

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590940

研究課題名（和文） スリット膜と移行し合う細胞間結合複合体の構造と機能の解析

研究課題名（英文） Intercellular junctional complexes replaced with slit diaphragms

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

研究成果の概要：

腎臓は細胞外液の質・量を一定に保ち、生命維持に必須な働きをしている。そのために常に一定量の糸球体濾過を維持しなければならない。糸球体濾過のための重要な構成要素になっているのがスリット膜である。スリット膜は、糸球体を覆っている上皮細胞(足細胞)の細胞間を繋ぐ結合装置であり、細胞傷害時に他の細胞間結合装置と移行し合っている。スリット膜の分子構造は明らかになりつつあるが、これと移行し合い、糸球体ろ過調節に与っている他の細胞間結合装置については、ほとんど明らかにされていない。本研究では、この細胞間結合装置の構成分子としてクロードイン-6があることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓、足細胞、細胞間結合、密着結合、スリット膜

1. 研究開始当初の背景

腎糸球体におけるスリット膜は、糸球体上皮細胞、すなわち足細胞の細胞間結合装置の一つである。スリット膜以外にも、足細胞間にはいくつかの細胞間結合(密着結合、ギャップ結合など)がある。このスリット膜以外の結合は近接して存在し細胞間結合複合体を形成している。足細胞の発生分化、傷害時において、これら細胞間結合はダイナミックに変動する。足細胞の分化に伴って、細胞間

結合複合体は消失しスリット膜に置き換わり、足細胞の傷害時、スリット膜は細胞間結合複合体に置き換わる。細胞間結合複合体は、生理的な状態でも僅かながら存在し、スリット膜と混在連続して存在している。また、硫酸プロタミンの腎灌流によって、スリット膜のみが存在する状態から、数分以内に細胞間結合複合体が形成されることが報告されている。この移行は6℃という低温でも、細胞骨格を阻害した状態でも起こりうる。このこ

とから、スリット膜自体、ないしはその近辺に、細胞間結合複合体の構成成分がすでに存在しており、それが状況に応じてスリット膜と細胞間結合複合体の間を移行し合っているものと考えられる。事実、両者の共通成分として、ZO-1、ポドシンが知られている。我々は、スリット膜と細胞間結合複合体は動的平衡状態にあり、両者の割合が正常と傷害時で異なっているのは、それぞれに特異的な構成成分の増減に因るのではないかと考えている。

スリット膜がどのように形成維持されているのかを理解するためには、移行し合っている細胞間結合複合体を理解する必要がある。しかしながら、精力的に解析が進められているスリット膜とは対照的に、細胞間結合複合体の構成成分、およびその機能については、ほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、この足細胞傷害時に出現してくる細胞間結合複合体の構成成分を、密着結合を中心に同定する。密着結合の中心となる分子はクローディンであることが分かっている。しかし、クローディンには 24 種類あり、(1)足細胞にどのクローディンが存在するのか、(2)そのクローディンは、生理的状态でどこに分布し、硫酸プロタミンの腎灌流によって密着結合に集積してくるのか、(3)発生の病的状態では、どのように変化するのか、を明らかにし、足細胞におけるクローディンの役割を解明する。

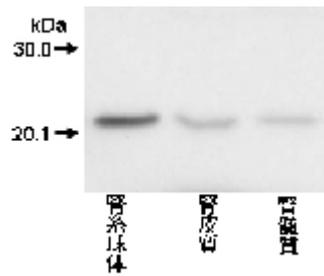
3. 研究の方法

- (1) 動物：成熟したラットと生後 2 日のラットを用いた。生後 2 日のラット腎は、完全に成熟していなく、発生のすべての過程の糸球体が存在している。病的状態は、ラットに puromycin aminonucleoside を投与し、足細胞を傷害してネフローゼ症候群を引き起こした (PAN 腎症)。
- (2) 市販のクローディンに対する抗体を用い、組織の Western blot、蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法で糸球体に存在しているクローディンを検討した。
- (3) 遺伝子発現は、PCR を用いた。

4. 研究成果

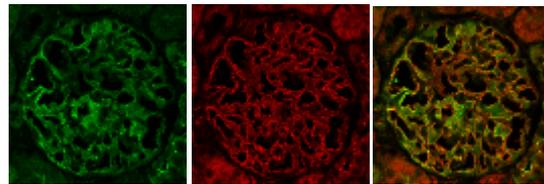
(1) 足細胞のクローディン：クローディン-1、-2、-5、-6、-7、-12、-15 に対する抗体を IBL 社から購入し、糸球体と腎皮質のサンプルを 15%PAGE につけ、各抗体との反応性と糸球体特異性を Western blot で検討した。その結果、クローディン-6、-12、-15 が糸球体に多いことが分かった。

[クローディン-6 の Western blot analysis]



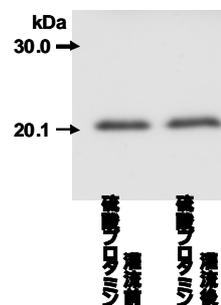
二重蛍光抗体法で、糸球体内の ZO-1 の分布と比較することから、足細胞の細胞間結合に一致するかどうかを検討した。その結果、クローディン-6 が足細胞に有意に染め出されることが分かった。

[正常ラット腎糸球体の二重蛍光抗体法]



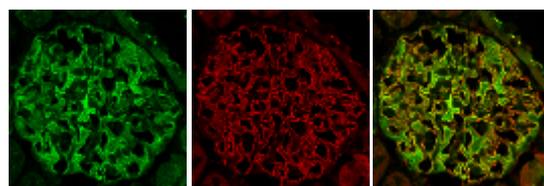
硫酸プロタミンで腎臓を灌流すると、数分以内に密着結合が形成されることが報告されている。Western blot では、この操作による単離糸球体でのクローディン-6 の増加は認められなかった。

[単離糸球体クローディン-6 の Western blot analysis]



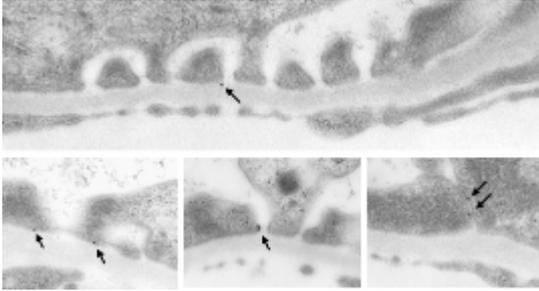
しかし、硫酸プロタミンの灌流腎を蛍光抗体法で観察すると、明らかにクローディン-6 の染色性が増加していた。

[硫酸プロタミン灌流腎の腎糸球体の二重蛍光抗体法]



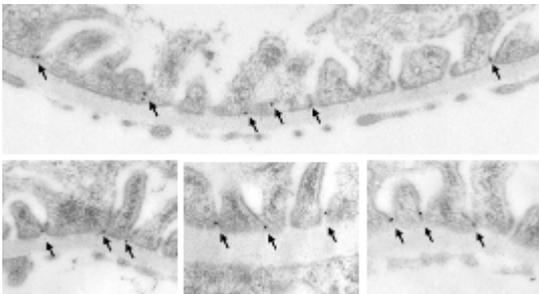
免疫電子顕微鏡法でより詳細に分布を観察すると、正常糸球体では、クローディン-6 を示す金コロイド粒子は極僅かにしか見られなかったが、主に足細胞の細胞膜基底側、密着結合、スリット膜に分布していた。

[正常ラット足細胞の免疫電子顕微鏡法]



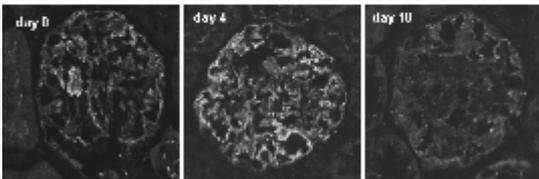
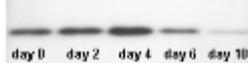
(矢印はクローディン-6を示す金コロイド粒子を示す)
硫酸プロタミン灌流腎では、新しく形成された密着結合に集中して存在していた。

[硫酸プロタミン灌流腎の腎糸球体の免疫電子顕微鏡法]



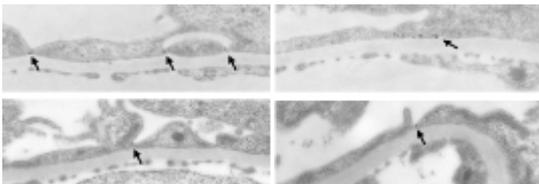
(矢印はクローディン-6を示す金コロイド粒子を示す)
(2) 病的状態における足細胞のクローディン-6 : puromycin aminonucleoside をラットに投与すると5日目より蛋白尿が出現し、10日目には著明なネフローゼ症候群を呈する。この経過中の糸球体のクローディン-6 の変化をみると、減少することはあっても増加することはなかった。

[Western blot analysisと蛍光抗体法]



4日目の糸球体を免疫電子顕微鏡法で観察すると、密着結合が新たに多く形成され、そこにクローディン-6が集積していた。

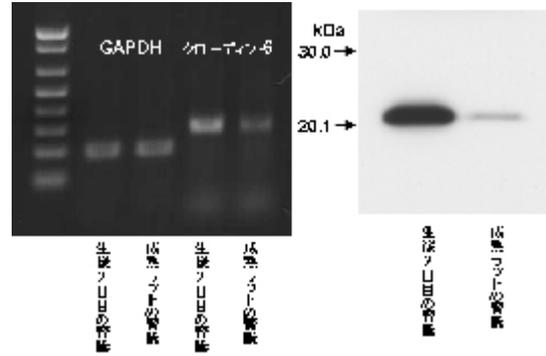
[PAN 腎症の腎糸球体の免疫電子顕微鏡法]



(矢印はクローディン-6を示す金コロイド粒子を示す)
(3) 発生過程における足細胞のクローディン

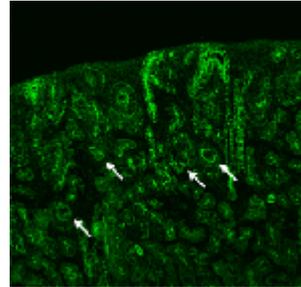
ン-6 : 腎臓全体におけるクローディン-6 の変化を PCR と Western blot で見てみると、生後2日目の発現量が成熟腎より有意に多かった。

[PCR と Western blot]



生後2日目の腎臓を蛍光抗体法で見るとクローディン-6は、糸球体のみならず、幼弱な尿管上皮にも認められた。

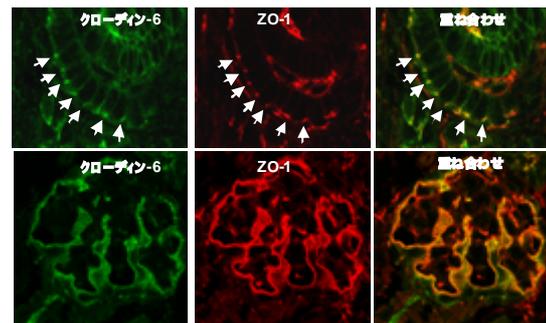
[生後2日目の腎臓のクローディン-6の蛍光抗体法]



(矢印は成熟前の糸球体)

幼弱な糸球体を二重蛍光抗体法でみると、足細胞に ZO-1 と一致してクローディン-6 が認められた。

[生後2日目の腎糸球体の二重蛍光抗体法]



(4) 成果の位置づけと今後の展望 : 今まで全く不明であった足細胞のクローディンが、クローディン-6であることを世界で始めて明らかにした。硫酸プロタミン灌流腎、PAN 腎症の実験は、足細胞における密着結合形成はクローディン-6の合成亢進よりはクローディン-6分子の分布の変化が重要であることを示している。このように構成分子が明らかになったことで、スリット膜と密着結合の係わり合い、糸球体ろ過での役割をより具体的に検討できるようになることが考えられる。

クローニン-6のように、未分化な状態では多くの上皮細胞に発現してくるが、分化成熟の過程で足細胞に局限してくる分子がいくつか知られており、足細胞の特異形質形成の機序を考える上で興味深い。

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 8件)

1. Cuellar LM, Fujinaka H, Yamamoto K, Miyamoto M, Tasaki M, Zhao L, Tamer I, Yaoita E, Yoshida Y, Yamamoto T. Identification and localization of novel genes preferentially expressed in human kidney glomerulus. *Nephrology (Carlton)*. 14:94-104, 2009
査読有り

2. Yoshida Y, Miyamoto M, Bo X, Yaoita E, Yamamoto T. Overview of kidney and urine proteome databases. *Contrib Nephrol*. 160:186-97, 2008
査読有り

3. Zhao L, Yaoita E, Nameta M, Zhang Y, Cuellar LM, Fujinaka H, Xu B, Yoshida Y, Hatakeyama K, Yamamoto T. Claudin-6 localized in tight junctions of rat podocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294(6):R1856-62, 2008
査読有り

4. Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Nagasaka Y, Tasaki M, Zhang Y, Xu B, Nameta M, Sezaki H, Cuellar LM, Osawa T, Morishita H, Sekiyama S, Yaoita E, Kimura K, Yamamoto T. In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 6(9):3680-90, 2007
査読有り

5. Shono A, Tsukaguchi H, Yaoita E, Nameta M, Kurihara H, Qin XS, Yamamoto T, Doi T. Podocin participates in the assembly of tight junctions between foot processes in nephrotic podocytes.

J Am Soc Nephrol. 18(9):2525-33, 2007
査読有り

6. Fujinaka H, Yamamoto T, Feng L, Nameta M, Garcia G, Chen S, El-shemi AA, Ohshiro K, Katsuyama K, Yoshida Y, Yaoita E, Wilson CB. Anti-perforin antibody treatment ameliorates experimental crescentic glomerulonephritis in WKY rats. *Kidney Int*. 72(7):823-30, 2007
査読有り

7. Fujinaka H, Nameta M, Kovalenko P, Matsuki A, Kato N, Nishimoto G, Yoshida Y, Yaoita E, Naito M, Kihara I, Tomizawa S, Yamamoto T. Periglomerular accumulation of dendritic cells in rat crescentic glomerulonephritis. *J Nephrol*. 20(3):357-63, 2007
査読有り

8. Gao SY, Li CY, Shimokawa T, Terashita T, Matsuda S, Yaoita E, Kobayashi N. Rho-family small GTPases are involved in forskolin-induced cell-cell contact formation of renal glomerular podocytes in vitro. *Cell Tissue Res*. 328(2):391-400, 2007
査読有り

[学会発表](計 9件)

1. 張 榮. Top-down proteomic analysis and identification of tyrosine-phosphorylated proteins in the glomerulus of normal rat kidney
第51回日本腎臓学会学術総会、2008.5.30~6.1、福岡

2. Zhang Y. Tyrosine-phosphorylated proteins are predominantly localized in the glomerulus of normal rat kidney.
第7回HUPO国際学会、2008.8.16~8.20、アムステルダム

3. Koda R. Proteomic approach of glomerulus microdissected from biopsy samples of human kidney. 第7回HUPO国際学会、2008.8.16~8.20、アムステルダム

4. Fujinaka H. Expression of the chemokine fractalkine in podocytes in normal and proteinuric glomeruli. 第40回アメリカ腎臓学会学術総会、2007.11.1~11.4、サンフランシスコ

5. Zhao L. Claudin-6 is a component of tight junctions of rat podocytes.
第 40 回アメリカ腎臓学会学術総会、
2007.11.1~11.4、サンフランシスコ

6. Miyamoto M. In-depth profiling of the normal human kidney glomerulus proteome by Two-dimensional protein prefractionation coupled with nanoflow LC-MS/MS.
第 40 回アメリカ腎臓学会学術総会、2007.11.1~11.4、サンフランシスコ

7. Yoshida Y. Handling and optimization of urinary protein preparation for 2-DE based Proteomic analysis and 2D DIGE quantitative analysis of urine proteomes of healthy Male children and adults
第 6 回 HUPO 国際学会、2007.10.6~10.10、ソウル

8. Yoshida Y. In-depth profiling of the normal human kidney glomerulus proteome by two-Dimensional protein prefractionation coupled with nanoflow LC-MS/MS
第 6 回 HUPO 国際学会、2007.10.6~10.10、ソウル

9. 矢尾板 永信. ラット足細胞におけるクローデイン-6. 第 50 回日本腎臓学会学術総会.
2007.5.25~5.27、松浜

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

山本 格 (YAMOTO TADASHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30092737

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

(3)連携研究者

なし