

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591188

研究課題名(和文)ボウマン嚢上皮細胞のシグナル伝達経路からみた糸球体障害機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of Glomerular Injury: The Signal Transduction Pathway of Bowman's Epithelial Cells"

研究代表者

廣村 桂樹(Hiromura, Keiju)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70292597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規のストレス関連蛋白であるSestrin 2が健常ラット腎のボウマン嚢上皮細胞に強く発現することを発見した。ネフローゼ症候群モデル(微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症)や半月体形成性腎炎モデルの検討では、Sestrin 2の発現が減弱することを見だし、Sestrin 2がボウマン嚢上皮細胞における新たな障害マーカーになりうることを示した。さらにSestrin 2の下流に存在するmTOR経路が、Sestrin 2発現と連動してボウマン嚢上皮細胞障害時に大きく変化することを明らかとし、本経路が糸球体障害の治療ターゲットとなる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we have shown that sestrin 2, a novel stress-inducible protein, is selectively expressed Bowman's epithelial cells of normal rat kidney. In rat model of nephrotic syndrome (minimal change or focal segmental glomerulosclerosis) and crescentic glomerulonephritis, sestrin 2 expression was decreased, demonstrating that decreased expression of Sestrin 2 could be a novel marker of Bowman's epithelial cell injury. In addition, mTOR pathway, which is the downstream of target of sestrin 2, was up- or down-regulated by the changes of sestrin 2 expression, suggesting that sestrin 2-mTOR pathway could be a target of treatment for glomerular injury.

研究分野：腎臓病学

キーワード：ボウマン嚢上皮細胞 糸球体障害 sestrin 2 mTOR経路 ネフローゼ症候群 蛋白尿

1. 研究開始当初の背景

ボウマン嚢上皮細胞はこれまで半月体形成細胞として認識されていたが、他の糸球体構成細胞である糸球体上皮細胞(ポドサイト)、メサンギウム細胞、糸球体血管内皮細胞に比べ研究が遅れている細胞であった。しかし、近年、ボウマン嚢上皮細胞が **tight junction** を持ち、濾過された原尿がボウマン腔外に漏れないようバリアとして機能していることや、腎幹細胞・前駆細胞として、尿細管細胞やポドサイトに分化する可能性も示され、注目されるようになった¹⁻³⁾。

Sestrin2 は癌抑制遺伝子である **p53** のシグナル経路の下流に位置する蛋白であり、ストレスなどに際して、**mTOR** (mammalian target of rapamycin) 経路を抑制することが最近明らかとなった⁴⁾。**mTOR** 経路は細胞の増殖、肥大のみならず、老化や幹細胞の制御に関わっており、糸球体障害においても、糖尿病性腎症でのポドサイト障害や、半月体形成性腎炎での半月体形成などで **mTOR** 経路の活性化が関与していることが報告されつつある^{5,6)}。しかし、ボウマン嚢上皮細胞における **Sestrin2-mTOR** 経路に関する研究はこれまでなされていない。

最近、ボウマン嚢上皮細胞に関する研究に着手し、これまでの検討で、**Sestrin2** がラット健常腎のボウマン嚢上皮細胞に強く発現することを発見した

2. 研究の目的

ラット腎炎モデルや培養ボウマン嚢上皮細胞を用いて、腎炎病態形成における **Sestrin 2-mTOR** 経路について検討した。

3. 研究の方法

1) ラット腎炎モデル

正常ラットには6週齢の **Wistar** ラットを使用した。アドリアマイシン腎症(巣状糸球体硬化症モデル)は、6週齢 **Wistar** ラットにアドリアマイシン **7.5mg/kg** を尾静脈より単回静注して作成した。ピューロマイシン腎症(微小変化型ネフローゼ症候群モデル)は6週齢 **Wistar** ラットにピューロマイシン **100mg/kg** を尾静脈より単回投与して作成した。抗 **GBM** 抗体腎炎(半月体形成性腎炎モデル)については、7週齢 **Wistar-Kyoto** ラットにモノクローナル抗体 **a84** (岩井化学薬品株式会社) **80µg/body** を尾静脈より単回投与した。

2) 免疫組織染色と半定量法

パラフィン固定した腎組織を **4µm** に薄切片し脱パラ後クエン酸処理を行い、各種一次抗体を載せ、酵素抗体法により染色した。糸球体硬化度(GS)は、PAS染色組織を糸球体硬化の程度について各糸球体に **0-4** 点のスコアをつけ、各ラットで糸球体を **50** 個ずつカウントし、その平均により半定量化した。**α-SMA**、**Sestrin 2** の発現についてもボウマン嚢周囲の発現を **0-4** 点のスコアをつけ、同

様に半定量化した。**P-S6RP**、**CD44** 染色については、糸球体全体の面積当たりのそれぞれの抗体を用いての染色陽性面積の割合(%)を **Photoshop CS6** を用いた画像処理により、糸球体 **50** 個の平均値を計測して求めた。

3) 培養ボウマン嚢上皮細胞

共同研究者の **Shankland** 教授の教室で作成された温度感受性不死化マウスボウマン嚢上皮を使用した⁷⁾。

4) Western Blot 法

RIPA バッファーを用いて培養細胞より蛋白を抽出。**SDS-PAGE** で泳動後、**PVDF** 膜に転写し、添加した一次抗体をアルカリホスファターゼ法で検出した。

5) Sestrin 2 のノックダウン

Sestrin 2 に対する **ShRNA** を、レンチウイルスプラスミドを用いて細胞に導入することで、**Sestrin 2** のノックダウンを行った。

6) アポトーシスの測定

アポトーシスについては、ヘキスト **33342** 染色によるアポトーシス細胞の検出あるいは、**Caspase-3** 活性について **colorimetric** アッセイキットを用いて測定した。

4. 研究成果

1) 正常ラット腎での **sestrin 2** の発現

免疫組織染色では成人ラットの腎臓において、既存のボウマン嚢上皮細胞のマーカーである **PGP9.5** (図1C)と同様のパターンで、**Sestrin 2** の強い発現がみられた(図1A, B)。

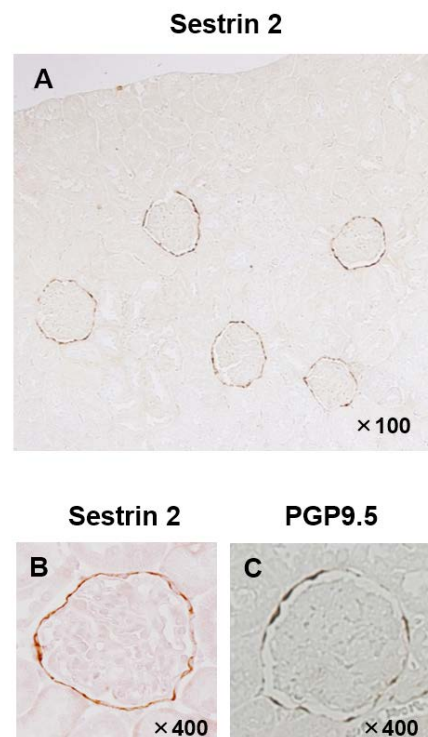


図1 成人ラットの腎臓における **Sestrin 2** の発現

2) アドリアマイシン腎症

アドリアマイシン腎症では day 8 に蛋白尿が出現し、day 14 では高度蛋白尿がみられ (図 2A)、また day 42 では高度な糸球体硬化がみられた (図 2B、図 3S)。Sestrin 2 の発現は day 14 より減弱し、day 42 では高度な減弱がみられた (図 2C、図 3N、T)。線維化マーカーとなる α -SMA の発現は day 14 より増加し、day 42 で強くみられた (図 2D、図 3O、U)。mTOR 活性化によりリン酸化される S6RP について、そのリン酸化抗体を用いて phosphorylated-S6RP (P-S6RP) の発現を検討したところ、蛋白尿が高度に増加し、Sestrin-2 の発現が低下する day 14、42 で P-S6RP の発現増強がみられた (図 2E、図 3P、3V)。ボウマン嚢上皮細胞の障害マーカーとして知られている CD44 については、day 14 で軽度増加し、day 42 で高度な増加がみられた (図 2F、図 3Q、W)。ボウマン嚢上皮細胞数については PAX2 の発現で検討したが、day 42 で軽度の減少がみられた (図 2G、図 3X)。

α -SMA の発現について、PAS 染色を後染色することで詳細に検討したところ、ボウマン嚢外側周囲の線維化を反映していることが示され、ボウマン嚢上皮細胞自体の α -SMA 発現はみられなかった (図 4A、B)。一方、P-S6RP については、ボウマン嚢上皮細胞自体が強く染色され、また糸球体内の細胞の一部も染色されることが確認された (図 4C、D、E)。ボウマン嚢上皮細胞における Sestrin 2 と P-S6RP の発現について day 14 の腎臓の連続切片を用いて検討すると、Sestrin 2 が低下した領域で P-S6RP の発現が増強するという鏡面像の関係にあることが分かった (図 4F、G)。

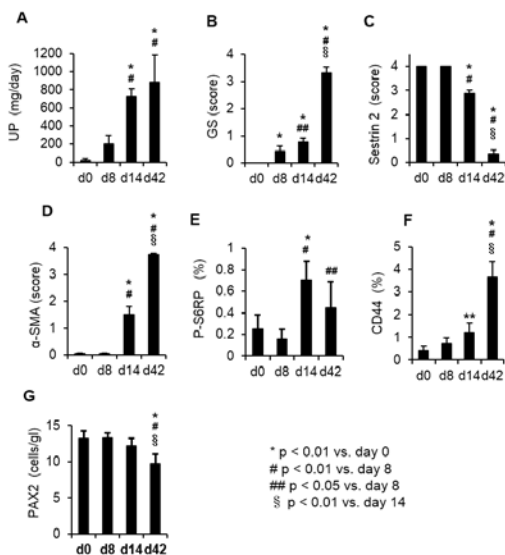


図2 アドリアマイシン腎症における尿蛋白(UP)、糸球体硬化スコア(GS)とボウマン嚢上皮細胞での各蛋白の発現の推移

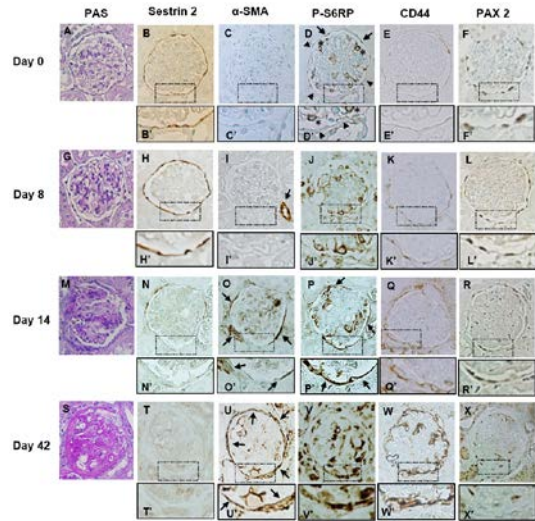


図3 アドリアマイシン腎症におけるボウマン嚢上皮細胞での各蛋白の発現

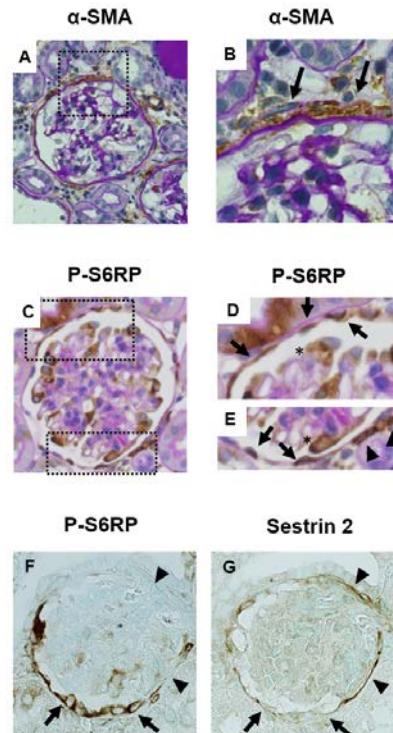


図4 アドリアマイシン腎症における α -SMA、P-S6RP、Sestrin 2の発現

3) ピューロマイシン腎症

ピューロマイシン腎症では一過性の高度蛋白尿がみられる day 9 では (図 5A)、Sestrin 2 の発現の減弱 (図 5C、図 6H)、P-S6RP の発現上昇 (図 5E、図 6J)、ボウマン嚢周囲に線維化がみられた (図 5D、図 6I)。一方、蛋白尿の改善がみられる day 28 では Sestrin 2 の発現はベースラインレベルに回復し (図 5C、図 6N)、P-S6RP の発現上昇や線維化も改善した (図 5D、E、図 6O、P)。

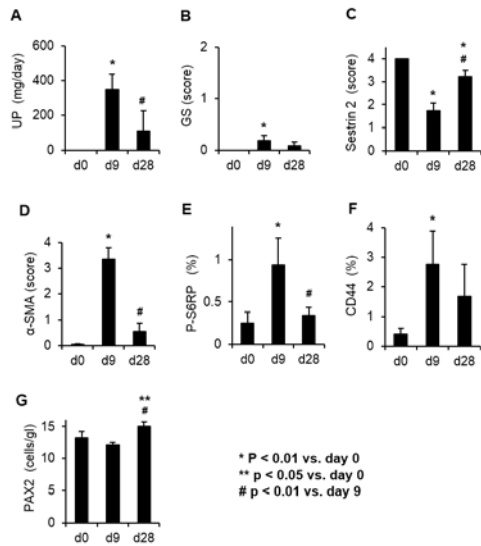


図5 ピューロマイシン腎症における尿蛋白(UP)、糸球体硬化スコア(GS)とボウマン嚢上皮細胞での各蛋白の発現の推移

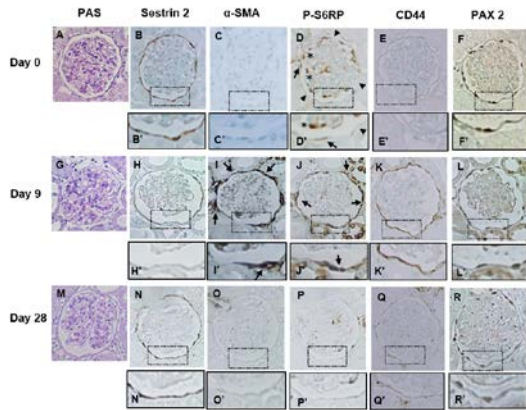


図6 ピューロマイシン腎症におけるボウマン嚢上皮細胞での各蛋白の発現

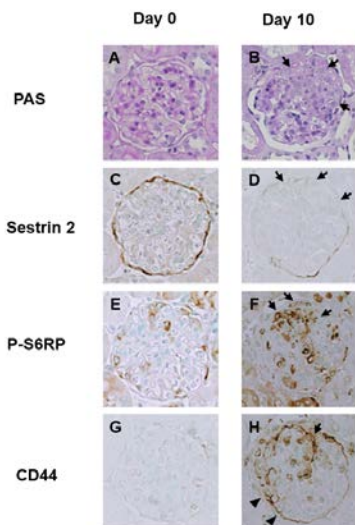


図7 抗GBM抗体腎症におけるボウマン嚢上皮細胞での各蛋白の発現

4) 抗GBM抗体腎症

抗GBM抗体による半月体形成性腎炎では、連続切片で観察したところ、半月体形成部位(図7B)に一致してSestrin 2の発現は消失し(図7D)、同部位にP-S6RP(図7F)とCD44(図7H)の発現が増強していた。

5) 培養ボウマン嚢上皮細胞の検討

培養ボウマン嚢上皮細胞においてSestrin 2は増殖環境よりも分化環境で発現の増加がみられ、また培養糸球体上皮細胞や培養メサンギウム細胞に比べ高いSestrin 2の発現がみられることが確認された(図8)。

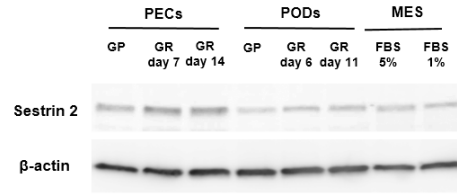
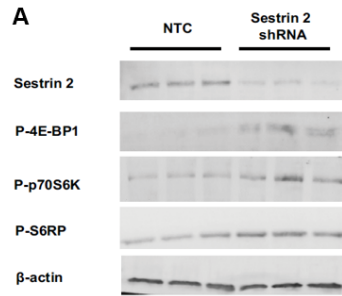
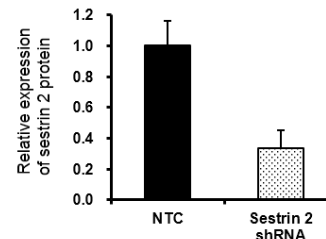


図8 各培養細胞におけるSestrin 2の発現

PECs: ボウマン嚢上皮細胞, PODs: 糸球体上皮細胞, MES: メサンギウム細胞
GP: 増殖環境 GR: 分化環境 FBS: 胎児牛血清



B



C

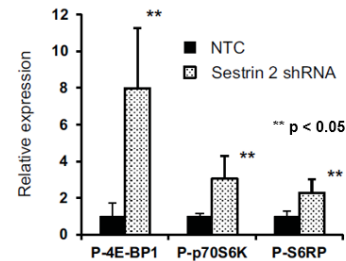


図9 培養ボウマン嚢上皮細胞におけるSestrin 2の発現減弱による4E-BP1、p70S6K、S6RPのリン酸化の増強

NTC: nontarget control

ShRNA を用いて培養ボウマン嚢上皮細胞の Sestrin 2 を減弱させたところ(図 9A, B)、mTORによりリン酸化される S6RP、4E-BP1、p70S6K のリン酸化の増強がみられた(図 9A, C)。一方、これらの変化は Sestrin 2 の標的で、mTOR の抑制に関与する酵素である AMP-activated protein kinase : (AMPK) を活性化する AICAR の投与で抑制された(図 10A, B)。また培養ボウマン嚢上皮細胞の ShRNA で Sestrin 2 の発現を減弱させると、アポトーシスの増強がみられた(図 11)。

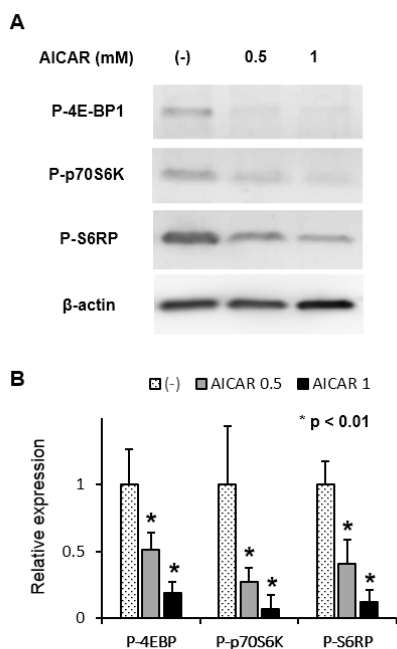


図10 培養ボウマン嚢上皮細胞における AMPK 活性化剤の AICAR による 4E-BP1、p70S6K、S6RP のリン酸化の増強

NTC: nontarget control

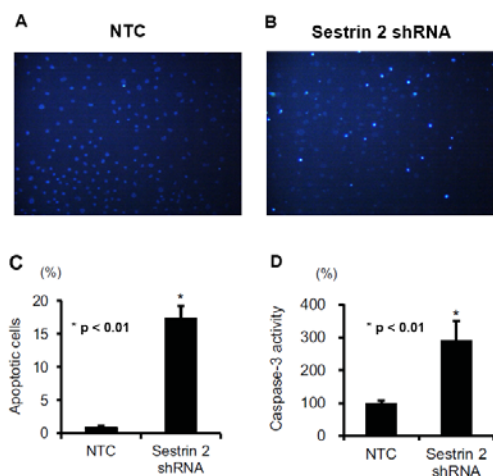


図11 Sestrin 2 の発現減弱によるアポトーシスの増加

6) まとめ

本研究により、ストレス関連蛋白 sestrin 2 が健常成体ラット腎のボウマン嚢上皮細胞に強く発現することを、世界に先駆けて示すことができた。そして、ネフローゼ症候群(微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症)モデルや半月体形成性腎炎モデルにおいて、ボウマン嚢上皮細胞における Sestrin 2 の発現が減弱することを見出し、Sestrin 2 がボウマン嚢上皮細胞の新たな障害マーカーになりうることを示した。また Sestrin 2 の下流に存在する mTOR 経路が、Sestrin 2 発現と連動してボウマン嚢上皮細胞障害時にダイナミックに変化すること示し、本経路が糸球体障害の治療ターゲットとなる可能性を示した。

<引用文献>

- Ohse T, Chang AM, Pippin JW, et al. A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 297: F1566-74.
- Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, et al. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: 3128-38.
- Smeets B, Uhlig S, Fuss A, et al. Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 2604-15.
- Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell.* 2008; 134: 451-60.
- Inoki K, Mori H, Wang J, et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121: 2181-96.
- Kurayama R, Ito N, Nishibori Y, et al. Role of amino acid transporter LAT2 in the activation of mTORC1 pathway and the pathogenesis of crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest.* 2011; 91: 992-1006.
- Ohse T, Pippin JW, Vaughan MR, et al. Establishment of conditionally immortalized mouse glomerular parietal epithelial cells in culture. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19: 1879-90.

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 1 件)

- Hamatani H, Hirumura K, Sakairi T,

Takahashi S, Watanabe M, Maeshima A, Ohse T, Pippin JW, Shankland SJ, Nojima Y: Expression of a novel stress-inducible protein, sestrin 2, in rat glomerular parietal epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 査読有 307: F708-17, 2014

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Hamatani H, Hiromura K, Sakairi T, Takahashi S, Maeshima A, Ohse T, Pippin JW, Shankland SJ, Nojima Y. Expression of a Novel Stress-Inducible Protein, Sestrin 2, in Rat Glomerular Parietal Epithelial Cells (PECs). 第 45 回アメリカ腎臓学会. 2012.11.1-4. サンディエゴ 米国
2. 浜谷博子, 廣村桂樹, 坂入 徹, 高橋哲史, 渡辺光治, 前嶋明人, 大瀬貴元, Stuart Shankland, 野島美久. ボーマン囊上皮細胞(PECs)における新規ストレス誘導蛋白 Sestrin-2 の検討. 第 8 回弥彦ポドサイトセミナー 2013.3.2 新潟
3. 浜谷博子, 廣村桂樹, 坂入 徹, 高橋哲史, 渡辺光治, 前嶋明人, 大瀬貴元, Stuart Shankland, 野島美久. ボーマン囊上皮細胞(PECs)における新規ストレス誘導蛋白 Sestrin-2 の検討. 第 56 回日本腎臓学会 2013.5.10-12. 東京.
4. Hamatani H, Hiromura K, Sakairi T, Takahashi S, Watanabe M, Maeshima A, Ohse T, Pippin JW, Shankland SJ, Nojima Y. Expression of A Novel Stress-Inducible Protein, Sestrin 2, in Rat Glomerular Parietal Cells. 第 14 回アジア太平洋腎臓学会. 2014.5.14-17 東京.
5. 浜谷博子, 廣村桂樹, 坂入 徹, 渡辺光治, 大瀬貴元, Stuart Shankland, 野島美久. ボーマン囊上皮細胞における新規ストレス誘導蛋白 sestrin-2 の発現に関する検討. 第 5 回分子腎臓フォーラム 2014.9.6 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣村 桂樹 (HIROMURA, Keiju)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70292597

(2)連携研究者

坂入 徹 (SAKAIRI, Toru)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20455976

(3)研究協力者

Stuart Shankland
University of Washington・Division of
Nephrology・Professor