

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790862

研究課題名(和文)系球体内皮細胞に発現するカベオラのアルブミン透過性に関する研究

研究課題名(英文)The relationship of caveolae on human glomerular endothelial cells with albumin permeability

研究代表者

森山 能仁 (Takahito, Moriyama)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20439821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：系球体内皮細胞上に発現するカベオラがアルブミンの細胞内取り込みに関与することを証明するため、標識したアルブミンが細胞上でカベオラマーカであるカベオリン-1と二重染色されること、カベオラ阻害効果のある薬剤(methyl beta cholecystdextrin, nystatin)やカベオリン-1 siRNAによる遺伝子操作にてカベオラの発現を抑制するとアルブミンの細胞内への取り込みが低下することを示した。これらの研究によりカベオラはアルブミンの透過に関与し、新たなアルブミン尿の一因となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate whether the albumin enter into the human glomerular endothelial cells (HRGECs) through caveolae or not.

In this experiment, we showed that the labeled albumin were co-localized with caveolin-1, which was a marker of caveolae, on HRGECs. We also showed that the uptake of albumin was dramatically decreased by the caveolae disrupting agents, such as methyl beta cholecystdextrin and nystatin. We also showed the decreasing of albumin uptake by the disrupting of caveolin-1 gene by caveolin-1 siRNA. These results indicated that albumin entered into HRGECs through caveolae, and albumin endocytosis through caveolae might become one of the new etiology of albuminuria instead of the fenestrae which is recognized as previous pathway of albumin through HRGECs.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：カベオラ カベオリン-1 アルブミン 系球体内皮細胞 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

尿蛋白の出現機序に関する研究は、糸球体濾過障壁として機能する糸球体上皮細胞、基底膜内皮細胞のうち、上皮細胞、基底膜を中心に展開されてきたが、内皮細胞に関しては隔壁を有しない fenestrae と呼ばれる 100nm の孔を有するため、蛋白の透過にはほとんど関与しないと考えられ、現在までその研究は発展してこなかった。しかし、内皮細胞を蛋白が自由に通過すると仮定するとフィルターである基底膜の機能はすぐに目詰まりを起こし破綻することが考えられることや、また通常の状態では基底膜にアルブミンや IgG などの沈着は認められないことから、糸球体内皮細胞もなんらかの濾過障壁機能を有すると近年考えられてきている。

カベオラは細胞膜上に存在する 50nm の窪み構造で、血管内皮細胞、平滑筋細胞などに高密度に存在し、脂質やたんぱく質などの輸送、一酸化窒素の産生調節、シグナル伝達に関連する分子機能の制御や増強の調整など生体に重要な役割を果たすことが報告されている。また、カベオリン-1 ノックアウトマウスの研究により、内皮型一酸化窒素合成酵素の亢進に伴う血管の弛緩や、アンジオテンシン II やエンドセリン I に対するカルシウムイオンを介する血管反応性の低下 (Drab M et al, *Science* 28, 2449-2452, 2001) に関与することが報告されている他、脳心血管イベントの主要危険因子であるインスリン抵抗性 (Cohen AW et al, *Am J Physiol Cell Physiol* 285, 222-235, 2003) や血中トリグリセライドの上昇、遊離脂肪酸増加 (Razani B et al. *J Biol Chem* 277, 8635-8647, 2002) などに関与することも報告されている。

腎臓での生理的役割はまだ不明であるが、以下のように近年カベオラ増殖と腎炎の関連が注目されてきている。

1) 糖尿病ラットの腎皮質でカベオラの構成蛋白であるカベオリン 1 の発現が増加しアンジオテンシン受容体拮抗薬で抑制されることから、糖尿病性腎症に関連する可能性があること (Demova et al. *Physiol Res* 58, 563-568, 2009)

2) メサンギウム増殖性腎炎モデルラットのメサンギウム細胞でカベオリン-1 の発現の増加を認め、病因の一因として考えられること (Tamai et al. *Kidney Int* 59, 471-480, 2001)

また血管内皮細胞におけるカベオラの機能として興味深いものとして、

3) アルブミンの輸送に関与し血液より細胞内にアルブミンを取り込み、組織へと移動させる働き (John TA et al. *Am J Physiol lung cell mol physiol* 284, L187-196, 2003, Wang Z et al. *ACS Nano*

3, 4110-4116, 2009) が報告されている

このようにカベオラは腎炎と関わりがあることが報告されてきているが、血管内皮細胞と同様に糸球体内皮細胞のカベオラがアルブミンの透過性にかかわると仮定し、本研究においてそれが証明されれば、「尿蛋白の出現の機序に大きく糸球体内皮細胞が関わる」という革新的な発想を展開させ、更なる腎炎の病態解明、新たな治療法の確立につながる研究と位置づけることができる。

研究者はカベオラと腎炎にかかわる因子の研究のため、留学中の研究施設でアミロイド蛋白のメサンギウム細胞へのエンドサイトーシスの研究 (2005 年 アメリカ腎臓学会にて発表) のほか、移植腎にウイルス性腎症を起こす BK ウイルスが尿細管上皮細胞にカベオラを通じ侵入すること (*J Virol* 81, 8552-8562, 2007)、微小管に沿って細胞質内を移動し、ゴルジ体をバイパスし小胞体に到達すること (*Virology* 371, 336-349, 2008) を、またカベオラにはコレステロールが豊富であることに着目し、実際臨床で使用されている抗高脂血症薬である pravastatin がカベオラの発現を抑え BK virus の細胞内侵入を抑止できる可能性に関して報告し (*Transplant* 85, 1311-1317, 2008)、腎疾患に関してカベオラが大きく関わる事実を明確にしてきた。

更にカベオラが糸球体腎炎とも何らかの関わりがあると考え、腎生検検体をカベオリン 1 で染色した。移植時腎生検検体と比較したところ、糸球体腎炎では糸球体内皮細胞のマーカー (PAL-E) と染色部位が一致して、カベオラの発現が有意に増加していること (図 1)、またステロイド加療で発現が抑制されることが観察された。さらにそれらがアルブミン尿の量と相関すること、つまりアルブミンの透過性にカベオラが関与し、蛋白尿 (アルブミン尿) の原因にカベオラが関与する可能性を報告した (*J Clin Path* 64, 504-509, 2011)。

現在糸球体腎炎の治療は尿蛋白や尿潜血など尿所見の改善をまず第一目標にしており、蛋白尿の発現機序を解明することは腎炎の進行抑制のため重要な役割を果たすと言える。そのため、糸球体内皮細胞のカベオラがアルブミン尿に関与する機序を解明することは、腎炎の病態解明・治療法の確立のために重要と考え、ヒト糸球体内皮細胞を用いアルブミンの取り込み・輸送経路を解明するための本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

血管内皮細胞表面に存在するフラスコ型の陥入部位であるカベオラがアルブミンの血管透過性に関与することが近年注目され

てきているが、糸球体内皮細胞におけるカベオラの役割は不明である。本研究の目的は糸球体内皮細胞に存在するカベオラがアルブミンの透過性に関与し、新たなアルブミン尿（蛋白尿）の機序となることを、ヒト糸球体内皮細胞を用いて証明し、腎炎の病態解明・今後の治療につなげることのみならず、近年アルブミン尿との関連が注目される心腎連関の病態解明・治療にもつなげることである。

3. 研究の方法

蛍光アルブミンとカベオラマーカーの共染色によるカベオラを通じたアルブミンエンドサイトーシス

24 wells plate に糸球体内皮細胞を培養した後、無血清培地で 24 時間静置する。その後、蛍光標識アルブミン添加培養液もしくはクラスリンを通じてエンドサイトーシスするトランスフェリンの添加培養液で 5、15、30、60 分、2、4、6 時間、ヒト糸球体内皮細胞を培養し、その後固定する。カベオラのマーカーである抗カベオリン-1 抗体、もしくは抗クラスリン抗体で染色し、アルブミンは強くカベオリン-1 と共染色するがクラスリンとは共染色せず、逆にトランスフェリンはクラスリンと強く共染色するがカベオリン-1 とは共染色しないことを証明し、アルブミンのカベオラエンドサイトーシスを証明する。

カベオラの発現を低下させることによるアルブミンのエンドサイトーシスの証明

35mm dish 上に糸球体内皮細胞を培養した後、無血清培地で 24 時間静置する。その後ヒト糸球体内皮細胞をカベオラ阻害薬 Methyl beta cyclodextrin (MBCD) もしくは nystatin を添加した培養液で 1 時間処理する。さらにアルブミンをそれぞれに添加し、6 時間培養後、細胞を回収する。cell lysate 内のアルブミン量を抗アルブミン抗体を用いて western blotting 法にて測定し、MBCD や nystatin 処理後のヒト糸球体内皮細胞内アルブミンが、コントロールの未処理のヒト糸球体内皮細胞と比較して、減少している事を検証する。

また、カベオリン-1 に対して siRNA を行いカベオラの発現を低下させ、アルブミンエンドサイトーシスを証明する。発現が最も低下する適正濃度と時間を決定したのち、カベオリン-1 欠損型のヒト糸球体内皮細胞を作成する。その後同様にヒトアルブミンと 24 時間培養後 western blotting 法にて、カベオリン-1 欠損型はコントロールと比較し、侵入が阻害されることによりカベオラを通じたアルブミンのエンドサイトーシスを証明する。

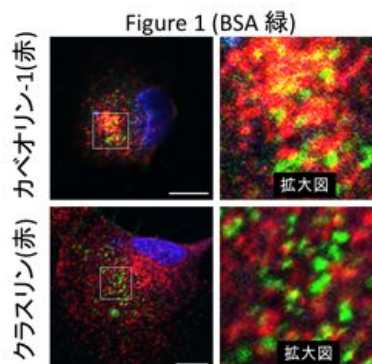
24 well plate 上で同様に MBCD や nystatin

で処理したヒト糸球体内皮細胞に、Alexa Fluor 488 標識アルブミンを加え 6 時間培養後固定する。抗カベオリン 1 抗体と DAPI にて染色後、共焦点顕微鏡にて MBCD、nystatin 処理ヒト糸球体内皮細胞では、未処理のヒト糸球体内皮細胞と比較し、細胞内進入が阻害され、アルブミンの発現が低下していることを証明する。

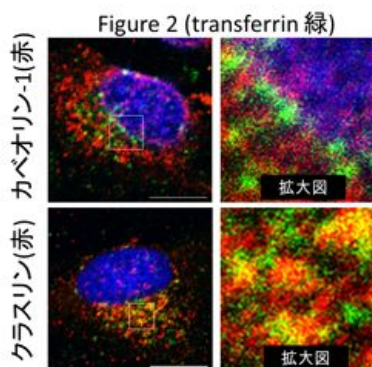
4. 研究成果

蛍光アルブミンとカベオラマーカーの共染色によるカベオラを通じたアルブミンエンドサイトーシス

Alexa Fluor 488 Bovine Serum Albumin (BSA) は添加 5 分後から糸球体内皮細胞上に発現し始め、経時的に増加した。また同様に Alexa Fluor 488 transferrin も添加後すぐに発現し始め、経時的に増加した。発現後 1-2 時間目の写真を示すが、BSA はカベオリン-1 と強く共染色する一方、クラスリンとはほとんど共染色されていない (Figure-1)。



また、逆に transferrin はカベオリン-1 と共染色しないが、クラスリンと強く共染色している (Figure-2)。



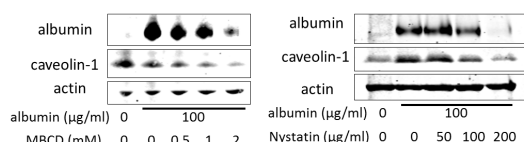
これらの結果からアルブミンはカベオラを通じてエンドサイトーシスする可能性が示唆された。

カベオラの発現を低下させることによるアルブミンのエンドサイトーシスの証明

Western blotting 法にて MBCD 0.5、1、2 mM もしくは Nystatin 50、100、200 μg/ml で処理後にアルブミンと incubate したヒト糸球

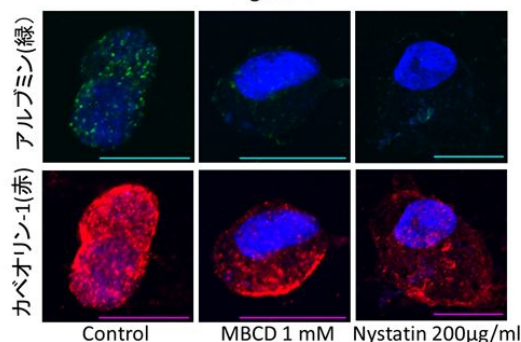
体内皮細胞では明らかに、未処理の細胞と比較しカベオリン-1 の発現が薬剤の容量依存的に低下しており、それに伴いアルブミンの発現も同様に容量依存的に低下していた (Figure 3)。

Figure 3



また、同様に免疫染色法においても、MBCD 1 mM、もしくは Nystatin 200 µg/ml で処理した細胞においては、明らかにカベオリン-1 の発現が未処理の細胞と比較し低下しており、それに伴いアルブミンの細胞内取り込み

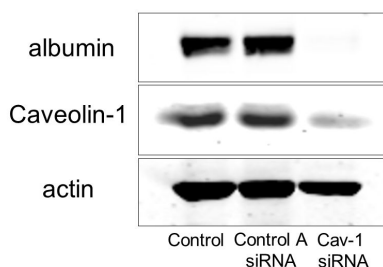
Figure 4



も低下していた (figure 4)。

また、カベオリン-1 siRNA を施したヒト糸球体内皮細胞では、明らかにカベオリン-1 の発現が低下しており、それに伴いアルブミンの発現も低下していた (Figure 5)。

Figure 5



これらの結果からもやはりアルブミンはカベオラを通じてエンドサイトーシスする可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Takahito Moriyama, Yasuko Oshima, Kayu Tanaka, Chihiro Iwasaki, Ken Tsuchiya, Kosaku Nitta, Caveolae may unable albumin to enter human glomerular endothelial cells, Kidney Week 2013, American Society of Nephrology, Nov 5th-Nov 10th, 2013, Philadelphia, USA.

森山能仁、板橋美津世、武井卓、内田啓子、土谷健、新田孝作、糸球体内皮細胞上カベオラの発現意義に関する研究、分子腎臓病フォーラム、2013 年 9 月 7 日、京都

森山能仁、板橋美津世、武井卓、内田啓子、土谷健、新田孝作、糸球体内皮細胞上カベオラのアルブミン透過性に関する研究、第 56 回日本腎臓学会総会、2013 年 5 月 10 日～13 日、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 能仁 (Takahito Moriyama)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20439821

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: