

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09275

研究課題名(和文) 足細胞機能に関わる形態制御分子の解明

研究課題名(英文) Identification of molecules which regulate the podocyte morphology tightly associated with the glomerular filtration.

研究代表者

栗原 秀剛 (Hidetake, Kurihara)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：80311976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：足細胞におけるミオシンIIA重鎖(NMMHCIIA)の局在をin vivoおよび培養足細胞において解析し、NMMHCIIAが突起形成に伴い細胞膜周囲のアクチン線維から突起に沿って束状化したビメンチン線維上に再分布すること、さらに両者の結合にプレクチンが介在することを明らかにした。Epstein症候群の原因となるR702C変異NMMHCIIAでは、ビメンチンとの結合能が低下し、突起形成が抑制された。以上の結果から、NMMHCIIAは足細胞において足細胞の突起形成とその維持に重要な役割を演じており、R702変異により中間径線維の結合能が低下することで足細胞の形態変化が起こる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The localization of myosin IIA heavy chain (NMMHCIIA) in cultured podocyte was analyzed. Cell process formation was induced in cultured podocytes by the treatment with cytochalasin-D. We found that NMMHCIIA was translocated to the bundle of vimentin filaments along the newly formed protrusions from the actin filaments beneath the cell membrane in the resting cell. Plectin was colocalized with the binding site between NMMHCIIA and vimentin. R702C mutation of NMMHCIIA, which causes Epstein syndrome, showed the decreased binding ability with vimentin and suppressed protrusion formation. The segregation between NMMHCIIA and vimentin was observed in both Epstein kidney and R702C knock-in mouse kidney. Our results indicate that NMMHCIIA binds to the intermediate filaments in the podocyte and play an important role in maintaining the unique cell structure of this cell. R702C mutation induces the change of binding ability with vimentin and results in the morphological change of the podocyte.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腎臓学 足細胞 糸球体濾過 形態形成 細胞骨格 ミオシン

## 1. 研究開始当初の背景

ネフロンはひとつながりの細胞集団であるにも関わらず、機能および形態が大きく異なるセグメントを形成する。この機能形態の発現がどのように調節されているかは不明である。特に細胞接着に着目すると、尿細管とボウマン嚢上皮細胞はタイト結合を形成して、細胞が接着しているが、それに続く足細胞は細胞間が開き、スリット膜という特殊な構造によって細胞の間を結んでいる。代表者はネフリンの発見以前に、スリット膜が細胞間接着構造であるタイト結合から派生することをタイト結合蛋白 ZO-1 の詳細な解析結果を中心として世界に先駆けて報告して以来 (Kurihara et al. PNAS 1992; Kurihara et al. Am J Pathol 1992)、スリット膜構成要素分子の解析を行っており、多くの機能分子を見いだしてきた。近年、細胞の極性を決定する重要な分子群である aPKC のポドサイト特異的ノックアウトマウスを用いた解析から aPKC がスリット膜構成分子であるネフリンの細胞膜への移行に重要であること (Satoh et al. J Biochem, 2014)、さらに、足細胞の分化に伴い、タイト結合からスリット膜へ移行する過程でモーター蛋白であるミオシン 1e が重要な役割を演じていることを報告している (Bi et al. Am J Physiol Renal Physiol, 2013)。また、代表者らがこれまでに解析してきたスリット膜の機能を担う分子群や腎炎の発症に伴う足細胞の形態変化に関わる分子群のいくつか (ミオシン IIA、ミオシン 1e など) はヒトの遺伝子変異によりネフローゼを発症することが明らかになったものであるが、その多くは足細胞の構造維持に重要な役割を持つ。足細胞のユニークな形態を維持するしくみは明らかではないが、正常な足細胞では細胞骨格の棲み分けが明瞭であることが特徴である。すなわち、細胞体と一次突起には中間径線維と微小管が分布しているが、足突起は先の2種類

の細胞骨格を欠いており、アクチン線維がその骨格となる (Ichimura et al. J Histochem Cytochem, 2003)。一方、外部環境ストレスによって腎炎を発症すると、足突起のアクチン線維が消失すると共に細胞骨格の分布が乱れて、細胞全体の形態も大きく変化する (Kobayashi et al. Nephron Exp Nephrol, 2009)。そのために、濾過装置であるスリット膜の正常な機能が失われ、生体に重要な血清蛋白が尿中へと排泄されると考えられる。こうした研究を通して、申請者は足細胞細胞骨格の棲み分けを安定的に維持するしくみが足細胞の機能維持に重要ではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

近年、代表者らの研究により、細胞骨格の再構成、特に一次突起形成に沿った中間径線維の束状化には Epsetein 症候群の原因遺伝子であるミオシン IIA 重鎖が深く関わっていることを腎炎モデルおよび in vivo の細胞骨格系分子の発現を安定的に維持している自家製の足細胞培養細胞系を用いて見いだした。このミオシン IIA 重鎖が細胞骨格の棲み分けに重要な役割を演じている可能性がある。本研究においては1) ミオシン IIA 重鎖と中間径線維の結合に関わる分子群を同定し、2) それらの分子の機能を in vitro 培養細胞系で詳細に検討し、3) 病態モデルでの発現と局在の変化を調べることで足細胞の形態変化への関与を明確にし、それらの制御機構を明らかにすることで、足細胞をターゲットとした新たな腎炎治療薬の開発のシーズとすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (足細胞の突起形成についての解析)

(In vivo における解析)

ラットおよびヒト腎臓におけるミオシン IIA 重鎖の局在を蛍光抗体法と免疫電顕法により解析する。ミオシン IIA 重鎖との関わり

が予想されるアクチンおよびアクチン関連タンパクさらに中間径線維関連タンパクとの共局在について組織レベルでの解析を行う。共局在が予想された分子について、足細胞の分化（突起形成）に伴う発現変化を調べるために、未熟な糸球体が存在する新生仔ラット腎を用いて解析する。

（In vitro における解析）

足細胞の突起形成に関わる分子群の同定とその作用機序を解析する目的で、代表者が樹立したラット培養足細胞株の中で、安定して突起形成を示す POD7 を選出し、今実験に用いることにする。POD7 は in vivo 足細胞に発現する多くの細胞骨格タンパクを安定して発現しており、cytochalasin-D で処理することにより、数分で突起形成を誘導することができる。この培養株を用いることで突起形成とそれに関わる分子の機能を詳細に検討することが可能である。また、本細胞株を用いて、ミオシン IIA 重鎖と相互作用する分子についても免疫沈降法により解析する。

#### （足細胞の突起形成におけるミオシン IIA 重鎖の変異の影響についての解析）

ミオシン IIA 重鎖の点突然変異が腎症の発症と強い関連性を持つことが分かってきた。そこで、R702C 変異を有するヒト腎および R702C トランスジェニックマウス腎におけるミオシン IIA 重鎖とそれに関連する分子の局在変化を免疫組織化学により解析する。また、足細胞特異的な変化を解析する目的で、培養足細胞に R702C 変異ミオシン IIA 重鎖遺伝子を発現させた培養株の樹立および足細胞特異的 R702C 変異ミオシン IIA 重鎖ノックインマウスの樹立を目指すこととする。

#### （中間径線維蛋白と細胞間接着装置の関係

#### についての解析）

幹細胞マーカーとして知られている中間径線維蛋白ネスチンは、成熟した足細胞に安定して発現している。ネスチンのノックダウンによりモザイク状にネスチンの発現が認められる状態で、ネスチン陽性細胞と陰性細胞が隣り合わせになると、両者の細胞接着が低下し、ネスチン陽性細胞が遊走する現象が認められた。この現象に関わる分子群やシグナル伝達系を明らかにするために、1) ネスチンと細胞間接着装置構成蛋白との結合について免疫沈降法により解析を行う。2) 先の実験でネスチンと細胞間接着結合が予想される分子について免疫電顕と STED により共局在を確認する。3) ネスチンノックダウンによりネスチン陽性細胞と陰性細胞の間で細胞間接着構造が変化する過程をタイムラプス（当研究室に設置）で観察するとともに細胞間接着構造およびネスチンの局在変化をコンフォーカルレーザー顕微鏡で解析を行う。4) 細胞間接着構造は培養液中のカルシウムを除去することで乖離し、また、カルシウムを加えることで再形成する（カルシウムスイッチ）。この手法を用いて、ネスチンと細胞間接着構造蛋白との関わりを免疫組織化学と生化学的に解析する。

#### 4. 研究成果

腎糸球体足細胞は細胞間に特殊な濾過装置であるスリット膜を形成し、終生休むことなく濾過を行っており、この細胞の障害は不可逆的な腎機能障害を引き起こし、腎不全となる。足細胞は大きな細胞体とそこから延びる一次突起、さらには二次突起である足突起を形成して腎糸球体の毛細血管に張り付いている。これまでの研究から、この特殊な構造の維持が足細胞の機能に重要であること

が分かってきた。我々は、足細胞の構造維持に関わる重要な分子としてミオシン IIA 重鎖に着目して研究を進めている。ミオシン IIA 重鎖は進行性腎炎、巨大血小板症および難聴を主訴とする Epstein 症候群の原因遺伝子であり、特にミオシン重鎖の R702C 変異は糸球体硬化症を発症する頻度が高い。しかしながら、ミオシン IIA 重鎖の変異と腎症発症の機序は不明である。そこで、我々はラット腎症モデルと独自に作製したラット足細胞培養株を用いてミオシン IIA 重鎖の足細胞における役割を検討した結果、正常足細胞ではミオシン IIA 重鎖がアクチンではなく中間径フィラメントの一つであるビメンチンと結合していることを見いだした。ミオシン IIA 重鎖の機能阻害や siRNA による発現低下によって突起形成が低下したことから、ミオシン IIA 重鎖が中間径フィラメントに結合して突起形成に関わることが強く示唆された。さらに、足細胞に発現する中間径フィラメント結合蛋白とミオシン IIA 重鎖の関係を調べたところ、プレクチンがミオシン IIA とビメンチンの結合部位に局在しており、プレクチン siRNA 処理により、ミオシン IIA 重鎖とビメンチンの結合が抑制されることが判明した。これらのことから、ミオシン IIA 重鎖はプレクチンを介して、ビメンチンと結合していることが分かった。

ラット培養足細胞に R702C 変異ミオシン重鎖を発現した細胞を作製し、ビメンチンとの結合の変化を調べたところ、変異ミオシンではビメンチンとの結合が低下していることが分かった。そこで、R702C 変異が腎糸球体に及ぼす影響を調べるために、国立医薬品食品衛生研究所との共同研究により、4-hydroxytamoxifen (4-OHT) 腹腔内投与 (0.5mg/匹、3日連続投与) で足細胞特異的に R702C 変異ミオシン IIA 重鎖 (Myh9) の発現誘導可能なノックインマウスの作製に成功した。変異ミオシン発現マウスは 4-OHT 投

与後 6 週間後から蛋白尿が検出された。投与後 6 週間後における糸球体の構造変化を調べたところ、足細胞の足突起の消失と細胞底部におけるアクチン線維の集合が認められた。また、足細胞の尿腔に面した apical 側で、bleb 形成が顕著であった。底部のアクチン集合体にはミオシン重鎖に加えて足突起のアクチン線維に結合するシナプトポディン及び alpha-actinin 4 が含まれていることが免疫電顕で明らかとなった。これまでの研究により、ミオシン IIA 重鎖は正常足細胞ではビメンチン中間フィラメントに結合しているが、変異ミオシンではその結合が弱くなることが分かっており、中間径フィラメントから外れたミオシンがどこに結合しているかを調べた。変異ミオシン重鎖を発現したマウスの足細胞におけるミオシン IIA 重鎖の局在を調べたところ、底部に集合したアクチン線維に加えて、細胞内のリソゾーム内に局在が確認された。また、ミトコンドリアへの結合が顕著であった。さらに、Mitophagy が 4-OHT 誘導 1 週間目から足細胞に観察されたことから、ミオシン IIA 重鎖が結合したミトコンドリアがライソゾームにより処理される可能性が示唆された。以上の結果から、変異ミオシン重鎖はミトコンドリアに結合して機能障害を誘発し、障害したミトコンドリアはオートファジーにより処理される可能性がある。ミトコンドリアの障害とアクチン線維の再編成による足突起消失および apical 膜での bleb 形成との関係について、さらに研究を進めている。

R702C 点突然変異 Myh9 のノックインマウスにおいてタモキシフェン誘導後に認められる形態学的変化の解析から、足細胞底部に出現する細線維束に焦点を当てて解析を進めてきた。その結果、足細胞の足突起消失とともに出現する細線維束には非筋ミオシン重鎖とアクチンが存在し、さらに alpha-actinin4 の局在も明らかとなった。こ

これらの3者はサルコメアと同様の分布を示すことも分かった。このような変化は糸球体障害モデル動物で足突起の消失に伴う扁平化の際に認められる構造として報告されているものと類似している。このことから、異常ミオシンの発現に伴う形態学的変化の際に、アクチンと非筋ミオシンの相互作用が起っていることが強く示唆された。さらに、異常非筋ミオシンはATPase活性を失っており、サルコメア様の構造を示すものの収縮力は失っている可能性がある。これらのことから異常ミオシンはアクチンや alpha-actinin4とともに effacement として知られている足突起の消失と足細胞の扁平化に関与しており、正常ミオシンとは異なる収縮力の低下による足細胞の接着力の低下が足細胞剥離の原因となっている可能性を示唆している。同様な所見を Epstein 症候群の患者腎試料においても観察したことから、ノックインマウスがヒトの病態を解析する上で、有用であることが判明した。現在、論文として発表すべく投稿準備中である。

#### (関連研究の成果)

中間線維タンパクネスチンと細胞接着の関係性を調べる過程で、微小管モータータンパクである KIF11 がネフロンのタイト結合に高発現していることを見だし、タイト結合形成に KIF11 が重要な役割を演じていることを明らかにし、米国細胞生物学会で報告した。現在、論文作成中である。また、新たに作製したモノクローナルのうち、足細胞を特異的に認識する D24 クローンの抗原を解析し、中間径フィラメント結合蛋白である synemin 分子 (150kd) を候補分子として同定した。この成果を日本解剖学会総会で報告した。

#### 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6件)

1. Kurihara H, Sakai T: Cell biology of mesangial cells: The third cell that maintains the glomerular capillary. *Anat Sci Int* 92(2):173-186, 2017 DOI: 10.1007/s12565-016-0334-1 (査読有)
2. Nakayama H, Kurihara H, Morita YS, Kinoshita T, Mauri L, Prinetti A, Sonnino S, Yokoyama N, Ogawa H, Takamori K, Iwabuchi K: Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *Sci. Signal.* 9(449): ra101, 2016 doi: 10.1126/scisignal.aaf1585 (査読有)
3. Sharmin S, Taguchi A, Kaku Y, Yoshimura Y, Ohmori T, Sakuma T, Mukoyama M, Yamamoto T, Kurihara H, Nishinakamura R: Human induced pluripotent stem cell-derived podocytes mature into vascularized glomeruli upon experimental transplantation. *J Am Soc Nephrol* 27(6):1778-91, 2016 doi: 10.1681/ASN.2015010096 (査読有)
4. 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* 11(3): e0150886, 2016 doi:10.1371/journal.pone.0150886 (査読有)
5. Tsurumi H, Kurihara H, Miura K, Ohta Y, Igarashi T, Oka A, Horita S, Hattori M, Harita Y: Afadin is localized at cell-cell contacts of mesangial cells and regulates migratory polarity. *Lab Invest* 96(1):49-59, 2016 doi: 10.1038/labinvest.2015.133 (査読有)
6. 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* 72(3):146-156, 2015 doi: 10.1002/cm.21211 (査読有)

#### [学会発表](計9件)

1. 栗原秀剛: 糸球体足細胞 (ポドサイト) 研究の新展開. 第 84 回関東小児腎臓研究会 特別講演 (東京女子医科大学) (2018.3.3)
2. 栗原秀剛, 坂井建雄: 足細胞においてミオシン IIA は中間径フィラメントと結合する. 第 60 回日本腎臓学会学術総会 (仙台) (2017.5.26-28)
3. 長瀬美樹, 栗原秀剛, 坂井建雄: 培養腎糸球体ポドサイト培養株のメカノ刺激に対する応答性ならびにメカノ関連分子発現の比較解析. 口演. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (長崎)

- (2017.3.28-30)
4. 鈴木隆太郎、後迫春輝、栗原秀剛、坂井建雄: 内皮細胞表面抗原(1-10 抗原)の膵ランゲルハンス島における発現について、口演、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会(長崎)(2017.3.28-30)
  5. 後迫春輝、鈴木隆太郎、栗原秀剛、坂井建雄: 糸球体足細胞に発現する新規中間径フィラメント結合蛋白について、口演、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会(長崎)(2017.3.28-30)
  6. 栗原秀剛、中村聡、岸龍馬、坂井建雄: タイト結合蛋白の再構成に関わるモーター蛋白の役割、口演、第 48 回日本臨床分子形態学会総会学術集会(熊本)(2016.9.23-24)
  7. 梁成秀、栗原秀剛、坂井建雄: DPPVI 抗体で惹起されるスリット膜の動的変化について、ポスター、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会(郡山)(2016.3.28-30) 優秀演題賞 受賞
  8. Kurihara H, Sakai T: ミオシン IIA plays a role in the organization of specialized cell body of podocyte via intermediate filaments. 55th Annual Meeting of the American Society of Cell Biology (San Diego) (2015.12.13)
  9. Nakamura S, Sakai T, Kurihara H: KIF11 is involved in the formation of tight junction in renal tubular epithelial cells. 55th Annual Meeting of the American Society of Cell Biology (San Diego) (2015.12.14)

〔図書〕(計 2 件)

1. 栗原秀剛: 腎の解剖学的特性-overview、所収: 日本小児腎臓病学会編「小児腎臓病学」改訂第 2 版、東京、診断と治療社、2017、435 頁
2. 栗原秀剛: 泌尿器系、所収: 坂井建雄、川上速人 監訳「ジュンケイラ組織学」第 4 版、東京、丸善、2015、567 頁

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・先任准教授  
研究者番号: 80311976

(2) 研究分担者

長瀬 美樹 (NAGASE, Miki)  
杏林大学・医学部・教授  
研究者番号: 60302733