

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34441

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08221

研究課題名(和文)系球体内皮細胞の場に応じた領域特異性の確立：腎炎発症進展解析の新たなアプローチ

研究課題名(英文) Establishment of region-specificity in glomerular endothelial cells

研究代表者

栗原 秀剛 (KURIHARA, Hidetake)

藍野大学・医療保健学部・教授

研究者番号：80311976

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)：腎臓が行う濾過システムの中心となる系球体毛細血管は2つの細胞により取り囲まれている。一つは足細胞で、この細胞はスリット膜という特殊なフィルターを形成して血液の濾過を行う。もう一つはメサンギウム細胞で、毛細血管の径を調整し、血流量を調整する。それぞれの細胞に面した血管内皮にどのような違いがあるかは明らかでない。本研究により、系球体毛細血管は2つの大きなドメイン構造を持ち、取り囲む細胞の種類によって異なる分子を発現していることが分かった。この成果により、一つの毛細血管を構成する内皮細胞は一樣ではなく、周囲の環境に応じて様々に性質を変化させ、組織特異的な機能に関わる事実を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺の毛細血管や腎臓の系球体毛細血管はそれぞれ、呼吸と血液の濾過による尿生成という生体にとって極めて重要な働きをしている。毛細血管を構成する内皮細胞は一樣な構造をしているように考えられているが、本研究により、内皮細胞は血管を取り巻く細胞や細胞外基質の状況に対応して形態や発現する分子を変化させる証拠を見いだした。この研究により、毛細血管は周囲を取り巻く環境に応じて性質を変化させることができる可塑性に富む構造であることが分かった。この血管内皮細胞の性質を分子レベルで明らかにすることにより、それぞれの組織において循環系が果たす役割をさらに詳細に理解することができるようになる。

研究成果の概要(英文)：The glomerular capillaries responsible for glomerular filtration are surrounded by two cells. One is a podocyte, which forms a specialized filter called a slit diaphragm to filtrate blood. The other is a mesangial cell, which regulates the diameter of capillary and control blood flow. We found that glomerular capillaries have two large domain structures and express different molecules depending on the type of surrounding cells. The study demonstrates that it is possible to clarify the fact that endothelial cells constituting one capillary are not uniform and change their properties in various way according to the surrounding environment and are involved in tissue-specific functions.

研究分野：腎臓の細胞生物学

キーワード：血管内皮細胞 膜ドメイン 腎臓 メサンギウム細胞 腎炎 肺 ペリサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身に張り巡らされた血管の内壁を構成する内皮細胞は、組織に応じた形態変化を示す。内皮細胞の形態は窓と呼ばれる孔を持つかどうか(有窓か無窓か)で大まかに分類される。一般的に、血管は単一な構造として理解されているが、糸球体の内皮細胞においては、糸球体毛細血管を外から取り巻く細胞により、状態は変化する。足細胞に面した側では、細胞は扁平で多くの窓孔を形成し、さらに足細胞との間に基底膜を形成し、足細胞間に張るスリット膜とともに糸球体濾過に関わる。一方、メサンギウム細胞側では、内皮細胞は窓を持たず、細胞質は核を有するため厚みを増している。さらに、この場所の内皮細胞は基底膜も形成しない。このように一つの血管において場所により形態が異なる状態を作り出す要因が、近接する細胞との相互作用によるのか、それとも内皮細胞自体が持つ特性によるのかは、未だ不明である。糸球体の発生過程において足細胞が産生する VEGF により内皮細胞を誘導し、その内皮細胞によって作られた PDGF によってメサンギウム細胞が誘導を受けると考えられる。VEGF や PDGF といった液性因子により内皮細胞の形態が制御されているならば、場所により内皮細胞の対応が変化していることになる。そこには、レセプターの発現の違いが想定できるが、そのような報告はされていない。メサンギウムに面した内皮細胞が基底膜を形成しないのはなぜか？メサンギウム側に内皮細胞の核が集まるのはなぜか？足細胞に面した側のみ窓が形成されるのはなぜか？これらが PDGF と VEGF のみで説明できるのか？など内皮細胞の領域特異的な形態と機能の制御機構について多くの疑問が湧く。文献的にもきちんとした証明はされていないため、一つの血管内で局所環境に応じて内皮細胞が形態と機能を変化させる機構について実験的に確かめる必要がある。具体的にメサンギウム細胞側でのみ発現する内皮細胞由来の分子が存在するならば、メサンギウム細胞と内皮細胞の関係を調べる上で極めて有用である。我々は内皮細胞と接触するメサンギウム細胞に発現する接着分子の研究を行い、いくつかの分子を同定し一部は論文として報告している。さらに、糸球体を抗原として多くのモノクローナル抗体を作製し、糸球体毛細血管に特異的に反応するクローンを選び出して抗原の局在を調べたところ、糸球体内皮細胞の基底側を認識する抗体 J22 を新たに得た。この抗体の抗原を明らかにし、その発現制御を解明することで、糸球体内皮細胞の領域特異的な制御による形態変化がどのようにして起こるかを解明する糸口になるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

加齢に伴う腎機能低下により、慢性腎臓病 (CKD) の割合は増加し、新規透析導入患者の約半数が 65 歳以上であることから、早急な対策が必要であるが、その治療および予防の基礎となる糸球体機能の解析は未だ充分ではない。CKD の原因である慢性糸球体腎炎の多くは糸球体毛細血管の炎症を特徴とする。内皮細胞の病態を考える上で、糸球体内皮細胞の特徴を理解することが重要である。糸球体毛細血管は足細胞との間に厚い基底膜を構成し、そこを通して血液の濾過を行うが、メサンギウム領域では、基底膜を欠く。足細胞に面した内皮細胞とメサンギウムに面した内皮細胞でどのような機能的な違いがあるのか、腎炎発症時に起こる変化の違いはあるかとの問いについては、全く研究がなされていない。我々はこれまでに糸球体の領域特異的な発現分子を見いだすため、ラット糸球体を抗原として多くのモノクローナル抗体を作製し、その認識部位の同定を行ってきた (Am J Physiol 1998)。また、メサンギウム増殖性腎炎を惹起するモノクローナル抗体の作製に成功し (Exp Nephrol 2002, Lab Invest 2002)、そのモデルを用いて世界

に先駆けて糸球体毛細血管の再構築の過程を明らかにし (Kidney Int 2003)、メサンギウム細胞に発現する内皮細胞との接着に関わる分子を報告してきた。腎炎モデルを使用した *in vivo* の実験に加え、申請者が確立した糸球体内皮細胞の培養系を用いてマトリゲル内で 3 元構築をさせることにも成功している。メサンギウム基質に面した内皮細胞はメサンギウム細胞と部分的に接しており、相互に情報交換を行っていると考えられる。従って、今回見いだしたモノクローナル抗体 J22 の抗原が、内皮細胞とメサンギウム細胞との相互作用に何らかの役割を演じている可能性が高い。本研究では、J22 抗体の抗原分子を明らかにするとともに、詳細な局在について、正常およびメサンギウム増殖性腎炎モデルを用いて解析を行い、その機能的な意義を明らかにしていくことで糸球体毛細血管内皮細胞の領域特異的な形態と機能の制御機構を明らかにし、糸球体疾患の病態解明に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

①J22 抗原の解析

糸球体毛細血管の場に依存した分子の発現を解析するため、メサンギウム領域に面した内皮細胞にのみ発現する J22 抗原の解析をまず行うこととする。抗原の単離はラット糸球体を単離し、種々の界面活性剤で溶解した後、最も高率良く抗原が単離できる条件をイムノブロット法により評価した後、免疫沈降法で分子の単離を行う。糸球体の単離と抗体による免疫沈降については、これまでにすでに多くの実績がある。免疫沈降により得られた試料は質量分析により解析を行うが、この技術については糸球体の蛋白解析で実績のある新潟大学の吉田豊博士に技術的なアドバイスとサポートを受けており、継続して指導をお願いする。

②J22 抗原の発現解析

新生仔ラット糸球体では皮質表層に未分化な糸球体が残っており、さまざまな糸球体の形成過程を観察することができる。この時期の腎臓を用いて、我々がこれまでの研究で明らかにした様々な糸球体構成細胞マーカーに対する抗体と J22 抗体の共局在を調べることで、J22 抗原の糸球体形成過程における発現の変化を調べることにする。また、我々が作製したモノクローナル抗体 (E30) で惹起されるメサンギウム増殖性腎炎モデルを用いて J22 抗原の局在と発現量の変化を免疫組織化学とイムノブロット法により解析する。これまでの研究により光学顕微鏡レベルで J22 抗原は腎糸球体皮細胞とメサンギウム細胞が相互作用する領域に発現していることが明らかになっており、それをさらに裏付けるため、免疫電顕法により詳細な解析を行うこととする。E30 腎炎ではメサンギウム細胞傷害による糸球体毛細血管の拡張とその後起こる一過性のメサンギウム細胞の過形成によりメサンギウム領域が著しく拡張し、その後メサンギウム細胞数は徐々に減少し、1 ヶ月後には正常に戻る。正常化の過程で糸球体毛細血管の再構築が起こる、この一連の過程を観察すると糸球体毛細血管がどのようにして出来上がるか、さらに、毛細血管網再生にメサンギウム細胞がどのような役割を演じているかを知ることができる。そのため、E30 腎炎モデルを用いた J22 抗原の発現解析は、J22 抗原の役割を考える上で、きわめて貴重なデータとなる。

4. 研究成果

①J22 抗原について

J22 抗原は腎糸球体を抗原として作製したもののクローナル抗体のひとつで、糸球体の内皮細胞を認識する抗体であることが分かっている。腎糸球体のフラクションを用いたイムノブロット解析により、抗原の分子量は 85kD であった。抗原のさらなる解析のため抗体を用いた免疫沈降と

その後のタンパク質の解析を継続している。この J22 抗体を静注するとメサンギウム基質に面した内皮細胞の基底側に結合することから、内皮細胞の基底側膜表面に J22 抗原が露出していることが分かった。メサンギウム細胞はメサンギウム角のところで突起を延ばし内皮細胞と接触している。両細胞間の接着に関わる分子についていくつかの論文で報告しており、それらの研究で見いだしたメサンギウム細胞と内皮細胞の接触部位に局在する分子である eplin 分子 (Kidney Int 86:548-557, 2014) および l-afadin および β -catenin (Lab Invest 96(1):49-59, 2016) と J22 抗原との関係を検討した結果、いずれの分子とも共局在が明らかとなった。これらのことから、J22 抗原はメサンギウム領域に面した腎糸球体内皮細胞の基底側に存在し、メサンギウム細胞と内皮細胞の結合に関わる可能性が強く示唆された。

②J22 抗原とメサンギウム細胞の関係について

J22 抗原のシグナルがメサンギウム細胞と内皮細胞の接着部位に存在する afadin や β -catenin と共局在することを免疫組織化学により明らかにしている。これまでの研究から、メサンギウム細胞増殖性腎炎のモデルである Thy1.1 腎炎において一度壊れた糸球体毛細血管網が再生していく過程で、メサンギウム細胞が重要な役割を演じていることを明らかにしている (Kidney Int 63:1365-1373, 2003)。特に、メサンギウム細胞が突起を延ばして内皮細胞基底膜を牽引することが血管網の再生に必要な (J Histochem Cytochem 54:1291-1301, 2006)。J22 抗原は、このメサンギウム細胞の突起形成部位に隣接する内皮細胞に存在していることを見いだした。これらのことから、J22 抗原は、メサンギウム細胞と内皮細胞の接着に重要な役割を持ち、腎炎発症後の糸球体の再構築に関わる分子である可能性がある。

E30 モノクローナル抗体は我々が確立したメサンギウム増殖性腎炎惹起抗体である。この抗体の抗原はラットメサンギウム細胞の表面抗原である Thy-1 であり、この抗原に抗体が結合することで、補体依存性にメサンギウム細胞が傷害する。その後メサンギウム細胞の異常増殖が起こり、1ヶ月ほどで正常に回復する。メサンギウム細胞傷害により一時的に糸球体毛細血管網が破綻し、糸球体の構造が回復するとともに毛細血管網の再構築が起こる。このような腎炎モデルでの経時的な発現変化の解析を行った結果、メサンギウム細胞増殖が最大となる d5 に膨張したメサンギウムの周辺に J-22 抗原の発現が増強することが分かった。また、糸球体の毛細血管形成で見られる嵌入型血管新生が認められる d8 ではメサンギウム細胞が突起を延ばして形成する pillar 構造の領域に J-22 抗原の特異的な反応が認められた。これらのことから腎糸球体において血管の再構築に関わるメサンギウム細胞と内皮細胞の相互作用の部位で J-22 抗原が重要な役割を演じていることが強く示唆される。

以上のように内皮細胞基底側膜に存在する J22 抗原がメサンギウム細胞と内皮細胞の接着に関わる分子であり、糸球体血管網の構築に重要な働きを持つ可能性を示すことができた。これらの結果について、臨床分子形態学会にて報告した。現在、論文を作製中である。

③内皮細胞膜に発現する I-10 抗原について

J-22 抗原とともに腎糸球体を抗原として作成したモノクローナル抗体のうち I-10 抗体が認識する抗原は腎糸球体と肺の内皮細胞に特異的な発現をする。この抗原は肺胞毛細血管において間質側のみ発現し、ガス交換を行う肺胞腔側には発現を認めず、明確なマイクロドメインを形成する。そこで、ラットの間質性肺炎モデルにおける発現の変化を調べた結果、I-10 抗原の発現増強が認められた。また、この抗原を単離する目的で I-10 抗原領域 (80 kD) のタンパク質解析を行った。IgM 抗体では免疫沈降法が使えないため、バンドと同位置の部分を取り取って

質量分析解析を行ったが混在するタンパク質が多く、分子の特定には至っていない。引き続き方法の改良等を含め検討していく。

J22 抗原とともに解析を進めている糸球体内皮細胞抗原である I-10 抗原について、新たな知見を得た。I-10 抗原 (80 kD) は腎臓および肺に加えて、膵臓の毛細血管内皮に発現が認められた。さらに、I-10 抗原は膵臓のランゲルハンス島に発現していることが分かった。ランゲルハンス島で分泌されるホルモンや細胞小器官マーカー分子と I-10 抗原との共局在を調べた結果、I-10 抗原がランゲルハンス島 A 細胞に発現しており、グルカゴンを内包する顆粒に局在が認められた。また、小腸において、腸絨毛にある内分泌細胞のうち、グルカゴン様ペプチド-1 (インクレチン:L 細胞が分泌) 分泌細胞が陽性となった。細胞小器官の中で、ゴルジ装置のマーカー分子 GM130 や TGN38 との共局在が認められたことから、I-10 で認識される分子はグルカゴンのプロセッシングに関わる分子の可能性はある。

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 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshimura Y, Taguchi A, Tanigawa S, Yatsuda J, Kamba T, Takahashi S, Kurihara H, Mukoyama M, Nishinakamura R	4. 巻 30
2. 論文標題 Manipulation of nephron patterning signals enables selective induction of glomerular podocytes from human pluripotent stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Am Sci Nephrol	6. 最初と最後の頁 304-321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2018070747.	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 Hara-Yokoyama M, Kurihara H, Ichinose S, Ichinose S, Kurosawa M, Tada N, Iwahara C, Matsuda H, Terasawa K, Podyma-Inoue KA, Furukawa K, Iwabuchi K	4. 巻 67
2. 論文標題 KIF11 as a potential marker of premeiotic germ cells within mouse seminiferous tubule cross-sections.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem	6. 最初と最後の頁 813-824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155419871027.	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 該当する
1. 著者名 Iwasa H, Sarkar A, Shimizu T, Sawada T, Hossain S, Xu X, Maruyama J, Arimoto-Matsuzaki K, Withanage K, Nakagawa K, Kurihara H, Kuroyanagi H, Hata Y	4. 巻 109
2. 論文標題 UNC119 is a binding partner of a tumor suppressor RASSF6 and induces apoptosis and cell cycle arrest via MDM2 and p53.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2767-2780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13706.	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 該当する
1. 著者名 Tanigawa S, Islam M, Naganuma H, Yoshimura Y, Miike K, Sharmin S, Haque F, Era T, Nakazato H, Nakanishi K, Sakuma T, Yamamoto T, Kurihara H, Taguchi A, Nishinakamura R	4. 巻 11
2. 論文標題 Organoids from nephrotic disease-derived iPSCs identify impaired NEPHRIN localization and slit diaphragm formation in kidney podocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Rep	6. 最初と最後の頁 1 - 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2018.08.003.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshikawa K, Kunishima S, Kurihara H, Takahashi K, Nakaya I, Soma J
2. 発表標題 Renal Lesions Associated with MYH9 Disorder (5773delG Mutation): Clinical and Pathological Analyses.
3. 学会等名 Am Soc Nephrol (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原秀剛
2. 発表標題 腎系球体内皮細胞の場に応じた領域特異性について
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮原克、田中奈々、藤原なほ、栗原秀剛、山高篤行
2. 発表標題 Altered expression of acetylated tubulin in enteric neurons in Hirschsprung disease mouse model.
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
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 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 栗原秀剛	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善	5. 総ページ数 608
3. 書名 ジュンケイラ組織学 第5版	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------