

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670427

研究課題名(和文)ポドサイトパチーにおけるRhoファミリーG蛋白質を介する形態機能連関

研究課題名(英文)Structure-function association in podocytopathy via Rho family small G proteins

研究代表者

長瀬 美樹 (Nagase, Miki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60302733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量G蛋白質Rac1は多機能分子で、細胞骨格制御、酸化ストレス惹起、遺伝子転写制御、細胞の運動性など、多様な生物機能を細胞ごとに特異的な機序で調節する。本研究では腎系球体ポドサイトにおけるRac1の役割を形態機能連関に着眼して解析するとともに、他細胞における役割と比較した。ポドサイトではRac1活性が過剰でも過小でもポドサイト傷害、アルブミン尿、糸球体硬化を生じ、またアクチン細胞骨格、細胞の運動性に影響を及ぼした。マクロファージRac1はM1サイトカイン産生を介して炎症性急性腎障害発症に関わり、心筋細胞のRac1はNOX4誘導を介して圧負荷心不全に寄与した。

研究成果の概要(英文)：Rac1, a Rho family small GTPase, is a multi-functional molecule that controls cytoskeleton, oxidative stress, gene transcription, and cell motility, in a cell-specific manner. In this study, we analyzed the role of Rac1 in the pathobiology of glomerular podocytes, focusing on the structure-function association, and compared its roles in other cells. In podocytes, both Rac1 hyperactivation and hypoactivation resulted in podocyte injury, albuminuria, and glomerulosclerosis, and affected actin cytoskeleton and cell motility by distinct mechanisms. Macrophage Rac1 played a central role in lipopolysaccharide-evoked acute kidney injury through M1 cytokine production. Cardiomyocyte Rac1 contributed to the pressure overload-induced heart failure via induction of NOX4.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト傷害、Rac1、アクチン細胞骨格、細胞の運動性、低分子量G蛋白質、鉍質コルチコイド受容体、マクロファージ、心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、慢性腎臓病(CKD)が新たな国民病と認識され、その病態の中核をなす蛋白尿の成因としてポドサイト障害が注目されている。ポドサイトは細胞体から多数の一次突起、足突起を出し、足突起間にはスリット膜が形成されサイズバリア機能を担う。ポドサイトが障害されると foot process effacement (足突起消失)という電顕像を呈し、障害から回復すると再度足突起を形成してくる。こうしたポドサイトの精巧でダイナミックな構造変化には細胞骨格が重要で、その制御因子として Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rac1、RhoA、Cdc42)の役割が想定されている。

(2) Rho ファミリーの一員である Rac1 は、アクチン細胞骨格、活性酸素種の生成、遺伝子転写制御、細胞の運動性など、多彩な細胞機能を制御する分子である。最近、ポドサイトの形態機能維持には RhoA と Rac1 のバランスが重要で、RhoA 優位であればポドサイトは健康な静的表現型を、Rac1 優位であれば病的な動的表現型をとる、という motile podocyte 仮説が提唱された(Mundel P et al. *Kidney Int* 2010)。そしてポドサイトにおいて、angiotensin II や糖尿病状態、PAN、LPS といったポドサイト傷害惹起因子、HIV 感染、ある種の遺伝子異常で Rac1 が過剰活性化されるとポドサイトの運動性が亢進し、foot process effacement が生じるといった、この仮説を裏付ける報告が相次いでなされた(Nagase M et al. *Nat Rev Nephrol* 2013)。

(3) 申請者は生活習慣病に伴うポドサイト障害について早くから着目し、Rho ファミリー、アルドステロン/MR 系、アルブミンなどの役割につき報告を重ねてきた(Nagase et al. *HTN* 1997; Hino et al. *BBRC* 2005; Shibata et al. *JASN* 2006; Nagase et al. *HTN* 2006; Nagase et al. *JASN* 2006; Shibata et al. *HTN* 2007; Nagase et al. *HTN* 2007; Yoshida et al. *Nephron* 2008)。さらに、RhoGDI α 遺伝子欠損(KO)マウスという腎特異的 Rac1 活性化モデルの解析を通じて、Rac1 によるリガンド非依存的 MR 活性化が様々な CKD モデルで認められ、足細胞傷害の病態に重要であること、Rac 阻害薬が新規治療薬となりうることを報告した(Shibata, Nagase et al. *Nat Med* 2008; Shibata et al. *JCI* 2011; Kawarazaki et al. *JASN* 2012)。しかしながら、Rac1 活性化がポドサイト障害を引き起こす分子機序は十分に解明されていない。

(4) 一方、motile podocyte 仮説では説明できない遺伝子改変マウスの表現型も報告され、従来解析法の問題点も浮き彫りにされている。例えば、Rho ファミリーの解析には時空間的パターンを考慮する必要性が指摘され

ている(Machacek M et al. *Nature* 2009)。すなわち、細胞や臓器丸ごとでの活性ではなく細胞の局所における活性を評価すべきであること、胎生期より恒常的に活性化/欠失させ続けるのではなく人為的に活性化/抑制を誘導するメリットが説かれている。

(5) ポドサイトパチーでは Rac1 活性化・RhoA 不活性化、細胞骨格再構築を介する機序が提唱されており、心臓病では Rac1・RhoA 同時活性化、酸化ストレスを介する機序が大半を占める。血管では RhoA 活性化による血圧上昇の報告が多い。こうした標的臓器・細胞による Rho ファミリーの意義の差異を解明できれば、創薬を進める上での有益な情報源となりうる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ポドサイトにおける Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質、特に Rac1 の役割を検討すべく、ポドサイト特異的に胎生期より Rac1 を過剰活性化ないし完全欠損させたマウスにおけるポドサイト障害、アルブミン尿、糸球体硬化とその分子メカニズムを対比解析することを目的とする。また、ポドサイトにおける役割を、他臓器・多細胞における Rac1 の役割と比較するために、マクロファージ特異的 Rac1 KO マウス、心筋特異的 Rac1 KO マウスを作製し、機能解析を行う。

(2) 培養ポドサイト細胞株において siRNA を用いて、Rac1 過剰活性化ポドサイト、Rac1 欠損ポドサイトを作製する。また、Wu らが開発したストラテジー(Wu et al. *Nature* 2009)を応用し、光照射により時間・部位特異的に、人為的かつ可逆的に Rac1 を活性化させる系を確立する。これらの系を用いて、Rac1 活性化部位や遠隔部位における細胞膜近傍の形態(ラメリポディア、ラフリングなど)、細胞骨格構築(アクチンフィラメント、中間系フィラメント、微小管)、ポドサイト一次突起や足突起の超微細構造、ポドサイトの運動性や透過性、アルブミン尿、Rac1 と RhoA/Cdc42 シグナルのクロストークなど、形態機能連関という観点からポドサイト傷害のメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ポドサイト特異的 Rac1 恒常活性化系・恒常欠損系におけるポドサイト障害の分子メカニズムの解析

Cre-loxP システムを用いて、Nphs1-Cre マウスと RhoGDI α flox/flox マウスを交配して、ポドサイト特異的 Rac1 恒常活性化型(Cre 陽性・RhoGDI α flox/flox) マウスと対照(Cre 陰性・RhoGDI α flox/flox)マウスを得る。同様に、Nphs1-Cre マウスと Rac1 flox/flox マウスを交配して、ポドサイト特異的 Rac1 恒

常欠損 (Cre 陽性・Rac1 flox/flox) マウスと対照 (Cre 陰性・Rac1 flox/flox) マウスを得る。ポドサイト特異的 Rac1 恒常活性型マウス、ポドサイト特異的 Rac1 恒常欠損マウスがいずれも足細胞障害、糸球体硬化を自然発症することはすでに確認している。両マウスにおいてポドサイト関連分子の発現、Rac1 と associate する分子の同定、RhoA/Cdc42 活性の評価、ポドサイト障害機序の差異 (細胞骨格、酸化ストレス、リン酸化蛋白など) を探索する。

(2) マクロファージ特異的 Rac1 恒常欠損マウスの作製と腎臓表現型の解析

LysM-Cre マウスと Rac1 flox/flox マウスを交配して、ポドサイト特異的 Rac1 恒常欠損 (Cre 陽性・Rac1 flox/flox) マウスと対照 (Cre 陰性・Rac1 flox/flox) マウスを得る。

これらマウスにおいて、LPS (E. coli 0111:B4, Sigma, 5 mg/ml 腹腔内注射) ないし vehicle (PBS) を投与して急性尿細管障害モデルを作製し、浸潤マクロファージ・好中球数の評価、マクロファージ M1 サイトカインの遺伝子発現変化、NADPH oxidase 活性、活性酸素種量などを比較解析する。

マウス *in vivo* の系で同定されたマクロファージ Rac1 シグナル系について、マクロファージ培養細胞株 RAW264.7 においても成立する可否かを検討する。

(3) 心筋特異的 Rac1 恒常欠損マウスの作製と心臓表現型の解析

Myh6-Cre マウスと Rac1 flox/flox マウスを交配して、心筋細胞特異的 Rac1 恒常欠損 (Cre 陽性・Rac1 flox/flox) マウスと対照 (Cre 陰性・Rac1 flox/flox) マウスを得る。Cre 陽性・Rac1 flox/flox (ホモ) は胎生致死であったため、Cre 陽性・Rac1 flox/wt (ヘテロ) を用いて解析した。

これらマウスにおいて、transverse aortic constriction (TAC) 手術を施行し、慢性圧負荷心不全モデルを作製する。心機能を心エコー、心臓カテーテル検査にて評価する。心肥大、炎症性因子、酸化ストレスマーカーなどを比較解析する。

(4) 培養ポドサイト細胞における遺伝子ノックダウン解析

培養ポドサイト細胞株において、siRNA を用いて RhoGDI α ノックダウン (KD)、Rac1 KD 操作を行い、Rac1 活性化ポドサイト、欠失ポドサイトを作製し、細胞形態や motility の変化を位相差顕微鏡、タイムラプス蛍光顕微鏡で解析する。Rac1 の活性化状態、PAK 以下下流シグナルの変化につき解析する。細胞骨格の変化を、アクチン、チューブリン、ビメンチンなどの免疫染色、電子顕微鏡による超微細構造の解析などで評価す

る。細胞の運動性、透過性の評価を、wound healing assay、アルブミン透過性試験などで行う。

(5) ポドサイトにおける Rac1 活性の *in situ* での可視化手法の確立

通常の GST pull down 法に加え、活性型 Rac1 を特異的に検出する抗体を用いて、免疫蛍光染色により Rac1 活性化状態とその局在を可視化し解析する方法を確立する。

(6) 光照射により時間・部位特異的にポドサイト Rac1 を活性化・不活性化させる系の確立と形態機能解析

すでに入手済みのプラスミド LOV(Leu404-Leu546)-Rac1(Ile4)-Q61L/E91H/N92H を用いて、ポドサイト細胞株に過剰発現させる。ヒト、ラットポドサイト細胞株の中で、トランスフェクション効率のよいものを探索する。

LOV ドメインの吸収極大である 450 nm 付近の波長の青レーザーを照射し、Rac1 の活性化状態を、(5) で確立する *in situ* での Rac1 活性測定法で評価する。Rac1 活性を人為的に変化させた際の細胞形態、機能変化、下流シグナルの変化を (4) の手法で解析する。

4. 研究成果

(1) ポドサイト特異的 RhoGDI α KO マウスと Rac1 KO マウスを作製したところ、両マウスともポドサイト障害を自然発症した。電子顕微鏡解析で、foot process effacement、スリット膜消失、microvillous transformation などの非特異的ポドサイト傷害所見を認めた。前者には Rac1 過剰活性化、鋳質コルチコイド受容体 (MR) 活性化が関与しており、Rac 阻害薬や MR 拮抗薬が有用であった。後者では MR シグナルは低下しており、MR 拮抗薬は無効で、異なるメカニズムの関与が示された。ポドサイト特異的 Rac1 KO マウスではアクチン線維の特徴的配列ははじめ、RhoGDI KO マウスとは異なる特異的な形態変化がいくつか認められた。以上より、ポドサイトの形態機能維持には適正レベルの Rac1 活性が必要で、過剰でも過小でもポドサイト傷害が生じることが示された。

(2) マクロファージ Rac1 の炎症性急性尿細管障害における役割

マクロファージ特異的 Rac1 KO マウス (M-Rac1 KO) は通常飼育下では腎機能に異常を認めなかった。そこで LPS 投与急性腎障害モデルを作製した。LPS の腹腔内投与により、対照マウス (M-Rac1 FC) では BUN、血清クレアチニン値が著明に上昇し、腎障害マーカー Kim-1 や Ngal の発現亢進を、腎病理組織で尿細管障害の所見を認めた。一方、マクロファージ特異的 Rac1 KO マウスでは LPS によるこ

うした腎障害がほぼ完全に回避された。対照群ではLPS投与によりマクロファージ由来炎症性サイトカイン(IL-6, TNF α)のmRNA発現が著明に増加し、それと並行してRac1活性化、NADPH oxidase活性化、活性酸素種の過剰産生が生じた。これらの変化はマクロファージ特異的Rac1 KOマウスで抑制されていた。LPSはF4/80陽性マクロファージの腎への浸潤を促進し、これはマクロファージ特異的Rac1 KOマウスでも同等に生じていた。

培養マクロファージ細胞株RAW264.7においても、LPSはIL-6とTNF α のmRNA expression発現を増加させた。LPSによるサイトカイン産生はRac1阻害薬(EHT1864)やNADPH oxidase阻害薬(DPI)、NF- κ B阻害薬(BAY11-7082)により用量依存性に抑制された。マクロファージではNOX1, NOX4の発現は低く、NOX2, p22phox, p47phox, p67phoxが高発現であった。

このように、マクロファージ特異的Rac1 KOマウスは、LPS誘発性急性腎障害や炎症所見が軽微であった。その際、マクロファージの浸潤自体は同程度生じていたが、マクロファージ由来サイトカイン(IL-6とTNF α)産生が抑制されていた。すなわち、マクロファージのRac1は腎障害治療の新たな標的と考えられた。以上の内容を Nagase M et al. PLoS One 2016 に報告した。

(3) 心筋細胞特異的Rac1 KOマウスを用いた検討

野生型マウスでTACによる心圧負荷モデルを作製したところ、心組織におけるRac1活性化が認められた。そこで、心筋細胞特異的Rac1 KO(ヘテロ)マウスと対照マウスにおいてTAC手術を施行したところ、対照マウスで認められた心肥大(心体重比、エコー所見、心筋断面積)と心機能低下(駆出率低下、ANP上昇)はヘテロマウスで改善していた。対照群のTACを施行した心組織では鉍質コルチコイド受容体活性化、Serpine1, Serpina3n, NOX4 (NOX2ではない)の発現誘導、NADPH oxidase 活性化、酸化ストレスマーカー亢進を認め、これらはヘテロマウスで軽減していた。培養心筋細胞において、非刺激状態ではNOX2発現は低く、NOX4は十分発現していた。以上の内容を Ayuzawa N, Nagase M et al. Hypertension 2016 に報告した。

(4) RhoGDI α KD、Rac1 KD 培養ポドサイト細胞株の形態機能解析

培養ヒトポドサイト株に siRac1, コントロール, siRhoGDI α をトランスフェクションし、十分なKD効果が得られていることをウエスタン法にて確認した。RhoGDI α KD 群で

は active Rac1 が著明に増加しており、同時に MR 発現も増加していた。タイムラプスイメージングにて細胞運動性を評価した所、siNC 群の動きに比べ、RhoGDI α KD 群すなわち Rac1 活性化群では運動性が増強しており、一方、siRac1 群では運動性が低下した。この過程に従来提唱されていない新たな分子機構を見出している。

(5) Rac1 活性を、従来の GST pull down アッセイ法に加えて、少量サンプルで解析可能な G-LISA 法で解析し、従来法と同傾向の結果が得られた。さらに、蛍光免疫染色法を用いて、活性型 Rac1 とファロイジンによるアクチンの二重染色を施行した所、ポドサイトの辺縁部で、コルチカル F actin リングを呈している部位に特異的な陽性シグナルを捉えることに成功した。

(6) 光照射誘発性 Rac1 活性化、不活性化プラスミドコンストラクトを作製し、数種類のヒト、ラットポドサイト細胞株にいくつかのトランスフェクション試薬を用いて過剰発現発現させ、(4) (5)と同様の Rac1 活性化評価、形態機能連関解析を進めたが、一過性発現の系ではトランスフェクション効率が低く、細胞毎に作用が不均一であったため、ステイブルな発現株を用いることに変更し、その作製を進めた。

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 10 件)

Nagase M, Kurihara H, Aiba A, Young MJ, Sakai T. Deletion of Rac1GTPase in the myeloid lineage protects against inflammation-mediated kidney injury in mice. PLoS One 査読有 11:e0150886, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0150886.

Ayuzawa N, Nagase M, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Marumo T, Aiba A, Sakurai T, Shindo T, Fujita T: Rac1-mediated activation of mineralocorticoid receptor in pressure overload-induced cardiac injury. Hypertension 査読有 67:99-106, 2016, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06054.

Nagase M: Recent topics on podocytes and aldosterone. J Ren Nutr 査読有 25:201-204, 2015, doi: 10.1053/j.jrn.2014.10.016.

Yoshida S, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Takeuchi M, Kawarazaki W, Fujita T, Nagase M. Renin inhibition ameliorates renal damage through prominent suppression of both angiotensin I and II in human renin angiotensinogen transgenic mice with high salt loading.

Clin Exp Nephrol 査読有 18:593-9, 2014, doi:10.1007/s10157-013-0893-6.

Yoshida S, Ishizawa K, Ayuzawa N, Ueda K, Takeuchi M, Kawarazaki W, Fujita T, Nagase M. Local mineralocorticoid receptor activation and the role of Rac1 in obesity-related diabetic kidney disease. Nephron Exp Nephrol 査読有 126:16-24, 2014, doi: 10.1159/000358758.

〔学会発表〕(計 13 件)

長瀬美樹, 坂井建雄. 鉱質コルチコイド受容体と腎脂肪連関(シンポジウム, 口演, 招待). 第38回日本高血圧学会総会, Oct 9, 2015, 愛媛県県民文化会館(愛媛県・松山市)

Nagase M, Sakai T. Regulation of podocyte structure and function: roles of Rho family proteins and their modulators (シンポジウム, 口演, 招待). 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会・第92回日本生理学会大会 合同大会, Mar 21, 2015, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

Nagase M, Sakai T. Rac1-mineralocorticoid receptor pathway in rodent macrophage contributes to inflammation-mediated kidney injury (oral). Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses 2014, Nuclear Receptors & Disease, Nov 1, 2014, New York (USA)

Nagase M, Sakai T, Fujita T. Role of Rac1 in podocyte injury and glomerulosclerosis (Symposium, oral, invited). ISN Nexus Symposium, Oct 26, 2014, Brisbane (Australia)

長瀬美樹. 鉱質コルチコイド受容体(MR)と食塩感受性高血圧. 第57回日本腎臓学会学術総会(ワークショップ, 口演, 招待), Jul 5, 2014, パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labou/kaibou_seitaikouzo/k4.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長瀬 美樹 (NAGASE, Miki)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60302733