

自己評価報告書

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2008～2012

課題番号：20590964

研究課題名（和文） ネフローゼ発症に関わる糸球体構成細胞間シグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文） Cell biological research on signal transduction between glomerular cells involved in onset of nephrose

研究代表者

栗原 秀剛 (KURIHARA HIDETAKE)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80311976

研究分野：細胞生物学

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：足細胞、スリット膜、メサンギウム細胞、シグナル伝達、腎炎

1. 研究計画の概要

申請代表者は脱リン酸化酵素 SHP1/2 を細胞膜につなぎ止める働きをする SIRP α 分子が糸球体足細胞に特異的に発現しており、そのリガンドである CD47 は足細胞に発現せず、メサンギウム細胞に発現していることを見いだした。本研究において SIRP α -CD47 系が糸球体構成細胞間のシグナル伝達に関与していることを明らかにすることを目的として病態モデル動物を用いて以下のような解析を計画した。

- 1) 申請者らは硫酸プロタミン (PS) で腎臓を灌流することでスリット膜領域の分子がチロシンリン酸化を受けることを見いだしている。この PS 灌流腎を用いて足細胞の形態変化に伴う分子群 (特にスリット膜関連分子と細胞膜蛋白および細胞骨格に注目する) の局在と SIRP α のリン酸化について生化学および組織学的な解析する。
- 2) メサンギウム細胞傷害を誘発するモノクローナル抗体 E30 をラットに投与することにより、メサンギウム細胞が補体依存的に傷害された後に SIRP α および SHP1/2 のリン酸化に変化があるかどうかを免疫沈降法とイムノブロット法により解析する。
- 3) SIRP α とスリット膜分子との結合について解析を行う。スリット膜分子の発現が変化する PAN 腎症や 5-1-6 腎症モデルを用いて、ネフリンと SIRP α の関係を明らかにする。
- 4) SIRP α が結合する脱リン酸化酵素である SHP1/2 の糸球体における局在を明らかにし、SIRP α との関係を詳細に解析する。

2. 研究の進捗状況

SIRP α -CD47 系が糸球体構成細胞間のシグナル伝達に関与しているかどうかを明らか

にすることを目的とした研究における 3 年間の成果は以下の通りである。

- 1) プロタミン硫酸 (PS) 灌流腎を用いて足細胞に発現する SIRP α のチロシンリン酸化の変化をリン酸化特異抗体 (東大医科研と共同で作成 Y501) を用いて調べた結果、PS 灌流により SIRP α のチロシンリン酸化が著しく低下することが分かった。それに反して、スリット膜分子ネフリンは強くチロシンリン酸化が起こる。SIRP α はネフリンと直接結合することが判明したことから、SIRP α の脱リン酸化により SHP2 が膜から遊離することでネフリンのリン酸化を促進している可能性が示唆された。
- 2) モノクローナル抗体 E30 をラットに投与後、メサンギウム細胞傷害が広範に認められる時期に一致して著しい SIRP α の脱リン酸化が起こることを見いだした。足細胞膜表面でメサンギウム細胞から遊離した CD47 のシグナルを免疫電顕で観察しており、CD47 が SIRP α に結合して脱リン酸化を引き起こしている可能性を強く示唆した。また、CD47 のメサンギウム細胞における発現は増殖細胞においても維持されていた。
- 3) スリット膜分子ネフリンのリン酸化は SIRP α が膜にリクルートする SHP1/2 によって制御されていることが SHP1/2 の阻害剤を用いた実験により明らかとなった。SHP1/2 の糸球体における発現を調べた結果、SHP1 は糸球体メサンギウムにある一部の細胞に発現しており、SHP2 は足細胞に発現していることを確認した。さらに、SHP2 と SIRP α との共局在を調べた結果、両分子の局在は完全に一致していた。また、正常ラットにおいて SHP2 はリン酸化されており、Thy1.1 腎炎モデルを用いてメサンギウム細胞傷害を惹起した後、脱リン酸化されることを見い

でした。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

本研究課題でもっとも重要な腎炎モデルを用いた研究については、これまでの長年にわたる腎臓研究の経験を生かし、適切に実験を行ったことにより、解析はおおむね順調に進展しており、世界に先駆けて成果を報告することができた。しかしながら、培養細胞を用いた研究については昨年、大学の再編計画に基づく研究室移転に伴い、一部の機器の使用が制限されたことにより、やや遅れていたが、研究室のスペースが確保できたため、最終年度には、すべて予定していた研究が完了する見込みである。

4. 今後の研究の推進方策

本研究はほぼ予定通り進行しており、最終年度には予定していたすべての実験が終了する予定である。すでに国内、国外の学会で成果の一部を報告し、その内容は米国生理学会誌に掲載済みである。論文作成以降の成果、特に SIRP 分子とスリット膜分子ネフリンとの結合等については、腎糸球体の濾過機能を考える上で重要なテーマであるが、これについても一部の成果についてはすでに論文を作成しており投稿中である。また、遅れていた培養細胞での実験が進行すると新たな成果が期待できるため、学会および論文として発表することを計画している。

5. 代表的な研究成果

(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 18 件)

1. Kurihara H, Harita Y, Ichimura K, Hattori S, Sakai T: SIRP- α -CD47 system functions as an intercellular signal in renal glomerulus. *Am J Physiol Renal Physiol* 299(3):F517- F 527, 2010 査読有り

2. Kobayashi T, Notoya M, Shinosaki T, Kurihara H: Cortactin interacts with podocalyxin and mediates morphological change of podocyte through its phosphorylation. *Nephron Exp Nephrol* 113: e89-e96, 2009 査読有り

3. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S: Phosphorylation of nephrin triggers Ca^{2+} signaling by recruitment and activation of phospholipase c - γ 1. *J Biol Chem* 284(13):8951-8962, 2009 査読有り

4. Harita Y, Kurihara H, Kosaka H,

Sekine T, Igarashi T, Hattori S: Tyrosine phosphorylation of the kidney slit diaphragm component Neph1 and its modulation of intracellular signaling by binding with Grb2. *J Biol Chem* 283(14) 9177-9186, 2008 査読有り

5. Ichimura K, Stan RV, Kurihara H, Sakai T: Glomerular endothelial cells form diaphragms during development and pathologic conditions. *J Am Soc Nephrol* 19:1463-1471, 2008 査読有り

[学会発表] (計 28 件)

1. 栗原秀剛: スリット膜構成蛋白の分子動態、第 6 回 弥彦ポドサイトセミナー (2011.3.5) (新潟)

2. 栗原秀剛、坂井建雄: 糸球体足細胞におけるスリット膜の分子構築について、第 53 回日本腎臓学会学術総会 (2010.6.17) (神戸)

3. Kurihara H, Ichimura K, Sakai T: SIRP- α -CD47 system functions as an emergency signal in renal glomerulus. 49th Annual Meeting of the American Society of Cell Biology (2009.12.6) (San Diego)

4. 栗原秀剛: SIRP- α -CD47 系の腎糸球体における発現、第 40 回日本臨床分子形態学会学術集会 (2009.9.5) (神戸)

5. 栗原秀剛、市村浩一郎、坂井建雄: 足細胞の微絨毛形成に関わる分子群の解析 第 51 回日本腎臓学会学術総会 (2008.5.30) (福岡)

[図書] (計 2 件)

1. 栗原秀剛: 「ジュンケイラ組織学」第 3 版、丸善、2011 (498 頁)

2. Kurihara H: Cell adhesion molecules in the kidney. *KOKO-DO*, 2010 (48 頁)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 補体依存性細胞障害を抑制するモノクローナル抗体

発明者: 栗原秀剛、篠崎俊宏、小林樹雄

権利者: 塩野義製薬

種類: 特許

番号: 第 4176214 号

取得年月日: 2008 年 8 月 29 日

国内外の別: 国内