

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590951
 研究課題名（和文）糸球体上皮細胞特異的メタロプロテアーゼ過剰発現ラットの網羅的解析と応用
 研究課題名（英文）Proteomic analysis of transgenic rat specifically expressing ADAMTS-8 in podocyte
 研究代表者
 後藤 眞 (GOTO SHIN)
 新潟大学・医歯学系・助教
 研究者番号：00463969

研究成果の概要（和文）：

腎臓の疾患であるネフローゼ症候群では蛋白尿が出現するが、このメカニズムには不明な点が多い。私たちは腎臓で尿を濾過する部位の細胞間構造に着目し、これらと相互作用する蛋白分解酵素（ADAMTS-8）と蛋白尿の関係を動物モデルで検討した。ADAMTS-8を腎臓で過剰に発現するラットは次第に蛋白尿が出現し、腎臓内に病変が生じる。正常のラットの腎臓と比較して、モデル動物で変化する分子を探索し、蛋白尿と関連する分子が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Nephrotic syndrome present massive proteinuria, however, underlying mechanisms remain elusive. We focused an interaction between the cell-cell contact which is involved with urine production, and proteinase produced in these cells (ADAMTS-8). Rat with forced expression of ADAMTS-8 gradually showed proteinuria. Using these rat model, we revealed molecules associated with development of proteinuria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：ADAMTS-8, transgenic rat, proteome, nephrotic syndrome, phage display

1. 研究開始当初の背景

微少変化型ネフローゼ症候群（MCNS）や巣状糸球体硬化症（FSGS）などの腎疾患において、糸球体上皮細胞の足突起の消失が認められ、蛋白尿の発症にはスリット膜における病変が重要であると考えられているが、その詳細は明らかではない。蛋白尿が出現する際も、特にネフローゼ症候群ではスリット膜関連分子の発現量や蛋白構造の変化が生じている可能性が指摘されている。Nephrin や

NEPH1 は免疫グロブリン様構造を有し、細胞間接着に関わる機能を果たしていると考えられているが、近年、シグナル伝達分子としての役割も注目されている。しかしスリット膜構造の詳細は明らかでなく、また糸球体濾過の際、非常に多くの蛋白と相互作用すると予想されるが、その詳細は不明である。現在までにスリット膜関連分子の結合蛋白に関する研究は細胞内分子に関するものが中心である。スリット膜関連蛋白の細胞外ドメイ

ンと相互作用する新規の分子を同定することは、スリット膜構造の解明や尿蛋白発症の機序を明らかにする上で非常に重要であると考えられる。私たちは既にペプチドファージディスプレイを用いて、スリット膜関連蛋白 (Nephrin と NEPH1) の細胞外ドメインと相互作用するペプチドをスクリーニングし、親和性を有するペプチド配列を同定した。このペプチド配列を有する分子群をデータベースから選択し、さらに腎糸球体に強く発現している、分泌型分子 (ADAMTS-8) を同定した。私たちはこの ADAMTS-8 が糸球体上皮細胞に発現することを確認し、その機能を検索するために、ヒト Podocin プロモーターを利用して ADAMTS-8 が糸球体上皮細胞に過剰発現するトランスジェニック (Tg) ラットを作成した。

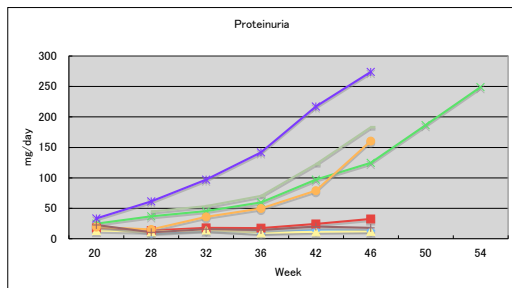
2. 研究の目的

私たちが作出した糸球体上皮細胞特異的 ASAMTS-8 Tg ラットは出生時は特に異常を示さないが、発現量が高度の Tg ラットでは半年以降になると有意に蛋白尿を示し、次第にネフローゼレベルとなる。

ADAMTS-8 は血管新生を抑制する遺伝子としてクローニングされ、プロテオグリカン硫酸を限定分解する aggrecanase として分類されているが、その分解効率からすると本来の基質はまだ明らかにされていないと思われる。分泌型メタロプロテアーゼである ADAMTS-8 が過剰発現し、糸球体構成成分の変化により蛋白尿が出現していると考えられるが、この機序についてプロテオーム解析を行うことで、蛋白尿の出現や糸球体透過性に関連した新たな機能分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

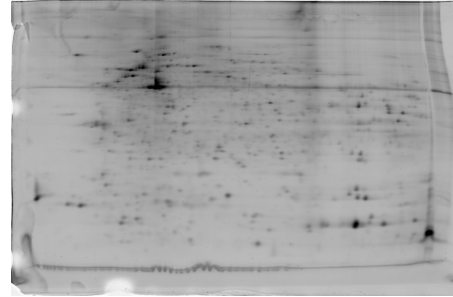
ヒト Podocin プロモーターを利用して ADAMTS-8 が糸球体上皮細胞に過剰に発現する動物モデル (トランスジェニック (Tg) ラット) を対象とした。



(1) プロテオーム解析

蛋白尿につながる糸球体病変の分子メカニズムを明らかにするために、Tg ラットと non-Tg ラットの糸球体をそれぞれ単離し、可溶化した後に二次元電気泳動を行う (右上

図)。二次元電気泳動の再現性を確認するた



めに、それぞれ三セットずつ行い、Tg ラットと non-Tg ラットで有意な差が認められたスポットを選択し、質量分析でアミノ酸配列を同定した。さらにデータベースからその蛋白質を決定した。

(2) 抗 ADAMTS-8 抗体を用いた免疫沈降

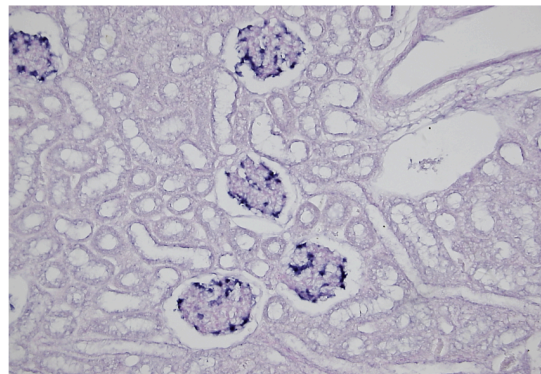
リコンビナント ADAMTS-8 あるいは ADAMTS-8 のペプチド配列に対する抗体を用いて、ラット糸球体を可溶化した後に免疫沈降を行った。電気泳動を行い、ADAMTS-8 と共沈降する分子の同定を試みた。

(3) ADAMTS-8 分子の触媒ドメインに対するファージディスプレイ

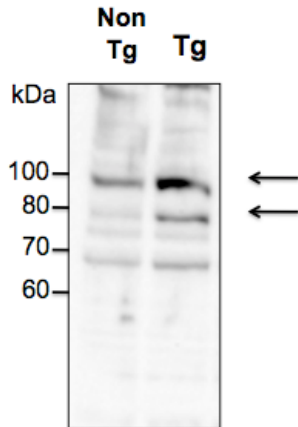
ADAMTS-8 の基質となり得る分子を明らかにするために、ADAMTS-8 の触媒ドメインをリコンビナント分子として発現させ、精製した後にペプチドファージディスプレイを行った。

4. 研究成果

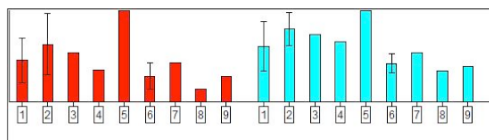
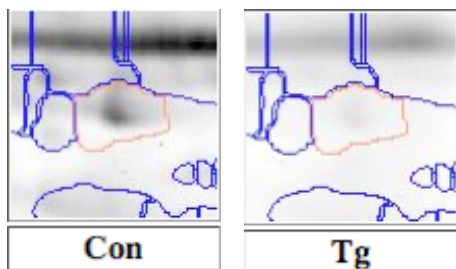
Tg ラットおよび non-Tg ラットの腎臓を用いて In Situ Hybridization を行った。下に示すように Tg ラットの糸球体上皮細胞で ADAMTS-8 が過剰発現していることが確認された。



また、Tg ラットおよび non-Tg ラットから糸球体を単離し、抗 ADAMTS-8 抗体を用いて Western blot を行った。次頁図のように Tg ラットにおいて ADAMTS-8 分子の発現の亢進が認められた。



(1) プロテオーム解析: Tg ラットと non-Tg ラットの糸球体をそれぞれ単離し、可溶化した後に二次元電気泳動を行った。Tg ラットと non-Tg ラットの各3セットのスポットを定量化し、有意な差があると認められたスポットを質量分析で分析し、蛋白質を決定した。



1:ref, 2-5:non-Tg, 6-9:Tg
NHE-RF2 の発現

Tg ラットで発現が低下している蛋白としては、NHE-RF2 や C22orf28、lactadherin などが同定された。特に NHE-RF2 は上皮細胞に発現し、細胞骨格とのアダプター蛋白として機能しているが、発現量の低下と上皮細胞の骨格変化、蛋白尿との関連が示唆された。また、発現が亢進している蛋白としては、glial fibrillary acidic protein などが認められた。今後、これらの分子と ADAMTS-8 過剰発現による蛋白尿の発症メカニズムの関連を検討していく予定である。

(2) 抗 ADAMTS-8 抗体による免疫沈降: ラット腎臓から糸球体を単離して可溶化し、抗 ADAMTS-8 抗体を用いて免疫沈降した。Western blot で ADAMTS-8 と共に共沈降するバンドが複数認められたが、質量分析でこれ

らの分子群を同定するには至らなかった。

(3) ADAMTS-8 の触媒ドメインに対するフェージディスプレイ:

ADAMTS-8 のプロテアーゼ基質を明らかにするためにプロテアーゼ触媒ドメインのリコンビナント ADAMTS-8 を用いてペプチドフェージディスプレイを行った。ADAMTS-8 に親和性のあるペプチド配列としていくつかの配列が得られ、現在、これらの配列を有して腎糸球体に発現する分子を検索中である。

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 8 件)

1. Miura T, Goto S, Iguchi S, Shimada H, Ueno M, Nishi S, Narita I. Membranoproliferative pattern of glomerular injury associated with complement component 9 deficiency due to Arg95Stop mutation. *Clin Exp Nephrol* 2011; 15, 86-91 査読あり
2. Inomata S, Sakatsume M, Sakamaki Y, Wang X, Goto S, Yamamoto T, Gejyo F, Narita I. Expression of SM22alpha (Transgelin) in Glomerular and Interstitial Renal Injury. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 117, e104-e113. 査読あり
3. Sakamaki Y, Sakatsume M, Wang X, Inomata S, Yamamoto T, Gejyo F, Narita I. Injured kidney cells express SM22α (transgelin): Unique features distinct from α-smooth muscle actin (αSMA). *Nephrology*. 2011;16:211-8. 査読あり
4. Koda R, Zhao L, Yaoita E, Yoshida Y, Tsukita S, Tamura A, Nameta M, Zhang Y, Fujinaka H, Magdeldin S, Xu B, Narita I, Yamamoto T. Novel expression of claudin-5 in glomerular podocytes. *Cell Tissue Res*. 2011;343:637-48.
5. Yamamoto T. Proteomics database in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010;17:487-92. 査読あり
6. Saeki T, Nishi S, Imai N, Ito T, Yamazaki H, Kawano M, Yamamoto M, Takahashi H, Matsui S, Nakada S, Origuchi T, Hirabayashi A, Homma N, Tsubata Y, Takata T, Wada Y, Saito A, Fukase S, Ishioka K, Miyazaki K, Masaki Y, Umehara H, Sugai S, Narita I. Clinicopathological characteristics of patients with IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 2010; 78,1016-1023. 査読あり
7. Narita I, Iguchi S, Omori K, Gejyo F. Uremic pruritus in chronic hemodialysis patients. *J Nephrol* 2008; 21, 161-165. 査読あり
8. Narita I, Gejyo F. Pathogenetic significance of aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2008; 12,

332-338. 査読あり

〔学会発表〕（計 3 件）

1. Iguchi A, Goto S, et al. Urinary angiotensinogen as a marker for histopathological severity in patients with IgA nephropathy. In International Society of Nephrology, Kyoto, Japan, 2009, Apr. 15.
2. Iguchi A, Goto S, et al. Urinary angiotensinogen as a marker for histopathological severity in patients with IgA nephropathy. In American Society of Nephrology, San Diego, CA, USA, 2009, Oct. 29.
3. Wada M, Goto S, et al. Aberrant glycosylation of IgA1 is heritable in familial IgA nephropathy. In American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, USA, 2008 Nov.8.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 眞 (GOTO SHIN)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：00463969

(2) 研究分担者

成田 一衛 (NARITA ICHIEI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：20272817

山本 格 (YAMAMOTO TADASHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30092737

井口 清太郎 (IGUCHI SEITARO)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授
研究者番号：20420309