

機関番号：12301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590945
 研究課題名（和文）糸球体バリアー機能における新規細胞間情報伝達系 SHPS-1-CD47 の解析
 研究課題名（英文）A role of SHPS-1/CD47 signaling pathway in the glomerular barrier function
 研究代表者
 野島 美久 (NOJIMA YOSHIHISA)
 群馬大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：90201699

研究成果の概要（和文）：

SHPS-1 (SIRP- α) は、細胞内に ITIM モチーフを有する膜蛋白である。様々な刺激で ITIM がリン酸化されると、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-1/SHP-2 が結合して周囲の分子を脱リン酸化し、シグナルが伝達される。本研究で我々は、SHPS-1 変異型マウスの解析により、糸球体上皮細胞に発現する SHPS-1 が上皮細胞足突起の構造と機能に重要な分子であることを明らかにした。本研究結果により糸球体バリアー機能の維持にチロシン脱リン酸化系が関与することが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

SHPS-1 (SIRP- α) is a transmembrane protein having ITIM motif in its cytoplasmic domain. When the ITIM motif in SHPS-1 is tyrosine-phosphorylated by a variety of stimuli, SHPS-1 binds tyrosine phosphatases, SHP-1 or SHP-2, which dephosphorylates neighboring proteins and transmits signals to downstream. In this study, we have shown that SHPS-1 is expressed on podocytes and plays a significant role in structure and function of podocytes by using mutant mice expressing SHPS-1 with a deleted cytoplasmic domain. The results strongly suggest that the tyrosine-dephosphorylation system is involved in maintaining the barrier function of glomerulus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：腎臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：SHPS-1、SIRP- α 、糸球体バリアー機能、チロシン脱リン酸化

1. 研究開始当初の背景

蛋白尿は腎疾患早期診断の鋭敏な指標であるとともに、腎不全進行や心血管事故の強力な危険因子としても重要である。糸球体が大量の血漿を濾過する際に、血管係蹄壁は蛋

白の透過を最小限に抑える機能を有する。この濾過障壁（バリアー）機能の喪失こそ蛋白漏出の主因であることから、バリアー機能の解明は腎臓病学が解決すべき最重要課題といえる。スリット膜は糸球体上皮細胞に備わ

る特殊に分化した細胞間接着装置であり、バリアーの要構造とされている。近年スリット膜を構成する分子がチロシンリン酸化されることが明らかにされ、バリアー機能がリン酸化カスケードで解析されるようになった。しかし、この経路に関与する脱リン酸化機構の解明は遅れていた。

2. 研究の目的

研究代表者がここ数年解析してきた新規の受容体型分子 SHPS-1 (チロシン脱リン酸化酵素 SHP の基質) とそのリガンド CD47 を新たな切り口として、スリット膜のバリアー機能を脱リン酸化シグナルの側面から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 腎糸球体における SHPS-1 の発現と局在

SHPS-1 に対する特異抗体を用いて、免疫組織染色により腎糸球体における SHPS-1 の発現を解析する。詳細に局在については、糸球体上皮細胞や血管内皮細胞のマーカー抗体との二重染色や免疫電子顕微鏡解析を用いて解析した。

2) SHPS-1 遺伝子改変マウスを用いた解析

既に樹立されている細胞内ドメインを欠失する SHPS-1 を発現する遺伝子改変マウスを用いて、SHPS-1 経由のシグナルが遮断されたマウスでは糸球体構造やバリアー機能にどのような影響があるかを解析した。

4. 研究成果

1) SHPS-1 は糸球体上皮細胞に発現する。

図 1 に示すように、SHPS-1 は腎の糸球体に発現し、その染色パターンから糸球体上皮細胞に局在していると推定された。

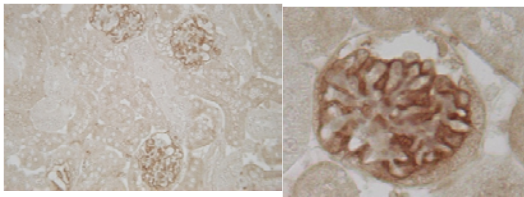


図 1 免疫組織染色による SHPS-1 の局在

さらに、糸球体上皮細胞のマーカーである synaptopodin との 2 重染色により、SHPS-1 は上皮細胞に特異的に発現していることが確認された (図 2)。

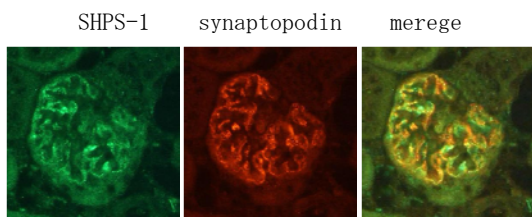


図 2 synaptopodin と SHPS-1 の 2 重染色

免疫電顕でも SHPS-1 の糸球体上皮細胞への局在が確認された (図 3)。上皮細胞内ではその一部がスリット膜近傍に分布しているのが確認された。

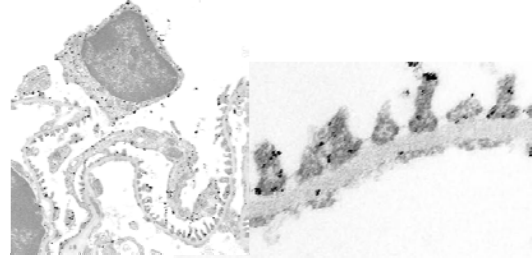


図 3 免疫電顕による SHPS-1 の局在

以上の組織学的解析により、SHPS-1 は糸球体上皮細胞に特異的に発現され、その一部はスリット膜近傍に局在していることが明らかにされた。

2) SHPS-1 遺伝子改変マウスでは糸球体上皮細胞の構造異常が認められる。

SHPS-1 は免疫グロブリン構造を有する細胞外ドメインと、ITIM モチーフを有する細胞内ドメインからなる膜蛋白質である。ITIM モチーフを構成するチロシン残基がリン酸化されると、SH-2 ドメインを有する脱リン酸化酵素である SHP-1 もしくは SHP-2 がこれに結合する。こうして膜近傍にリクルートされた SHP-1/SHP-2 は周辺の蛋白を脱リン酸化することにより SHPS-1 経由のシグナルを細胞内に伝達することになる。共同研究者である崎 尚博士 (現神戸大学教授) により、SHPS-1 の細胞内ドメインを欠失した変異型 SHPS-1 (図 4) を発現するトランスジェニックマウスが樹立されている。本変異型 SHPS-1 を発現するマウスでは、SHPS-1 からのシグナルが伝達されず、従って、SHPS-1 の機能を知る上で貴重なツールとなる。

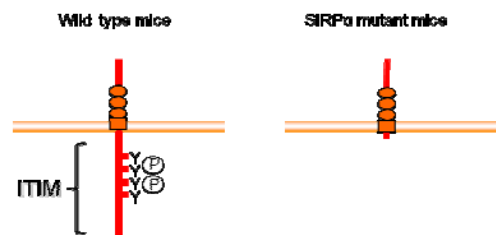


図 4 変異型 SHPS-1 (SRP- α) の構造

図 5 に SHPS-1 (SRIP- α) の細胞質ドメインを認識する抗体によるウェスタンブロットの結果を示す。野生型マウスでは腎糸球体に SHPS-1 のバンドが検出されるが、細胞内ドメインを欠失する SHPS-1 を発現する変異型マ

ウスの糸球体ではバンドが検出されないことがわかる。

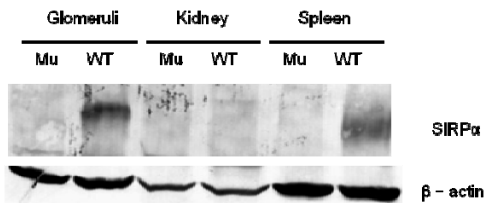


図5 野生型 (WT) および変異型 (Mu) マウス糸球体の SHPS-1 (SIRP-α)

そこで、この変異型マウスの腎糸球体構造を解析した。図6に示すように、光学顕微鏡による観察では、野生型のマウスと SHPS-1 変異型マウスにおける糸球体の数および形態に明らかな差はなかった。ただし、糸球体の大きさが変異型マウスでは野生型マウスに比べて有意に大きかった (100.2 ± 3.0 vs $91.7 \pm 1.9 \mu\text{m}/\text{glomerular tuft}$ $p < 0.01$)。

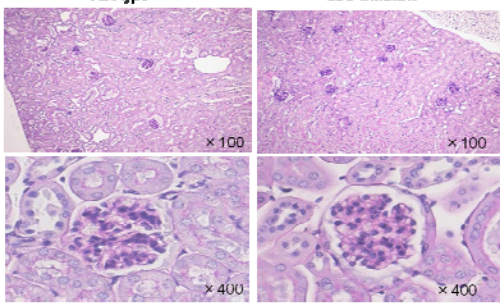


図6 野生型および変異型マウスの腎組織

次に、野生型と変異型のマウス糸球体を、上皮細胞特異的に発現する nephrin、synaptopodin、podocalyxin で免疫染色したところ、これらの分子の発現分布パターンに有意な差は認められなかった (図7)。

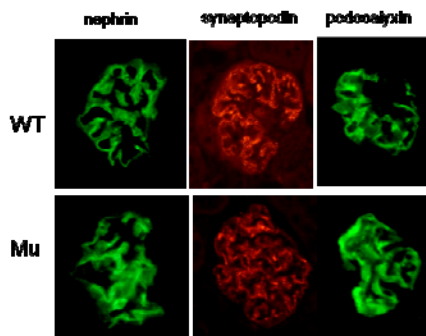


図7 野生型 (WT) および変異型 (Mu) マウス糸球体における上皮細胞特異的分子の発現と分布

さらに、上皮細胞特異的な WT1 を抗体により染色し、WT1 陽性細胞をカウントして糸球体当たりの上皮細胞数を定量したところ、野生型マウスと変異型マウスにおいて有意の差は認められなかった (図8)。

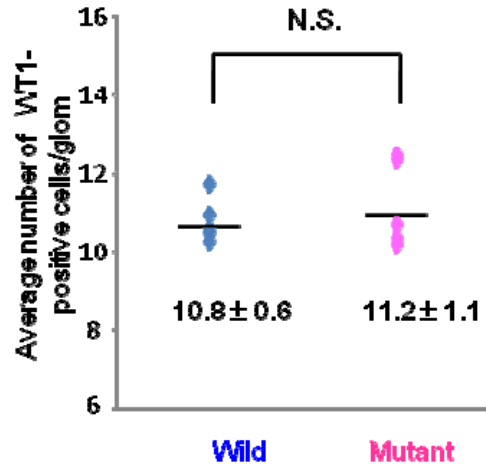


図8 野生型および変異型マウスにおける糸球体の上皮細胞数

以上のことから、SHPS-1 変異型マウスにおいては、光学顕微鏡レベルでの明らかな異常は認めず、上皮細胞数もスリット膜のバリア機能を司る nephrin、synaptopodin、podocalyxin などの機能分子の発現と分布も野生型マウスと有意の差はないことが確認された。

そこで次に電子顕微鏡を用いて、変異型マウス糸球体上皮細胞の微細構造を解析した。図9に示すように、変異型マウスの上皮細胞足突起は野生型マウスのそれに比べて平坦で癒合しており、明らかな形態異常を認めた。位相差電子顕微鏡でも変異型マウスの足細胞の形態異常は明らかであった (図10)。

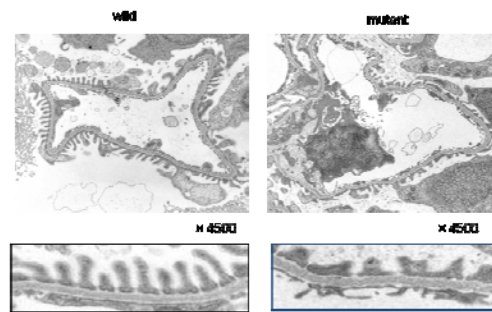


図9 野生型および変異型マウスの糸球体上皮細胞の電顕像

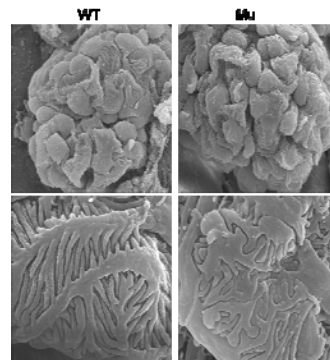


図10 野生型および変異型マウス糸球体の

位相差電子顕微鏡像

また、糸球体上皮細胞足突起の数を定量したところ、変異型マウスでは野生型に比べて有意に減少していた (図 1 1)。

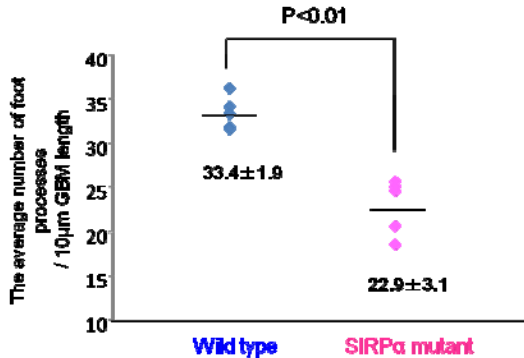


図 1 1 上皮細胞足突起の数

3) SHPS-1 遺伝子改変マウスでは糸球体のバリアー機能が障害されている。

上記の結果より、SHPS-1 遺伝子改変マウスでは、糸球体上皮細胞の形態異常、特に足突起の形態に異常が認められることが明らかにされた。足突起は糸球体のバリアー機能に重要な役割を果たす構造体である。

そこで、野生型マウスと変異型マウスにおいて尿中のアルブミンを測定した。図 1 2 に示すように、微量ではあるが、野生型マウスと変異型マウスのアルブミン尿に有意の差が認められた。

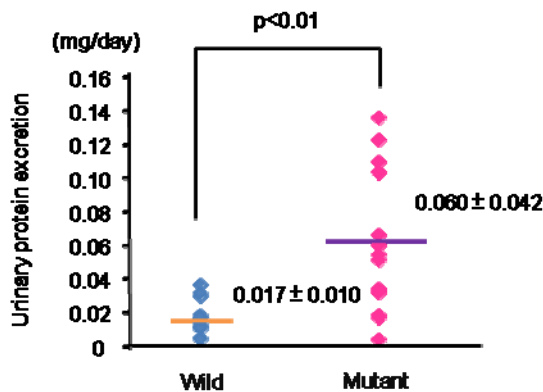


図 1 2 変異型マウスにおける微量アルブミン尿

最後に、野生型マウスと変異型マウスにアドリアマイシンを投与し、糸球体上皮細胞障害型の蛋白尿の誘導を試みた。変異型マウスのバックグラウンドである C57BL/6 マウスは一般にアドリアマイシン耐性である。実際に、同じバックグラウンドを有する野生型マウスではアドリアマイシンで蛋白尿がほと

んど誘導されない。これに対して SHPS-1 変異型マウスでは図 1 3 に示すように、大量の蛋白尿が誘導できた。

さらに、大量の蛋白尿の漏出とともに、変異型マウスでは糸球体の硬化が著しく認められた (図 1 4)

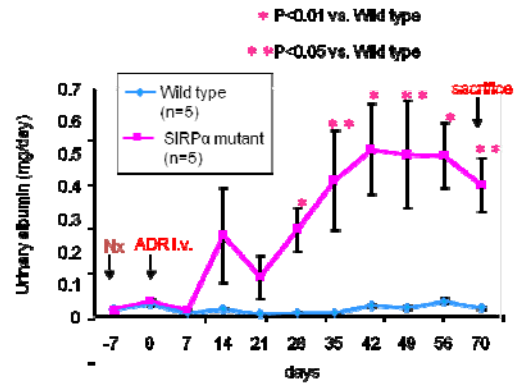


図 1 3 アドリアマイシン投与による蛋白尿の誘導

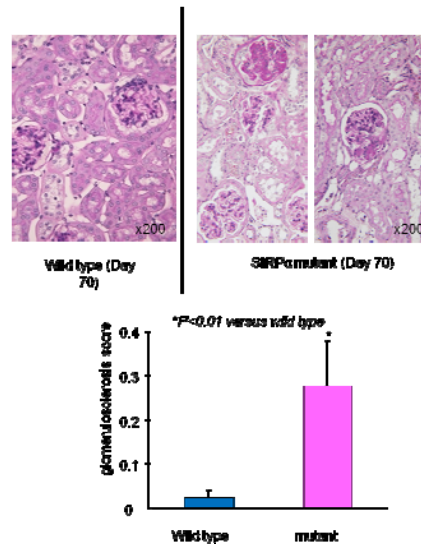


図 1 4 アドリアマイシン投与による糸球体硬化

以上のことより、糸球体上皮細胞に発現される SHPS-1 は糸球体上皮細胞の構造とバリアー機能に重要な役割を演じていることが明らかにされた。こうした事実は、チロシン脱リン酸化経路が糸球体バリアー機能の維持に重要であることを支持するものである。

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 5 件)

- ① Sakairi T, Hiromura K, Takahashi S, Hamatani H, Takeuchi S, Tomioka M, Maeshima A, Kuroiwa T, Nojima Y: Effects of proteasome inhibitors on rat renal fibrosis in vitro and in vivo.

- Nephrology (Carlton). 16(1):76-86, 2011 査読有
- ② Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Takeuchi S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Takeuchi T, Nojima Y. Nestin is a novel marker for renal tubulointerstitial injury in immunoglobulin A nephropathy. Nephrology (Carlton). 15:568-74, 2010. 査読有
- ③ Matsumoto T, Hess S, Kajiyama H, Sakairi T, Saleem MA, Mathieson P, Nojima Y, Kopp JB. Proteomic analysis identifies insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 as a podocyte product. Am J Physiol Renal Physiol. 299(4): F776-84, 2010 査読有
- ④ Takeuchi S, Hiromura K, Tomioka M, Takahashi S, Sakairi T, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Nojima Y. The Immunosuppressive Drug Mizoribine Directly Prevents Podocyte Injury in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis. Nephron Exp Nephrol. 21:116(1):e3-e10, 2010 査読有
- ⑤ Sakurai N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Hiramatsu N, Takeuchi S, Tomioka M, Shigehara T, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, Kopp JB, Nojima Y. Fluvastatin prevents podocyte injury in a murine model of HIV-associated nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 24(8):2378-83. 2009 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Takahashi T, Hiromura K, Nojima Y et al. Efficacy of Low-Dose Tacrolimus (TAC) in Induction Therapy of Lupus Nephritis (LN) 第43回アメリカ腎臓学会 2010年11月20日デンバー (米国)
- ② Takahashi T, Hiromura K, Nojima Y et al. The Role of SIRPα (SHPS-1) in Experimental Diabetic Nephropathy. 第43回アメリカ腎臓学会 2010年11月19日 デンバー (米国)
- ③ Tomioka M, Hiromura K, Nojima Y et al. Tubulointerstitial nestin expression as a predictive marker for renal prognosis in IgA nephropathy. 国際腎臓学会 NEXUS 京都シンポジウム 2010年4月17日 京都国際会議場 (京都)
- ④ Tomioka M, Hiromura K, Nojima Y The Role of SIRPα in Podocyte Structure and Function. 国際腎臓学会 NEXUS 京都シンポジウム 2010年4月

- 16日 京都国際会議場 (京都)
- ⑤ Tomioka M, Hiromura K, Nojima Y et al. SIRP α (SHPS-1) Signaling Pathway Is Involved in Podocyte Structure and Function. 第42回アメリカ腎臓学会 2009年10月29日 サンディエゴ(米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野島 美久 (NOJIMA YOSHIHISA)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90201699