

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390224

研究課題名(和文)細胞間接着装置の障害としての蛋白尿—他臓器疾患との関連—

研究課題名(英文)Common pathogenesis of nephrotic syndrome and vascular diseases in other organs

研究代表者

河内 裕(KAWACHI, HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60242400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白尿と他臓器疾患の発症に関連がある分子としてEphrin-B1とSV2Bを同定し、これら分子の性状、機能解析を行った。Ephrin-B1は、神経細胞の軸索誘導に関与する分子で、腎ではポドサイトの膜部に局在し、細胞外部でネフリンと結合しスリット膜のバリア機能維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。シナプス小胞関連分子であるSV2B、その関連分子がポドサイトに発現していることを観察した。KOマウスを用いた検討で、SV2Bはスリット膜、足突起、基底膜の形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらの観察はポドサイト障害と他臓器疾患の関連を考えるうえで極めて重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：We have identified Ephrin-B1 and SV2B as molecules of which dysfunction is involved in the development of nephrotic syndrome and neuronal and vascular diseases. In this study we analyzed the expression and function of these molecules with several experimental models and knockout mice. This study revealed that ephrin-B1 was localized at the surface of podocyte and bound to nephrin, a critical molecule of the slit diaphragm. SV2B (synaptic vesicle protein 2B), which is expressed on the surface of synaptic vesicles in neuron, was localized at the slit diaphragm area in podocyte and played an essential role in maintaining the structure of foot process, slit diaphragm and GBM. SV2B KO mice showed proteinuria. The altered expression of the slit diaphragm molecules including CD2AP and nephrin was detected in KO mice. These observations provide important information to understand the common pathogenesis of nephrotic syndrome and other diseases.

研究分野：医歯薬学

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：蛋白尿 細胞間接着装置 心腎関連 ネフローゼ症候群 慢性腎臓病 ポドサイト

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病患者は脳・心血管イベントの発症率が有意に高いことが疫学的研究で明らかになっており、臓器連関は腎臓病学の最も重要な研究テーマの1つとなっている。蛋白尿陽性者は、腎機能の低下が無い場合でも、心血管イベントの発症率が蛋白尿陰性者の3.07倍、脳血管イベントは4.4倍であると報告されている。しかし、「蛋白尿と心・脳血管イベントの関連」、「蛋白尿と他臓器疾患とに共通する発症メカニズム」はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、蛋白尿を細胞間接着装置の障害と捉え、蛋白尿とその発症に関連があると報告されている他臓器疾患とに共通する発症機序を解明し、これら疾患の治療法の開発に向けた研究を進めることである。具体的には、蛋白尿の発症、他臓器疾患の発症に関連がある分子として同定した Ephrin-B1 と synaptic vesicle protein 2B (SV2B) の性状、機能解析を行い、各種病態発症における役割を検討した。

3. 研究の方法

Ephrin-B1 の検討：(1)Ephrin-B1 並びに関連分子の各臓器における局在、各種病態モデルでの発現動態を蛍光抗体法 (IF), Western Blot, RT-PCR 法を用いて解析した。(2)強制発現系を用いて分子間の結合様式の解析を行った。

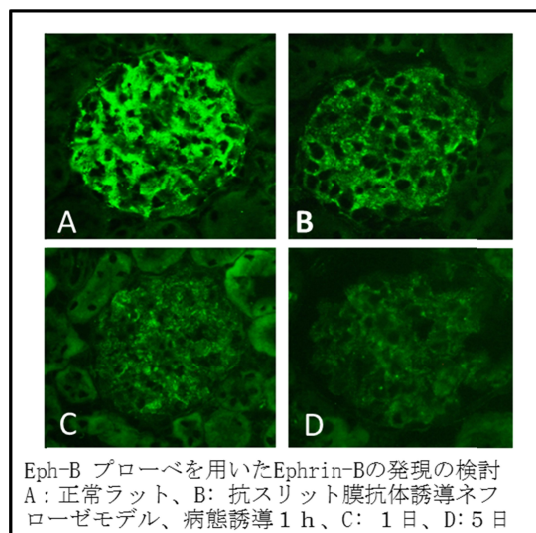
SV2B の検討：ノックアウト (KO) マウスを製作し、ポドサイトの形態、スリット膜の分子構造、バリア機能異常の有無、傷害に対する脆弱性の検討を行った。

4. 研究成果

Ephrin-B1 の発現解析は、特異抗体での検討に加え、Ephrin と ligand-receptor 関係にある分子である Eph をプローベとして用いた検討を行い、Ephrin B が糸球体上皮細胞膜表面に局在していることを確認した。糸球体障害の発症、進行における Ephrin B の関与を解析することを目的として、各種病態モデルでの発現動態を解析した。病態モデルとして (1)スリット膜特異的傷害モデル (図1) (2)微小変化型ネフローゼモデル (PAN 腎症) (図2) (3)巣状糸球体硬化症モデル (ADR 腎症)、(4)膜性腎症モデル (ハイマン腎炎) を用いた。これらモデルでの検討で、病態誘導直後の病的蛋白尿が発症する以前にその発現が既に著明に低下していることを観察した。この結果は Ephrin B がネフローゼ症候群の早期マーカーとして有用であることを示している。免疫組織学的検討で Ephrin-B1 は、スリット膜部、ネフリンの近傍に発現していることが確認されている。Ephrin-B1 とネフリンの関係、結合性をさらに解析するため、HEK293 細胞を用いた強制発現系での検討を

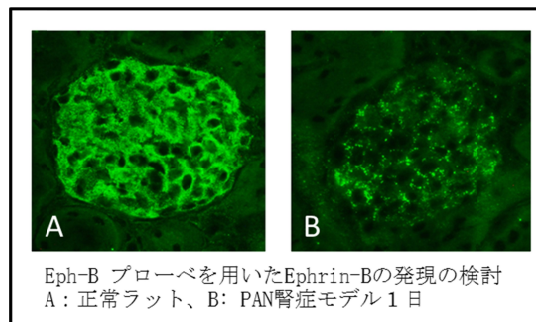
行い、Ephrin B はネフリンと結合していることを明らかにした (図2)。また各部を delete した発現系での検討で、両者は細胞外部で結合していることを明らかにした。また、この系を用いた解析で、ネフリンの対する刺激で、Ephrin-B1 の性状が変化することも確認しており、両分子が構造的な結合性を有するだけでなく、機能的に共同していることを明らかにした。これらの観察から、Ephrin B はスリット膜構成分子の1つで、糸球体血管壁の蛋白透過性制御に重要な役割を果たしていることを示している。Ephrin-B1 は生体各所に発現している分子で、炎症性腸疾患モデルで

【図1】



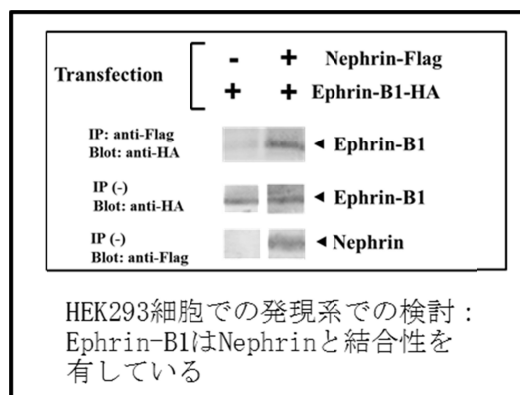
Eph-B プローベを用いたEphrin-Bの発現の検討
A: 正常ラット、B: 抗スリット膜抗体誘導ネフローゼモデル、病態誘導 1 h、C: 1日、D: 5日

【図2】



Eph-B プローベを用いたEphrin-Bの発現の検討
A: 正常ラット、B: PAN腎症モデル 1日

【図3】

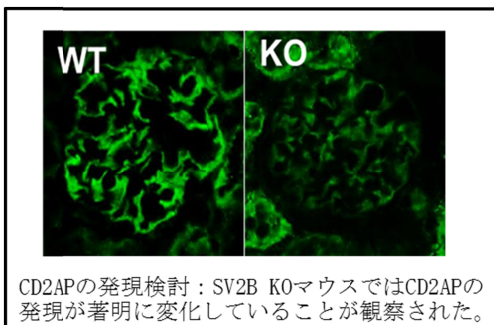


も発現が変化していることを確認している。Ephrin-B1 は、細胞間接着装置のバリア機能維持に協調的に作用する分子であることを示唆しており、臓器連関を考える上で重要な知見であると考えられる。

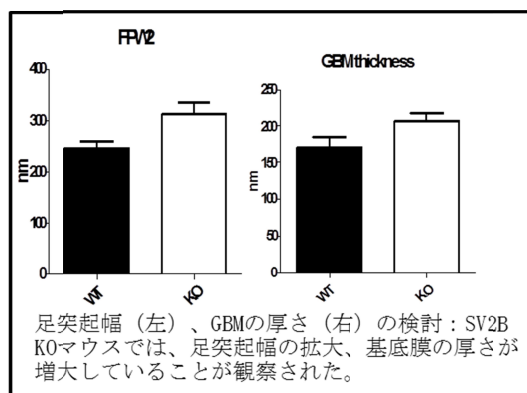
Ephrin-B1 の検討に並行して、SV2B の検討を進めた。SV2B KO マウスを作製し、同マウスを用いた機能解析を行った。SV2B KO マウスでは CD2AP, ネフリン, Neph1 などのスリット膜機能分子の局在が著明に変化すること(図4)、足突起並びに糸球体基底膜(GBM)の形成に異常がみられること(図5)、SV2B KO マウスでは野生型マウスに比して有意に尿蛋白量が増加していることを観察した。また SV2B KO マウスは高タンパク質負荷などの刺激に対して脆弱性を示すこと、片腎摘出後の生存率が、野生型マウスに比べ有意に低いことを観察した(図6)。また、SV2B KO マウスでは他の vesicle 関連分子の発現変化が著明に変化していることを確認した。

これらの観察は、シナプス様 vesicle がポドサイト機能維持に重要な役割を果たしていること、この vesicle 機能維持に SV2B が重要な働きを果たしていることを示していると考えられる。シナプス様 vesicle は他組織でも重要な役割を果たしているとする報告もある。今回の研究は、蛋白尿と他臓器疾患に共通する発症機序として、SV2B 分子、シナプス様 vesicle の機能低下が関与している可能性を示している。シナプス様 vesicle を標的とした新規治療法の開発は、有望な戦略として考えられることを示している。

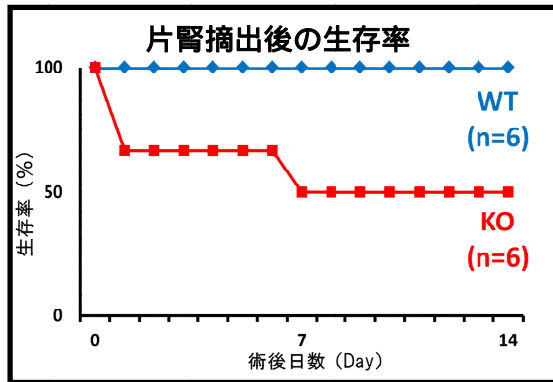
[図4]



[図5]



[図6]



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 26 件)

1. Yamada S, Nakamura J, Asada M, Takase M, Matsusaka T, Iguchi T, Yamada R, Tanaka M, Higashi AY, Okuda T, Asada N, Fukatsu A, Kawachi H, Graf D, Muso E, Kita T, Kimura T, Pastan I, Economides AN, Yanagita M. Twisted gastrulation, a BMP antagonist, exacerbates podocyte injury. PLoS One. 2014 25;9(2):印刷中. doi:10.1371/journal.pone.0089135. (査読有)
2. Y. Fukusumi, N. Miyauchi, T. Hashimoto, A Saito and H. Kawachi. Therapeutic target for nephrotic syndrome: Identification of novel slit diaphragm associated molecules. World journal of Nephrology 2014 印刷中 (査読有)
3. 河内裕, 福住好恭 糸球体性蛋白尿の発症機序 Medicina vol.51, No.8, 2014 印刷中(査読無)
4. 河内裕 糸球体濾過障壁と蛋白尿 腎と透析 76,2014 (査読無)
5. Wang-Rosenke Y, Khadzhyrov D, Loof T, Mika A, Kawachi H, Neumayer HH, Peters H. Tyrosine kinases inhibition by Imatinib slows progression in chronic anti-thy1 glomerulosclerosis of the rat. BMC Nephrol. 2013 14:14 doi: 10.1186/1471-2369-14-223. (査読有)
6. Babayeva S, Rocque B, Aoudjit L, Zilber Y, Li J, Baldwin C, Kawachi H, Takano T, Torban E. Planar cell polarity pathway regulates nephrin endocytosis in developing podocytes. J Biol Chem. 2013 16;288(33):24035-48. doi: 10.1074/jbc.M113.452904. (査読有)
7. Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, Soetikno V, Nagata M, Nakamura T, Takahashi T, Sone H, Kawachi H, Watanabe K. The hyperglycemia stimulated myo- cardiac endoplasmic

- reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: a differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 45:438-447.2013
doi:10.1016/j.biocel.2012.09.017.(査読有)
8. 河内裕、高橋彩、山崎美穂子、福住好恭、富田雅之 腎系球体上皮細胞(ポドサイト) スリット膜の構造と機能 - ARB のポドサイト保護作用 - *Pharma Medica*、2013 31:98-100.2013
 9. Soetikno V, Sari FR, Lakshmanan AP, Arumugam S, Harima M, Suzuki K, Kawachi H, Watanabe K. Curcumin alleviates oxidative stress, inflammation, and renal fibrosis in remnant kidney through the Nrf2-keap1 pathway. *Mol Nutr Food Res.*57:1649-1659 2012 doi: 10.1002/mnfr. 201200540. (査読有)
 10. Soetikno V, Sari FR, Sukumaran V, Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, Kawachi H, Watanabe K. Curcumin decreases renal triglyceride accumulation through AMPK-SREBP signaling pathway in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 24:796-802 2012 Aug 13.doi:10.1016/j.jnutbio.2012.04.013. (査読有)
 11. Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Sukumaran V, Thandavarayan RA, Kawachi Y, Yokoyama J, Tomita M, Kawachi H, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H, Takagi R. Irsogladine maleate ameliorates inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. *Med Mol Morphol.* 45: 140 -151 . 2012 (査読有)
 12. Ramadan R, Faour D, Awad H, Khateeb E, Cohen R, Yahia A, Torgovicky R, Cohen R, Lazari D, Kawachi H, Abassi Z. Early treatment with everolimus exerts nephroprotective effect in rats with adriamycin-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 27:2231 -2241. 2012 doi: 10.1093/ndt/gfr581. (査読有)
 13. Tanabe M, Shimizu A , Masuda Y, Kataoka M, Ishikawa A, Wakamatsu K, Mii A, Fujita E, Higo S, Kaneko T, Kawachi H, Fukuda Y, Development of lymphatic vasculature and morphological characterization in rat kidney. *Clin Exp Nephrol.* 16:833-842.2012 doi: 10.1007/s10157- 012-0637-z. (査読有)
 14. Sofue T, Kiyomoto H, Kobori H, Urushihara M, Nishijima Y, Kaifu K, Hara T, Matsumoto S, Ichimura A, Ohsaki H, Hitomi H, Kawachi H, Hayden MR, Whaley-Connell A, Sowers JR, Ito S, Kohno M, Nishiyama A. Early treatment with olmesartan prevents juxtamedullary glomerular podocyte injury and the onset of microalbuminuria in type 2 diabetic rats. *Am J Hypertens.* 25(5):604-11.2012 doi: 10.1038/ajh.2012.1. (査読有)
 15. Sato A, Piao H, Nozawa Y, Morioka T, Kawachi H, Oite T. Local delivery of a direct renin inhibitor into the kidney ameliorates progression of experimental glomerulonephritis. *Clin Exp Nephrol.*16:539-48. 2012 doi: 10.1007/s10157-012-0601-y. (査読有)
 16. Toyama K, Morisaki H, Cheng J, Kawachi H, Shimizu F, Ikawa M, Okabe M, Morisaki T. Proteinuria in AMPD2-deficient mice. *Genes Cells.* 17:28-38.2012 doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01568.x. (査読有)
 17. Kinoshita Y, Kondo S, Urushihara M, Suga K, Matsuura S, Takamatsu M, Shimizu M, Nishiyama A, Kawachi H, Kagami S. Angiotensin II type I receptor blockade suppresses glomerular renin-angiotensin system activation, oxidative stress, and progressive glomerular injury in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Transl Res.* 158:235-48.2012 doi: 10.1016/j.trsl.2011.05.003. (査読有)
 18. Soetikno V, Sari FR, Veeraveedu PT, Thandavarayan RA, Harima M, Sukumaran V, Lakshmanan AP, Suzuki K, Kawachi H, Watanabe K. Curcumin ameliorates macrophage infiltration by inhibiting NF- B activation and proinflammatory cytokines in streptozotocin induced-diabetic nephropathy. *Nutr Metab (Lond).* 8:35.2011 doi: 10.1186/1743-7075-8-35. (査読有)
 19. Suzuki K, Sun X, Nagata M, Kawase T, Yamaguchi H, Sukumaran V, Kawachi Y, Kawachi H, Nishino T, Watanabe K, Yoneyama H, Asakura H. Analysis of intestinal fibrosis in chronic colitis in mice induced by dextran sulfate sodium. *Pathol Int.* 61:228-238.2011 doi:10.1111/j.1440-1827.2011.02647.x. (査読有)
 20. Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Hasegawa H, Yamada T, Imai N, Narita I, Kawachi H, Polkinghorne KR,

- Nikolic-Paterson DJ, Uchiyama M. Identification of alternatively activated macrophages in new-onset paediatric and adult immunoglobulin A nephropathy: potential role in mesangial matrix expansion. *Histopathology* 58:198-210. 2011: doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03742.x. (査読有)
21. Saito A, Miyauchi N, Hashimoto T, Karasawa T, Han GD, Kayaba M, Sumi T, Tomita M, Ikezumi Y, Suzuki K, Koitabashi Y, Shimizu F, Kawachi H. Neurexin-1, a presynaptic adhesion molecule, localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocytes in kidneys. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comparative Physiology* 300: R340-R348. 2011 doi: 10.1152/ajpregu.00640.2009 (査読有)
 22. Ohtsuka Y, Kanaji T, Nishi M, Sakai N, Sato T, Aoki S, Wakayama K, Nakazato S, Hisano S, Sado Y, Kawachi H, Izuhara K, Hamasaki Y. A notable case report of May-Hegglin anomaly with immune complex-related nephropathy: a genetic and histological analysis. *Clin Nephrol* 75:255-262, 2011 doi: 10.5414/CNP75255 (査読有)
 23. Kojima K, Nosaka H, Kishimoto Y, Nishiyama Y, Fukuda S, Shimada M, Kodaka K, Saito F, Matsumura K, Shimizu T, Toda T, Takeda S, Kawachi H, Uchida S. Defective glycosylation of -dystroglycan contributes to podocyte flattening. *Kidney Int* 79:311-316. 2011 doi: 10.1038/ki.2010.403 (査読有)
 24. Miyasato K, Takabatake Y, Kaimori J, Kimura T, Kitamura H, Kawachi H, Li XK, Hünig T, Takahara S, Rakugi H, Isaka Y. CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangio proliferative glomerulo- nephritis in rats. *Clin Exp Nephrol* 15:50-57. 2011 doi: 10.1007/s10157-010-0370-4. (査読有)
 25. 河内裕, 長田道夫, 膜性腎症 (特発性膜性腎症) 腎臓 33 : 227-231, 2011 (査読無)
 26. 長田道夫, 河内裕, ループス腎炎モデル 腎臓 34 : 48 -53, 2011 (査読無) [学会発表] (計 32 件)
1. 福住好恭, Synaptic vesicle protein 2B is essential for the maintenance of the integrity of the slit diaphragm. 第 10 回国際ポドサイト学会 2014 年 6 月 4 日~6月6日 フライブルグ、ドイツ
 2. 福住好恭, シナプス小胞分子 SV2B KO マウス腎におけるシナプス小胞様輸送関連分子の発現解析 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4 日~7月6日 横浜、神奈川
 3. 若松彩子 Calcineurin (CN) 阻害薬はスリット膜保護作用により蛋白尿を改善する 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4 日~7月6日 横浜、神奈川
 4. 金子博司 各種ポドサイト機能分子の病勢診断マーカーとしての有用性の検討: ラット PAN 腎症モデルを用いた解析 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4 日~7月6日 横浜、神奈川
 5. Takahashi Y, Rituximab Ameliorates Proteinuria in Rat Adriamycin Nephropathy Independently with Its Action to B Lymphocyte 第 46 回アメリカ腎臓学会総会、2013 年 11 月 5 日~10 日アトランタ、アメリカ
 6. Wakamatsu A, Calcineurin Is Mainly Localized at the Slit Diaphragm Area, and Its Altered Expression Precedes Proteinuria in Rat Nephrotic Syndrome Models 第 46 回アメリカ腎臓学会総会、2013 年 11 月 5 日~10 日アトランタ、アメリカ
 7. Fukusumi Y, Synaptic Vesicle Protein 2B Is Essential for Maintaining the Integrity of the Podocyte Slit Diaphragm; SV2B KO Mice Are Vulnerable to the Podocyte Injury 第 46 回アメリカ腎臓学会総会、2013 年 11 月 5 日~10 日アトランタ、アメリカ
 8. Yanagita M, Twisted Gastrulation, a BMP Antagonist, Exacerbates Podocyte Injury 第 46 回アメリカ腎臓学会総会、2013 年 11 月 5 日~10 日アトランタ、アメリカ
 9. Yamazaki Y, Glomerular expression of Renin-Angiotensin system components in Rats with podocyte dysfunction 第 45 回アメリカ腎臓学会総会、2012 年 10 月 30 日~11 月 4 日、サンディエゴ、アメリカ
 10. Takahashi Y, Role of p38 MAPK activation in the slit diaphragm dysfunction and proteinuria caused by a direct stimulation to nephrin 第 45 回アメリカ腎臓学会総会、2012 年 10 月 30 日~11 月 4 日、サンディエゴ、アメリカ
 11. Tomita M, Ephrin-B is interacted with nephrin and plays an important role in the slit diaphragm. - Decreased expression of ephrin-B is an early marker to detect slit diaphragm dysfunction- 9th International Podocyte Conference 2012 年 04 月 22 日~25 日 Miami Beach Resort & Spa マイアミ、アメリカ
 12. Murad H, Ephrin B1 in podocyte is

interacted with nephrin and is phosphorylated by a signal from nephrin
第 44 回アメリカ腎臓学会総会、2011 年
11 月 10 日～13 日、フィラデルフィア、
アメリカ

13. Murad H, Ephrin-B1 is expressed at the slit diaphragm and is structurally and functionally interacted with nephrin. 国際腎臓学会 (ISN) Forefront Symposium、2011 年 9 月 22 日～25 日、オーフス、デンマーク

〔図書〕(計 2 件)

1. 河内裕、「小児腎臓病学」診断と治療社、2011 年、p94-98.
2. 河内裕、「腎臓症候群」日本臨床社、2011 年、p93-96.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/nim/welcomej.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 裕 (KAWACHI HIROSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60242400

(2) 研究分担者

・鈴木 健司 (SUZUKI KENJI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：00303123

・松井 克之 (MATSUI KATSUKI)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：20256027

・渡邊 賢一 (WATANABE KENICHI)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70175090

・池住 洋平 (IKEZUMI YOHEI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70361897