

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06227

研究課題名(和文)腎系球体上皮細胞の突起形成におけるアクチン細胞骨格制御機構の解明

研究課題名(英文)Actin cytoskeletal regulation of process formation in kidney podocytes.

研究代表者

斉藤 康二 (Saito, Koji)

北里大学・理学部・講師

研究者番号：70556901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の濾過機能を担う重要な細胞である腎系球体上皮細胞(ポドサイト)は、アクチン細胞骨格によって支えられる高度に発達した濾過に必須の突起構造をもつ。本研究では、生体に近い突起構造の形成を誘導できるポドサイト細胞株を用いた生体外(in vitro)実験により、ポドサイトの突起形成に重要な役割を果たす分子として、アクチン細胞骨格を制御するRho small GTPase Rac1の不活化因子(GAP)であるFilGAPを同定した。最終的に、FilGAPによるRac1及びその標的分子(エフェクター)であるPAK1の活性抑制が、ポドサイトの突起形成に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポドサイトの突起消失を特徴とするポドサイト障害では、大量の蛋白尿を呈する腎疾患が生じる。ポドサイト障害を要因とする進行性の腎疾患は、最終的に腎不全に至るケースもあり、医学的観点からその発症に関わる分子機構の解明が望まれている。本研究ではin vitro実験による解析から、ポドサイトの突起形成に関わる分子の一つとして、Rac1 GAPであるFilGAPを同定した。本研究で得られたポドサイトの突起形成に関わる分子機構の知見は、今後の生体を用いた解析(遺伝子欠損マウスなど)に活かされ、最終的に、ポドサイト障害(突起消失)を通じた腎疾患発症の作用機序の解明につながると期待できる。

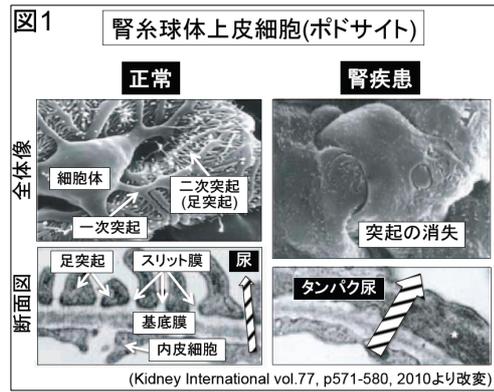
研究成果の概要(英文)：Kidney podocytes, which are essential for glomerular filtration barrier maintenance, have highly developed process structures supported by an actin cytoskeleton. Using in vitro experiments with a unique podocyte cell line capable of inducing the formation of highly organized cell processes, we identified FilGAP, a GTPase-activating protein (GAP) for Rho small GTPase Rac1, as an important regulator that mediates the formation of processes in podocytes. In this study, we found that the inactivation of Rac1 by FilGAP is required for the process formation of podocytes. Moreover, FilGAP regulated the process formation through suppression of P21-activated kinase 1 (PAK1), a downstream effector of Rac1. Finally, we propose that FilGAP, as a Rac1 GAP, contributes to the process formation of podocytes by suppressing Rac1/PAK1 signaling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腎ポドサイト 突起構造 細胞骨格 Rho small GTPase ポドサイト細胞株

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎臓は、血液からの老廃物や余分な水分の濾過および排出を行って尿を生成する器官として機能し、体の恒常性を維持している。腎糸球体は腎臓の基本的な機能単位の一つで、3層構造になっており、内側(血管側)から内皮細胞、基底膜、腎糸球体上皮細胞(ポドサイト)で構成されている(図1左, 正常)。なかでも、ポドサイトは濾過を行う必須の細胞である。ポドサイトは細胞体から伸びる一次突起とそこから進展する二次突起(足突起)を持ち、足突起が常に別の細胞から出た足突起と隣り合うように絡みあって基底膜を覆っている(図1左, 正常)。血液からの成分は、この足突起間のスリット膜と呼ばれる構造を通過するときに濾過され(図1左, 斜線矢印)、尿管へ輸送されて尿となって排出される。ポドサイトの突起は腎糸球体の濾過機能にとって必須の構造であり、突起が消失すると濾過機能を失って血液成分が漏れでてタンパク尿が生じ(図1右, 斜線矢印)、ネフローゼ症候群などを発症する。従って、ポドサイトの突起形成やその維持がどのように制御されているのかを明らかにすることが、腎疾患の原因遺伝子の特定やその作用機序を知る上で極めて重要である。近年、世界的に慢性腎疾患患者数は増加の一途を辿っている。国内でも腎疾患による血液透析者の数は年々増大していることから、慢性腎疾患の進展機序の解明とその治療戦略の構築は、医学的、社会的、そして医療経済上の重要な課題である。



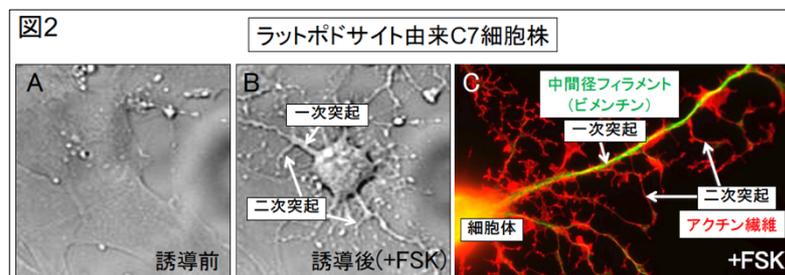
(2) ポドサイトの突起構造は、Rho small GTPaseによって制御されるアクチン細胞骨格によって支えられている。Rho small GTPaseの活性異常は、アクチン細胞骨格の再編成を通じて細胞形態を変化させ、突起の消失を引き起こす。特に Rac1 の活性化は、突起消失の原因となることが蛋白尿発症マウスの解析から報告されており(Nat Med, 14, 55-63, 2008; Nat Med, 14, 1370-1376, 2008)、その活性化がポドサイト障害(突起消失)による腎疾患発症の要因の一つであると考えられている。従って、ポドサイトの突起形成において Rac1 の活性がどのように制御されているのかを明らかにすることは、腎研究の重要な研究課題の一つである。しかし当時、ポドサイトにおいて Rac1 の活性を制御する分子機構はほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、Rac1 の不活化因子(GAP)の一つである FilGAP に着目した。FilGAP は以前、研究分担者である太田安隆教授が Rac1 GAP として同定した分子である(Nat Cell Biol, 8, 803-814, 2006)。さらに、FilGAP がポドサイトに多く発現し、家族性腎疾患患者においてその GAP 活性に影響を与える遺伝子変異が報告されていた(J Clin Invest, 121, 4127-4137, 2011)。おそらく、FilGAP の機能不全が細胞内の Rac 活性の上昇を引き起こして突起形成に影響を及ぼしていると推察された。そこで、アクチン細胞骨格を制御する Rac1 の GAP である FilGAP のポドサイトにおける突起形成への関与を調べることを目的に生体外(*in vitro*)実験を行った。

3. 研究の方法

実験には、連携研究者である栗原秀剛教授が樹立したラットポドサイト由来 C7 細胞株を使用した。C7 細胞は通常培養すると図 2A のような扁平な形態をしているが、フォルスコリン(FSK)の添加により数時間で図 2B のような突起構造を形成する。実際に、細胞体から伸びた突起では、一次突起のマーカーとなるビメンチン(中間径フィラメント)の染色が観察される(図 2C)。さらにそこから伸びた細かい突起には、二次突起に豊富に存在するアクチン繊維の染色が観察され(図 2C)、確かに生体内でみられる突起の特徴を示している。本研究では、C7 細胞を用いて以下の実験を行った。



- (1) Small interfering RNA (siRNA)による FilGAP の遺伝子発現抑制(KD)及び FilGAP の GAP 活性欠損変異体(Δ GAP, R175A)の遺伝子導入による突起形成への影響を調べた。
- (2) FSK 処理による Rac1 及び Rac1 の標的分子(エフェクター)である PAK1 の活性変化を調べた。
- (3) PAK1 阻害剤(IPA-3)処理及び PAK1 の恒常活性化型(T423E)もしくは優性阻害型(K299R)変異

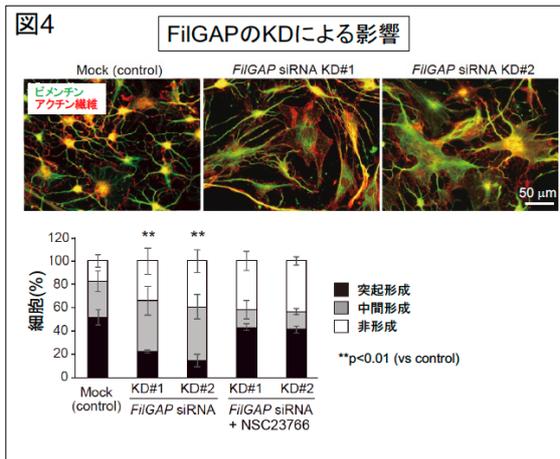
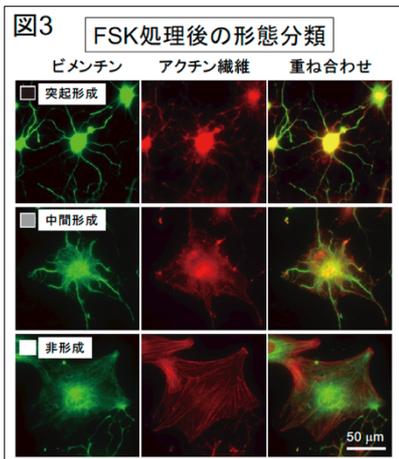
体の遺伝子導入による突起形成への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) FilGAP は Rac1 の不活化を通じて突起形成を制御する。

① 最初に、C7 細胞を FSK 処理 (90 分間) した細胞の形態を観察し、図 3 で示すように形態を 3 つに分類した：一次突起のマーカであるビメンチンが明確に集積して突起を形成している細胞 (突起形成)、突起構造は一部観察できるもののビメンチンの集積が不十分な細胞 (中間形成)、及びビメンチンの集積が全く観察できない細胞 (非形成)。

② 上記分類をもとに、C7 細胞で FilGAP を KD したときの突起形成への影響を調べた。その結果、FilGAP の KD によって突起を形成する細胞 (■) はコントロールに比べて顕著に減少した (図 4)。この減少は、Rac1 の阻害剤 (NSC22766) 処理によって回復した (図 4)。

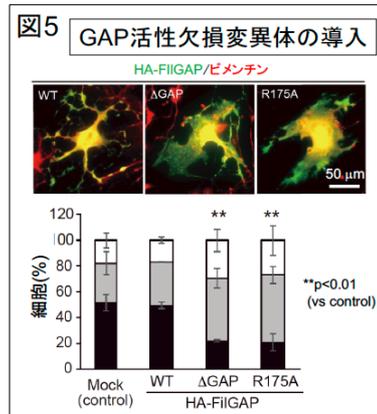


③ FilGAP の GAP 活性がない優性阻害型 FilGAP 変異体 (Δ GAP, R175A) を遺伝子導入して、突起形成への影響を調べた。その結果、FilGAP の Δ GAP や R175A 変異体の発現によって突起を形成する細胞は顕著に減少した (図 5)。FilGAP の野生型 (WT) を遺伝子導入しても突起形成に影響はみられなかった。

④ Rac1 の恒常活性化型 (G12V) もしくは優性阻害型 (T17N) 変異体を遺伝子導入して、突起形成への影響を調べた。その結果、Rac1 G12V 変異体の発現によって突起形成は顕著に阻害された。一方、Rac1 T17N 変異体の発現では突起形成に影響はみられなかった (データ示さず)。

⑤ C7 細胞で FSK 処理によって誘導される突起構造は、培地中の FSK の除去によって徐々に消失する。時間経過に伴う突起消失の様子をタイムラプス顕微鏡を用いて観察した結果、FilGAP を KD するとコントロールに比べて速やかに突起が消失した (データ示さず)。

以上の結果より、FilGAP による Rac 1 活性の抑制が突起形成に重要であることが示唆された。



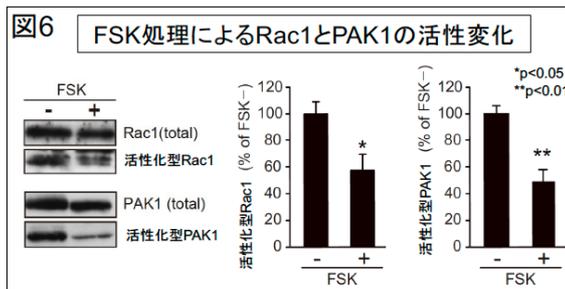
(2) 突起形成に伴って Rac1 及び PAK1 活性は低下する。

① 上記の通り、C7 細胞を FSK で処理すると突起形成が誘導される。そこで、FSK 処理による Rac1 活性の変化を活性化型 (GTP 結合型) Rac1 のプルダウンアッセイにより調べた。その結果、誘導前 (-FSK) に比べて誘導後 (+FSK) の方が Rac1 の活性は低下した (図 6)。

② Rac1 はエフェクターと結合して活性化し、その下流にシグナルを伝達する。Rac1 エフェクターの一つである PAK1 に着目し、FSK 処理による PAK1 活性の変化を活性化型 (リン酸化型) PAK1 抗体を用いたウエスタンブロットにより調べた。その結果、Rac1 同様、FSK 処理によって PAK1 の活性は低下した (図 6)。

③ FilGAP を KD すると、FSK 処理後の Rac1 及び PAK1 の活性はコントロールに比べて上昇した (データ示さず)。

以上の結果より、Rac1 及び PAK1 の活性抑制が突起形成に関与していることが示唆された。

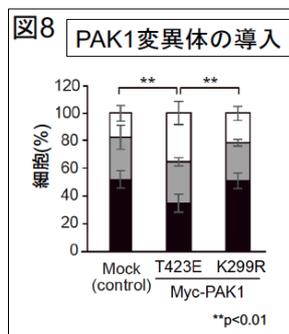
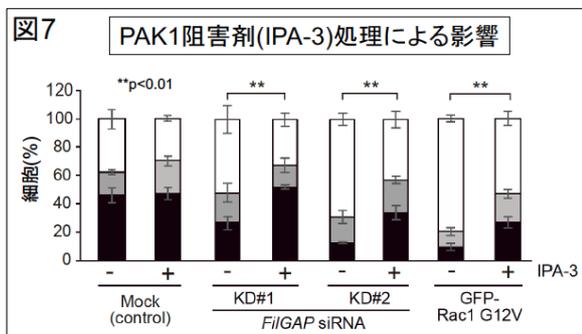


(3) FilGAP は PAK1 活性の抑制を通じて突起形成を制御する。

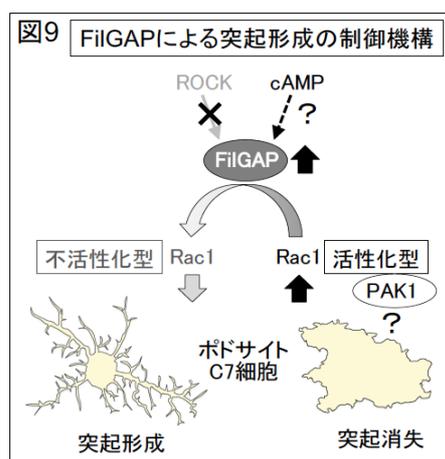
① 上記の結果から、C7 細胞における FilGAP の KD は Rac1 を活性化し、その下流の PAK1 を活性

化して突起形成を阻害していると考えられる。そこで、FilGAP を KD した C7 細胞において、PAK1 の阻害剤 (IPA-3) で処理して突起形成への影響を調べた。その結果、FilGAP の KD による突起形成の阻害効果は、IPA-3 処理によって回復した (図 7)。さらに、Rac1 G12V 変異体の発現によるその阻害効果も、IPA-3 処理によって一部回復した (図 7)。

② 突起形成への PAK1 活性の影響を調べるため、PAK1 の恒常活性化型 (T423E) もしくは優性阻害型 (K299R) 変異体を遺伝子導入した。その結果、PAK1 T423E 変異体の発現によって突起形成が阻害された (図 8)。一方、PAK1 K299R 変異体の発現では突起形成への影響はみられなかった (図 8)。以上の結果より、FilGAP による PAK1 活性の抑制が突起形成に重要であることが示唆された。



以上、ポドサイト細胞株を用いた *in vitro* 実験により、FilGAP がポドサイトの機能に必須の突起構造の形成に関与していることが明らかになった (図 9)。本研究では、FilGAP による Rac1 活性の抑制が突起形成に重要であることが示された。さらに Rac1 下流の PAK1 シグナル経路の抑制の重要性も示された。一方で、当初計画していた FilGAP の機能を制御する上流の分子機構は明らかにできなかった。FilGAP は Rho キナーゼ (ROCK) によってリン酸化されるとその活性が促進されるが (Nat Cell Biol, 8, 803-814, 2006)、ポドサイトの突起形成における ROCK による FilGAP のリン酸化の関与は認められなかった。上記の通り、FSK はポドサイト細胞株で突起形成を誘導する。また、突起消失を特徴とするポドサイト障害モデルマウスにおいて、FSK 投与によって突起構造が回復することが報告されている (PLoS ONE, 9, e92003, 2014)。FSK は cAMP シグナル経路を活性化することから、cAMP シグナル下流で FilGAP の機能を制御する分子機構があるのか、その検証が必要である。今後、生体を用いた解析 (遺伝子欠損マウスなど) も含め、Rac1/PAK1 シグナルの活性化が突起形成を阻害する分子機構を明らかにすることが、Rac1 の活性化に起因する腎疾患発症の作用機序の解明につながると期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Koji, Mori Mamiko, Kambara Norito, Ohta Yasutaka	4. 巻 35
2. 論文標題 FilGAP, a GAP protein for Rac, regulates front rear polarity and tumor cell migration through the ECM	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202002155R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanzaki Satoko, Tamura Shiori, Ito Toshiaki, Wakabayashi Mizuki, Saito Koji, Kato Shigeki, Ohta Yasutaka, Sekita Yoichi, Kimura Tohru	4. 巻 160
2. 論文標題 Involvement of Nlrp9a/b/c in mouse preimplantation development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-19-0516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsutsumi Koji, Nakamura Yoh, Kitagawa Yusuke, Suzuki Yurina, Shibagaki Yoshio, Hattori Seisuke, Ohta Yasutaka	4. 巻 522
2. 論文標題 AGAP1 regulates subcellular localization of FilGAP and control cancer cell invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 676 ~ 683
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zuinen Takuya, Tsutsumi Koji, Ohta Yasutaka	4. 巻 514
2. 論文標題 FilGAP regulates distinct stages of epithelial tubulogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 742 ~ 749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.04.187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 齊藤康二, 與川正治, 水田さり, 多田奏絵, 小田萌紀, 畠山裕康, 高橋倫子, 栗原秀剛, 太田安隆
2. 発表標題 ポドサイトにおけるRacGAP因子FilGAPの機能解析
3. 学会等名 ポドサイト研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 與川正治, 齊藤康二, 畠山裕康, 高橋倫子, 栗原秀剛, 太田安隆
2. 発表標題 ポドサイトにおけるFilGAPの機能解析
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村史織, 神崎理子, 伊藤駿瑛, 若林美月, 横田佳奈, 齊藤康二, 加藤重城, 太田安隆, 関田洋一, 木村透
2. 発表標題 着床前および着床後の発生に関与する母性因子としてのNLRP9
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 與川正治, 齊藤康二, 畠山裕康, 高橋倫子, 栗原秀剛, 太田安隆
2. 発表標題 FilGAPはポドサイトにおいて細胞 - ECM間の接着を制御する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斉藤康二, 與川正治, 水田さり, 多田奏絵, 小田萌紀, 栗原秀剛, 太田安隆
2. 発表標題 Rac1/PAK1シグナルの活性化は腎系球体上皮細胞の突起形成を阻害する
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村杜萌, 斉藤康二, 梅川恵美, 大槻蘭子, 太田安隆
2. 発表標題 RacGAP因子ARHGAP25はセプチン複合体と結合し、葉状仮足形成を制御する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村史織, 神崎 理子, 伊藤 駿瑛, 若林 美月, 斉藤康二, 加藤 重城, 太田安隆, 関田洋一, 木村透
2. 発表標題 着床前および着床後の発生に関する母性因子としてのNLRP9
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斉藤康二, 水田さり, 多田奏絵, 小田萌紀, 與川正治, 栗原秀剛, 太田安隆
2. 発表標題 Racシグナルの活性化は腎系球体上皮細胞の突起形成を阻害する
3. 学会等名 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千葉 陽介, 斉藤 康二, 高橋 留梨, 太田 安隆
2. 発表標題 RacGAP因子FilGAPは乳がん細胞において浸潤突起形成を制御する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斉藤康二, 水田さり, 多田奏絵, 栗原秀剛, 太田安隆
2. 発表標題 腎系球体上皮細胞の突起形成におけるFilGAPの役割
3. 学会等名 生体運動合同班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyle D. Morgan, Hui Kang, Ana V. Araujo, Trevin R. Zyla, Koji Saito, Denis Tsygankov, Daniel J. Lew
2. 発表標題 Understanding cell-cycle regulation of cell polarity in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Saito, Norito Kambara, Yasutaka Ohta
2. 発表標題 FilGAP, a GAP protein for Rac1, contributes to tumor cell migration by regulating front-rear polarity
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斉藤康二, 水田さり, 多田奏絵, 栗原秀剛, 太田安隆
2. 発表標題 腎系球体上皮細胞の突起形成におけるRacGAP因子FiliGAPの機能解析
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	太田 安隆 (Ohta Yasutaka) (90192517)	北里大学・理学部・教授 (32607)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	栗原 秀剛 (Kurihara Kidetake) (80311976)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	現所属：藍野大学, 医療保健学部 役職：教授

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------