

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591190

研究課題名(和文)より *in vivo*に近いポドサイト培養系の確立をめざして - VEGFを中心に -研究課題名(英文) Toward the establishment of culture system to restore *in vivo* phenotypes of podocytes

研究代表者

矢尾板 永信 (Yaoita, Eishin)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00157950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓糸球体上皮細胞(ポドサイト)は、糸球体濾過機能、構造維持に非常に重要であり、*in vivo*の形質を維持した培養条件の確立はポドサイトの研究を行う上で不可欠である。本研究は、初代培養を用い *in vivo*の細胞の性質を保つ培養条件を確立しようとするものである。最も低下の激しい特異遺伝子(ネフリン)の発現量を指標にして検討した結果、単離糸球体培養3日目での継代、非酵素的細胞剥離、ヘパリンの添加、胎仔牛血清の濃度の低下、細胞密度の適正化などにより、遺伝子発現レベルで *in vivo*に近い培養条件が確立できた。また、形態学的には、デキサメサゾン、ATRAの添加によって細胞突起の改善が認められた。

研究成果の概要(英文)：Glomerular epithelial cells in the kidney (podocytes) play critical roles in maintenance of glomerular structure and glomerular ultrafiltration. Establishment of culture system remaining *in vivo* phenotypes of podocytes is essential for studies of podocytes, although podocytes drastically decrease podocyte-specific gene expressions with time in the primary culture. Of these, decrease in nephrin was the most evident. In this study, we evaluated effect of various culture conditions on the gene expression in primary culture of podocytes to improve phenotypes of cultured cells to restore *in vivo* phenotypes. Consequently, subculture on day 3 of culture of isolated glomeruli, detachment with non-enzymatic solution, addition of heparin, decrease in fetal bovine serum, adequate cell density, and extracellular matrices enable expression of podocyte-specific genes at the level of *in vivo*. In addition, dexamethasone and all trans-retinoic acid induce cellular processes of cultured podocytes.

研究分野：腎臓病理学

キーワード：ポドサイト 培養 継代 トリプシン ヘパリン ビタミンA 細胞外基質 細胞密度

1. 研究開始当初の背景

ポドサイトは、糸球体濾過、病変形成に重要な役割を担っている。そのため、ポドサイトの細胞生物学的研究、分子生物学的研究が盛んに行われている。その中で、ポドサイトの培養細胞は細胞機能・分子機能を調べるための重要な手段となっている。理想的な培養系は、ポドサイト由来の細胞を使い、in vivo と同じ形質を示す条件下で培養することである。ポドサイトは細胞分裂能が低いため、SV40 large T 抗原を導入したマウスを基にいくつかの不死化細胞株が樹立されている。しかし、これらの細胞株は形態、特異遺伝子の発現量、in vivo では検出されない遺伝子の発現など in vivo のポドサイトと明らかな相違点を見せている。また、細胞株確立に使われたスクリーニングの方法によって、細胞株間に違いが見られる。そのため、我々は、より in vivo の形質を保持している初代培養の確立を目指してきた。その結果、ポドカリキシン、ポドシンなどのポドサイト特異遺伝子発現を比較的保持し、1次突起を伸展させる初代培養の系を確立し報告した (Kidney Int 69:2101, 2006)。残念ながら、この初代培養であっても、ポドサイトの特徴である足突起・スリット膜は消失し、特異遺伝子の発現低下は著しい。糸球体培養開始から8日目でネフリンは1000分の1、ポドシンは50分の1、ポドカリキシンは60分の1に、ポドサイト特異的クローディングであるクローディング5では40000分の1に激減している (日腎会誌 53:320, 2011)。

2. 研究の目的

ポドサイトが、より in vivo の形質に近い性質を示す培養条件を探す。

3. 研究の方法

(1)ポドサイトの初代培養：ラット腎臓を磁気ビーズで灌流後、腎皮質をコラゲナーゼ処理し、Cell Strainer(100 μ m)を通し、磁石で集めた (Kidney Int. 69:2101, 2006)。培地(DMEM/F-12 medium、0.5% ITS、5% FBS、100U/ml PC、100 μ g/ml SM)下で3日間または4日間培養し、生え出してくる細胞をトリプシンまたは Cell Dissociation Solution (CDS)(Sigma)で剥がし、残存糸球体を Cell Strainer(40 μ m)で除去したのち実験に用いた。培養皿として、type I collagen-coated 96-well multiwell plate (Iwaki)または高撥水性印刷 12 穴スライドグラス (Matsunami)を用いた。

(2)遺伝子発現の定量:real time-PCR を用い、単離糸球体由来の cDNA をスタンダードとした。標準化は GAPDH を用いた。

(3)抗体：抗ネフリン抗体(5-1-6)(新潟大学、分子病理学分野、河内裕教授より供与)、抗ポドシン抗体 (IBL)、抗 Z0-1(Invitrogen)、抗ビメンチン抗体(Sigma-Aldrich)。

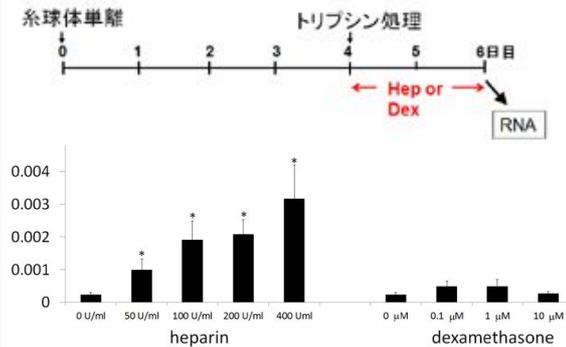
(4)試薬：Sigma-Aldrich より購入した。

4. 研究成果

(1) nephrin の発現量からの検討

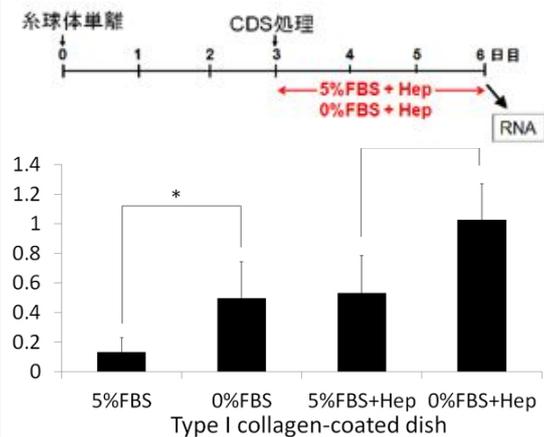
ヘパリン (heparin)、デキサメサゾン (dexamethasone) の効果

ヘパリンを培地に加えることによって、用量依存的に下図のようにネフリンの発現量を有意に増加させた (* p<0.05)。縦軸は単離糸球体の発現量を1としている。デキサメサゾンは有意に増加させなかった。他のポドサイト特異遺伝子(ポドシン、ポドカリキシン)でも、ヘパリンによって有意な増加が見られた。



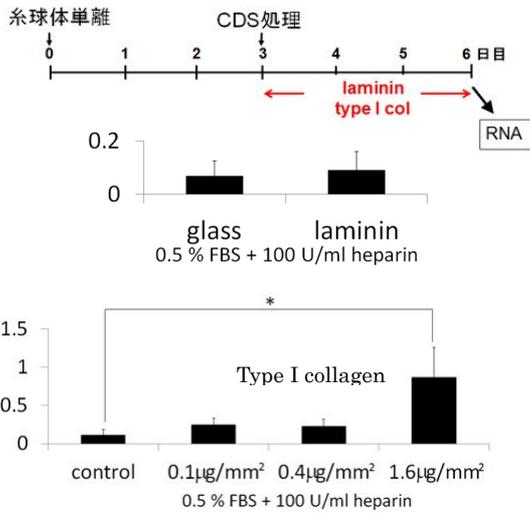
ウシ胎児血清 (FBS) の効果

培地中の FBS の濃度を低下または除くと、下図のようにネフリンの発現量は有意に増加した。この実験でもう一つ注目すべきは、基本培地(5% FBS)でのネフリン発現量が単離糸球体の1/10まで上昇していることである。これは、細胞剥離の時期を1日早め単離糸球体培養3日目に行なっていること、トリプシンに代わりに CDS を使っていること、I型コラゲンを新たにコーティングした培養皿を用いたことによる。

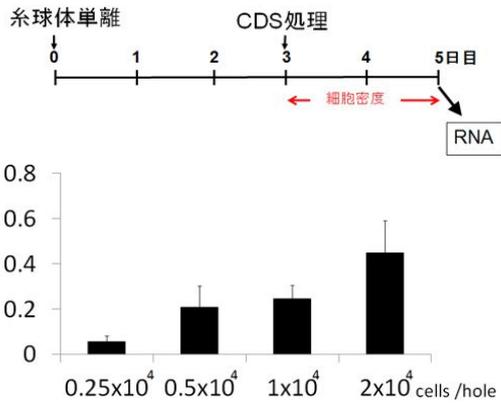


細胞外基質の効果

細胞外基質として、ラミニン、I型コラゲンを比較した。ラミニンはネフリンの発現量を有意に増加させることはなかった。I型コラゲンのコーティングは用量依存的にネフリンの発現量を増加させた。



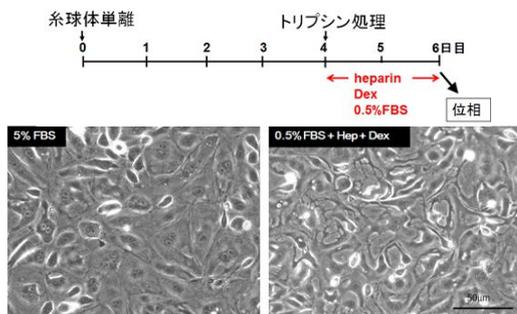
細胞密度の検討
細胞密度を上げ、in vivo のポドサイトと同じ接着面積にしたほうが、ネフリンの発現量は上昇した。



以上のネフリンの発現量をあげる条件の組み合わせによって、単離系球体レベル近くまで遺伝子の発現量をあげることが可能となった。VEGF の効果については、ネフリンの発現量が 1/1000 での状態では有意に特異遺伝子の発現を増加させたが、1/10 までに改善した状態では有意な変化を示さなかった。

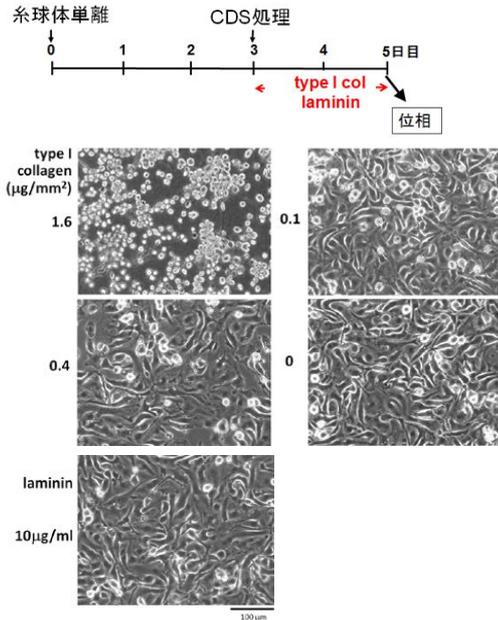
(2)形態からの検討

ヘパリン(Hep)、ウシ胎児血清 (FBS)、デキサメサゾン(Dex)の効果
位相差像は、ヘパリンによる変化は顕著ではないが、デキサメタゾン、低血清により、細胞内に索状の構造物を認め著明に変化する。

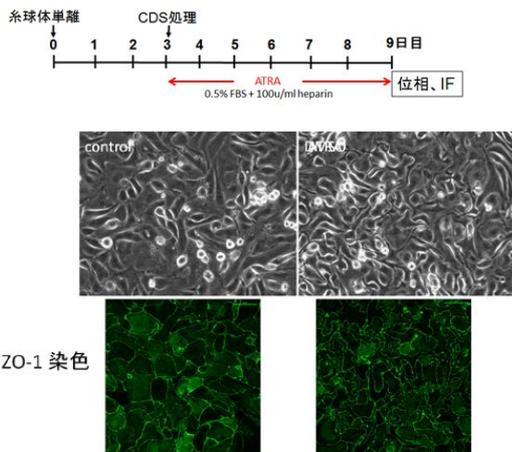


細胞外基質の検討

I 型コラーゲンコートは細胞の接着進展を阻害し、細胞は丸くなる傾向があった。対照的にラミニンは、細胞の接着進展を促進した。



all trans-retinoic acid (ATRA)の検討
ATRA を添加することによって、細胞間の入り組みを誘導することができた。



未だ in vivo の複雑な形態を再現できないが、デキサメサゾン、ATRA などの物質によって、in vivo の細胞の入り組みを誘導する手がかりが得られた。

(1)(2)の結果から、より in vivo に近い形質を示す培養条件が確立された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Zhang Y, Muller M, Xu B, Yoshida Y, Horlacher O, Nikitin F, Garessus S, Magdeldin S, Kinoshita N, Fujinaka H, Yaoita E, Hasegawa M, Lisacek F, Yamamoto T. Unrestricted modification search reveals lysine methylation as major modification induced by tissue formalin fixation and paraffin embedding.

Proteomics. 査読有 2015 Mar 30. doi: 10.1002/pmic.201400454.

Zhang Y, Xu B, Kinoshita N, Yoshida Y, Tasaki M, Fujinaka H, Magdeldin S, Yaoita E, Yamamoto T. Label-free quantitative proteomic analysis reveals strong involvement of complement alternative and terminal pathways in human glomerular sclerotic lesions. J Proteomics. 査読有 2015 123:89-100. doi: 10.1016/j.jprot.2015.03.024.

Koda R, Yoshino A, Imanishi Y, Kawamoto S, Ueda Y, Yaoita E, Kazama JJ, Narita I, Takeda T. Expression of tight junction protein claudin-1 in human crescentic glomerulonephritis. Int J Nephrol. 査読有 2014 2014:598670. doi: 10.1155/2014/598670.

Yaoita E, Yoshida Y, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Yamamoto T. Heparin increasing podocyte-specific gene expressions. Nephrology (Carlton). 査読有 2014 19:195-201. doi: 10.1111/nep.12207.

Magdeldin S, Yamamoto K, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Fujinaka H, Yaoita E, Yates JR 3rd, Yamamoto T. Deep proteome mapping of mouse kidney based on OFFGel prefractionation reveals remarkable protein post-translational modifications. J Proteome Res. 査読有 2014 13:1636-1646. doi: 10.1021/pr401122m.

矢尾板永信. 糸球体足細胞の培養系・腎と透析. 査読無 2014 77:406-411.

Cui Z, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Nameta M, Magdeldin S, Makiguchi T, Ikoma T, Fujinaka H, Yaoita E, Yamamoto T. Profiling and annotation of human kidney glomerulus proteome. Proteome Sci. 査読有 2013 11:13. doi: 10.1186/1477-5956-11-13.

Liu Z, Xu B, Nameta M, Zhang Y, Magdeldin S, Yoshida Y, Yamamoto K, Fujinaka H, Yaoita E, Tasaki M, Nakagawa Y, Saito K, Takahashi K, Yamamoto T. Profiling of kidney vascular endothelial cell plasma membrane proteins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Exp Nephrol. 査読有 2013 17:327-337. doi: 10.1007/s10157-012-0708-1.

Yoshida Y, Nameta M, Kuwano M, Zhang Y, Bo X, Magdeldin S, Cui Z, Fujinaka H, Yaoita E, Tomonaga T, Yamamoto T. Proteomic approach to human kidney glomerulus prepared by laser microdissection from frozen biopsy specimens: exploration of proteome after removal of blood-derived proteins. Proteomics Clin Appl. 査読有. 2012 6:412-417. doi: 10.1002/prca.201200016.

〔学会発表〕(計 5件)

矢尾板永信、西村宏子、行田正晃、山本格. ポドサイトにおける接着結合. 第 57 回日本腎臓学会, 2014.7.4, パシフィコ横浜(横浜)

行田正晃、吉田豊、矢尾板永信、許波、張エイ、山本格. 質量分析と免疫組織化学によるヒト糸球体プロテオームデータベースの比較, 第 56 回日本腎臓学会, 2013.5.10, 東京国際フォーラム(東京)

矢尾板永信、吉田豊、山本格. ラット足細胞初代培養におけるヘパリンの効果(2). 第 56 回日本腎臓学会, 2013.5.12, 東京国際フォーラム(東京)

水谷栄介、矢尾板永信、山本格. 糸球体単離時の尿細管混入が糸球体発現遺伝子量に与える影響について, 第 56 回日本腎臓学会, 2013.5.12, 東京国際フォーラム(東京)

矢尾板永信、山本格. ラット足細胞初代培養におけるヘパリンの効果. 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 2012.6.3, パシフィコ横浜(横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾板 永信 (YAOITA, Eishin)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 00157950

(2) 研究分担者

吉田 豊 (YOSHIDA, Yutaka)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号: 40182795

竹内 恒成 (TAKEUCHI, Kousei)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90206946

山本 格 (YAMAMOTO, Tadashi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 30092737