

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591214

研究課題名(和文)系球体足細胞スリット膜形成と再生に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism on the formation and renewal of slit membranes of glomerular podocyte

研究代表者

栗原 秀剛 (KURIHARA, HIDETAKE)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80311976

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)：系球体足細胞スリット膜は濾過の重要な装置である。我々は、スリット膜の形成と再生に関わる分子群を同定した。1)スリット膜蛋白として同定したMAGI-1のポドサイト特異的ノックアウトマウスを解析した結果、MAGI-1欠損マウスでは、スリット膜分子の膜への輸送が障害されることが判明した。さらに、aPKCがネフリン分子の細胞膜への移行に関わる重要な分子であることが分かった。2)スリット膜はタイト結合から派生する。我々はMyosin 1eがタイト結合の細胞頂部から底部への移動とスリット膜形成に関わることを見いだした。さらに、タイト結合分子の膜への輸送に関わるモーター分子としてKIF11を新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：The slit diaphragm (SD) plays an important role in permeability barrier function. We have identified several molecules associated with the formation and renewal of SD. 1) To assess the function of MAGI-1, we analyzed the podocyte-specific MAGI-1 deficient mice and found that the deletion of MAGI-1 caused the decrease of SD molecules at the plasma membrane. In addition, exocytosis of nephrin molecule is inhibited by podocyte-specific deletion of aPKC. Data indicate that both molecules are associated with the turnover of SD. 2) We have found that myosin 1e is tightly associated with the tight junction which moves from the apex to the base of immature podocyte during the development. Myosin 1e is also involved in the SD formation. Recently, we have determined that KIF11 is tightly associated with tight junctions of renal epithelial cells in vivo and in vitro. Calcium switch experiment and silencing of KIF11 indicate that KIF11 is involved in the tight junction formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腎臓学 足細胞 系球体濾過 細胞接着 ネフローズ

1. 研究開始当初の背景

糸球体の足細胞は、分裂能を失って高度に分化した細胞で、大きな細胞体とそこから伸びだした一次突起、さらに分岐した多数の足突起で糸球体表面を覆う。このユニークな形態を維持する機構は未だ明らかではないが、足細胞が特異な形態をとる背景には足突起間にある特殊な構造であるスリット膜の形成が重要であると考えている。スリット膜は糸球体基底膜とともに濾過障壁の不可欠な構成要素である。足細胞スリット膜の電子顕微鏡による解析から 20 年以上を経て、その構成分子ネフリンが発見され、その遺伝子異常が重篤なネフローゼの原因となることが判明したことにより、スリット膜が糸球体濾過の重要な装置であることが明らかとなった。申請者はネフリンの発見以前に、すでにスリット膜関連分子としてタイト結合 ZO-1 について詳細な解析を行い、スリット膜が細胞間接着構造から派生した構造であることを報告してきた。申請者らは、足細胞スリット膜の構成要素を明らかにすべく多くの研究を行っており、その過程でスリット膜の基部に局在するタイト結合蛋白 ZO-1 の α 要素を欠くアイソフォームが局在していること (Kurihara et al. PNAS 1992)、カドヘリンスーパーファミリーの一つ FAT-1 がスリット膜の構成蛋白であること (Inoue et al. Kidney Int 2000)、タイト結合に局在する足場蛋白 MAGI-1 がネフリンと直接結合してスリット膜形成に関与すること (Hirabayashi et al. Lab Invest 2005)、スリット膜分子ポドシンがスリット膜と細胞間接着構造両方の形成に関与すること (Shono et al. JASN 2007)などを明らかにしている。また、申請者らは、これまで足細胞を抗原として数多くのモノクローナル抗体を作成し、それらをツールとして不死化培養足細胞株の確立に尽力してきた。得られた数多くのクローンの解析をしていく中で、ス

リット膜分子を安定に発現する株を得ている。これらの細胞を使用して、培養条件を整えることによりスリット膜の *in vitro* 形成が可能ではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

申請者を含め、多くの研究者により、スリット膜の構成分子が明らかになってきたが、スリット膜を構成する分子群がいつ、どのように集合して構造体を形成するのか、何がその誘導に関わっているのか、培養細胞においてスリット膜は形成されるのかといった基本的な疑問については、何も明らかになっていない。申請者はこれまでのスリット膜研究を行ってきた経験を生かし、以上の3つの疑問を解き明かすことを目的として研究を進める。それにより、スリット膜に関する理解が飛躍的に発展し、濾過装置としてのスリット膜構造の詳細な生理学的解析を可能にすることができるものと考えられる。

3. 研究の方法

1) スリット膜の形成過程についての解析

蛍光抗体法と免疫電顕法を用いて、スリット膜分子 (Nephrin, Neph-1, Podocin, CD2AP, FAT-1, CAR)の発現について、足細胞分化のどのステージでどこに発現して行くかを詳細に解析する。足細胞の分化マーカーとして Podocalyxin、スリット膜とタイト結合に局在する ZO-1, MAGI-1, PAR3 を位置マーカーとして用いる。分子の共局在については免疫電顕の二重染色を行うが、その前段階として、効率良く広い視野で解析を行うため、STED(stimulated emission depletion)顕微鏡(本学環境医学研究所に設置済み)を使用する。この顕微鏡システムは従来の共焦点レーザー顕微鏡と同等の視野で 40nm の分解能を得ることができる。このシステムにより糸球体全体で分子の共局在を定量的に調べることができる。

2) MAGI-1 ノックアウトマウスの解析

ポドサイト特異的 MAGI-1 ノックアウトマウスは Dr. Kaufman (Mount Sinai, USA) により供与される。ノックアウトマウスとコントロールマウスについて、蛍光抗体法と免疫電顕法を用いて、スリット膜分子の発現について詳細に解析する。

3) スリット膜再生機構の解析

2 種類の腎炎モデルを中心に in vivo で解析を行う。5-1-6 腎症モデルでは一度に大量のスリット膜分子が乖離するために櫛の歯が抜けたような状態になり蛋白尿が発症するのではないかと予測し実験を進める。スリット膜の構造を免疫電顕と電子線トモグラフィーにより正常組織と 5-1-6 腎症モデルを比較して、スリット膜の 3 次元構造変化を詳細に解析する。aPKC ノックアウトマウスではスリット膜分子の代謝回転に障害があることが分かってきた。そこで、このマウスを用いてスリット膜再生における aPKC の役割を調べる。PKC ノックアウトマウスについては横浜市大の大野茂男教授より供与される。これらの 2 つのモデル系を用いてスリット膜分子の代謝回転について検討する。具体的には、腎のピオチン灌流でポドサイト細胞膜表面をピオチン標識し、経時的に糸球体を単離して細胞内へのスリット膜分子の取り込みの割合をイムノプロット法と免疫電顕法により調べる。取り込まれたピオチン標識分子と非標識分子との共局在の有無については STED 顕微鏡(環境研に設置済み)を用いることにより解析が可能である。

4) スリット膜形成に関わるモーター分子の解析

スリット膜の形成に関わるモーター分子として見いだされた myosin 1e の足細胞成熟過程における発現変化を調べる目的で、蛍光抗体法と免疫電顕法にて、myosin 1e の局在をタイト結合分子およびスリット膜分子との共局在により解析する。タイト結合形成にお

ける myosin 1e の役割については培養足細胞を用いて解析を行う。また、タイト結合とスリット膜に関連した新たなモーター分子を見いだすための探索を行う。

4. 研究成果

1) スリット膜形成過程についての解析

主要なスリット膜分子である、Nephrin、Podocin 及び Neph1 は、糸球体形成過程では別々なルート (Podocin と Neph1 はタイト結合からスリット膜へ、Nephrin は細胞膜からスリット膜へ移行する) からスリット膜として集合体を形成することを未分化な足細胞の免疫電顕による解析から明らかにした。未熟な足細胞においてはスリット膜が形成される過程で、タイト結合が頂部から細胞底部へ移動してスリット膜へ移行することが知られている。このタイト結合の移動はスリット膜が形成されるために必須であるが、それに関わる分子は不明であった。我々は米国の Krendel 博士と共同で、タイト結合の移動に関わる分子としてモーター蛋白である myosin 1e を見いだした。この分子は代表者が以前報告したスリット膜とタイト結合両方に局在する分子 ZO-1 と直接結合することも判明したことから、タイト結合からスリット膜への移行にも重要な役割を担っている可能性がある。この成果は Am J Physiol に論文として掲載した。その後の研究で、この分子がネフローゼ発症に伴う足突起間のタイト結合形成に ZO-1 とともに関わることが示唆された。さらに、タイト結合に関わるモーター蛋白を探索した結果、微小管モーター蛋白である KIF11 を見いだした。この分子は尿細管上皮細胞のタイト結合に一致して局在しており、細胞間接着分子の運び役としての可能性が示唆された。そこで、KIF11 がタイト結合に発現している培養細胞を調べた結果、MDCK 細胞と代表者が確立したラット腎由来の培養細胞でタイト結合での発現を確認した。これらの細胞を用いてタイト結合

分子と KIF11 の関係を解析し、KIF11 がタイト結合形成に重要な役割を担っていることを示唆する結果を得た。

2) スリット膜分子の再生機構の解析

新潟大学腎研の清水らによって作成された 5-1-6 モノクローナル抗体は Nephrin の細胞外ドメインを認識する抗体である。この抗体をラットに静注した後、抗体が結合したネフリンの動向を免疫電顕で解析した結果、5-1-6 抗体が結合した Nephrin 分子は Podocin とともにマイクロドメインを形成して apical 膜へ移動し、shedding によって尿中に放出されることが分かった。興味深いことにその際、Neph1 はマイクロドメイン形成に関わらないことも判明した。Neph1 のスリット膜再生における機能について、今後も研究を継続する。

以前、スリット膜分子 nephrin とタイト結合蛋白 MAGI-1 が直接結合し、スリット膜形成に関わることを報告しているが、MAGI-1 の役割を詳細に解析するために、米国の Kaufman 博士と共同でポドサイト特異的 MAGI-1 ノックアウトマウスの解析を行った。その結果、スリット膜の主要な分子である podocin と nephrin のシグナルがノックアウトマウスでは顕著に減少しており、その原因として合成された分子がスリット膜へ運ばれず、細胞内で消化されていることを示唆する結果を得た。MAGI-1 はスリット膜分子のソーティングに重要な役割を演じている可能性がある。MAGI-1 は Nephrin と直接結合することから、スリット膜の形成と安定化に重要であると考えられる。この結果は日本解剖学会総会にて報告した。

横浜市大の大野研究室との共同でスリット膜関連分子として以前に報告した (PLoS ONE 2009) aPKC-PAR3 複合体のスリット膜形成における役割についてさらに検討を進め、この aPKC がスリット膜の turnover に関わっており、特にスリット膜分子ネフリンが

膜に移行する exocytosis のステップに重要であることを初めて明らかにすることができた。この分子の機能が阻害されると、スリット膜の再生が正常に行われず、ネフローゼを発症することが分かってきた。この成果は J Biochem に発表した。

スリット膜形成の前段階として足突起形成が必要であるが、この足突起形成に myosin IIA が関わるということが判明した。この結果は米国細胞生物学会にて報告し、現在論文作成中である。本研究の成果として培養細胞を用いて一次突起と二次突起形成を自由にコントロールすることが可能となり、この系を用いてスリット膜の in vitro 形成に向けた準備を進めている。

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 14 件)

1. Kusaba G, Ohsawa I, Ishii M, Inoshita H, Takagi M, Tanifuji C, Takahashi K, Nakamoto J, Yoshida M, Ohi H, Horikoshi S, Kurihara H, Tomino Y: Significance of broad distribution of electron-dense deposits in patients with IgA nephropathy. Med Mol Morphol 査読有, 45(1), 2012, 29-34, DOI: 10.1007/s00795-011-0538-3 (平成 25 年度日本臨床分子形態学会論文賞)

2. Withanage K, Nakagawa K, Ikeda M, Kurihara H, Kudo T, Yang Z, Sakane A, Sasaki T, Hata Y: Expression of RASSF6 in kidney and the implication of RASSF6 and the Hippo pathway in the sorbitol-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells. J Biochem, 査読有, 152(1), 2012, 111-119
DOI: 10.1093/jb/mvs056 (第 21 回 JB 論文賞)

3. Kajiho Y, Harita Y, Kurihara H, Horita S, Matsunaga A, Tsurumi H, Kanda S, Sugawara N, Miura K, Sekine T, Hattori S, Hattori M, Igarashi T: SIRP Interacts with Nephrin at the Podocyte Slit Diaphragm. FEBS J, 査読有, 278(17), 2012, 3010-21
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08682.x

4. Ichimura K, Powell R, Fukuyo Y, Nakamura T, Tran U, Oda S, Tanaka M, Wessely O, Kurihara H, Sakai T, Obara T: A comparative analysis of glomerulus development in the pronephros of medaka and zebrafish. PLoS

One, 査読有, 7(9), 2012, e45286
DOI: 10.1371/journal.pone.0045286

5. Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Koike M, Piao J-H, Ehiken H, Kurihara H, Hara M, Pasparakis M, Van Rooijen N, Schutzi G, Ohmura Y, Uchiyama Y, Yagita H, Okumura K, He Y-W, Nakano H: c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. *Sci Signal*, 査読有, 5(255), 2012, ra93
DOI: 10.1126/scisignal.2003558

6. Kasagi H, Kuhara T, Okada H, Sueyoshi N, Kurihara H: Mesenchymal stem cell transplantation to the mouse cochlea as a treatment for childhood sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 査読有, 77(6), 2013, 936-42
DOI: 10.1016/j.ijporl.2013.03.011.

7. Bi J, Chase S, Pellenz C, Kurihara H, Fanning A, Krendel M: Myosin 1e is a component of the glomerular slit diaphragm complex that regulates actin reorganization during cell-cell contact formation in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 査読有, 305(4), 2013, F532-F544
DOI: 10.1152/ajprenal.00223

8. Ichimura K, Powell R, Nakamura T, Kurihara H, Sakai T, Obara T: Podocalyxin regulates pronephric glomerular development in zebrafish. *Physiol Rep*, 査読有, 1(3), 2013, e00074
DOI: 10.1002/phy2.74

9. Miura K, Kurihara H, Horita S, Chikamoto H, Hattori M, Harita Y, Tsurumi H, Kajiho Y, Sawada Y, Sasaki S, Igarashi T, Kunishima S, Sekine T: Podocyte expression of nonmuscle myosin heavy chain-IIA decreases in idiopathic nephrotic syndrome, especially in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 査読有, 28(12), 2013, 2993-3003
DOI: 10.1093/ndt/gft350.

10. Tsurumi H, Harita Y, Kurihara H, Kosaka H, Hayashi K, Matsunaga A, Kajiho Y, Kanda S, Miura K, Sekine T, Oka A, Ishizuka K, Horita S, Hattori M, Hattori S, Igarashi T: Epithelial protein lost in neoplasm regulates PDGF-mediated focal adhesion dynamics and motility of glomerular mesangial cells. *Kidney Int*, 査読有, 86, 2014, 548-557
DOI: 10.1038/ki.2014.85.

11. Satoh D, Hirose T, Harita Y, Daimon C, Harada T, Kurihara H, Yamashita A, Ohno S: aPKCλ maintains the integrity of glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. *J Biochem*, 査読有, 156(2), 2014, 115-128

DOI: 10.1093/jb/mvu022.

12. Ning L, Kurihara H, de Vega S, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E: Laminin alpha1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGFbeta pathway. *Am J Pathol*, 査読有, 184(6), 2014, 1683-94

DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.02.006.

13. Kobayashi N, Ueno T, Ohashi K, Yamashita H, Takahashi Y, Sakamoto K, Manabe S, Hara S, Takashima Y, Dan T, Pastan I, Miyata T, Kurihara H, Matsusaka T, Reiser J, Nagata M: Podocyte injury-driven intracapillary plasminogen activator inhibitor type 1 accelerates podocyte loss via uPAR-mediated 1-integrin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 査読有, 308(6), 2014, F614-26

DOI: 10.1152/ajprenal.00616.2014.

14. Saito K, Shiino T, Kurihara H, Harita Y, Hattori S, Ohta Y: Afadin regulates RhoA/Rho-associated protein kinase signaling to control formation of actin stress fibers in kidney podocytes. *Cytoskeleton*, 査読有, in press

DOI: 10.1002/cm.21211

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Ichimura K, Bubenshchikova E, Fukuyo Y, Powell R, Hsu C, Tran U, Tanaka M, Wessey O, Kurihara H, Sakai T, Obara T: Using both medaka and zebrafish to study glomerulus development and slit diaphragms. The 9th International Podocyte Conference (Miami) (2012年4月22日)

2. Tsurumi H, Harita Y, Kurihara H, Kajiho Y, Kanda S, Miura K, Sekine T, Hattori M, Igarashi T: EPLIN (Epithelial protein lost in neoplasm) interacts with paxillin and regulates mesangial migration. American Society of Nephrology Renal week 2012 (San Diego) (2012年11月3日)

3. 椎野達大、齊藤康二、望月優加、栗原秀剛、張田豊、柴垣芳夫、服部成介、太田安隆: RacGAP 因子 FilGAP は Afadin と結合し、腎糸球体上皮細胞におけるアクチン細胞骨格形成を制御する、第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ "Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質による情報伝達制御" (福岡、福岡国際会議場) (2012年12月14日)

4. Kurihara H, Sakai T: Myosin IIA regulates the cellular architecture of podocyte. 52nd Annual Meeting of the American Society of Cell Biology (San Francisco) (2012年12月18日)

5. 栗原秀剛: ポドサイトの形態変化に関わる細胞骨格系蛋白、第 56 回日本腎臓学会学術総会シンポジウム "タンパク尿と Podocyte

Biology”(東京、東京国際フォーラム)(2013年5月10日)

6. 栗原秀剛、坂井建雄：ポドサイトの突起形成におけるミオシンIIAの役割。第45回日本臨床分子形態学会総会シンポジウム「臨床・病理から見た分子形態学の病態解明へのインパクト」(福岡、アクロス福岡)(2013年9月13日)

7. Takizawa H, Sakai T, Kurihara H: Heterologous expression of nestin is involved in cell-cell contact inhibition. 53rd Annual Meeting of the American Society of Cell Biology (New Orleans) (2013年12月17日)

8. 栗原秀剛、坂井建雄：足細胞形態制御の分子機構。第119回日本解剖学会総会、解剖学会・生理学会合同シンポジウム”腎臓の機能と形態-update-”(栃木、自治医大)(2014年3月29日)

9. 中村聡、岸龍馬、栗原秀剛、坂井建雄：腎臓における微小管モーター蛋白KIF11の局在について、ポスター、第1報、第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(栃木、自治医大)(2014年3月27日)優秀演題賞 受賞

10. 岸龍馬、中村聡、栗原秀剛、坂井建雄：腎臓における微小管モーター蛋白KIF11の局在について、ポスター、第2報、第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(栃木、自治医大)(2014年3月27日)

11. 栗原秀剛、坂井建雄：中間径線維タンパクネスチンの足細胞における発現とその機能的意義について、口演、第57回日本腎臓学会学術総会(横浜、パシフィコ横浜)(2014年7月6日)

12. 栗原秀剛、坂井建雄：足細胞の細胞間接着を制御する新たな機構について、第46回日本臨床分子形態学会総会・学術集会シンポジウム”腎疾患の病態解明における分子形態学の現状と今後の展望”(東京、TKP市ヶ谷カンファレンスセンター.) (2014年10月18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 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

栗原 秀剛 (KURIHARA, Hidetake)

順天堂大学・医学部・前任准教授

研究者番号：80311976

(2) 研究分担者

市村 浩一郎 (ICHIMURA, Koichiro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10343485