

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461617

研究課題名(和文) 膜性増殖性糸球体腎炎におけるメサンギウム細胞内シグナルの病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of subcellular signals in mesangial proliferative glomerular nephritis

研究代表者

鶴見 晴子 (TSURUMI, HARUKO)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：20632269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)は、補体調節不全や糸球体への免疫複合体沈着を端緒として発症するが、特徴的なメサンギウム細胞の形態変化がおこるメカニズムは不明である。本研究によりF-actin結合蛋白質EPLINおよび細胞間蛋白質Afadinの正常腎における発現の詳細と膜性増殖性糸球体腎炎などの患者および動物モデルにおける発現変化を解析し、それら分子の発現量により刺激に対する細胞の挙動が変わることが明らかにされた。腎炎の病態形成過程において、メサンギウム細胞の骨格蛋白質の時間空間的な発現変化や局在変化が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined precise localization of F-actin binding protein EPLIN and intercellular junction protein Afadin in mesangial cells in vivo and in vitro and found alteration of expression and localization of these cytoskeletal regulators underlies phenotypical change of mesangial cells induced by mitogens (Tsurumi H. et al. Kidney Int. 2014, Tsurumi H. et al. Lab Invest. 2016). Comprehensive investigation of spatiotemporal dynamics of mesangial intercellular molecules is warranted to elucidate precise mechanisms of mesangial proliferative glomerulonephritis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児腎・泌尿器学 病理学 細胞・組織 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)は、メサンギウム細胞の増殖と基底膜の二重化病変を主体とする難治性の腎疾患で、全腎生検患者の約7-10%に認められる(Sethi S et al. N Eng J Med. 2012)。原因不明の特発性と、C型肝炎や膠原病などに続発する二次性に分類される。中には高血圧、腎機能低下を示す症例もあり、50-60%が10-15年で末期腎不全に至り人工透析や腎移植を要する。高電子密度沈着物の存在様式により3型に分類され、Type1および3ではメサンギウム領域および糸球体係蹄壁にC3など補体成分を含む免疫複合体が沈着する。補体のみの沈着を示すType2は近年先天的な補体の調節異常(I因子とH因子の変異および欠損)により発症することが明らかになっているが(Pickering MC et al. Nat Genet. 2002, Rose KL et al. J Clin Invest. 2008)、これらの症例では腎不全に対し腎移植を施行した後も高頻度に再発することが問題となる(Andresdottir MB et al. Nephrol Dial Transplant. 1999)。局所における補体の活性化がこの病態の本態であることが明確であり、実際にMPGN患者に対し抗C5抗体(エクリズマブ)が有効であると報告され始めている(Sethi S et al. N Eng J Med. 2012, Smith RJ et al. J Am Soc Nephrol. 2007)。病理学的にはいずれのTypeにおいても糸球体基底膜が二重化し、メサンギウム角(mesangial angle)を起点としてメサンギウム突起(mesangial process)が内皮下へ陥入するmesangial interpositionの像を呈することが特徴である。しかし、このような特徴的な構造変化がどのようにして惹起されるかという分子メカニズムは多くが不明である。補体により傷害された内皮細胞から産生されるPDGFがメサンギウムに作用するという説(Kubo et al. Nephron 1994)、補体最終産物C5b-9やC3a, C5a受容体を介した補体によるメサンギウム細胞の直接傷害の可能性も示唆されているが(Couser WG et al.

Kidney Int. 2001, Nangaku M et al. J Am Soc Nephrol. 1997, Wan JX et al. J Cell Physiol. 2007, Shushakova N et al. J Cell Sci. 2005)、これらはすべてin vitroにおける細胞の表現型の変化を観察したものであり、生体内でどのような因子により糸球体の変化がどのように起こり、さらにそれが進行するプロセスの詳細については報告がない。

研究代表者らはこれまでメサンギウム細胞の形態の維持、運動、収縮などの機能を担う細胞骨格タンパク質による制御について研究し、この細胞独自の細胞骨格や接着分子群を明らかにした。そのうち、F-アクチンを架橋し束化するEPLIN(epithelial protein lost in neoplasm)がメサンギウム細胞に多く発現し、特にmesangial angleに伸びるmesangial processesに強く集積し、そこで接着斑蛋白質paxillinと結合しており、PDGFの刺激下では離れることを明らかにした。またEPLINの発現を抑制すると、メサンギウム細胞の接着斑が消失し、細胞の運動性が亢進することから、EPLINがメサンギウム細胞の形態、運動性を制御していることが明らかになった(2012年日本小児腎臓病学会、2012年日本腎臓病学会、2012年アメリカ腎臓学会発表)。さらに分担研究者らはDipeptidyl peptidaseが補体依存的なメサンギウム細胞の変化を抑制することを見だし(Shinosaki et al. Lab Invest. 2002)、糸球体細胞間のシグナル伝達が腎炎の発症と関連している可能性についても報告してきた(Kurihara H et al. Am J Physiol Renal Physiol.)。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの研究を進展させ、MPGNにおいて補体をはじめ各刺激因子がどのように特徴的なメサンギウム細胞の形態変化を引き起こすのかを明らかにすることを目的とした。研究は4つのステップからなる。まず(1)MPGNの腎生検標本を用いてメ

サンギウム細胞の形態変化の詳細を検討する。研究代表者らが新たに明らかにしたこの細胞独自の細胞骨格制御因子や接着分子群の発現や局在を MPGN において経時的に観察し、その変化を明らかにする。次に(2)補体および各刺激因子による影響を解析するため、培養メサンギウム細胞に刺激因子を作用させ、メサンギウム細胞での蛋白および遺伝子発現変化を網羅的に解析する。(3)(1)や(2)で認められた変化が実際にメサンギウム細胞に影響するかどうかを検討するため、候補分子群の抑制あるいは強発現による細胞の形態および機能変化を検討する。

3. 研究の方法

(1) MPGN におけるメサンギウムの形態変化の分子的検討

研究代表者らはメサンギウム細胞の細胞生物学的な側面から EPLIN をはじめとした細胞骨格や接着分子群がメサンギウム増殖性腎炎動物モデルのメサンギウム細胞において変化することを見いだしている。また動物モデルでメサンギウム細胞の発現が変化することが報告されているが、メサンギウム増殖性腎炎あるいは MPGN で検討されていない一連の分子群も存在する(Hic-5, Vinculin, Paxillin 等)。本研究ではまずメサンギウム細胞に発現する分子の発現や細胞内局在が MPGN 病変において経時的にどのように変化するかを検討するため、パラフィンおよび凍結切片を用いた蛍光染色、ならびに免疫電子顕微鏡を用いた評価を行う。特に mesangial angle から陥入する mesangial interposition の構造に着目し、細胞突起の形態、細胞骨格の成分の局在変化を明らかにする。また、IgA 腎症などに伴って認める mesangial interposition についても同時に解析を行い、MPGN との類似点、相違点について検討する。

(2) 補体および各種刺激因子によるメサンギウム細胞内シグナルの網羅的解析

補体による影響の解析のため、培養メサンギウム細胞に補体および刺激因子を作用させ、細胞での蛋白質及び遺伝子発現変化を解析する。変化が認められた分子群について実際に MPGN 患者で変化が認められるか(1)の系に立ち返り、評価する。

(3) メサンギウム細胞の形態・機能変化に対する補体作用の解析

(1)(2)で MPGN において変化が認められた分子群が実際にメサンギウム細胞の形態変化に関与するかを検討する。ヒト培養メサンギウム細胞において当該分子の抑制あるいは強発現を行い、メサンギウム細胞の形態/運動性変化などを検討する。この解析により、ある特定の分子群が MPGN の変化の原因となっている可能性を探索する。

(4) 腎炎モデル動物における MPGN 病態の経時的变化の追跡

(1)~(3)で変化の見られた分子群が経時的にどのように変化するか腎炎モデル動物によって検証する。

4. 研究成果

メサンギウム細胞の細胞形態制御する因子の機能解析を行い、F-アクチンを架橋し束化する EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm)がメサンギウム細胞のメサンギウム突起に強く集積し、接着斑蛋白質 Paxillin と結合し PDGF の刺激下で離れることを見いだした。EPLIN の発現を抑制するとメサンギウム細胞の接着斑が消失し、細胞の運動性が亢進すること、また EPLIN の発現が IgA 腎症や MPGN などのメサンギウム増殖性腎炎患者の糸球体およびラットの糸球体腎炎モデルで低下していることから腎炎発症の背景にメサンギウム細胞の接着斑や細胞骨格の変化があることが示され、その結果を論文発表した(Tsurumi H.et al. Kidney International 2014)。

さらに、細胞間蛋白質として Afadin 及び

β -catenin を見だし、ヒト及びラットの腎切片と培養メサンギウム細胞における局在の詳細を解析した。ラットの腎炎モデル及び患者腎組織ではメサンギウム細胞間の Afadin 発現は低下していた。ラットの腎炎モデル及び Afadin 発現を抑制した培養メサンギウム細胞では、平面内細胞極性を示すゴルジ体の配向が喪失し、細胞の運動性が低下していたことが示され、その結果を論文発表した (Tsurumi H. et al. Lab Invest. 2016)。

以上の知見より、膜性増殖性糸球体腎炎などの腎炎進行には、メサンギウム細胞の骨格蛋白質の時間空間的な発現変化や局在変化が関わることを示された。今後は、メサンギウム細胞において刺激前後で変化する分子の網羅的探索と腎炎進行に関わる分子メカニズムの詳細説明が求められる。

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 7 件)

1. Tsurumi H, Kurihara H, Miura K, Tanego A, Ohta Y, Igarashi T, Oka A, Horita S, Hattori M, Harita Y. Afadin is localized at cell-cell contact sites in mesangial cells and regulates migratory polarity. *Lab Invest*. 2016, 査読有
2. Tsurumi H, Harita Y, Kurihara H, Kosako 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 modulates platelet-derived growth factor-mediated adhesion and motility of mesangial cells. *Kidney Int*. 2014, 査読有
3. Harita Y, Ishizuka K, Tanego A, Sugawara N, Chikamoto H, Akioka Y, Tsurumi H, Miura K, Gotoh Y, Tsujita M, Yamamoto T, Horike K, Takeda A, Oka A, Igarashi T, Hattori M. Decreased glomerular filtration as the primary factor of elevated circulating suPAR levels in focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2014, 査読有
4. Satoh D, Hirose T, Harita Y, Daimon C, Harada T, Yamashita A, Ohno S. aPKC λ maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. *J Biochem*. 2014, 査読有
5. Isojima T, Harita Y, Furuyama M, Sugawara N, Ishizuka K, Horita S, Kajiho Y, Miura K, Igarashi T, Hattori M, Kitanaka S. LMX1B mutation with residual transcriptional activity as a cause of isolated glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2014, 査読有
6. Ning L, Kurihara H, de Vega S, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E. Laminin α 1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF- β pathway. *Am J Pathol*. 2014, 査読有
7. 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*. 2013, 査読有

[学会発表](計 13 件)

1. Tsurumi H, Harita Y, Kurihara H, Miura K, Hattori M, Oka A: Alteration of mesangial cell-cell junction in glomerulonephritis is associated with directional migration. Asian Society for Pediatric Research. (2015年4月15日)(Osaka, Japan)
2. 鶴見晴子, 栗原秀剛, 三浦健一郎, 服部元史, 張田豊: 細胞間蛋白質 Afadin はメ

- サンギウム細胞の極性を維持し細胞運動性を制御する、日本腎臓病学会。(2015年6月5日)(名古屋)
3. 鶴見晴子、栗原秀剛、三浦健一郎、張田豊：メサンギウム細胞接着構造は極性形成に必要であり細胞運動を制御する、日本小児腎臓病学会。(2015年6月26日)(神戸)
 4. 張田豊：ネフローゼ症候群の遺伝子解析、第53回遺伝子医学研究会(招待講演)(2015年7月25日)(新宿)
 5. 張田豊：蛋白尿の成因。日本腎臓病学会。(2014年7月4日)(横浜)
 6. 張田豊；蛋白尿の分子生理学、近畿小児腎臓研究会(招待講演)(2015年3月28日)(大阪)
 7. Tsurumi H, Harita Y, Kurihara H, Miura K, Hattori M, Oka A, Igarashi T: Coordinated actin remodeling of mesangial cells by epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) in mesangial proliferative glomerulonephritis. Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting. (2014年5月4日)(Vancouver, Canada)
 8. 鶴見晴子、張田豊、栗原秀剛、林健二、小迫英尊、服部元史、服部成介、岡明、五十嵐隆：EPLIN(Epithelial protein lost in neoplasm)は接着斑を安定化し、PDGF刺激によるメサンギウム細胞の運動性を制御する、第36回日本分子生物学会年会。(2013年12月5日)(神戸)
 9. Haruko Tsurumi, Yutaka Harita, Hidetake Kurihara, Yuko Kajiho, Shoichiro Kanda, Kenichiro Miura, Takashi Sekine, Motoshi Hattori, Takashi Igarashi: EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm) interacts with paxillin and regulates mesangial migration. American Society of Nephrology Kidney Week 2012, (2012年11月2日)(San Diego, CA)
 10. Haruko Tsurumi, Yutaka Harita, Hidetake Kurihara, Yuko Kajiho, Kenichiro Miura, Takashi Igarashi: Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) regulates actin dynamics and motility of glomerular mesangial cells. 2012 Pediatric Academic Societies Annual Meeting (2012年4月29日)(Boston, Massachusetts)
 11. Haruko Tsurumi, Yutaka Harita, Kenichiro Miura, Takashi Igarashi: Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) regulates actin dynamics and motility of glomerular mesangial cells. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research (2012年5月18日)(Seoul, Korea)
 12. 鶴見晴子、張田豊、栗原秀剛、梶保祐子、神田祥一郎、三浦健一郎、関根孝司、服部元史、五十嵐隆、EPLIN(Epithelial protein lost in neoplasm)はアクチン細胞骨格を介してメサンギウム細胞の運動性を制御する、第55回日本腎臓病学会学術総会(2012年6月2日)(横浜)
 13. 鶴見晴子、張田豊、栗原秀剛、林健二、神田祥一郎、三浦健一郎、関根孝司、大野茂男、服部成介、五十嵐隆、アクチン結合蛋白質 EPLIN(Epithelial protein lost in neoplasm)は paxillin と結合し、メサンギウム細胞の運動性を制御する、第3回分子腎臓フォーラム(2012年9月1日)(東京)
6. 研究組織
- (1)研究代表者
鶴見 晴子 (TSURUMI, HARUKO)
東京大学・医学部附属病院・登録研究員
研究者番号：20632269
 - (2)研究分担者
張田 豊 (HARITA, YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10451866

服部 元史 (HATTORI, MOTOSHI)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50192274

栗原 秀剛 (KURIHARA, HIDETAKE)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80311976