

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16164

研究課題名（和文）系球体上皮細胞におけるRho-GTPase制御機構を解明する

研究課題名（英文）Clarification of the regulatory mechanism of Rac1 in podocytes

研究代表者

松田 潤（Matsuda, Jun）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：10778260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Rho GTPaseはアクチン線維を制御し、細胞形態に重要な役割を果たす。これまでにポドサイトの代表的なRho GTPaseであるRac1の活性異常が尿蛋白や糸球体硬化に関わることが知られているが、その制御機構の詳細は明らかでない。そこで本研究で近位依存性ビオチン標識を用いてポドサイトのRac1関連因子の網羅的同定を試みた結果、GIT2蛋白が検出された。GIT2はポドサイトにおいて接着斑に局在した。GIT2欠損ポドサイトではRac1活性に依存した細胞面積の増加を認めた。以上より、ポドサイトのGIT2は接着斑に局在し、Rac1活性を制御することで細胞形態の維持に関わると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではポドサイトのRac1活性を制御する蛋白としてGIT2を同定した。GIT2は接着斑に局在し、Rac1の活性を抑制することでポドサイト形態の維持を行っていると考えられる。Rac1の亢進は、足突起の形態変化・機能異常以外に、アルドステロン非依存性にミネラルコルチコイド受容体を活性化することが知られており、それも腎障害を引き起こす機序の1つと考えられている。現在いくつかのミネラルコルチコイド受容体阻害薬が腎疾患の治療に用いられているが、GIT2がそれに代わる新規治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Rho GTPases, including Rac1, play important roles in actin cytoskeletal remodeling required for cell morphology. While previous studies have shown that Rac1 activation in podocytes causes foot process effacement and proteinuria, the regulatory mechanism of Rac1 remains unknown. In the current study, using proximity-dependent biotin identification, we identified that Rac1 in immortalized human podocytes (HP) interacts with GIT ArfGAP 2 (GIT2). GIT2 localized with paxillin in focal adhesions. GTP-bound (active) Rac1 levels were higher in GIT2 knockdown (KD) HP than in controls. GIT2 KD elicited cell spreading with marked lamellipodial protrusions, which was significantly attenuated by the Rac1 inhibitor. Our findings demonstrate that GIT2 localizes in the focal adhesion in podocytes and plays a critical role in podocyte cytoskeletal dynamics. Rac1 regulation by GIT2 may offer a new therapeutic target.

研究分野：ポドサイト

キーワード：系球体上皮細胞 Rho GTPase

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では透析や腎移植にかかる費用が医療経済を圧迫しており、慢性腎臓病進展に歯止めをかける有効な治療手段の確立が急務である。腎機能低下の大半は糸球体病変に由来する。腎糸球体上皮細胞であるポドサイトは、接着斑を介して糸球体基底膜に接着し、隣り合うポドサイトとの間にスリット膜と呼ばれる濾過バリアを形成して、血清蛋白の尿への漏出を防いでいる。接着斑やスリット膜の直下では、ポドサイトのアクチン線維が、インテグリンやネフリンといった接着斑・スリット膜貫通蛋白からのシグナルを受けて消失と再構築を繰り返し、均衡を保つことで緻密な細胞形態を維持している。

Rho-GTPase は、アクチン線維の調節に関わる蛋白群である。近年のマウスを用いた研究により、代表的な Rho-GTPase である Rac1 の活性がポドサイトで亢進することで、蛋白尿と糸球体硬化を引き起こすことが知られている(文献 1)。一般に、Rho-GTPase は「活性型(Rho-GTP)」と「不活性型(Rho-GDP)」の2形態をとる分子スイッチであり、活性化された Rho-GTPase はエフェクター蛋白に結合してアクチン線維構造を変化させる。この Rho-GTPase の活性調節を主に3タイプの蛋白群(Guanine nucleotide Exchange Factors [GEF]、GTPase-Activating Proteins [GAP]、GDP Dissociation Inhibitors [GDI])が司っているが、その種類は豊富でありポドサイトにおける Rac1 制御の詳細は明らかでない。

2. 研究の目的

ポドサイトにおける Rac1 の関連蛋白を網羅的に同定する。また、同定された蛋白の機能解析を行うことで、ポドサイトにおける Rac1 の制御・作用機構解明の一助とする。

3. 研究の方法

- (1)近位依存性ビオチン標識(BioID)によりポドサイトの Rac1 関連蛋白を同定し、それらの蛋白の腎疾患患者糸球体における転写発現量を、Nephroseq データベースを用いて評価する。
- (2)GIT2 欠損ポドサイトを作製し、GIT2 が細胞形態、Rac1 活性、接着斑のターンオーバーに与える影響を解析する。また、ポドサイト内での GIT2 の局在を免疫染色で調べる。
- (3)GIT2 欠損マウスを作製し、ポドサイト傷害をきたす薬剤の投与による尿蛋白量の変化、ポドサイトの足突起形態の変化を対照マウスと比較する。

4. 研究成果

(1)BioID による Rac1 関連蛋白の同定

BioID により、185 個の Rac1 関連蛋白を同定した。その中には GEF に属する ARHGEF7 や、GAP に属する ARHGAP10 と ARHGAP42 のような、Rho GTPase との関連が既知である蛋白群が含まれていた。しかし、同定された 185 個の Rac1 関連蛋白の中で、腎疾患患者で健常人と比較して特に有意に転写量が亢進していたのは、上記の既知の蛋白群ではなく GIT2 であった。

(2)培養ポドサイトを用いたGIT2の機能・細胞内局在・調節因子の解析

GIT2欠損(KD)培養ポドサイトの細胞面積は対照細胞と比較して有意に増加し、細胞辺縁部では葉状仮足の形成が目立った。この細胞面積の増加は、Rac1阻害薬NSC23766の投与により有意に減少した。また、対照細胞にRhoAシグナル阻害薬を投与すると、GIT2欠損培養ポドサイトと同様の変化が見られた。

プルダウンアッセイでは、GIT2欠損培養ポドサイトでRac1活性が有意に亢進していた。対照細胞にRhoAシグナル阻害薬を投与しても、同様のRac1活性亢進が認められた。

接着斑のサイズの測定では、GIT2欠損培養ポドサイトで小さい接着斑の割合が有意に増加し

ており、接着斑の形成-分解-消失のサイクル(ターンオーバー)が亢進していることを示す所見であった。

野生型細胞の免疫染色では、GIT2と接着斑構成蛋白であるパキシリンの共局在が示された。この共局在はRac1阻害薬では変化がなかったが、RhoAシグナル阻害薬では減少していた。

(3)マウスを用いたGIT2の機能の解析

CRISPR/Cas9によりGIT2欠損(KO)マウスを樹立し、そのマウスの単離糸球体を用いたイムノブロットによりGIT2蛋白が欠損していることを確認した。

LPS投与後、対照マウスの尿蛋白量は24時間後にピークとなり、48時間後には減少した。GIT2欠損マウスでは24時間後は対照マウスと有意差がなかったが、48時間後まで尿蛋白の漏出が遷延していた。

電子顕微鏡を用いたLPS投与48時間後の足突起の形態評価では、GIT2欠損マウスで足突起の癒合が目立ち、足突起幅が有意に増加していた。

以上の結果から、GIT2はパキシリンとともに接着斑に局在し、Rac1の活性を抑制することでポドサイト形態と糸球体濾過バリア機能の維持を行っていると考えられる。これより、腎疾患患者でGIT2のmRNA転写量が増加していたのは、腎障害の抑制あるいは修復を行うための反応であると推察される。

さらに、GIT2の機能はRhoAシグナル依存性であることが示唆された。一般的に、RhoAは細胞中心部でストレスファイバーの形成と細胞形態の安定に働き、Rac1は細胞辺縁部でアクチンネットワークの形成と葉状仮足の形成・細胞移動に関わるとされている。本研究から、GIT2がRhoA、Rac1の両方に関与し、細胞形態の維持と変化において重要な役割を果たしていると考えられる。

引用文献

1. Burridge K and Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004;116:167-179.
2. Robins R et al. Rac1 activation in podocytes induces the spectrum of nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 2017;92:349-364.
3. Yu H et al. Rac1 activation in podocytes induces rapid foot process effacement and proteinuria. *Mol Cell Biol*. 2013;33:4755-64.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jun Matsuda, Tomoko Takano	4. 巻 2664
2. 論文標題 Monitoring of Rho GTPase Activity in Podocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 343-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-3179-9_22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun Matsuda, Naoyuki Shimada, Kana Asano-Matsuda, Tomoko Takano, Yoshitaka Isaka
2. 発表標題 GIT2 regulates Rac1 activity and is critical for cytoskeletal dynamics in podocytes
3. 学会等名 The 14th Biennial International Podocyte Conference 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田 直幸、松田 潤、松田 佳奈、高野 朋子、猪阪 善隆
2. 発表標題 ポドサイトのGIT2はRac1活性を制御し細胞形態と糸球体濾過バリアを維持する
3. 学会等名 第66回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松田 潤、島田 直幸、松田 佳奈、高野 朋子、猪阪 善隆
2. 発表標題 Rac1抑制を介したGIT2のポドサイト保護効果（優秀演題賞受賞）
3. 学会等名 第8回ポドサイト研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松田 潤、島田 直幸、松田 佳奈、高野 朋子、猪阪 善隆
2. 発表標題 ポドサイトのGIT2はRac1活性を制御し細胞形態と糸球体濾過バリアを維持する
3. 学会等名 第7回ポドサイト研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	島田 直幸 (Shimada Naoyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------