

機関番号：32620

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2012

課題番号：20790166

研究課題名 (和文) 足細胞の観点から原尿産生装置の進化を解明する研究

研究課題名 (英文) Evolution of podocyte and primary urine-producing organs

研究代表者

市村 浩一郎 (Koichiro Ichimura)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10343485

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：比較解剖学、比較細胞組織学、比較細胞生物学、腎臓学

### 1. 研究計画の概要

足細胞 podocyte は無脊椎動物から脊椎動物にいたる動物群 (真体腔類) に広く存在し、原尿産生装置の主要部分を構成する。足細胞の基本構造は共通だが、動物の進化に伴い、形態や発現分子種に様々な修飾が加わる。このような修飾は、足細胞を大きな力学的負荷に適応させ、濾過量の増大を可能にするうえで重要な変化 (高度化) である。ところが、過去の研究では足細胞の類似性ばかりが目され、高度化に関してはそのほとんどが見逃されてきた。このような状況の中、申請者らは、アクチン細胞骨格の高度化を脊椎動物の足細胞において初めて明らかにしてきた (Ichimura *et al.* 2003; Ichimura *et al.* 2007)。これを踏まえ、本研究では足細胞に起こったアクチン細胞骨格とその調節機構の進化過程を比較形態学的・分子細胞生物学的に解明し、原尿産生装置の進化を足細胞の観点から明らかにする。

### 2. 研究の進捗状況

哺乳類では高い糸球体内圧を維持することで、極めて効率のよい糸球体濾過を実現しているが、このような「高内圧・多濾過型」の糸球体を維持するため、哺乳類には糸球体壁を高い内圧から力学的に保護するための装置が発達している。この保護装置ひとつに、足細胞の足突起にある太いアクチン束があげられる。研究代表者は、アクチン結合タンパク質の一種である synaptopodin-1 が足突起内に高濃度に局在することで、 $\alpha$ -actinin によってできるプリミティブなアクチンの束が太い高度なものに発達するのではないかと推測している。この仮説を検証するため、足細胞に太いアクチン束を持たない動物種

(ゼブラフィッシュ) において、足細胞に synaptopodin-1 が発現しているかどうかをこれまで検討してきた。つまり、ゼブラフィッシュにおいて、synaptopodin-1 が足突起内に存在しなければ、この分子が哺乳類の足突起におけるアクチン束の発達に重要な役割を果たしていることが強く示唆されるわけである。RT-PCR 法では、ゼブラフィッシュの腎組織において synaptopodin-1 の発現が確認できたが、その発現レベルが低く、*in situ hybridization* 法での発現細胞の同定は極めて困難であった。そこで、synaptopodin-1 の N 末端領域と GST の融合タンパク質を抗原としてポリクロナール抗体を作製し、免疫組織化学的に synaptopodin-1 がゼブラフィッシュの足細胞に発現しているかどうかを検討することとした。現時点では作製した抗原をウサギに免疫している段階であるが、精製抗体 (抗原カラムを用いたアフィニティー精製を行なう) も近々完成するので、この抗体が免疫組織化学法でワークすれば、ゼブラフィッシュの足細胞における synaptopodin-1 の発現の有無が判明し、申請代表者の仮説を検証することが可能となる。

以上の他にも、鳥類や哺乳類では足細胞から一次線毛が消失することを見出した。多濾過型の糸球体をもつ哺乳類や鳥類において足細胞に一次線毛が存在すると、激しく湧き上がる原尿により一次線毛が絶えず揺り動かされ、細胞内にカルシウムイオンが過剰に流入し、細胞内シグナル伝達系が攪乱される恐れがある。したがって、高濾過型糸球体を持つ動物において足細胞から一次線毛が消失することは極めて合理的な細胞現象と言える。

### 3. 現在までの達成度

#### ③ やや遅れている

(理由)

(1) 本研究課題では、*in situ* hybridization に用いる cRNA プロブや GST 融合タンパク質を抗原としたポリクロナル抗体の作製を行なう必要がある。これには一般的な分子生物学の実験手技を必要とするが、申請代表者はこれまでに PCR 法やサブクローニングを含む分子生物学実験に携わった経験がなく、本研究課題において初めてこれらの実験手技を習得し、これに予想以上の時間を要した。

(2) 講座の入っていたビルの建替え工事に伴い、実験室の移転を行わなければならない、その準備や移転後の立ち上げに予想以上の時間を要したことも遅れの原因として挙げられる。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) これまでに基本的な分子生物学実験の操作 (PCR 法、サブクローニング、リコンビナント蛋白質作製等) を習得し、着実に実施できるようになった。今後は抗体作製までの効率をいかに高めるかが重要な課題である。幸い、当大学には共同実験施設がいくつか設置されており、いくつかの実験操作を依頼することができる。進捗状況を勘案しながら、適宜これらの施設に実験操作の一部 (抗原注射、抗体精製等) を依頼することを予定している。

(2) *in situ* hybridization 法に関しては、プローブ作製過程も含めて、手技に問題を残している可能性もあることから、習熟した研究室に短期間滞在し、技術の再習得を目指すことも予定している。

### 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 9 件)

Ichimura K, Kurihara H, Sakai T. Primary cilia disappear in rat podocytes during glomerular development. *Cell and Tissue Research* **341**: 197-209 (2010) 査読有

Dong HM, Ichimura K, Sakai T. Structural organization of hepatic portal vein in rat with special reference to musculature, intimal folds, and endothelial cell alignment. *Anatomical Record* **293**(11): 1887-95 (2010) 査読有

Hosoyamada Y, Ichimura K, Koizumi K, Sakai T. Structural organization of pulmonary veins in the rat lung, with special emphasis on the musculature consisting of cardiac and smooth muscles. *Anatomical Science International*

**85**(3):152-9 (2010) 査読有

Ichimura K, Kurihara H, Sakai T.  $\beta$ -Cytoplasmic actin distribution in vertebrate glomerular podocytes. *Archives of Histology and Cytology* **72**(3): 165-174 (2009) 査読有

Ichimura K, Stan RV, Kurihara H, Sakai T. Glomerular endothelial cells form diaphragms during development and pathologic conditions. *Journal of the American Society of Nephrology* **19**: 1463-1471 (2008) 査読有

[学会発表] (計 13 件)

市村浩一郎、坂井建雄. 糸球体足細胞の構造進化. 第 115 回 解剖学会総会 シンポジウム: 脊椎動物における組織・細胞の構造進化 2010 年 3 月 29 日 岩手県民会館 (盛岡市)

市村浩一郎、栗原秀剛、坂井建雄. 系統発生的にみた足細胞の線毛構造. 比較生理生化学会第 31 回大会 2009 年 10 月 23 日 千里ライフサイエンスセンター (大阪市)

市村浩一郎、栗原秀剛、坂井建雄. 糸球体足細胞における 1 次線毛の消退. 第 52 回日本腎臓学会総会 2009 年 6 月 4 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

市村浩一郎. 腎糸球体の形成と維持に関わる糸球体構成細胞の細胞生物学的研究. 第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (日本解剖学会奨励賞受賞者講演) 2009 年 3 月 29 日 岡山理科大学 (岡山市)

市村浩一郎、栗原秀剛、坂井建雄. 糸球体足細胞におけるアクチンアイソフォームの局在様式. 第 51 回日本腎臓学会学術総会 2008 年 5 月 30 日 福岡国際会議場 (福岡市)