

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790839

研究課題名(和文)腎系球体上皮細胞スリット膜の形成・維持におけるシナプス小胞輸送機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of the neuron-like vesicle in the formation and maintenance of podocyte slit diaphragm

研究代表者

福住 好恭 (Fukusumi, Yoshiyasu)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：20609242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腎系球体上皮細胞(ポドサイト)の細胞間接着装置であるスリット膜の濾過障壁形成・維持におけるシナプス小胞様輸送機構の役割について、シナプス小胞分子SV2B遺伝子破壊(KO)マウスを用いて解析を行った。SV2B KOマウスでは、野生型マウスと比較して有意な蛋白尿を呈し、スリット膜構成分子の異常局在が観察された。また、SV2Bがスリット膜構成分子Nephrin、CD2APと相互作用していることを明らかにした。以上より、シナプス小胞様輸送機構がポドサイトスリット膜のバリア機能に重要な役割を果たしていることが示され、シナプス小胞輸送関連分子が蛋白尿に対する新たな治療のターゲットとなることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of SV2B in maintaining the podocyte function and to better understand the function of the neuron-like vesicle expressing SV2B in the podocyte, SV2B knockout (KO) mice were analyzed. An increase in the amount of proteinuria, effacement of the foot process of the podocyte, and alterations of the GBM were detected in SV2B KO mice. It was also found that the expression of CD2AP, nephrin, and NEPH1, the functional molecules of the slit diaphragm, and laminin, a critical component of the GBM, is clearly altered in SV2B KO mice. The interaction assays showed that SV2B interacts with CD2AP. In addition, SV2B is densely expressed close to the cell surface in the presumptive podocyte in the early stage of glomerulogenesis. These results suggest that SV2B has an essential role in the formation and maintenance of the glomerular capillary wall. SV2B and other synaptic vesicle-associated molecules could be a novel therapeutic target for nephrotic syndrome.

研究分野：腎分子病態学

キーワード：ポドサイト SV2B 蛋白尿 シナプス小胞輸送 Neurexin スリット膜 CD2AP Nephrin

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白尿は、足突起を有する腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）のバリアー機能の低下により発症すると考えられている。スリット膜と呼ばれるポドサイト足突起間にある細胞間接着装置が、血漿蛋白の透過を防ぐバリアー機能を保つ上で極めて重要な役割を果たしている。

研究代表者の所属する研究室では、シナプス小胞分子である Synaptic Vesicle 2B (SV2B) が、培養ポドサイトを用いた実験及び病態モデルから、スリット膜構成分子の正常局在に重要な役割を担っていることを報告した。また、SV2B 以外にもシナプス小胞輸送、並びにその制御に関わる分子群が糸球体においてポドサイトに限局して発現し、種々のネフローゼ症候群発症モデル動物において、それらの発現が変動することを明らかにしてきた。しかし、ポドサイトのスリット膜の形成・維持におけるシナプス小胞様輸送機構の役割は、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、シナプス小胞輸送分子群に焦点を当て、スリット膜構成分子の細胞内輸送におけるシナプス小胞様輸送機構の役割を明らかにし、スリット膜の濾過障壁形成・維持におけるシナプス小胞様輸送機構の重要性を解明することである。

具体的には、スリット膜近傍に局在しているシナプス小胞輸送分子 SV2B が糸球体でどのような機能を担っているのかを、SV2B 遺伝子破壊 (KO) マウスを用いて解析する。これらマウススリット膜構成分子群 (Nephrin、Podocin、CD2AP、NEPH1 など) の発現と局在、相互作用を解析し、スリット膜形成・維持における SV2B の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) SV2B KO マウスの解析；SV2B KO マウスを作製し、KO マウス腎におけるバリアー機能異常の有無、ポドサイトの形態、スリット膜構成分子の局在変化、シナプス小胞輸送関連分子の発現動態の検討を行った。

(2) シナプス小胞輸送関連分子とスリット膜構成分子の相互作用解析；シナプス小胞輸送関連分子とスリット膜構成分子の相互作用についての解析を行った。また、組織切片について二重染色を行い、シナプス小胞輸送関連分子と各種スリット膜構成分子との共局在を解析した。

(3) 発達期糸球体における SV2 の発現解析；出征直後のラット腎組織を用いて、糸球体形成期における SV2A 及び SV2B の発現様式を解析した。

(4) 次世代シーケンサを用いた解析；腎糸球体の SV2B に関連する新規分子を同定するため、次世代シーケンサを用いた解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 代謝ケージを用いて経時的に蓄尿 (24 時間) し、尿中への蛋白質排泄量を検討したところ、野生型マウスと比較して SV2B KO マウスで有意な蛋白尿の上昇を観察した (図 1)。

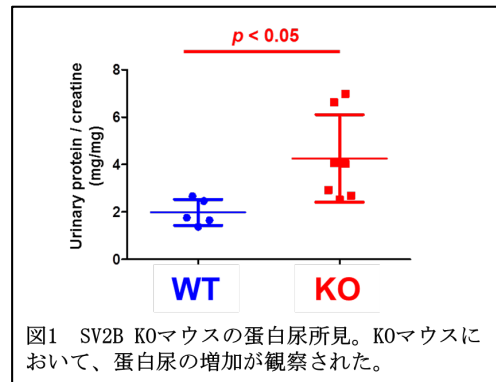


図1 SV2B KOマウスの蛋白尿所見。KOマウスにおいて、蛋白尿の増加が観察された。

また、KO マウスから腎を摘出し、光学顕微鏡下における糸球体構造の解析や、スリット膜の微細な構造異常の有無を電子顕微鏡を用いて解析したところ、KO マウスでポドサイト足突起の消失と糸球体基底膜の肥厚が観察された (図 2)。

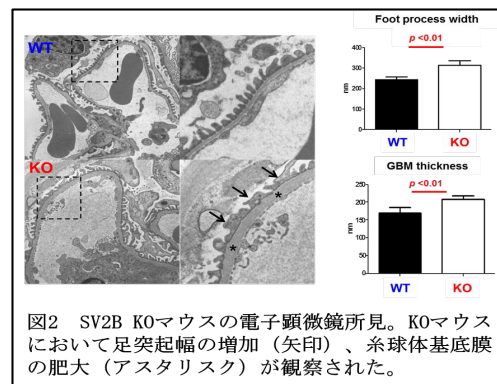


図2 SV2B KOマウスの電子顕微鏡所見。KOマウスにおいて足突起幅の増加 (矢印)、糸球体基底膜の肥大 (アスタリスク) が観察された。

さらに、KO マウスにおけるスリット膜機能分子の発現動態を解析したところ、スリット膜機能分子 CD2AP、nephrin、NEPH1、糸球体基底膜マーカーの1つである laminin の発現異常を観察した (図 3)。

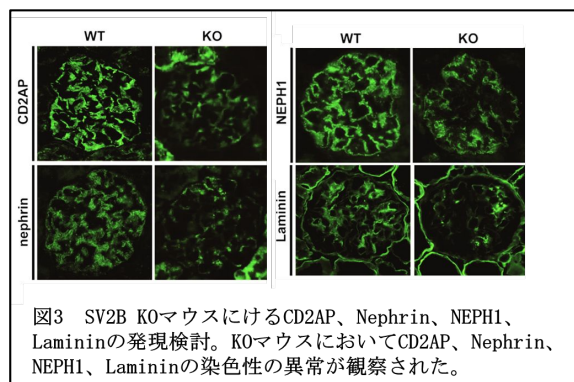


図3 SV2B KOマウスにおけるCD2AP、Nephrin、NEPH1、Lamininの発現検討。KOマウスにおいてCD2AP、Nephrin、NEPH1、Lamininの染色性の異常が観察された。

また、SV2B ノックアウトマウス腎皮質におけるシナプス小胞輸送関連分子の発現解析を行ったところ、前シナプスにおいてシナプス

小胞とのドッキング・開口に關与する Neurexin、Synaptotagmin の発現低下が觀察された(図4)

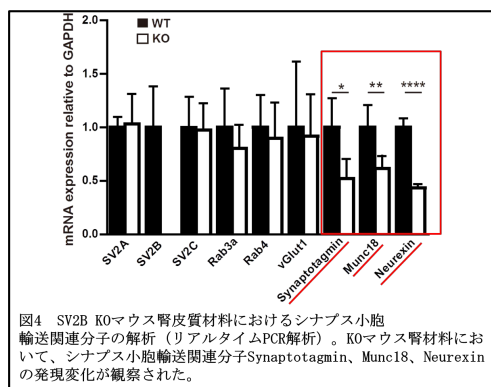


図4 SV2B KOマウス腎皮質材料におけるシナプス小胞輸送関連分子の解析(リアルタイムPCR解析)。KOマウス腎材料において、シナプス小胞輸送関連分子Synaptotagmin、Munc18、Neurexinの発現変化が觀察された。

(2) SV2B とスリット膜機能分子の相互作用を免疫沈降法、及び Duo Link in situ 法により解析したところ、SV2B が CD2AP、nephrin と相互作用することを觀察した(図5)

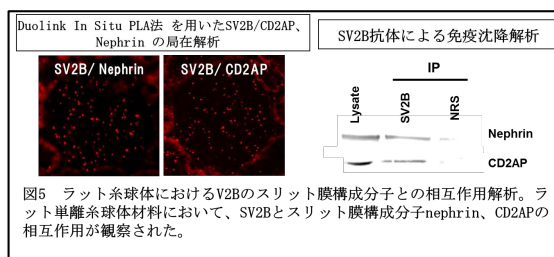


図5 ラット糸球体におけるSV2Bのスリット膜成分との相互作用解析。ラット単離糸球体材料において、SV2Bとスリット膜成分分子nephrin、CD2APの相互作用が觀察された。

(3) 発達期糸球体におけるSV2発現を検討したところ、SV2Aの染色性は腎組織の広範囲に觀察されたのに対し、SV2B染色は初期の糸球体発達時の未成熟なポドサイトの細胞表面上に強い発現を觀察した(図6)

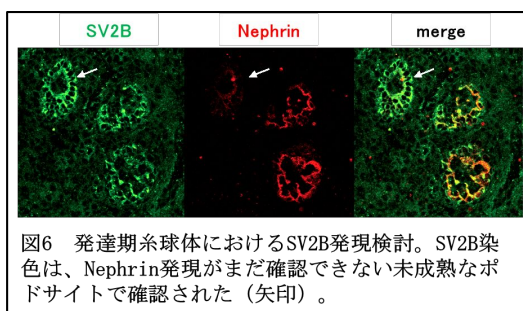


図6 発達期糸球体におけるSV2B発現検討。SV2B染色は、Nephrin発現がまだ確認できない未成熟なポドサイトで確認された(矢印)。

(4) 腎糸球体のSV2Bに關連する新規分子を同定するため、次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、チャネル分子、ケモカイン関連分子、極性維持関連分子などの、いくつかの重要な分子を同定した。

以上の結果から、SV2Bは糸球体濾過障壁の形成と維持に極めて重要な役割を果たしていることが示され、ポドサイトにおいて神経シナプス小胞輸送分子がスリット膜成分分子の輸送と局在維持に關与することを明らかにした。ポドサイトにおけるシナプス小胞様輸送機構の解析により、スリット膜の濾過障壁

形成・維持に關する新しい知見が得られるだけでなく、糸球体のバリア機能が低下して引き起こされる蛋白尿の発症機構が明らかになることが期待され、シナプス小胞様輸送関連分子を標的とした蛋白尿に対する新規治療法開発に貢献できると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計9件)

1. Wakamatsu A, **Fukusumi Y**, Hasegawa E, Tomita M, Watanabe T, Narita I, Kawachi H. Role of calcineurin (CN) in kidney glomerular podocyte: CN inhibitor ameliorated proteinuria by inhibiting the redistribution of CN at the slit diaphragm. *Physiological Reports*. Mar;4(6). pii: e12679. doi: 10.14814/phy2.12679. 2016. (査読有)
2. **Fukusumi Y**, Meier F, Götz S, Matheus F, Irmler M, Beckervordersandforth R, Faus-Kessler T, Minina E, Rauser B, Zhang J, Arenas E, Andersson E, Niehrs C, Beckers J, Simeone A, Wurst W, Prakash N. Dickkopf 3 promotes the differentiation of a rostralateral midbrain dopaminergic neuronal subset in vivo and from pluripotent stem cells in vitro in the mouse. *Journal of Neuroscience*. 35(39):13385-401. 2015. (査読有)
3. Suzuki K, **Fukusumi Y**, Yamazaki M, Kaneko H, Tsuruga K, Tanaka H, Ito E, Matsui K, Kawachi H. Alteration in the podoplanin-ezrin-cytoskeleton linkage is an important initiation event of the podocyte injury in puromycin aminonucleoside nephropathy, a mimic of minimal change nephrotic syndrome. *Cell and Tissue Research*. 362(1):201-213. 2015. (査読有)
4. **Fukusumi Y**, Wakamatsu A, Takashima N, Hasegawa E, Miyauchi N, Tomita M, Kawachi H. SV2B is essential for the integrity of the glomerular filtration barrier. *Laboratory Investigation*. 95(5):534-545. 2015. (査読有)
5. **Fukusumi Y**, Miyauchi N, Hashimoto T, Saito A, Kawachi H. Therapeutic target for nephrotic syndrome: Identification of novel slit diaphragm associated molecules. *World Journal of Nephrology*. 3(3):77-8. 2014. (査読有)
6. Takahashi A, **Fukusumi Y**, Yamazaki M, Kayaba M, Kitazawa Y, Tomita M, Kawachi H. Angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates

proteinuria in puromycin aminonucleoside nephropathy by inhibiting the reduction of NEPH1 and nephrin. Journal of Nephrology. 27:627-634. 2014. (査読有)

7. 河内裕、**福住好恭** 糸球体濾過障壁と蛋白尿 腎と透析 51 巻、p791-795、2014 年 (査読無)
8. 河内裕、**福住好恭** 糸球体性蛋白尿の発症機序 Medicina 76 巻、p2-7、2014 年 (査読無)
9. 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、31 巻、p98-100、2013 (査読無)

[学会発表](計 28 件)

1. **Fukusumi Y**, Ephrin-B1 is essential for the formation and maintenance of the integrity of the slit diaphragm component: Inducible podocyte-specific Ephrin-B1 deletion causes irregular localization of Nephrin, NEPH1, CD2AP and ZO-1 第 48 回米国腎臓学会総会 2015 年 11 月 3 日 ~ 8 日 サンディエゴ、アメリカ
2. **Fukusumi Y**, Identification of differentially expressed genes in rat puromycin aminonucleoside (PAN) nephropathy, a mimic of MCNS with Next-generation sequencing 第 48 回米国腎臓学会総会 2015 年 11 月 3 日 ~ 8 日 サンディエゴ、アメリカ
3. **福住好恭** ポドサイト機能維持における Ephrin-B1 の役割 - K0 マウスを用いた解析 - 第 58 回日本腎臓学会学術総会 2015 年 6 月 5 日 ~ 7 日 名古屋国際会議場 (愛知、名古屋)
4. 長谷川絵理子 フィンゴリモドのポドサイトの保護作用 第 58 回日本腎臓学会学術総会 2015 年 6 月 5 日 ~ 7 日 名古屋国際会議場 (愛知、名古屋)
5. 高島奈津美 発生期糸球体におけるスリット膜関連分子の発現動態の解析; Par3、ZO-1、Nephrin、Podoplanin の発現パターンの検討 第 58 回日本腎臓学会学術総会 2015 年 6 月 5 日 ~ 7 日 名古屋国際会議場 (愛知、名古屋)
6. **福住好恭** 糸球体上皮細胞におけるシナプス様小胞の役割: SV2B K0 マウスでの解析 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日 パシフィコ横浜 (神奈川、横浜)
7. **Fukusumi Y**, Synaptic-like-microvesicle regulated by SV2B in podocyte plays a role in intracellular trafficking of slit diaphragm molecules and exocytosis of GBM components. 第 46 回米国腎臓学会総会 2014 年 11 月 11 日 ~ 16 日 フィラデルフィア、アメリカ
8. Hasegawa E, Fingolimod (FTY720), an Analog of Sphingosine Inhibited the Reduced Expression of the Slit Diaphragm Molecules and Ameliorated Proteinuria in PAN Nephropathy. 第 46 回米国腎臓学会総会 2014 年 11 月 11 日 ~ 16 日 フィラデルフィア、アメリカ
9. **福住好恭** シナプス小胞分子 SV2B K0 マウス腎におけるシナプス小胞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 ~ 6 日 パシフィコ横浜 (神奈川、横浜)
10. 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 ~ 6 日 パシフィコ横浜 (神奈川、横浜)
11. 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 ~ 6 日 パシフィコ横浜 (神奈川、横浜)
12. 広瀬絵理子 ポドサイト機能維持におけるスフィンゴシン 1 リン酸受容体シグナルの役割 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4 日 ~ 6 日 パシフィコ横浜 (神奈川、横浜)
13. **Fukusumi Y**, 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 日 フライブルク、ドイツ
14. **Fukusumi Y**, Synaptic vesicle protein 2B is essential for maintaining the integrity of the podocyte slit diaphragm: SV2B K0 mice are vulnerable to the podocyte injury. 第 45 回米国腎臓学会総会 2013 年 11 月 5 日 ~ 11 月 10 日 アトランタ、アメリカ
15. Wakamatsu A, Calcineurin is mainly localized at the slit diaphragm area, and its altered expression precedes proteinuria in rat nephrotic syndrome models. 第 45 回米国腎臓学会総会 2013 年 11 月 5 日 ~ 11 月 10 日 アトランタ、アメリカ
16. Takahashi Y, Rotuximab ameliorates proteinuria in rat adriamycin nephropathy independently with its action to B lymphocyte. 第 45 回米国腎臓学会総会 2013 年 11 月 5 日 ~ 11 月 10 日 アトランタ、アメリカ
17. **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 ~ 12 日 東京国際フォーラム (東

- 京、千代田区)
18. 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～12 日 東京国際フォーラム(東京、千代田区)
  19. 高橋雄一 ラット巣状系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～12 日 東京国際フォーラム(東京、千代田区)
  20. 高橋彩 ネフローゼモデル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～12 日 東京国際フォーラム(東京、千代田区)
  21. 相馬彩子 系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～12 日 東京国際フォーラム(東京、千代田区)
  22. 鎌田悠志 ポドサイト機能維持における Neuroligin-1 の役割: 巣状系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～12 日 東京国際フォーラム(東京、千代田区)
  23. 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～12 日 東京国際フォーラム(東京、千代田区)
  24. Yamazaki Y, Glomerular expression of Renin-Angiotensin system components in Rats with podocyte dysfunction. 第 45 回米国腎臓学会総会 2012 年 10 月 30 日～11 月 4 日 サンディエゴ、アメリカ
  25. Takahashi Y, Role of p38 MAPK activation in the slit diaphragm dysfunction and proteinuria caused by a direct stimulation to nephrin. 第 45 回米国腎臓学会総会 2012 年 10 月 30 日～11 月 4 日 サンディエゴ、アメリカ
  26. **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～3 日 パシフィコ横浜(神奈川、横浜)
  27. 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 p38MAPK 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～3 日 パシフィコ横浜(神奈川、横浜)
  28. 山崎美穂子 系球体局所における 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～3 日 パシフィコ横浜(神奈川、横浜)

〔図書〕(計 1 件)

1. 河内裕、**福住好恭**、蛋白尿の発症機序、新たな治療標的 Annual Review 腎臓 2015、中外医学社、2015 年、230(124-130)

〔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

福住 好恭 (FUKUSUMI, YOSHIYASU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 20609242