

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09278

研究課題名(和文) 糸球体内皮・上皮細胞のカベオラを介すアルブミンの透過及びその抑制法の研究

研究課題名(英文) The experiments of Intracellular trafficking pathway of albumin in glomerular endothelial and epithelial cells through caveolae and its suppression methods

研究代表者

森山 能仁 (Moriyama, Takahito)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20439821

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)：これまで研究してきたアルブミンの糸球体内皮細胞へのカベオラを介す進入に続く透過経路を調べた。各種オルガネラとの二重染色によりアルブミンはアクチンや微小管などの細胞骨格に沿わずに初期エンドソームへ移動し、小胞体、ゴルジ体やライソソームなどの各種オルガネラはバイパスすることが明確となり、更にtranswells plateを用いた実験にて細胞の反対側にアルブミンは排出されることが明確となった。

また、ピューロマイシン投与ネフローゼ症候群マウスにおいてカベオラ阻害薬によりアルブミン尿が減少することが確認された。これらの結果よりアルブミン尿の新機序としてカベオラを介する細胞内通過経路が明確となった。

研究成果の概要(英文)： The analysis of intracellular trafficking pathway of albumin through glomerular endothelial cells after endocytosis via caveolae has been performed. Co-localization of immunofluorescence study of albumin with several organelle and cytoskeletons showed transcytosis that albumin moved not along with actins and microtubules, reached to early endosome, and sorted to bypass endoplasmic reticulum, golgi apparatus, and lysosomes. The experiment to use transwells plates showed that the exocytosis of albumin to the other side of cells.

In the in vivo study with nephrotic syndrome modeled mouse induced by the peritoneal injection of puromycin, the inhibitors of caveolae reduced the amount of albuminuria. All these results indicated that intracellular trafficking pathway of albumin through glomerular endothelial cells after endocytosis via caveolae as the new etiology of urinary albumin excretion.

研究分野：内科系臨床医学

キーワード：カベオラ アルブミン 糸球体内皮細胞 糸球体上皮細胞 エンドサイトーシス トランスサイトーシス エキソサイトーシス 細胞内透過

1. 研究開始当初の背景

アルブミン尿は、本邦における最多の透析導入原因疾患である糖尿病性腎症や種々の糸球体腎炎の最大の進行危険因子であり、アルブミン尿を含む蛋白尿の減少・寛解が腎炎の治療ターゲットである。しかし、実臨床の現場では、そのコントロールに難渋することが多く透析導入患者は増加の一途を辿り、アルブミン尿に対する有効な治療法、そしてそのためにアルブミン尿の発現機序の解明が望まれていた。

糸球体におけるアルブミン尿の発現機序は、濾過障壁として機能する糸球体上皮細胞、基底膜、内皮細胞が関与するが、実際はその研究は主に上皮細胞が中心であり、内皮細胞に関しては隔壁を有しない fenestrae と呼ばれる 100nm の孔を有するためアルブミンを含む蛋白の透過には関与しないと考えられてきた。しかし、実際の糸球体腎炎では fenestrae が狭小化・消失するような内皮細胞の腫大も観察され、fenestrae 以外の細胞内を通過するような経路の存在も考えられた。また、上皮細胞に関しても細胞間に存在するスリット膜の異常によりアルブミン尿が出現すると考えられてきたが、ネフローゼ症候群では上皮細胞の足突起は融合化し一塊となりスリット膜を含む細胞間隙は消失することから、上皮細胞に関しても細胞内を通過する経路の存在も考えられていた。しかし、実際はその糸球体上皮・内皮細胞内を通過する経路の解明にいたっておらず、早期の新たなアルブミン尿の発現経路の解明が求められていた。

2. 研究の目的

我々は新たな細胞内の通過経路として、細胞表面に存在する約 50nm の窪み構造であるカベオラに注目してきた。カベオラは肺など多くの血管内皮細胞のアルブミン透過に関与し血管内から血管外への漏出に影響を及ぼしている結果から、腎糸球体内皮細胞のカベオラもアルブミン透過に関わりアルブミン尿の一因となっている可能性を考えこれまで研究を行ってきた。その結果、実際に糸球体腎炎において糸球体係蹄上のカベオラの発現がアルブミン尿と相関し増強すること (J Clin Pathol 2011; 64: 504-509)、in vitro の研究でカベオラを介しアルブミンが細胞内に取り込まれることを報告した (J Cell Biochem 2015; 116: 1060-1069)。

本研究は更にその結果の発展として継続性を重視し細胞内へのカベオラを介するエンドサイトーシスの後のトランスサイトーシス及びエキソサイトーシスの解明と更に in vivo の研究に展開し経路遮断によるアルブミン尿減少効果を調べ、将来的な創薬につなげることを目的とした研究である。

3. 研究の方法

アルブミンのカベオラを介するエンドサイトーシス後の輸送経路として、微小管、アクチンなどの細胞骨格などに沿って移動、またその際モータープロテインであるキネシンやダイネイン、ミオシンなどが関与し、エンドソーム、ライソソーム、プロテオソーム、ゴルジ体、小胞体などの細胞内オルガネラに到達し、最終的に細胞の反対側に排泄されることを想定した。緑色標識アルブミンを糸球体内皮細胞に 15 分から 360 分まで経時的に incubation した後に固定し、それらの細胞骨格や細胞内オルガネラと二重染色を行い、細胞内のトランスサイトーシスを確認した。

また transwell plate を用いアルブミンが糸球体内皮細胞を介し細胞の反対側にアルブミンが移動するかどうかを調べ、また移動が確認された後、カベオラ阻害薬 (methyl beta cyclodextrin: MBCD) を用いその移動が阻害されるかを調べた。

更にピューロマイシンの腹腔内投与によるネフローゼ症候群モデルマウスを作成し、MBCD を投与することによりアルブミンの減少効果が得られるかどうかを調べた。また、その際に腎臓の病理組織も確認し、免疫染色にて MBCD 投与によりカベオラの発現が低下しているが、電子顕微鏡では糸球体内皮細胞の腫大や上皮細胞の足突起の融合所見は MBCD 未投与のマウスと比較しても同等に認められるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 緑色標識アルブミンと細胞骨格、細胞内オルガネラとの二重染色の実験

緑色標識アルブミンを糸球体内皮細胞に incubate し 15, 30, 60, 120, 240, 360 分で固定した。図 1a に 120 分後の各種オルガネラとの二重染色写真を示したが、初期エンドソームではアルブミンと強く二重染色するのに対して、その他のオルガネラである小胞体、ゴルジ体、ライソソーム、プロテアソームとはほとんど二重染色されず、また細胞骨格であるアクチンや微小管とも二重染色はされなかった。

これらを経時的に定量解析したものを図 1b に提示したが、初期エンドソームでは 15 ~ 360 分にかけて経時的に二重染色の程度が増強していくのに対して、その他のオルガネラや細胞骨格ではどの時間帯でもほとんど二重染色されないことが確認され、またそのどの時間帯でも初期エンドソームと比較し有意に二重染色の程度は低値であることが確認された。

これらの結果よりアルブミンはカベオラを介して糸球体内皮細胞へ進入した後、アクチンや微小管などの細胞骨格に沿わずに初期エンドソームへと移動するが、その他の小胞体やゴルジ体、ライソソームなどのオルガネラに移動しないことが明確となった。

図1a. 緑色標識アルブミンと各種オルガネラの二重染色

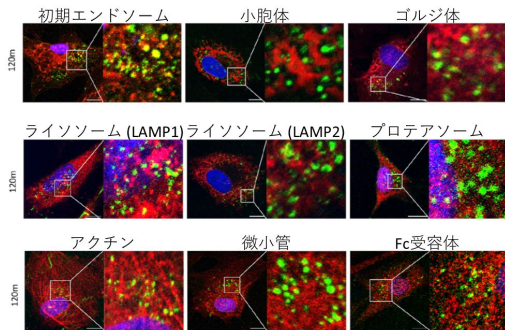
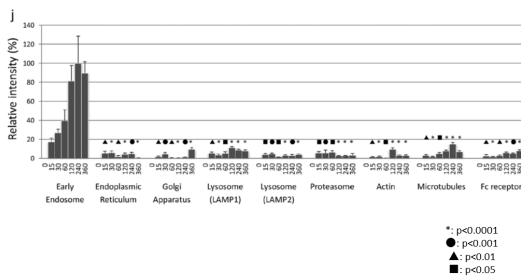


図1b. 各オルガネラと緑色標識アルブミンの二重染色の定量解析

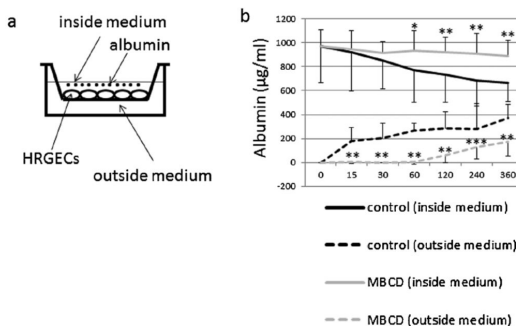


(2) Transwells plate を用いたアルブミンのエキソサイトーシスの実験

図2aのようにTranswells plateの内側のwellにfull confluentに糸球体内皮細胞(human renal glomerular endothelial cells: HRGECs)を培養し、内側の培養液のみにアルブミンを1000 µg/ml加え、外側にはアルブミンを加えていない培養液を加え、経時的にwellの内外の培養液の濃度を測定した。

その結果、図2bのようにコントロールのwellの内側の培養液のアルブミン濃度は経時的に低下し、外側の培養液のアルブミン濃度は経時的に上昇したのに対して、MBCDで処理した細胞では内側のアルブミン濃度の低下及び外側のアルブミン濃度の上昇は緩徐であることより、アルブミンは細胞内を透過し反対側に排出され、かつMBCDによるカベオラ阻害によりその透過が抑制されていることから、カベオラを介したアルブミンの細胞内透過が抑制されていることが示された。

図2. Transwells plateを用いたアルブミンの細胞透過

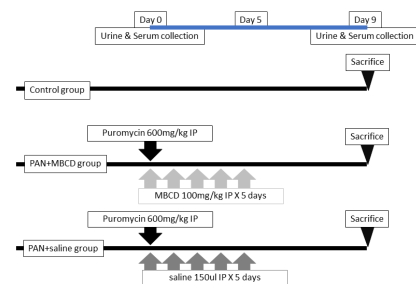


これらの結果より、アルブミンのトランスサイトーシスはアクチンや微小管などの細胞骨格に沿わずに移動し初期エンドソームに到達し、そこで小胞体やゴルジ体で修飾を受けることなく、ライソソームやプロテアソームなどで分解されることなく、反対側にエキソサイトーシスされるように仕分けされることが明確となった。

(3) ネフローゼ症候群モデルマウスを用いたカベオラ抑制に伴うアルブミン尿減少効果

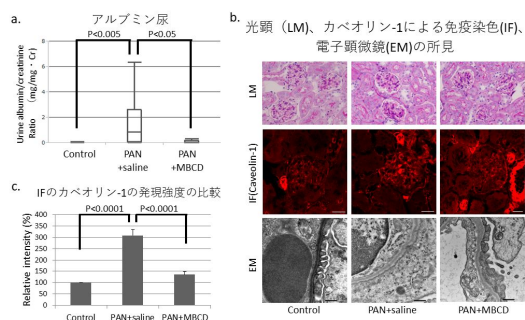
図3のプロトコールのようにコントロールとピューロマイシン(PAN)投与+MBCD投与群、PAN+saline投与群に分け、PAN投与後9日目のアルブミン尿と腎臓病理所見を調べた。

図3. ネフローゼ症候群モデルマウスに対するカベオラ抑制によるアルブミン尿減少効果の実験



その結果は図4aのように、PAN+saline群ではコントロールと比較し有意にアルブミン尿が増加し、またMBCDの投与によりその程度は有意に抑制された。また、病理組織所見では電子顕微鏡ではPAN+MBCD群においてもPAN+saline群と同等に糸球体内皮細胞の腫大、上皮細胞の足突起の融合が認められるが、免疫染色におけるカベオリン-1の発現はMBCDの投与により減弱していた。

図4. コントロール、ネフローゼ症候群モデル及びMBCD投与ネフローゼ症候群モデルマウスの臨床病理所見



これらの結果より in vivo の研究においてもカベオラの発現の低下とともにアルブミン尿の減少効果が得られることが明らかとなり、細胞内透過経路であるカベオラ経路が新たなアルブミン尿の一因である可能性が示唆された。

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2件)

- (1) Takahito Moriyama, Kazunori Karasawa, Kosaku Nitta. The role of caveolae on albumin passage through glomerular endothelial and epithelial cells: The new etiology of urinary excretion. Contributions to Nephrology 2018. 196: 1-11. DOI: 10.1159/000486929. 査読なし
- (2) Takahito Moriyama, Kayo Sasaki, Kazunori Karasawa, Keiko Uchida, Kosaku Nitta. Intracellular transcytosis of albumin in glomerular endothelial cells after endocytosis through caveolae. Journal of Cellular Physiology 2017. 232: 3565-3573. DOI: 10.1002/jcp.25817. 査読あり

[学会発表](計2件)

- (1) 森山能仁、唐澤一徳、内田啓子、新田孝作、アルブミンのカベオラを介すヒト系球体内皮細胞通過・排出経路、第60回日本腎臓学会学術集会、2017年5月26日~28日、仙台
- (2) 森山能仁、武井卓、板橋美津世、唐澤一徳、内田啓子、新田孝作、ヒト系球体内皮細胞におけるカベオラを介すアルブミンの通過/排泄経路、第58回日本腎臓学会学術集会、2015年6月5日~7日、名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

森山 能仁 (MORIYAMA, Takahito)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20439821