

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591186

研究課題名(和文)系球体上皮細胞におけるシナプス小胞関連分子によるスリット膜機能調節機構の解明

研究課題名(英文)Role of the synapse like vesicle in maintaining the podocyte function

研究代表者

富田 雅之(TOMITA, MASAYUKI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：60568492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ネフローゼ症候群発症機序の解明、新規治療法開発に向けたバイオマーカー探索、ポドサイト障害発症におけるシナプス様vesicleの役割、シグナル伝達機構の解明を目的として研究を行った。SV2B並びにその関連分子群がポドサイト障害を早期に感知するマーカーとしてだけでなく、予後判定のマーカーとしても有用である所見を観察した。スリット膜刺激により誘導されるポドサイト障害においてp38 MAPKが活性化していること、p38 MAPK阻害薬が蛋白尿を改善すること、ポドサイト傷害初期に見られるスリット膜分子の発現低下を抑制することを観察した。また、単離系球体を用いた蛋白透過性保持の程度を検出する系を確立した。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that SV2B is one of the critical molecules in maintaining the podocyte function. The study with several experimental models revealed that SV2B could be an early sensitive marker to detect podocyte injury. This study also revealed that the podocyte injury caused by the stimulation to the extracellular site of nephrin was p38MAPK dependent, and that p38MAPK inhibitor ameliorated proteinuria in this podocyte injury. We observed that p38MAPK inhibitor prevented the decrease in the expression of slit diaphragm molecules, nephrin and podocin, which is detect at the early phase of this podocyte injury. Besides, in this project we established the novel assay system to semi-quantitatively analyze the effect of reagents to glomerular permeability barrier with isolated glomeruli.

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：系球体上皮細胞 蛋白尿 スリット膜 シナプス小胞 SV2B

1. 研究開始当初の背景

腎臓病学領域において新規薬剤の開発が進んでいない理由の1つとして薬効機序を判定するための効果的なバイオマーカーが存在しないことが挙げられている。また、蛋白尿発症に重要な役割を果たすと考えられている糸球体上皮細胞(ポドサイト)の障害発症機序が十分に解明されていないことが、薬剤開発を難しくさせる要因となっている。

2. 研究の目的

本研究課題は、ネフローゼ症候群の新規治療法開発に向けたバイオマーカーの探索、薬効判定のためのアッセイ系の開発、ポドサイト障害発症におけるシナプス小胞様 vesicle の役割、細胞内シグナル伝達機構の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1)SV2B の検討: これまでの研究でポドサイト障害を早期に感知するマーカーとなる可能性があり、その機能低下がポドサイト障害に関与していると考えられている synaptic vesicle protein (SV2B) について、そのマーカーとしての有用性を検討するため、各種病態モデルでの発現解析を行った。また SV2B ノックアウト(KO) マウスを用いた機能解析を行った。

(2)ポドサイト障害のシグナル伝達機構の検討: ポドサイト障害モデルにおける p38 MAPK 阻害薬、Rho kinase の阻害薬の効果、作用機序の検討を行った。

(3)糸球体のバリア機能に対する効果を検討するためのアッセイ系の開発: Savinらの方法を基にして、より定量的なアッセイ系を確立するための検討を行った。破裂する糸球体の頻度を計測することにより、アルブミンに対するバリア機能が残存している糸球体の比率を定量化した。この系を用いて各種薬剤の糸球体に対する直接効果を検討した。

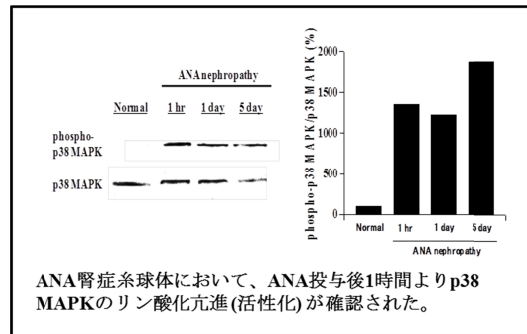
4. 研究成果

(1) SV2B の検討: SV2B 並びにその関連分子群の病態における発現の検討を行った。一過性の蛋白尿を呈するスリット膜抗体により誘導されるモデル(ANA 腎症)、微小変化型ネフローゼ症候群モデル(PAN 腎症)と、持続性の蛋白尿を呈する巣状糸球体硬化症モデル(ADR 腎症)を用いて比較検討した。SV2B はいずれのモデルにおいても早期から発現が低下することを観察した。SV2B と共同してシナプス様 vesicle と細胞膜表面とのドッキングに関与すると考えられている分子は、持続性の蛋白尿モデルでのみ発現が低下していることを観察した。また、SV2B KO マウスはポドサイト刺激に対する脆弱性を有することを確認した。これらの観察は、SV2B の機能低下が病態発症に関与していること、

vesicle 関連分子は、ポドサイト障害を早期に感知するためのマーカーとして有用であることを示している。

(2)ポドサイト障害機序の検討: スリット膜刺激により誘導されるポドサイト障害モデルである ANA 腎症(anti-nephrin antibody 誘導モデル)において p38 MAPK が活性化していることを観察した(図1)。

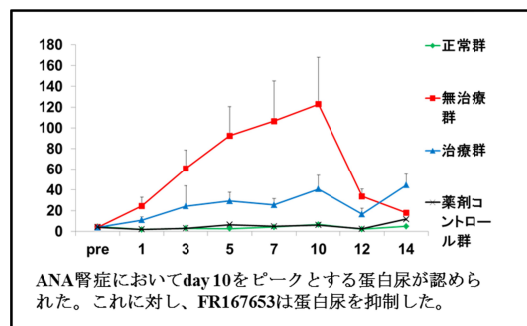
<図1>



ANA 腎症糸球体において、ANA 投与後1時間より p38 MAPK のリン酸化亢進(活性化)が確認された。

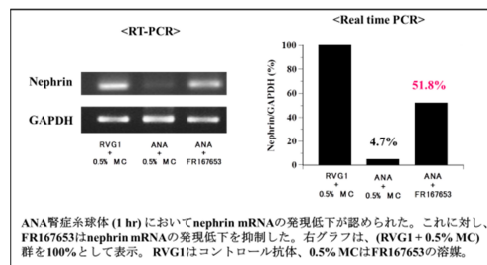
p38 MAPK 阻害薬(FR167653)は、同モデルにおける蛋白尿を改善することを(図2)観察した。同モデルでは病態誘導初期(1時間)で nephrin, podocin などのスリット膜関連分子の mRNA の低下が観察されるが p38 MAPK 阻害薬は、その発現低下を抑制することを観察した(図3)。

<図2>

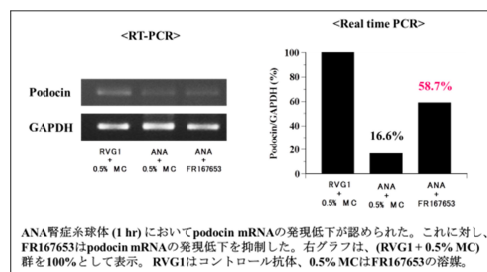


ANA 腎症において day 10 をピークとする蛋白尿が認められた。これに対し、FR167653 は蛋白尿を抑制した。

<図3>



ANA 腎症糸球体 (1hr) において nephrin mRNA の発現低下が認められた。これに対し、FR167653 は nephrin mRNA の発現低下を抑制した。右グラフは、(RVG1 + 0.5% MC) 群を 100% として表示。RVG1 はコントロール抗体、0.5% MC は FR167653 の溶液。



ANA 腎症糸球体 (1hr) において podocin mRNA の発現低下が認められた。これに対し、FR167653 は podocin mRNA の発現低下を抑制した。右グラフは、(RVG1 + 0.5% MC) 群を 100% として表示。RVG1 はコントロール抗体、0.5% MC は FR167653 の溶液。

Nephrin の細胞外部からの刺激により誘導されるスリット膜分子の mRNA 発現の低下は p38 MAPK 依存性の変化であることを示している。スリット膜障害、スリット膜関連分子の発現低下は各種糸球体疾患における蛋白尿の発症、進行に関与していると考えられている。p38 MAPK 阻害薬はこれらの蛋白尿に対する治療戦略として有望であると考えられる。

(3) 単離糸球体を用いたアッセイ系の開発：Savin らの既報に準拠して単離糸球体を調整し維持培地中のアルブミン濃度を生理的濃度以下にした際の糸球体への水分の流入の程度を指標として糸球体濾過障壁の蛋白透過性保持の程度を検出する系を確立した。この系を用いた解析で、puromycin により誘導された蛋白透過性の変化がカルシニューリン阻害薬であるタクロリムスで抑制されることを確認した。この結果はリンパ球などの糸球体外因子の関与なしで、タクロリムスが糸球体に対する直接作用を有することを示した重要な所見である。このアッセイ系は各種化合物の糸球体バリアーに対する効果をスクリーニングする上で有用なツールになると考える。

#### 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 3 件)

- 河内裕、高橋彩、山崎美穂子、福住好恭、富田雅之 腎糸球体上皮細胞(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 印刷中
- Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, Kawase T, Sukumaran V, Thandavarayan RA, Kawauchi 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)
- 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)

[学会発表](計 22 件)

- 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
- 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
- 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
- 河内裕、スリット膜の細胞生物学：スリット膜のバリアー機能維持に関わる分子の同定、機能解析 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日~5 月 12 日 東京国際フォーラム、東京
- 高橋雄一、ラット巣状糸球体硬化症モデルにおける Rituximab の蛋白尿抑制効果 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日~5 月 12 日 東京国際フォーラム、東京
- 高崎麻美、TRPM4 のポドサイトにおける発現様式、ネフローゼモデルにおける発現動態の検討 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日~5 月 12 日 東京国際フォーラム、東京
- 福住好恭、シナプス小胞分子 SV2B のポドサイト機能維持における役割 - ノックアウトマウスを用いた解析 - 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日~5 月 12 日 東京国際フォーラム、東京
- 高橋 彩、ネフローゼ症候群モデルにおける Endomucin 発現動態の検討 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日~5 月 12 日 東京国際フォーラム、東京
- 相馬彩子、糸球体上皮細胞障害モデルにおける Calcineurin の発現の解析 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日~5 月 12 日 東京国際フォーラム、東京
- 鎌田悠志、ポドサイト機能維持における Neuroligin-1 の役割：巣状糸球体硬化症モデルでの検討 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10 日~5 月 12 日 東京国際フォーラム、東京
- Yuichi Takahashi, 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 アメリカ サン  
 ディエゴ
12. Mihoko Yamazaki, Glomerular Expression of Renin-Angiotensin System Components in Rats with Podocyte Dysfunction Mihoko Yamazaki, 2012 年 10 月 30 日 ~ 11 月 4 日 アメリカ サン  
 ディエゴ
  13. 福住好恭、次世代シーケンサを用いた PAN 腎症モデルにおける遺伝子発現の比較検討 第 55 回日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1 日 ~ 6 月 3 日 パシフィコ  
 横浜、神奈川
  14. **富田雅之**、スリット膜障害により誘導されるネフローゼモデルにおける p38 MAPK 阻害剤の効果、作用機序の解析 第 55 回  
 日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1 日 ~ 6 月 3 日 パシフィコ横浜、神奈川
  15. 山崎美穂子、糸球体局所における RA 系分子の発現 - ポドサイト障害モデルでの検討 - 第 55 回日本腎臓学会学術総会  
 2012 年 6 月 1 日 ~ 6 月 3 日 パシフィコ横浜、神奈川
  16. **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
  17. **Tomita M**, 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
  18. **Tomita M**, 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
  19. **富田雅之**、ポドサイトに発現している Neurexin-1 の存在様式、機能の解析 第 54 回日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月  
 15 日 ~ 17 日 パシフィコ横浜、神奈川
  20. 山崎美穂子、糸球体局所における RA 系制御機構の解析 第 54 回日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月 15 日 ~ 17 日 パシ  
 フィコ横浜、神奈川
  21. **河内裕** シナプス小胞関連分子のポドサイトにおける発現: Syntaxin 2 の機能の解析 第 54 回日本腎臓学会学術総会  
 2011 年 6 月 15 日 ~ 17 日 パシフィコ横浜、神奈川
  22. 高橋 彩 ARB の糸球体上皮細胞保護作用 - PAN 腎症での解析 - 第 54 回日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月 15 日 ~ 17 日

パシフィコ横浜、神奈川

〔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  
 富田 雅之 (TOMITA MASAYUKI)  
 新潟大学・医歯学系・准教授  
 研究者番号 : 60568492  
 (2) 研究分担者  
 河内 裕 (KAWACHI HIROSHI)  
 新潟大学・医歯学系・教授  
 研究者番号 : 60242400