

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670431

研究課題名(和文)腎系球体足細胞(ポドサイト)の培養条件下での高次構造再現の試み

研究課題名(英文)Reproduction of podocyte tertiary structure under cultured condition

研究代表者

浅沼 克彦 (ASANUMA, KATSUHIKO)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：60449064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：系球体障害は、ポドサイトに障害を引き起こし、慢性腎臓病の進行に深く関与していることが判明している。これまで、病的条件下ではDendrinがポドサイトの核へと移行し、アポトーシスを促進することを見つけている。さらにDendrinの核への移行を系球体疾患において報告している。本研究では、生理的条件下でMAGI-2がDendrinと結合し、Dendrinをスリット膜裏打ち部へ固定していることを見つけた。また、ポドサイト障害時にスリット膜裏打ち蛋白であるPodocinがエンドサイトーシスにより局在が変化するが、SNX-9によってそれが引き起こされることを見つけた。

研究成果の概要(英文)：It has recently become clear that initial glomerular injury affects glomerular podocytes, making them important target cells for progression of chronic kidney disease (CKD). Podocyte injury may cause podocyte detachment from the GBM, which leads to glomerulosclerosis. We have reported that dendrin translocates to the nucleus in injured podocytes, promoting podocyte apoptosis. Moreover, nuclear translocation of dendrin was also found in human kidney biopsy specimens from patients with glomerular diseases characterized by podocyte loss and glomerulosclerosis. We found that MAGI-2 is necessary for inhibiting dendrin nuclear translocation under physiological conditions. We have demonstrated the endocytic translocation of podocin to the subcellular area in injured podocytes. we identified SNX9 as a facilitator of podocin endocytosis in severe podocyte injury and demonstrated the expression of SNX9 in the podocytes of irreversible glomerular disease.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ポドサイト 系球体硬化 Dendrin MAGI-2 Podocin SNX-9

1. 研究開始当初の背景

ポドサイトは、腎糸球体の構成細胞の一つであり、高度に分化し、分化した後は分裂し難い終末分化細胞として知られている。ポドサイトは、ボウマン嚢腔に飛び出した大きな細胞体に核やゴルジ装置が局在し、細胞体からは太い一次突起が伸び出している。さらに、一次突起からは細い足突起が伸び、隣り合うポドサイトの足突起との間で規則的な噛み合わせを作っている。足突起の間に張ったスリット膜は、糸球体濾過障壁の重要な構成要素となっている。電子顕微鏡による検討では、この複合体は規則正しく配列され、アルブミン以上の大きさの分子が尿中に漏出しないようにしていると考えられている。主要なスリット膜構成蛋白として Nephrin が同定されて以来、多くのスリット膜構成蛋白とスリット膜関連蛋白が同定され、大きな複合体を形成していると考えられているが、どのようにスリット膜構成蛋白が足突起に整然と分布し、その濾過機能を維持しているかはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

足突起構造とスリット膜構造の決定に必須な蛋白を同定し、培養ポドサイトに in vivo で認められる、足突起・スリット膜構造を再現することを目指すこととした。

3. 研究の方法

スリット膜蛋白複合体の配置・局在を決める蛋白の探索。ポドサイト特異的 MAGI-2 ノックアウトマウスの作成と解析。スリット膜タンパク Podocin のタンパク機能解析。

4. 研究成果

ポドサイト特異的 MAGI-2 ノックアウトマウスを作成し、MAGI-2 のポドサイトにおける役割を検討した。このノックアウトマウスは、早期にタンパク尿が出現し、慢性腎不全により死亡することがわかった。その機序は、MAGI-2 が存在しないために、スリット膜裏打ちタンパクである Dendrin が核へ移行し、ポドサイトのアポトーシスを促進することで、糸球体硬化に陥り腎不全となると考えられた。さらに、生理的条件下と病的条件下での Dendrin の局在制御の詳細なメカニズムを解明し報告した。以上より、MAGI-2 はポドサイトのスリット膜構成タンパクの局在維持に極めて重要な役割を果たしていることがわかった。

スリット膜タンパク Podocin がエンドサイトーシスに関係するタンパク SNX9 とポドサイト内で結合し、障害時に局在が変化することを見つけ報告した。

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 15 件)

1. Wang J, Asanuma K, Hidaka T, Sasaki Y, Yanaka E, Takagi-Akiba M, Trejo JAO,

- Tomino Y. Newly identified molecules related to podocyte injury induced by Adriamycin. *Juntendo Medical Journal*. 61.34-40.2015
2. Fukuda H, Hidaka T, Takagi-Akiba M, Ichimura K, Trejo JAO, Sasaki Y, Wang J, Sakai T, Asanuma K, Tomino Y. Podocin is translocated to cytoplasm in puromycin aminonucleoside nephrosis rats and in poor prognosis patients with IgA nephropathy. *Cell & Tissue Research* 360. 391-400. 2015
3. Jeong KH, Asanuma K, Lydia A, Takagi M, Asao R, Kodama F, Asanuma E, Tomino Y. Combination therapy with telmisartan and oxalacetic acid suppresses the progression of murine adriamycin nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*. 129. 143-54. 2015 (K A is corresponding author)
4. Ueda S, Ozawa S, Mori K, Asanuma K, Yanagita M, Uchida S, Nakagawa T. ENOS deficiency causes podocyte injury with mitochondrial abnormality. *Free Radic Biol Med*. 87. 181-92. 2015
5. Ishizaka M, Gohda T, Takagi M, Omote K, Sonoda Y, Trejo JAO, Asano R, Hidaka T, Asanuma K, Horikoshi S, Tomino Y. Podocyte-specific deletion of Rac1 leads to aggravation of renal injury in STZ-induced diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 467. 549-55. Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.158. 2015
6. Ozawa S, Ueda S, Imamura H, Mori K, Asanuma K, Yanagita M, Nakagawa T. Glycolysis, but not Mitochondria, responsible for intracellular ATP distribution in cortical area of podocytes. *Sci Rep*. 18. 18575. Doi: 10.1038/srep1857. 2015
7. Tagawa A, Yasuda M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki SI, Koya D, Asanuma K, Kim EH, Haneda M, Kajiwarana N, Hayashi K, Ohashi H, Ugi S, Maegawa H, Uzu T. Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 65. 755-67. 2016
8. Nonaka-Yamamoto K, Koike M, Asanuma K, Akiba-Takagi M, Trejo JAO, Seki T, Hidaka T, Ichimura K, Sakai T, Tada N, Ueno T, Uchiyama Y, Tomino Y. Cathepsin D in podocytes plays an important role in the pathogenesis of proteinuria and chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 27. 2685-700. 2016
9. Yamada-Obara N, Yamagishi SI, Taguchi K, Kaida Y, Yokoro M, Nakayama Y, Ando R, Asanuma K, Matsui T, Ueda S, Okuda S, Fukami K. Maternal exposure to high-fat and high-fructose diet evokes hypoadiponectinemia and kidney injury in rat offspring. *Clin Exp Nephrol*. 20. 853-861.

- 2016
10. Ohtsubo H, Okada T, Nozu K, Takaoka Y, Shono A, **Asanuma K**, Zhang L, Nakanishi K, Taniguchi-Ikeda M, Kaito H, Iijima K, Nakamura S. Identification of mutations in FN1 leading to glomerulopathy with fibronectin deposits. *Pediatr Nephrol.* 1459-67. 2016
 11. Tsuchida K, Matsusaka T, Ohtcuka M, Miura H, Okuno Y, **Asanuma K**, Nakagawa T, Yanagita M, Mori K. Establishment of Nephrin Reporter Mice and Use for Chemical Screening. *PLoS One.* 11: e0157497. Doi: 10.1371/journal.pone.0157497. 2016
 12. Takagi H, Nishibori Y, Katayama K, Katada T, Takahashi S, Kikuchi Z, Takahashi SI, Kamei H, Kawakami H, Akimoto Y, Kudo A, **Asanuma K**, Takematsu H, Yan K. UPS40 gene knockdown disrupts glomerular permwability in zebrafish. *Am J Physiol Renal Physiol.* 312. F702-F715. 2017
 13. Sasaki Y, Hidaka T, Ueno T, Akiba-Takagi M, Trejo JA, Seki T, Nagai-Hosoe Y, Tanaka E, Horikoshi S, Tomino Y, Suzuki Y, **Asanuma K**. Sorting Nexin 9 facilitates podocin endocytosis in the injured podocyte. *Sci Rep.* Mar 7;7:43921. Doi: 10.1038/srep43921.2017
 14. **Asanuma K**, Trejo JAO, Tanaka E, The role of Notch signaling in kidney podocytes. *Clin Exp Nephrol.* 21. 1-6. 2017
 15. **Shirata N**, Ihara KI, Yamamoto-Nonaka K, Seki T, Makino SI, Trejo JAO, Miyake T, Yamada H, Campbell K, Nakagawa T, Mori K, Yanagita M, Mundel P, Nishimori K, **Asanuma K**. *J Am Soc Nephrol.* 2017 in press
- [学会発表](計12件)
1. 関卓人, **浅沼克彦**, 浅尾りん, 野中香苗, 佐々木有, 黒澤寛之, 平山吉朗, 富野康日己. 尿中メガリンと糸球体病変との関連. 第112回日本内科学会講演会(平成27年4月11日)京都
 2. **浅沼克彦**, Jeong Kyoung Hwan, Lydia Aida, 高木美幸, 浅尾りん, 浅沼悦子, 富野康日己. TelmisartanとOxalacitriolの組み合わせ投与はアドリアマイシン腎症の進行を抑制する. 第38回日本高血圧学会総会(2015年10月10日)松山
 3. 田口顕正, 山岸昌一, 東元祐一郎, 中山陽介, 山本靖彦, **浅沼克彦**, 上田誠二, 深水圭. RAGE-DNA アプタマーはRac1-MR 経路を抑制しアルドステロン誘導性ポドサイト障害を改善させる. 第38回日本高血圧学会総会(2015年10月10日)松山
 4. Shuko Ueda, Shota Ozawa, Kiyoshi Mori, **Katsuhiko Asanuma**, Motoko Yanagita, Shunya Uchida, Takahiko Nakagawa. A lack of eNOS leads to Mitochondrial injury in the podocytes. ASN Annual Meeting, 2015. November 7, San Diego
 5. Kensei Taguchi, Sho-ichi Yamagishi, Yuichiro Higashimoto, Nakayama Yosuke, **Katsuhiko Asanuma**, Seiji Ueda, Kei Fukami. RAGE-DNA aptamer improves asdosterone-induced renal injury possible via inhibition of Rac1-MR axis in mice with hypertensive nephropathy. ASN Annual Meeting, 2015. November 6, San Diego
 6. Shota Ozawa, Shuko Ueda, Kiyoshi Mori, **Katsuhiko Asanuma**, Motoko Yanagita, Takahiko Nakagawa. Fatty acid binding protein 3 might mediate diabetic nephropathy in mouse lacking eNOS Gene. ASN Annual Meeting, 2015. November 5, San Diego
 7. **白田成俊**, 伊原寛一郎, 柳田素子, 西森克彦, **浅沼克彦**. ポドサイト障害促進因子 dendrin の核移行メカニズムの解明. 第59回日本腎臓学会学術総会(2016年6月19日)横浜(日本腎臓学会誌.2016;58:314)
 8. 山本香苗, **浅沼克彦**, 小池正人, 高木美幸, Oliva Trejo JA, 関卓人, 日高輝夫, 市村浩一郎, 坂井建雄, 上野隆, 内山安男, 富野康日己. ポドサイトにおけるカテプシンDの病態生理的役割. 第59回日本腎臓学会学術総会(2016年6月17日)横浜(日本腎臓学会誌.2016;58:269)
 9. **Naritoshi Shirata**, Kan-ichiro Ihara, Motoko Yanagita, Katsuhiko Nishimori, **Katsuhiko Asanuma**. TH-PO225 The mechanisms of dendrin nuclear translocation in kidney podocytes. ASN KIDNEY WEEK 2016(2016.11.17) Chicago, USA
 10. **白田成俊**, 伊原寛一郎, 柳田素子, 西森克彦, **浅沼克彦**. 2P-0773 腎糸球体上皮細胞(ポドサイト)障害促進因子 dendrin の核移行メカニズムの解明. 第39回日本分子生物学会年会(2016年12月1日)横浜
 11. **Naritoshi Shirata**, Kan-ichiro Ihara, Motoko Yanagita, Katsuhiko Nishimori, **Katsuhiko Asanuma**. P-97 Podocyte-specific MAGI-2 deficiency results in nephrosis and renal failure. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium (2017.2.16) Sendai, Japan
 12. **浅沼克彦**, **白田成俊**, 伊原寛一郎, 西森克彦, 柳田素子. ポドサイトにおけるMAGI-2の機能. 第1回ポドサイト研究会(2017年3月4日)コープシ

ティー花園ガレソホール、新潟

〔図書〕(計 11 件)

1. **浅沼克彦**, 「高血圧と薬剤」血圧が上昇したらすぐに降圧薬を服用すべきですか?, 降圧薬は一度服用したら、一生服用しなければなりませんか?, **腎臓病・高血圧と薬剤**, 富野康日己(編集), 中外医学社, 東京, 147-150, 2014
2. **浅沼克彦**: 「第 10 章 腎・尿路疾患、水・電解質異常」5. 原発性糸球体疾患、III 慢性糸球体腎炎、a. 慢性糸球体腎炎, b. IgA 腎症, **わかりやすい内科学(第 4 版)**, 井村裕夫(編集主幹), 文光堂, 東京, 832-836, 2014
3. **浅沼克彦**, Clinical nephrology 検査・診断ポドサイト障害の評価法. *Annual Review 腎臓* 2014 129-135, 2014
4. 井上隆司, **浅沼克彦**, 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-Podocytology がひらく新しい慢性腎臓病治療戦略. *日本薬理学雑誌* 143. 27-33, 2014
5. **浅沼克彦**, 「尿検査・腎機能検査の実際と臨床的意義」ポドカリキシン定量. *臨床病理レビュー*. 152. 37-40, 2014
6. **浅沼克彦**: 「第 1 章 腎の構造」*New エッセンシャル 腎臓内科学(第 2 版)*, 富野康日己(編集), 医歯薬出版株式会社, 東京, 1-14, 2015
7. **浅沼克彦**. 慢性腎臓病におけるポドサイト障害の役割. *日本臨床免疫学会会誌* 38. 26-36, 2015
8. 野中香苗, **浅沼克彦**. ポドサイトのオートファジー. *腎と透析*. 78. 357-363, 2015
9. **浅沼克彦**, 田中絵里子. Notch シグナルと糸球体障害. *Annual Review 腎臓*. 102-108, 2016
10. **浅沼克彦**, 野中香苗. 糸球体ポドサイトの機能と疾患. *実験医学*. 34. 1236-1244, 2016
11. **Asanuma K**. Podocyte injury and significance of urinary Podocalyxin and Megalin, Pathogenesis and treatment in IgA nephropathy, p89-96, Tomino Y, eds, Springer Japan, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 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
浅沼 克彦 (KATSUHIKO ASANUMA)
京都大学大学院医学研究科、特定准教授

研究者番号: 60449064

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
白田 成俊 (NARITOSHI SHIRATA)
京都大学大学院医学研究科、客員研究員

研究者番号: 00726200

(4)研究協力者
()