

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790998

研究課題名（和文） インターロイキン 17E の糸球体上皮細胞シグナル伝達障害による蛋白尿発症機序の解明

研究課題名（英文） IL-17E signaling regulates podocyte function and proteinuria

研究代表者

此元 隆雄（KONOMOTO TAKAO）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80315366

研究成果の概要（和文）：腎疾患では、ネフリンなどのスリット膜蛋白のシグナル伝達の異常によってスリット膜が機能障害を起こし蛋白尿が出現する。IL17Eは喘息などのアレルギー疾患との関連が知られているが、腎疾患との関連は検討されていない。IL-17Eの作用を糸球体上皮細胞株を用いて分子レベルで解析を行った。糸球体上皮細胞には、IL-17Eの受容体IL-17RBが存在し、IL-17EによりERKが活性化された。また、ネフリンmRNAの発現が増強した。IL-17Eは糸球体上皮細胞に作用しスリット膜機能を変化させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：IL-17E, a member of the IL-17 cytokine families, is known associate with allergic diseases. The roles of IL-17E are unknown in renal diseases. The aims of study are to investigate the effect of IL-17E on podocyte injuries. IL-17RB, a major receptor of IL-17E was expressed on human podocyte cell line. Our result showed that phosphorylation of ERK was increased and phosphorylation of p38MAPK transiently reduced in the IL-17E treated podocyte. And the nephrin mRNA expression was up-regulated. IL-17E changed nephrin mRNA expression via ERK and p38MAPK signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：小児腎臓学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児科学

キーワード：ポドサイト、インターロイキン17E、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

腎糸球体における過機能の障害は腎機能不全の主な原因の一つである。蛋白尿は腎機能障害の鋭敏なマーカーであるばかりでなく、それ自身が腎機能を悪化させる因子であるため、蛋白尿抑制はすべての腎疾患における大きな目標となる。ポドサイトは糸球体係蹄の尿管腔側に糸球体基底膜を覆うように

存在し、隣接するポドサイトの足突起間でスリット膜を形成し血液ろ過の最終バリアーとして働いている。スリット膜に存在するNephrinなどの蛋白の先天性異常により遺伝性のネフローゼ症候群が発症することからも、腎疾患でスリット膜関連分子の重要性が確認されている。NephrinやPodocinなどのスリット膜蛋白は複合体を形成し構造的に

糸球体透過におけるサイズバリアーを形成している。また、近年の分子生物学的検討からスリット膜はシグナル伝達複合体として機能していることも明らかとなった。スリット膜蛋白は多くのシグナル分子と細胞内で結合することでポドサイトの形態、分化、生存などのさまざまな機能を修飾している (Curr Opin Nephrol Hypertension 2005 14, 211-216)。たとえば、Nephrin 細胞内領域がチロシンリン酸化を受けることにより Nck などのアダプター蛋白と結合し Nephrin 直下のアクチンの重合が促進される (Nature Vol. 440/6, 2006, 818-823)。つまり、Nephrin からのシグナル伝達がポドサイトの特徴的な足突起の細胞骨格系を制御していると考えられる。また、スリット膜構成分子のカルシウムチャネル TRPC6 の機能亢進による細胞内のカルシウム濃度の上昇が、遺伝性の巣状糸球体硬化症のみならず後天性の膜性腎症や巣状糸球体硬化症で示され、TRPC6 の活性化が糸球体疾患の病態生理に關与している可能性が報告された (J Am Soc Nephrol 2007 18, 29-36)。以上ことから、スリット膜複合体のシグナル伝達の異常によって、ポドサイトの構造維持や機能発現ができず蛋白尿が発症すると考えられる。スリット膜複合体の分子生物学的検討から蛋白尿の発症機序を解明できれば、特発性ネフローゼ症候群など蛋白尿をきたす腎疾患の新たな治療法の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

インターロイキン 17 (IL-17) ファミリーを産生する Th17 細胞と呼ばれる新たな T 細胞サブセットが存在し、これがアレルギー応答や自己免疫、細菌感染防御などで中心的役割を果たしていることが分かってきた。IL17 ファミリーの中で IL-17E (IL-25) は T 細胞を Th2 細胞へ誘導し、Th2 サイトカインの産生とともに喘息などのアレルギー疾患の発症に關与している (Cytokine & Growth Factor Reviews 2003 14, 155-174)。われわれは、IL-17E (IL-25) のレセプターである IL-17RB が糸球体上皮細胞 (ポドサイト) に発現していることを見出した。そこで、IL-17E (IL-25) のポドサイトへの作用を解析し、蛋白尿発症機序を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト不死化糸球体上皮細胞 (ポドサイト) の培養系の確立

Dr. Moin A Saleem (Academic Renal Unit, University of Bristol, Bristol, UK) が樹立したヒト不死化糸球体上皮細胞 (J Am Soc

Nephrol 2002 13, 630-638) の分与を受けた。ポドサイトに発現している podocin および CD2AP を蛍光抗体法で確認した。

(2) IL-17E 受容体 IL-17RB の確認

ポドサイト細胞株を用いて、IL-17RB の有無を RT-PCR および蛍光抗体法で解析した。

(3) ポドサイトに対する IL-17E の直接作用の解析

ポドサイト細胞株を 37 で 10~14 日間培養し分化状態とした後に、無血清培地へ培地交換し他の因子の影響を排除した。Recombinant human (rh)-IL-17E (R&D) を 100ng/ml の濃度で培養液へ直接添加し、細胞内シグナル伝達である ERK, P38MAPK のリン酸化の有無をウエスタンブロットで解析した。また、Nephrin mRNA の発現を real-time PCR を用いて定量的に検討した。

(4) Nephrin 過剰発現ポドサイト細胞株の樹立

Nephrin と IL-17E の相互作用ならびに Nephrin 以下の細胞内シグナル伝達解析のために、レンチウイルスベクターを用いて完全長 Nephrin-GFP 融合蛋白を過剰発現したポドサイト細胞株を樹立した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト不死化糸球体上皮細胞 (ポドサイト) の培養系の確立

Dr. Moin A Saleem (Academic Renal Unit, University of Bristol, Bristol, UK) が樹立したヒト不死化糸球体上皮細胞 (J Am Soc Nephrol 2002 13, 630-638) の分与を受け培養系を確立した。本細胞は温度感受性遺伝子を導入されており、培養温度 33 で増殖し、37 へスイッチすることで分化状態となる。

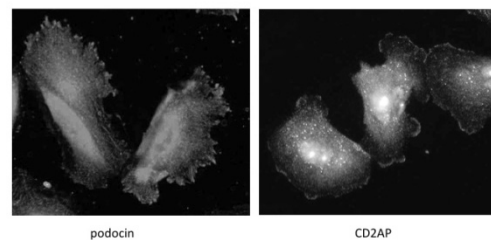


Figure 1. ポドサイトにおける podocin, CD2AP の発現。ヒト不死化ポドサイト細胞株を 33°C で培養した後 37°C へ温度変更後 14 日間培養し、podocin および CD2AP のウエスタンブロットを行った。

蛍光抗体法を用いて分化状態のポドサイト蛋白である podocin および CD2AP の発現を確認した (Figure 1)。

(2) ポドサイトにおける IL-17E 受容体 IL-17RB の確認

IL-17E は IL-17RB との親和性が最も強く、受容体と結合する事によって細胞内シグナルを伝達する。ポドサイト細胞株を 37 で 10~14 日間培養し分化状態とした。IL-17RB の発現の有無を RT-PCR と蛍光抗体法を用いて検討した。分化状態のポドサイトより RNA を抽出し、RT-PCR を行ったところ、IL-17RB に一致してバンドを認めた。また、直接シーケンス法により IL-17RB のシーケンスと一致することを確認した。IL-17RB に対する抗体を用いて蛍光抗体法を行い IL-17RB の蛋白レベルでの発現を確認した (Figure 2)。

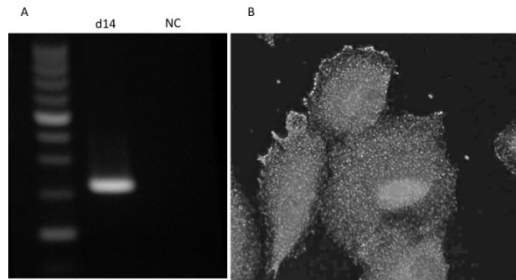


Figure 2. ポドサイトにおけるIL17RBの発現。(A)ヒト不死化ポドサイト細胞株分化状態とした後、RNAを採取しReverse transcription PCR(RT-PCR)をおこなった。d14: ポドサイトcDNA, NC: negative control。(B)IL17RB蛋白に対する蛍光抗体法

### (3)ポドサイトに対する IL-17E の直接作用の解析

37 で 10~14 日間培養し分化状態のポドサイト細胞に rh-IL-17E (100ng/ml) を培養液中に直接添加し、IL-17E がポドサイトに与える影響を検討した。

) 刺激後 15,30,60 分に蛋白を抽出し、細胞内シグナル伝達を ERK, P38MAPK のリン酸化の有無をウエスタンブロットで検討した。p38MAPK のリン酸化は 30 分後に抑制され、60 分後には回復した。一方 ERK のリン酸化は、15 分後にはリン酸化が増強し 60 分まで持続していた (Figure 3)。

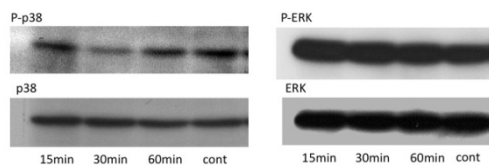


Figure 3. IL17E直接刺激後のp38MAPK,P-38MAPK,ERK,P-ERKの発現。ヒト不死化ポドサイト細胞株を33°Cで培養した後37°Cへ温度変更後14日間培養し、IL17Eを100ng/mlで培養液に添加し、15,30,60分に蛋白を抽出しウエスタンブロットを行った。

) IL17E で刺激後、2,4,8,24,48 時間に RNA を抽出し、SYBR Green 法による Quantitative real time PCR を行った。Nephrin mRNA の発

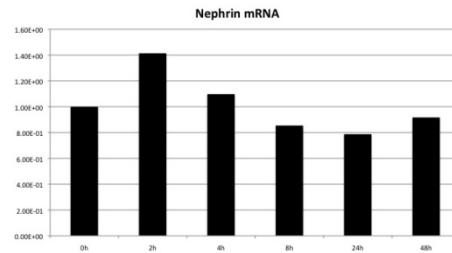


Figure 4. IL17E直接刺激後のNephrinの発現。ヒト不死化ポドサイト細胞株を33°Cで培養した後37°Cへ温度変更後14日間培養し、IL17Eを100ng/mlで培養液に添加し、2,4,8,24,48時間にmRNAを抽出しSYBR Green法によるreal-time PCRを行った。

現は、刺激後、2 時間には発現が増強し、その後徐々に低下傾向を示した。8 時間後には刺激前より発現量は低下し、48 時間目も発現低下は持続していた (Figure 4)。

### (4)Nephrin 過剰発現ポドサイト細胞株の樹立

human kidney RNA (クロンテック) より完全長の human Nephrin cDNA を作成した。この cDNA をレンチウイルスベクターへ挿入し、GFP-Nephrin 融合蛋白を発現するベクターを作成した。本ベクターを用いて、完全長 Nephrin-GFP 融合蛋白を過剰発現したポドサイト細胞株を樹立し、GFP-nephrin 融合蛋白の発現を蛍光顕微鏡で確認した。

### (考察)

これまでの検討により、ポドサイトには IL-17E の受容体 IL-17RB が存在し、IL-17E 刺激によって細胞内に out side in のシグナル伝達を起こすことを示した。IL-17E により p38MAPK のリン酸化は一活性に抑制され、一方で ERK のリン酸化は持続的に増強した。ポドサイトでは高糖刺激で P38MAPK が活性化しアポトーシスなどの細胞障害が報告されている。また、TGF の刺激では ERK が活性化され、その後 TRPC6 が活性化され細胞障害が起こることが報告されている。したがって、細胞内 p38MAPK や ERK の活性化はポドサイト傷害を起こすと推測される。今回の検討では、IL-17E の直接刺激によって、p38MAPK は一過性に抑制され、ERK 活性化は持続した。このことが、ポドサイト傷害をきたしているのかさらに検討が必要である。しかし、一方では IL-17E によって Nephrin mRNA の発現は亢進した。Nephrin はポドサイトスリット膜の重要な構成分子であり、その発現の低下や分布の異常あるいは Nephrin からの out side in のシグナル伝達が変化することによって、スリット膜の機能障害をきたし蛋白尿をきたすと推測されている。IL-17E によって Nephrin mRNA の発現が亢進したことは、スリット膜の機能を回復した可能性がある。しかし、発現増強は一過性であることから傷害に対する一過性の反応であった可能性も考

えられたため、さらなる解析が必要である。  
ポドサイトにおいて、IL-17E が p38MAPK や ERK などの細胞内シグナル伝達を活性化し、Nephrin の発現を変化させることはスリット膜の機能に変化を及ぼすことが予想され、IL-17E はポドサイトを傷害する可能性が示唆された。このことは、IL-17E は腎系球体疾患の治療ターゲットとなる可能性があると考えられる。IL-17E の糸球体上皮細胞に対する影響をさらに詳しく検討するため、GFP-Nephrin 融合蛋白を強制発現した細胞株を用いてさらなる検討を進めていく予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織  
(1)研究代表者

此元 隆雄 (KONOMOTO TAKAO)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号：80315366

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：