

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23590242

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた糸球体濾過システムと上皮バリアの統合的解析

研究課題名(英文) The analyses of glomerular filtration system and epithelial barrier using genetically-engineered mice

研究代表者

伊藤 雅彦 (Itoh, Masahiko)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70270486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血液濾過を担う腎糸球体の主要構成要素の一つである糸球体上皮細胞は、足突起と呼ばれる特殊な構造を介して濾過に必要なslit diaphragmを形成している。隣り合う細胞間に形成されるslit diaphragmは、分化前の糸球体上皮細胞に存在するアドヘレンス結合が変化して構築される構造と考えられてきた。しかしながら、アドヘレンス結合の構成分子を欠損させても顕著な異常は認められなかった。そこで、アドヘレンス結合と密着結合の2つの接着構造に関係する分子ZO-1を欠損するマウスを作製し、糸球体構造および濾過機能への影響を解析したところ、変異マウスはヒト糸球体障害で認められるのと同様の異常を示した。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated that podocytes in the kidney glomerulus play a crucial role in blood filtration and in the pathogenesis of proteinuria and glomerular sclerosis; however, the molecular mechanisms that organize the podocyte filtration barrier are not fully understood. We suggest that tight junction protein 1 (Tjp1 or ZO-1), which is encoded by Tjp1 gene, plays an essential role in establishing the podocyte filtration barrier. The podocyte-specific deletion of Tjp1 down-regulated the expression of podocyte membrane proteins, impaired the interdigitation of the foot processes and the formation of the slit diaphragm, resulting in glomerular dysfunction. We found the possibility that podocyte filtration barrier requires the integration of two independent units, the pre-existing epithelial junction components and the newly synthesized podocyte-specific components, at the final stage in glomerular morphogenesis, for which Tjp1 is indispensable.

研究分野：統合分子細胞生物学

キーワード：腎臓 糸球体 糸球体上皮細胞 密着結合 糸球体障害 蛋白尿 ZO-1 Tjp1

1. 研究開始当初の背景

体内生理環境の恒常性を調節する腎臓において糸球体は濾過機能を有し、血液浄化・尿生成を司る必要不可欠なユニットである。

糸球体の濾過システムは、内皮細胞・基底膜・足細胞の3層より構成されており、これまで基底膜の重要性が強調されていた。

しかし最近になり、足細胞が作る足突起およびスリット膜と呼ばれる特殊な構造が実質的に限外濾過システムの主体として機能していることが判明してきている。例えば、タンパク尿を遺伝的に発症する家系の連鎖解析により同定された3つの分子 **nephrin**, **α -actinin4**, **podocin** は全て足細胞の構成因子であった。

足突起は、もともと通常の上皮細胞である足細胞が大きく形態変化を起こして作る構造であり、アクチンフィラメントがその形成に関与する。また、足突起の間に張られたスリット膜は、上皮細胞間接着構造においてアクチンと相互作用するカドヘリン-カテニン複合体のアドヘレンス結合に由来するとする説が有力であった。

しかしながら、足細胞において β カテニン発現を欠損するマウスの解析から、正常な糸球体の形成に β カテニンは必須でないことが明らかになり、足突起・スリット膜の形成が上皮細胞間接着構造とどのように関連するのか、その分子制御機構について不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

上皮細胞において、アクチンフィラメントと結合する細胞間接着構造には、アドヘレンス結合の他にタイト結合が存在する。タイト結合は、隣接する細胞同士を密着させ、細胞間の距離をゼロにすることによって、物質の透過を制御するバリアとしての機能を担っている。

足細胞のスリット膜部分では、隣接する細胞間に数十ナノメートルの距離が存在することから、タイト結合とは明らかに構造的に異なる。しかしながら、タイト結合の構成分子 **ZO-1** がスリット膜近傍に局在しており、また、濾過とバリアは機能的に共通する性質をもつと考えられることから、タイト結合構成分子、特に **ZO-1** の役割に着目した。

本研究の目的は、糸球体足細胞における **ZO-1** の生理機能を個体レベルで解析することによって、濾過システムの分子基盤の解明を進めると同時に、糸球体障害とそれに起因する疾患の診断や治療への貢献につなげることである。

3. 研究の方法

以前に作製した **ZO-1** ノックアウトマウスは、胎生 10.5 日頃に致死となるため、腎臓を含め各種臓器における生理的機能を解析することは困難であった。そこで、コンディショナルに **ZO-1** 欠損を可能とする **floxed ZO-1**

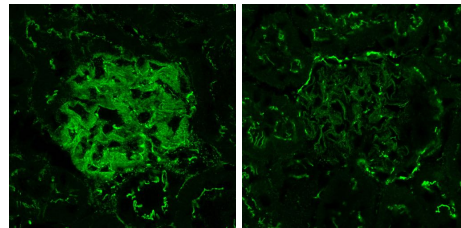
マウスの作製を行った。

この **floxed ZO-1** マウスと、腎臓の足細胞特異的に **Cre** リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス **Nephrin-Cre^{tg}** を交配することによって、足細胞において **ZO-1** を欠損した腎臓を持つ変異マウス **ZO-1 ^{Δ pod}** の創出を行い、以下の点について解析する。

- (1) 目的どおり足細胞特異的に **ZO-1** 発現が消失しているか免疫染色にて確認
- (2) 変異マウス個体の成長状況の観察
- (3) 尿中タンパク質の解析
- (4) 腎臓全体の観察
- (5) 光学顕微鏡による組織像解析
- (6) 電子顕微鏡による糸球体の微細構造解析
- (7) 病理染色による解析
- (8) 走査型電子顕微鏡による糸球体の3次元構造解析
- (9) スリット膜構成分子の細胞内局在への影響
- (10) スリット膜構成分子の発現に対する影響
- (11) 細胞レベルで起きる変化の解析
- (12) 糸球体発生過程の解析

4. 研究成果

(1) 足細胞特異的 **ZO-1** 欠損マウスの作製



左：コントロールマウス腎

右：変異マウス腎

上図に示すように、抗 **ZO-1** 抗体による免疫染色の結果、足細胞における **ZO-1** の発現が消失し、糸球体の血管内皮細胞・ボウマン嚢壁側上皮細胞ならびに尿管管上皮細胞における **ZO-1** の発現はコントロールと同様の状態が保持されていた。

このことから、目的とする足細胞特異的 **ZO-1** 欠損マウスの作製に成功していると考えられる。

(2) 変異マウス個体の成長状況の観察



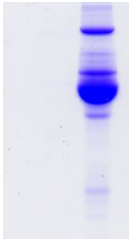
6週齢マウスの全身像

左：コントロールマウス

右：変異マウス

変異マウスはコントロールと比較して成長が遅く、なおかつ徐々に衰弱が激しくなり、6週齢前後に死亡してしまった。

(3) 尿中タンパク質の解析



マウス尿の電気泳動像
左：コントロールマウス尿
右：変異マウス尿

コントロールマウスの尿中にはタンパク質の漏出がほとんど認められないのに対し、変異マウス尿にはアルブミンを始め様々な分子量のタンパク質が漏出していた。

したがって、足細胞における ZO-1 の欠損は、糸球体濾過機能に破綻をもたらすことが明らかとなった。

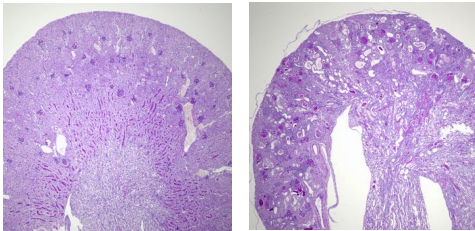
(4) 腎臓全体像の観察



左：コントロールマウス腎臓
右：変異マウス腎臓

変異マウスの腎臓は虚血状態を示し、また組織表面の様子から硬化している可能性が示唆された。

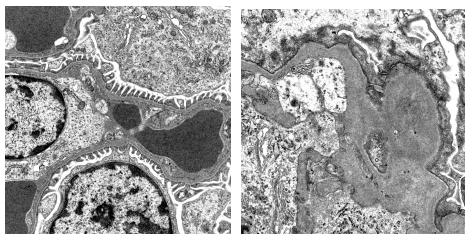
(5) 光学顕微鏡による組織像解析



左：コントロールマウス腎臓切片
右：変異マウス腎臓切片

腎臓組織切片を HE 染色したところ、変異マウスの腎臓は髄質部分に変性を生じ、また主に皮質に存在する糸球体に異常を認めた。

(6) 電子顕微鏡による糸球体微細構造解析

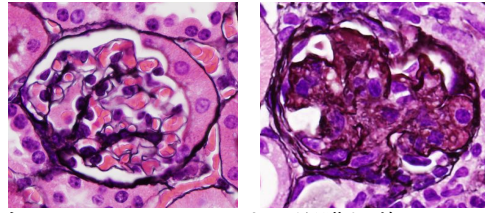


左：コントロールマウス腎臓切片
右：変異マウス腎臓切片

透過型電子顕微鏡を用いて糸球体の微細構造を解析したところ、変異マウスの糸球体基底膜はコントロールのそれに比較すると肥厚および蛇行している様子が観察された。また、コントロールで明瞭に認められる足突起構造が、変異マウス糸球体ではほぼ完全に

消失していることが判明した。

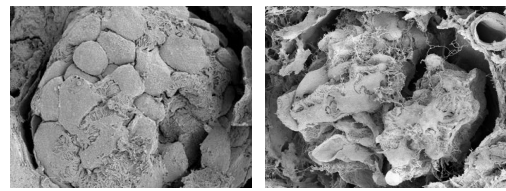
(7) 病理染色による解析



左：コントロールマウス腎臓切片
右：変異マウス腎臓切片

糸球体疾患の診断に用いられる、基底膜成分に対する染色法を、マウス腎組織に対して行った。その結果、変異マウス糸球体は強陽性となり、糸球体に占める基底膜成分の割合が増加していることが示唆された。このことは、(6)で示した透過型電子顕微鏡像の結果と一致しており、また、変異マウス糸球体の特徴は、ヒト糸球体硬化症の病変に類似していることが明らかになった。

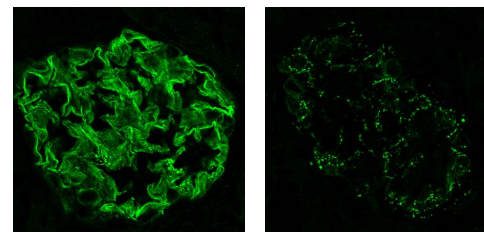
(8) 走査型電子顕微鏡による糸球体の3次元構造解析



左：コントロールマウス腎臓切片
右：変異マウス腎臓切片

2-3 週齢マウス糸球体の 3 次元立体構造を、走査型顕微鏡を用いて観察すると、コントロールでは隣り合う細胞から伸びた足突起がかみ合っている。しかし、変異マウス糸球体の場合、足突起のかみ合いが緩み、基底膜から剥離してしまっている。このことは、糸球体における濾過の圧力にスリット膜・足突起が耐えられなかったために起きたものと予想される。

(9) スリット膜構成分子の細胞内局在への影響



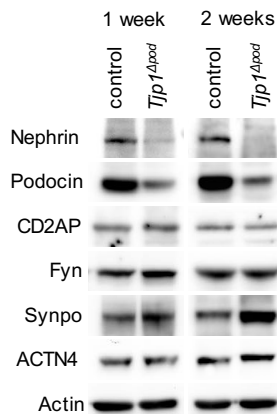
左：コントロールマウス腎臓切片
右：変異マウス腎臓切片

以上の解析から、足細胞特異的な ZO-1 欠損によって、糸球体の構造および濾過機能に重篤な異常を生じることが明らかになったが、分子レベルでどのような変化が起きているのか、

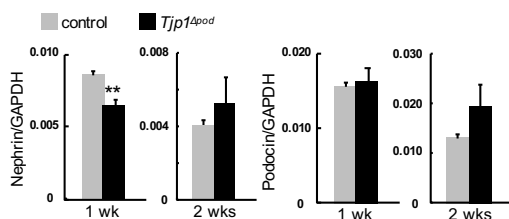
まずスリット膜の構成分子podocinの局在を免疫染色で解析した。

その結果、podocinの染色パターンはドット状に変化し、またシグナル強度も減弱している様子が観察された。

(10) スリット膜構成分子発現に対する影響



次いで、ウエスタンブロッティングにより、スリット膜および足突起を構成するタンパク質の発現を検討した。その結果、足突起内でアクチンと結合する分子は発現減少を認めなかったが、膜タンパク質 Nephrin と Podocin は有意に低下していた。



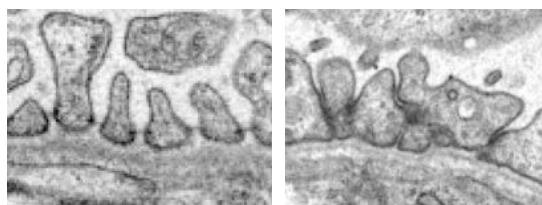
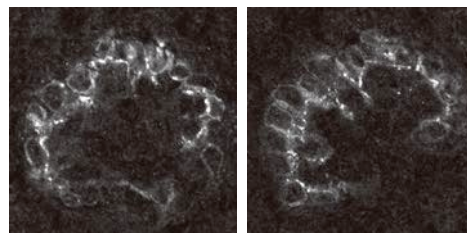
また、Nephrin と Podocin の発現低下が転写レベルで起きているのか測定したところ、mRNA では明確な違いは起きていなかった。したがって、タンパク質発現の低下は、翻訳後に生じる事象であることが示唆された。

(11) 細胞レベルで起きる変化の解析

上記のタンパク質発現低下の原因として、タンパク質の安定性に变化あるのではないかと考え、ZO-1 発現に違いのある培養細胞を用いて、Nephrin および Podocin の安定性を解析した。その結果、Nephrin については差がなかったが、Podocin の場合、ZO-1 がなくなると安定性が低下することが明らかになった。

(12) 糸球体発生過程の解析

マウスの場合、糸球体は出生直後にまだ成熟しておらず、足突起やスリット膜の形態形成が進行している過程にある。そこで、出生直後のマウス腎臓を用いて、足細胞におけるZO-1の欠損が、足突起やスリット膜の維持のみならず形成にも影響を及ぼすか解析した。



左：コントロールマウス腎臓
右：変異マウス腎臓

Podocinの局在を検討した結果(上図)、形態形成のごく初期には差がないことが判明した。しかし、成熟する過程においてPodocinの分布に異常が現れ、透過型電子顕微鏡で微細構造を解析したところ(下図)、変異マウスでは足突起同士が密着したままで、コントロールに見られるスリット膜構造の形成が起きていないことが分かった。

以上の結果から、タイト結合の構成分子であるZO-1は、タイト結合が存在しない足細胞に発現し、その発現が、糸球体濾過に重要なスリット膜構造の正常な形成と維持に不可欠であることが明らかになった。

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 5 件)

- ① Ando H, Aoyama C, Horibata Y, Satou M, Mitsuhashi S, Itoh M, K Hosaka, H Sugimoto. Transcriptional suppression of CTP:phosphoethanolamine cytidyl transferase by 25-hydroxycholesterol is mediated by nuclear factor- κ B and Yin Yang1. *Biochem J.* 471(3) 369-379, 2015. 査読有 DOI: 10.1042/BJ20150318.
- ② Itoh M, Nakadate K, Horibata Y, Matsusaka T, Xu J, Hunziker W, Sugimoto H. The Structural and Functional Organization of the Podocyte Filtration Slits Is Regulated by Tjp1/ZO-1. *PLOS ONE* 9(9):e106621, 2014. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0106621.
- ③ Itoh M. ARHGEF11, a regulator of junction-associated actomyosin in epithelial cells. *Tissue Barriers* 1(2):e24221.1-24221.5, 2013. 査読有 DOI: 10.4161/tisb.24221

- ④ Horibata Y, Ando H, Itoh M, Sugimoto H. Enzymatic and transcriptional regulation of the cytoplasmic acetyl-CoA hydrolase ACOT12. J Lipid Res 54(8):2049-2059, 2013. 査読有 DOI: 10.1194/jlr.M030163.
- ⑤ Itoh M, Tsukita S, Yamazaki Y, Sugimoto H. Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-myosin II signaling. PNAS 109(25):9905-9910, 2012. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1115063109.

()
研究者番号 :
(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :

[学会発表] (計 2 件)

- ① Itoh M. Molecular Mechanisms Regulating Junction-Associated Actomyosin in Epithelial Cells. 第 66 回 日本細胞生物学会大会 2014 年 6 月 奈良県・奈良市
- ② 伊藤雅彦, 中館和彦, 堀端康博, 上田善彦, 杉本博之: ZO-1 is essential for the glomerular barrier function and the slit diaphragm structure in the kidney. 第 36 回 日本分子生物学会大会, 2013 年 12 月 兵庫県・神戸市

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

伊藤 雅彦 (ITO, Masahiko)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 70270486

(2) 研究分担者