

令和元年6月13日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07344

研究課題名(和文) 糸球体濾過障壁の恒常性維持におけるGpr116受容体の作用機構

研究課題名(英文) Role of Gpr116 in maintenance of the glomerular filtration barrier in mice

研究代表者

中村 信大 (Nakamura, Nobuhiro)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：80361765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、Gpr116が腎糸球体の血管内皮細胞に局在することを免疫電顕で明らかにした。次に、正常マウスとGpr116欠損マウスの糸球体血管内皮細胞の遺伝子比較解析を行い、Gpr116欠損によって変動する遺伝子を同定した。また、Gpr116の細胞内シグナル伝達経路については、Gpr116の過剰発現によって活性化状態に変化する細胞内シグナル伝達分子の候補の絞り込みができた。さらに、Gpr116安定発現細胞株を用いてせん断ずり応力(shear stress)への応答性について検討したところ、流れ刺激によってわずかであるが応答を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎炎や腎不全に有効な治療法が確立しておらず、年々透析患者数が増加する傾向にあって患者の医療費負担や国の財政圧迫が国内外問わず問題視されている。その為、糸球体濾過障壁の形成維持機構の解明が急務となっている。本研究は、糸球体血管内皮における情報伝達とその作用という新しい切り口から濾過障壁の恒常性維持機構の解明に挑戦する点が特色であり、今まで不明な点が多かった糸球体内皮細胞の特性を明らかにするばかりでなく、腎疾患の病態の基礎・臨床研究の進展に貢献できる点で意義深い。

研究成果の概要(英文)：In this study, 1) we showed that Gpr116 is localized to the glomerular endothelial cells by immunoelectron microscopy. 2) We identified genes of which expression are altered in the glomerular endothelial cells of Gpr116-deficient mice. 3) We identified candidates of downstream signaling molecules, which are activated by Gpr116 overexpression. 4) We observed that several intracellular signaling pathways were activated to a lesser extent in Gpr116 overexpressing cells by shear stress.

研究分野：分子生物学

キーワード：受容体 血管内皮細胞 腎臓 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

体液の恒常性維持に必要な尿の生成は、腎系球体における血漿成分の限外濾過で始まる。濾過の場である系球体毛細血管は、血管内皮細胞、基底膜、系球体上皮細胞 (podocyte) の三層構造から成り、細胞構造に由来するサイズバリアーと基底膜の陰性荷電に由来するチャージバリアーの働きによって血漿タンパク質の濾過を防ぐフィルター (濾過障壁) を形成している。糖尿病や高血圧では、この濾過障壁に障害が起こって血漿タンパク質が濾過されて蛋白尿を生成する腎炎を併発し、やがて腎不全へと進行することが知られている。しかしながら、系球体毛細血管壁の形成・維持機構はおろか、濾過障壁の障害の発症機序もほとんど不明であるため、腎炎や腎不全の根本治療法は確立しておらず対症療法である人工透析が主流なのが現状である。

我々は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーに属し、リガンド不明のオーファン受容体である Gpr116 が系球体毛細血管の内皮細胞に発現すること、Gpr116 欠損マウスが、系球体濾過障壁の形態異常といった腎炎に似た異常を呈することを見出した。Gpr116 を介した内皮細胞や podocyte への情報伝達が系球体の濾過機能の維持に重要である可能性が高くなった。

## 2. 研究の目的

腎系球体の毛細血管壁には、尿生成の第一段階である血液濾過を担うバリアー (濾過障壁) が備わっており、その構造異常は腎疾患を誘発することが知られている。しかしながら、濾過障壁がどのようにして形成・維持されているかは不明点が多い。我々は Gpr116 受容体の欠損マウスの解析から、Gpr116 が濾過障壁を構成する血管内皮細胞の形態形成や基底膜構成分子の発現制御に関与することを見出した。本研究の目的は、系球体毛細血管内皮細胞における Gpr116 の作用機構を解明し、濾過障壁の恒常性維持とその破綻による病態発症のプロセスを説明できるようにすることである。

## 3. 研究の方法

我々が見出した腎系球体のユニークな表現型を手がかりに、Gpr116 の系球体血管内皮における役割を解明するため、Gpr116 の細胞内局在を免疫電顕により決定し、Gpr116 欠損マウスの系球体で発現量が変化する遺伝子の中から、基底膜や内皮細胞の構造維持に機能するものを絞り込み、その機能解析から Gpr116 の下流シグナルを探索した。また、免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド法などでリガンドの探索を行い、上流シグナルの決定を試みた。さらに、Gpr116 のユビキチン化に焦点を当てた発現制御機構を解析し、Gpr116 の局在および活性化の調節の仕組みを解析した。

## 4. 研究成果

腎系球体における Gpr116 の細胞内局在を決定するために免疫電顕を行ったところ、Gpr116 が血管内皮細胞の血管内腔側の細胞膜上に局在することを明らかにした。この結果、Gpr116 が血液中の何らかの刺激を受けてシグナル伝達を行っており、基底膜成分との直接的な相互作用はないことが示唆された。

正常マウスと Gpr116 欠損マウスの系球体血管内皮細胞の RNA を用いてマイクロアレイ解析による遺伝子比較解析を行った結果、基底膜成分などの遺伝子発現が Gpr116 欠損によって変動することが分かった。肺血管内皮細胞を用いて同様の遺伝子比較解析を行ったが、系球体血管内皮細胞で認められた基底膜成分の遺伝子発現変動は認められなかった。Gpr116 の下流シグナル制御が組織・細胞特異的なものであることが示唆された。この解析の過程で肺血管内皮細胞において、Gpr116 欠損によって CCL2 の発現上昇が生じて喘息に似た炎症を引き起こす可能性を見出した。

また、Gpr116 の細胞内シグナル伝達経路を明らかにするために、Gpr116 とその変異体を恒常的に発現する細胞株を作製して、各細胞株における主要なシグナル伝達中継分子の活性化状態について解析をした。その結果、Gpr116 の過剰発現によって活性化状態に変化する候補分子の絞り込みができたものの、正常および Gpr116 欠損マウス由来の血管内皮細胞では候補分子の活性化状態に差異は認められなかった。

Gpr116 の細胞内局在から、何らかの物理的刺激によって活性化されるのではないかと予想をした。Gpr116 安定発現細胞株を用いてせん断ずり応力 (shear stress) への応答性について検討したところ、流れ刺激によってわずかに応答を示したが、生体内で意味を持つほどの活性化を引き起こした結果を得たとは言い難いものであった。今後の条件検討や他の刺激 (伸展刺激など) を検討する必要がある。

Gpr116 のタンパク質安定化に関わる領域について、変異体の発現解析により候補を絞り込むことに成功した。研究期間内の解明は出来なかったものの、引き続き安定化に必要な領域の特定とその分子機構についての解析を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

### 査読付原著論文

Kubo F, Ariestanti DM, Oki S, Fukuzawa T, Demizu R, Sato T, Sabirin RM, Hirose S, Nakamura N  
Loss of the adhesion G-protein coupled receptor ADGRF5 in mice induces airway inflammation and the expression of CCL2 in lung endothelial cells.  
Respir. Res. 20, 11 (Jan 2019)

〔学会発表〕(計 5件)

久保 文雅、Donna Ariestanti、沖 颯太、福澤拓、出水 遼太郎、佐藤朋哉、Rahmaningsih Sabirin、広瀬茂久、中村 信大  
G タンパク質共役型受容体 ADGRF5 の欠損は肺血管内皮細胞における炎症性分子の発現と喘息に似た表現型を誘導する  
第91回日本生化学会大会(2018年9月24日, 京都, ポスター発表)

佐藤朋哉、加藤真子、久保 文雅、中村 信大  
Intracellular signaling Mechanism of G-protein coupled receptor ADGRF5  
13th Toin International Symposium on Biomedical Engineering (2018年10月27日, 横浜, ポスター発表)

久保 文雅、Donna Ariestanti、沖 颯太、Rahmaningsih Sabirin、出水 遼太郎、中村 信大  
Adgrf5 欠損マウスは気管支喘息および肺線維症様の表現型を現す  
2017年度生命科学系学会合同年次大会 (2017年12月6日, 神戸, ポスター発表)

Fumimasa Kubo, Donna Maretta Ariestanti, Souta Oki, Rahmaningsih Mara Sabirin, Ryota Demizu, and Nobuhiro Nakamura  
Adgrf5 deficient mice exhibit bronchial asthma- and fibrosis-like phenotypes  
12th Toin International Symposium on Biomedical Engineering (2017年11月11日, 横浜, 口頭発表)

Xiaochuan MA 他 26名 (中村信大: 11番目)  
FNDC4 promotes brown-like adipocyte formation and glucose clearance via an orphan G-protein coupled receptor  
77<sup>th</sup> American Diabetes Association Scientific Sessions( 2017年6月9~13日, San Diego, USA, ポスター発表)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
研究室のホームページ：  
<http://www.nnakamura.bio.titech.ac.jp/TOP.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。