimally constructed slit-diaphragm-protein expression system and a 'pseudo-slit diaphragm' formed by podocytes on an artificial filter membrane. The results have suggested that the complex of TRPC6-podocin-(nephrin)-cytoskeletal actin mediates Ca influx into renal podocytes in response to receptor and mechanical stimuli, thereby effectively regulating the glomerular barrier function, and that conditions causing the excess of these Ca responses such as mutations associated with familial focal glomerulosclerosis and renal inflammation, may lead to disruption of the barrier and subsequent proteinuria.

研究分野：分子病態生理学、システム分子生理学

キーワード：腎スリット膜複合体 機械刺激情報伝達 TRP蛋白質 Ca情報伝達 糸球体硬化症

## 1. 研究開始当初の背景

腎系球体壁は毛細血管内皮細胞、基底膜、足細胞が形成するスリット膜の3層構造から成り、常に60mmHg以上の血管内圧を受けている。足細胞は分岐した突起を互いに伸ばして20-45nmの間隙を形成し、濾過障壁として働いている。種々の原因によって足細胞のリモデリングや障害が生じると足細胞突起の展退が起こり、腎の限外濾過機能が破綻し蛋白尿を伴う慢性腎機能不全に陥る。足細胞の突起は収縮性を有するアクチン線維が分布し、正常時には毛細管内圧変化に応じて収縮し、濾過障壁の溶質透過性を調節していると想像されている。スリット膜の足細胞突起側には、transient receptor potential (TRP) スーパーファミリーの一員である TRPC6 を含む数多くの蛋白質 (nephrin, Neph1, podocin, TRPC6 等) が集積して複合体を形成し、足細胞内でアダプター蛋白質 (CD2AP 等) を介してアクチン細胞骨格と連結している。このようにスリット膜の TRPC6 を含む膜蛋白質細胞骨格複合体は、腎系球体の濾過障壁機能制御に決定的な役割を果たす、Ca を含む種々のシグナル伝達のプラットフォームとして機能していると考えられている。これらの蛋白質の遺伝的・後天的要因 (炎症、化学物質暴露等) による量的・機能的変化は、腎系球体の濾過障壁機能の異常や消失を引き起こすことが報告されている。しかしこれまでの研究は、主にシグナル分子の同定や発現量操作による長期的変化の形態学的・生化学的解析に限られ、スリット膜分子間の動的相互作用による濾過障壁のダイナミクスは全く不明であった。

TRPC6 チャネルは、種々の物理化学刺激で活性化される Ca 透過型陽イオンチャネル群 TRP 蛋白質の一つで、一部の家族性巣状系球体硬化症 (FSGS) の原因遺伝子として報告されている。TRPC6 チャネルは、ホスホリパーゼ C 共役型受容体等の刺激時に産生されるジアシルグリセロールを介して活性化されるばかりでなく、膜伸展・細胞膨張・ずり応力等の機械刺激が同時に作用すると劇的な増強を受ける。これには、機械刺激の直接的な活性化作用や脂質メディエーター(20-HETE)の産生を介した間接的な作用が関与していると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、再構成系、培養足細胞系を用い、機能的、形態学的および分子生物学・生化学的手法によって、スリット膜の濾過機能の制御やその破綻の分子機序を明らかにすることを目的として実験を行った。すなわち、(1)発現細胞に再構成した最小の情報伝達系 (nephrin, podocin, TRPC6 等) 及び培養足細胞系を用いて、腎系球体ス

リット膜蛋白質群-TRPC6-アクチン複合体における、受容体・機械刺激を感知して活性化される Ca 情報伝達機構を検討した。(2) 更に FSGS 原因遺伝子変異がもたらす Ca 情報伝達異常が濾過障壁機能の破綻にどのように寄与しているのかを検討した。(3) FSGS 遺伝子変異に起因する濾過障壁機能破綻の改善手段として、プロテインキナーゼ G (PKG) の活性化が有効であるかを探索した。

## 3. 研究の方法

TRPC6 チャネルのマウス型 FSGS 変異体 (P111Q, M131T, N142S 等) は標準的な分子生物学的手法で作成した。podocin, nephrin 遺伝子 (マウス型) は、浅沼博士 (順天堂大医学部・腎臓内科) より供与を受けた。不死化マウス由来足細胞株 MPC はマウントサイナイ大学医学部の P. Mundel 博士より供与して頂いた。TRPC6 遺伝子 (野生型、変異体) の発現には、遺伝子導入試薬 lipofectamine2000™ を使用した。一部の足細胞への遺伝子導入実験では、導入効率を高めるため、アデノウイルスをベクターとして用いた。電気生理学的解析・Ca イメージング解析、形態的解析、生化学的解析は、上記遺伝子を強制導入・発現した HEK293 細胞を用いて行った。また一部の実験では、MPC 細胞を用いて同様の解析を行った。MPC 細胞の培養・分化誘導は、供与元から提供されたプロトコルに従った。受容体刺激に用いたアゴニストは自作の Y-チューブより投与した。機械刺激としては、パッチ電極内の陰圧、膜伸展物質 2,4,6-trinitrophenol (TNP)、低浸透圧(-30mOsm)による細胞膨張を、膜伸展刺激として細胞に加えた。

疑似スリット膜を用いた濾過機能評価には、コラーゲンコートした人工膜 (ポアサイズ: 3 or 0.4µm; BD Biosciences) 上に足細胞を培養し、終末分化誘導をかけて2次元シートを形成させた。その後、FITC標識アルブミンをスリット膜上に一定時間加え、様々な実験条件下で漏出したアルブミンの吸光を測定した。また一部の実験では、スリット膜を横切る電気抵抗を測定するため、Trans Epithelial Electrical Resistance (TEER)測定装置 (Millicell ERS-2) を用いた。

高感度の蛍光イメージングを可能とするため、高感度冷却EMCCDデジタルカメラ (モレキュラーデバイス) を購入した。

## 4. 研究成果

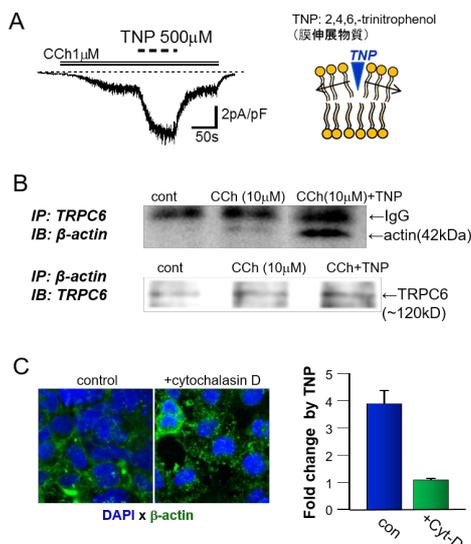
### (1) 最小発現系におけるスリット膜分子情報伝達機能の検討

まずアクチン骨格と腎スリット膜の主要な情報伝達分子 TRPC6、podocin、

nephrin の相互作用を検討するため、Flag-tag を N 末端に連結した TRPC6 を、podocin、nephrin と HEK293 細胞に共発現させ、ウェスタンブロット法による検討を行った。抗 Flag 抗体で免沈させた後、抗 TRPC6 抗体、抗 nephrin 抗体、抗 podocin 抗体、抗  $\beta$  アクチン抗体で免疫ブロットを行うと、全ての抗体において、それぞれの蛋白質の分子量にほぼ一致したバンドが得られた。このことから、 $\beta$  アクチン、TRPC6、nephrin、podocin は物理的結合を介してシグナル伝達複合体を形成している可能性が示唆された。

次に同様の発現系を用いて、受容体および機械刺激による TRPC6 電流(あるいはそれによる細胞内 Ca 上昇)の大きさとアクチン骨格との機能的な相互作用の関係について検討した。図 1 に示すように、TRPC6 電流の振幅(およびそれに伴う細胞内 Ca 上昇)は、無刺激<受容体刺激<受容体刺激 + 機械刺激の順で有意に増大し、それに伴ってアクチン骨格と TRPC6 の物理的結合も増強した(図 1)。

図 1



アクチン骨格と TRPC6 の物理的結合の強化が、チャンネル活性の増強に關与しているか否かを検討するため、アクチン重合を阻害する物質サイトカラシン D を投与してその影響を調べた。この阻害薬によってアクチン骨格を破壊すると、受容体刺激、機械刺激による TRPC6 電流の活性化・増強が著しく抑制され、同時に自発電流の持続的な出現が観察された(図 1)。

一方、スリット膜分子である nephrin を TRPC6 と共発現した場合には受容体・機械刺激応答には有意な変化が見られなかったが、podocin を TRPC6 と共発

現すると、弱い受容体刺激に対する応答と機械刺激に対する応答が著しく増強された。この応答の増強は高濃度の受容体刺激では消失した。

以上より、TRPC6 は少なくとも podocin、アクチン骨格と複合体を形成し、その相互作用が強まることによって受容体刺激や機械刺激で生じる Ca 流入の活性化が増強されていることが示唆された。その分子構造基盤は不明であるが、後述するように TRPC6-N 末端とアクチンおよび podocin の相互作用が TRPC6 チャンネルの活性化ゲートの制御に密接に關与している可能性がある。

## (2) TRPC6-FSGS 変異体における Ca 情報伝達の変化

次に、TRPC6 の N 末端変異 (P111Q、M131T、N142S) を HEK293 細胞に発現した際の、受容体応答、機械刺激応答、アクチン細胞骨格との物理的および機能的相互作用の変化について検討した。

細胞免疫染色では、これらの変異体の導入によるアクチン骨格の変化は見られなかった。しかし、すべての変異体において、自発電流(および細胞内 Ca 濃度)が増大し、これらの受容体刺激に対する応答も数倍まで増強された。一方、機械刺激に対する応答は、M131T 変異体で著しく増強し、逆に P111Q、N142S 変異では著明な抑制がみられた。更にサイトカラシン D によるアクチンの脱重合化は M131T 変異における受容体応答、機械刺激応答の過剰な増強をほぼ完全に抑制した(図 2)。

この時、アクチン骨格とチャンネルの相互作用を免疫沈降法で調べると、M131T、P111Q 変異体では受容体刺激、機械刺激それぞれによる物理的結合の増強が見られたが、N142S 変異体では無刺激時からアクチンとの結合が既に増強しており、受容体・機械刺激による更なる結合の増強は見られなかった。

一方、podocin をこれら FSGS 変異体と共発現すると、野生型と同様に、低濃度受容体刺激時の Ca 応答が著明に増強したが、機械刺激応答は、P111Q 変異体のみで増強し、M131T 変異体では逆に著しく抑制された。

以上より、FSGS 変異体では、受容体刺激による Ca 応答が増加しているのみならず、自発活性増加による非刺激時の細胞内 Ca 流入も増加しており、細胞内への過剰な Ca 負荷が生じていること(Ca 過負荷状態)が強く示唆された。更にこれに加えて、早期発症重症型の FSGS 変異 M131T では、機械刺激応答も著しく増強していることが分かった。これらの病的な Ca 応答の増加には、アクチン細胞骨格との相互作用の増強が密接に關与していることが予想される。

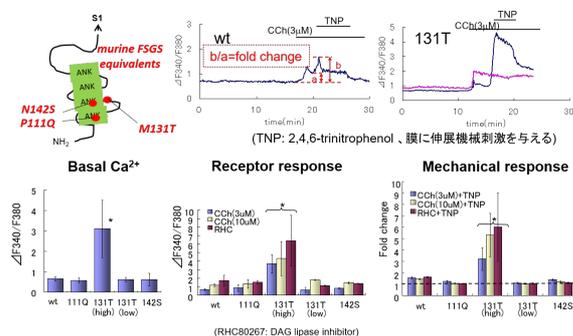


図 2

### (3) 不死化足細胞株 MPC を用いた検討

以上の発現系における結果が、実際の腎スリット膜複合体においても妥当か否かを検討するため、マウスから樹立し不死化した足細胞 (podocyte) 株 MPC を用いて、以下の検討を行った。

MPC 細胞における podocin、nephrin の発現量は、分化誘導によって著明に増加したが、TRPC6、 $\beta$ -アクチンの発現量には有意な変化は見られなかった。一方、免疫染色で検討したアクチン線維の分布パターンは、分化誘導によって G-actin 型からフィラメント上の F-actin 型へと変化した (図 3)。

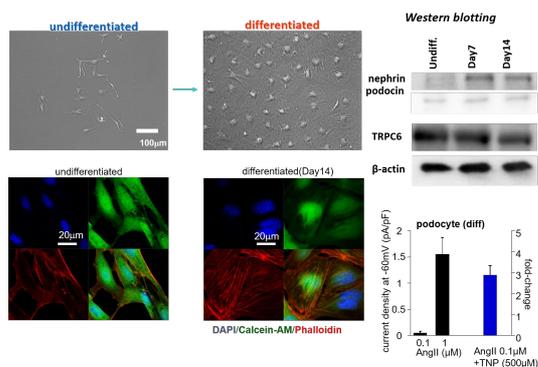


図 3

更に、MPC 細胞をアンジオテンシン II (AGII) で刺激して誘発した TRPC6 様電流の密度は、分化誘導後に有意に増加した (図 3)。以上の結果を発現系のそれと合わせると、少なくとも podocin の発現増加が、TRPC6 チャネル活性化を介した受容体応答の増強に寄与していることが考えられた。

次に、アデノウイルスベクターを用いて、分化させた MPC 細胞に野生型の TRPC6 を強制発現すると、静止時細胞内 Ca 濃度、受容体活性化および機械刺激に対する Ca 応答の増大が見られた。この効果は M131T 変異体を導入するとより顕著であった。このことは、podocin や nephrin を内因的に発現する分化した足

細胞においても、刺激の有無に関わらず TRPC6-FSGS 変異体の存在が、過剰な Ca 負荷の原因となっていることを示唆している。

一方、腎起炎物質である puromycin aminonucleoside (PAN) や TGF- $\beta$  で MPC 細胞を 24 ないし 48 時間処置すると、TRPC6 の mRNA 発現量が有意に増加した。更に TGF- $\beta$  は podocin の発現を数倍まで増加させた。このことは、TRPC6 と podocin の共発現が TRPC6 の活性化を促進するという発現系の結果と合わせると、炎症時の足細胞においては TRPC6 の過剰な活性化が生じる可能性を示唆している。

### (4) 擬似スリット膜を用いたアルブミン漏出アッセイ

微細な小孔を有するフィルター膜上に分化させた不死化足細胞による濾過障壁を形成させ、その濾過機能に影響を与える諸因子について検討した。

まず、足細胞の播種密度を変えて FITC 標識アルブミンの漏出が最も少ない最適な密度を検討した。ちなみに、播種密度が高くなると、mTRPC6 の mRNA 発現量が顕著に減少し (0.25, 0.5 vs. 1.0  $\times 10^4/cm^2$ )。nephrin はこれと全く反対の傾向を示した。

上記の方法で形成させた擬似スリット膜を用いて FITC 標識アルブミン漏出アッセイを行うと、比較的短時間 (30min) では、受容体刺激 (AGII; 1  $\mu$ M) 単独でも漏出の減少傾向が見られたが、受容体刺激と機械刺激 (TNP 500  $\mu$ M or -30mOsm) が共存すると、漏出量は半減した (図 4)。このことから、生理的な状態において、受容体刺激や機械刺激は、腎スリット膜を介したアルブミン等の高分子の漏出を防御的に制御していることが示唆された。

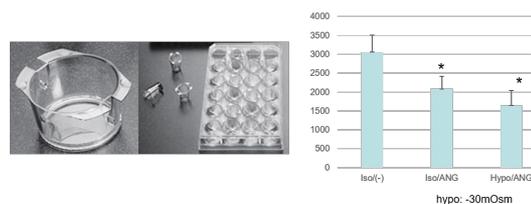


図 4

その分子機序として、活性化された TRPC6 チャネルを介した Ca 流入によってアクチン線維の収縮を介した足細胞突起間隙の狭小化などが考えられるが、MPC 細胞のアクチン骨格の細胞免疫染色像には、有意な形態的变化を見出すことはできなかった。今後は、より高い空間解像度を有する形態解析法 (電顕等) によって更なる精査を行う必要があると考えられる。

一方、受容体刺激や機械刺激が遷延する

と(≥1h) アルブミンの漏出量は再び増加する傾向を示した。更に起炎物質の PAN、TGF-β で 24 時間処置した後は、漏出量の有意な増加が見られた。これらの結果は、TRPC6 の過剰活性(過剰発現)が、足細胞内への Ca 過負荷を引き起こし、その結果生じる足突起の変性展退によってスリット膜の濾過機能が破綻し、蛋白尿が生じる可能性を示唆している。

今後、Ca 過負荷で活性化される細胞内情報伝達系(特に細胞変性と関連する)の検討も含め、更なる詳細な検討が必要である。

#### (5) PKG 活性化による TRPC6 過剰活性化の抑制

最後に、FSGS 変異や炎症による TRPC6 の過剰 Ca チャネル活性が PKG の活性化によって是正できるか否か検討するために、以下の検討を行った。

以前の我々の研究において、受容体刺激による TRPC6 チャネル活性化や機械刺激によるその更なる増強は、PKG の活性化薬 8-bromo-cGMP(8-bcGMP)によって抑制されることが判明している。これと一致して、免疫沈降法による検討によって、同時に TRPC6 チャネルとアクチン骨格の物理的結合も抑制されていることが分かった。更に、PKG による TRPC6-N 端のリン酸化部位をアラニン置換した変異体(T69A)では、8-bcGMP による抑制効果が消失しており、この変異体とアクチンとの結合は 8-bcGMP で影響を受けないことが分かった(図 5)。以上の事は、TRPC6-N 端のリン酸化が、受容体刺激や機械刺激によるアクチン-チャネル蛋白質間相互作用の増強効果を減弱させることによって、過剰な活性化を抑制しうることを示唆している。

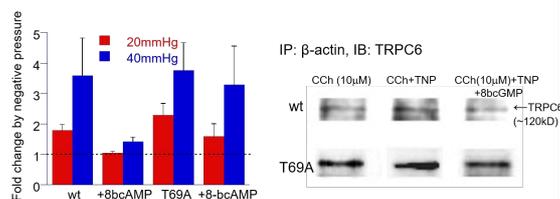


図 5

実際、8-bcGMP は、M131T 変異体の受容体刺激や機械刺激に対する過剰応答を有意に抑制する結果も得られている。今後は、この知見の臨床的有用性を、動物モデルなどで確認していく必要があると考えられる。

#### 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)

Numata T, Takahashi K, Inoue R. 'TRP-inflammation' relationship in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 38:339-356, 2016. 10.1007/s00281-015-0536-y (査読あり)

Kurahara LH, 5 名, Inoue R. Intestinal myofibroblast TRPC6 channel may contribute to stenotic fibrosis in Crohn's disease. *Inflam Bowel Dis*. 2015. 10.1097/MIB.0000000000000295. (査読あり)

Ichikawa J, Inoue R. TRPC6 regulates cell cycle progression by modulating membrane potential in bone marrow stromal cells. *Br J Pharmacol*, 2014. 171(23):5280-94. doi:

10.1111/bph.12840 (査読あり)

井上隆司、淺沼克彦、関卓人、長瀬美樹、長船健二、ポドサイトを標的とした基礎研究の新展開。 *日薬誌* 143(1): 27-33, 2014.

Mizoguchi Y, 8 名, Inoue R, 2 名. BDNF induces sustained intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation through the upregulation of surface TRPC3 channels in rodent microglia. *J Biol Chem* 289(26): 18549-55, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.555334 (査読あり)

Mori MX, Inoue R. New experimental trends for Phosphoinositides research on Ion transporter / Channel regulation. *J Pharmacol Sci* 126:186-97, 2014. doi.org/10.1254/jphs.14R14CP (査読あり)

Itsuki K, 3 名, Inoue R, Mori M. PLC-mediated PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *J Gen Physiol* 143(2): 183-201, 2014. doi: 10.1085/jgp.201311033. (査読あり)

Shi J, 7 名, Inoue R. Molecular determinants for cardiovascular TRPC6 channel regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *J Physiol (Lond.)* 591.11, 2851-2866, 2013. doi: 10.1113/jphysiol.2013.251249. (査読あり)

Imai Y, 2 名, Inoue R, Mori MX. A Self-limiting Regulation of vasoconstrictor-activated TRPC3/C6/C7 Channels Coupled with PI(4,5)P<sub>2</sub>-Diacylglycerol Signaling. *J Physiol (Lond.)* 590.5, 1101-1119, 2012. doi: 10.1113/jphysiol.2011.221358. (査読あり)

Itsuki K, 3 名, Inoue R, Masayuki X

Mori. Voltage-sensing phosphatase reveals temporal regulation of TRPC3/C6/C7 channels by membrane phosphoinositides. *Channels* 6(3): 1-4, 2012. (査読あり)

Kawarabayashi Y, 4, Inoue R. Critical Role of TRPC1-mediated  $Ca^{2+}$  entry in Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells. *Molecular Endocrinology* 26(5), 846-858, 2012. (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

井上隆司。シンポジウム「平滑筋の生理と機能」, 5. Mar, 2016. ウェステインナゴヤキャッスル。(国内シンポジウム講演)

Inoue R, 他4名, Symposium VIII “The roles of TRP channels in cardiovascular system”, The 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Korean Physiological Society, Oct.23, 2015. Moam Hall, Pusan National University Hospital, Busan, Korea. (国際シンポジウム講演)

Inoue R, 他4名. Symposium “Multicellular Inputs Regulating Muscle Excitability”, 2015.6.14, Granlibakken, Lake Tahoe, California, USA. (国際シンポジウム講演)

Inoue R, International Symposium on Ion channels, transporters, and small molecules as key regulators of homeostatic systems. Nagoya, 18. March, 2015 (国際シンポジウム講演).

Inoue R. 11<sup>th</sup> International Symposium on Resistance Arteries. Banff, Canada, 7-11 September, 2014 (国際シンポジウム講演).

Inoue, R., 4名. The 2<sup>nd</sup> International Symposium of Mechanobiology. 22. May, 2014, Okayama (国際シンポジウム講演).

Inoue R, 4名. KPS-PSJ symposium (FAOPS Joint Symposium)

"Mechanosensitive regulation of biological function: update". Kagoshima, Japan, March 16-18, 2014 (国際シンポジウム講演).

井上隆司。第 33 回日本眼薬理学会。東京、2013 年 9 月 22 日 (特別講演)  
井上隆司。生体機能と創薬シンポジウム2013。福岡 8/29 2013 (国内シンポジウム講演)

Inoue R, 2名. Symposium 6 “New therapeutic insights for chronic kidney disease provided by the podocytology. The 86<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society. Symposium. 21. Mar. 2013, Fukuoka (国内シンポジ

ウム講演)。

井上隆司、市川純、中川緑。生理研研究会「イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：細胞機能の分子機序とその統合的理解」。2013 年 11 月 21-22 日、岡崎(研究会口演)。  
井上隆司、市川純、中川緑、生理研研究会「心血管イオンチャネル・トランスポーター研究の新展開：基礎研究と臨床研究の融合」。平成 24 年 11 月 21-22 日、岡崎(研究会口演)。

〔図書〕(計 3 件)

井上隆司、*服薬理* 28:11-27, 2014.

井上隆司、*実験医学* 32(4): 534-539, 2014.

Inoue R, In: “Mechanosensitivity in Cells and Tissues. Vol. 6. Springer Verlag, eds. A. Kamkin, pp.281- 300, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/physiol/index-j.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上隆司 (INOUE, Ryuji)  
福岡大学医学部 (教授)  
研究者番号：30232573

(2)研究分担者

無し。

(3)連携研究者

森 誠之 (MORI, Masayuki)  
京都大学工学部 (准教授)  
研究者番号：80342640

(4)研究協力者

倉原 琳 (KURAHARA, Lin-Hai)  
市川 純 (ICHIKAWA, Jun)  
胡 耀鵬 (HU, Yaopeng)