

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461624

研究課題名(和文) CD28細胞内シグナル活性化によるポドサイト傷害機序の解明

研究課題名(英文) The effect of CD28 signal in podocyte injury

研究代表者

此元 隆雄 (konomoto, takao)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80315366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポドサイト培養細胞を用いて、CD80-CD28シグナルのポドサイト傷害における役割を検討した。ポドサイトを傷害する種々の刺激(angiotensin², PolyI:C)によってCD80分子及びCD28分子の発現が亢進した。また、免疫沈降法によってCD80分子とCD28分子はポドサイトにおいても結合していることが示された。ポドサイトにおいてCD28をCD28刺激抗体で活性化すると、アクチンストレスファイバーの減少が認められ、細胞骨格の変化が起こることが示されたが、細胞内シグナルの検討では、CD28の活性化によって優位に変化(活性化、増加)するものを見出すことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigate that effect of CD80-CD28 signal in podocyte injury. Both of CD80 and CD28 expression were upregulated by podocyte injury stimuli such as angiotensin² and polyI:C. Immunoprecipitation analysis showed that CD80 combined with CD28. Activating CD28 signal by anti-CD28 antibody induced decreasing of actin stress fiber in podocyte. However we could not find the molecules, which were activated by CD28 signal.

研究分野：小児腎臓

キーワード：ポドサイト CD80 CD28

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ所雨行軍は小児の代表的な腎疾患で、多量の蛋白尿に起因する病態である。何らかの要因によって、糸球体上皮細胞(ポドサイト)の機能異常をきたし、糸球体係蹄壁のバリア機構が破綻することによって蛋白尿が出現すると考えられているが、その原因の同定には至っていない。

近年、微小変化型ネフローゼ症候群において、蛋白尿出現時にポドサイトに CD80 分子が発現し、寛解時には消失すること、また、尿中にも CD80 分子が検出されることが報告された¹⁾。マウスやポドサイト細胞株を用いた検討では、LPS や IL-13 といったポドサイト傷害因子によって、ポドサイトでの CD80 分子の発現が亢進するとともにアクチン再構成によって細胞骨格の変化をもたらし、蛋白尿や腎機能障害を認めると報告されている²⁾。以上のことから、CD80 分子はポドサイト傷害における重要な分子と考えられており、Shimada らは MCNS の新たな発症機序として、「ウイルス感染や T 細胞サイトカインなどによってポドサイトに CD80 分子が発現し (First-hit)、制御性 T 細胞の機能異常により CD80 分子の過剰発現を制御できない (Second-hit)」とする “Two-hit” 仮説を提唱している³⁾。

CD80 分子は主に抗原提示細胞に発現し、T 細胞上の CD28 に結合することで活性化シグナルを伝達する補助シグナル分子である。T-cell receptor (TCR) シグナルとともに CD80 が CD28 に結合すると細胞内シグナル伝達によって、種々の分子が活性化され増殖、分化、サイトカイン産生などを引き起こす⁴⁾。また、CD28 細胞内シグナルによって、アクチンの再構成による細胞骨格変化が変化することも報告されている⁵⁾。

ポドサイトにおける CD80 分子の発現はポドサイト傷害に関連していると考えられているが、CD28 分子との結合によるシグナル伝達の関与は不明である。

2. 研究の目的

CD80 と CD28 との結合による細胞内シグナル活性化のポドサイト傷害における意義を明らかにし、ネフローゼ症候群の原因あるいは治療ターゲットとなることを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

ヒト不死化ポドサイト細胞株 (Dr.M.saleem より供与) を用いて実験を行った。本細胞株は 33 °C の培養条件では増殖能を有し、37 °C へ温度を上昇することによって増殖が抑制され、分化誘導される。すべての実験において、37 °C

7日から14日間の培養し分化状態としたのちに、薬剤投与などを行った。

2) CD80 分子と CD28 分子の発現
上記、ポドサイト細胞株を用いて、種々の刺激 (Angiotensin II, PolyI:C, 抗 CD28 抗体) における CD80 と CD28 のタンパク及び mRNA 発現をウエスタンブロット、リアルタイム PCR で確認する。

3) CD80 分子と CD28 分子の結合
ポドサイト細胞株を用いて、CD80 と CD28 タンパクの結合を免疫沈降法によって確認する。

4) CD28 活性化によるポドサイト細胞骨格の変化
ポドサイト細胞株を CD28 刺激抗体で刺激し、細胞形態の変化、特にアクチンストレスファイバーの変化を免疫傾向染色によって確認する

5) CD28 細胞内シグナル
ポドサイト細胞株を傷害因子及び CD28 抗体で刺激し、細胞内シグナルの活性化をウエスタンブロットで確認する

CD28 細胞内ドメインにリクルートされ、CD28 が CD80 によって活性化されるとリン酸化する VAV2 のリン酸化のウエスタンブロットで確認する

アクチン再構成に関わる低分子タンパクである Cdc42 はリンパ球などでは CD28 の細胞内シグナルによって調節されることが知られている。また、ポドサイトにおいても細胞骨格の調整に関与していることが知られているため、活性化 cdc42 をウエスタンブロットで確認する。

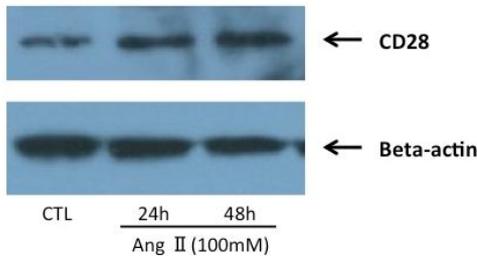
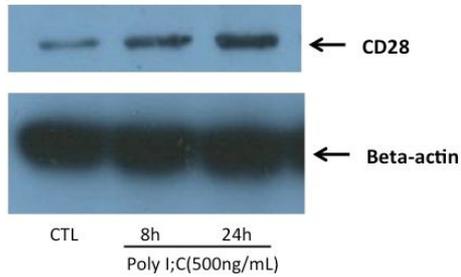
ポドサイトにおいて細胞骨格の維持に関わっている cathepsin L のタンパク発現をウエスタンブロットで確認する。

4. 研究成果

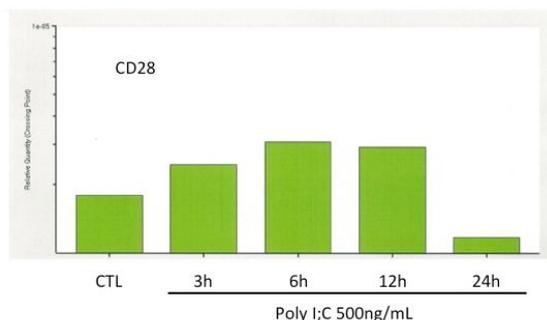
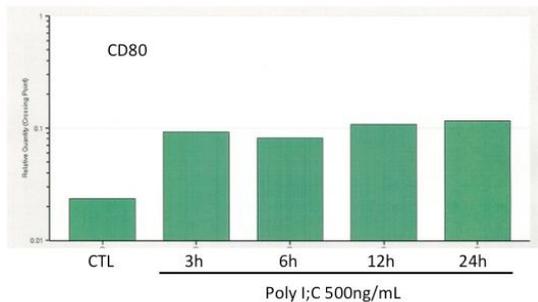
1) CD80 分子と CD28 分子の発現

ポドサイトを Angiotensin (100nM)、PolyI:C(500ng/mL) で刺激し、CD28 タンパクの発現をウエスタンブロットで確認した。

ポドサイト細胞株に CD28 タンパク発現が確認された。刺激によって、刺激後 24 時間、48 時間と経時的に発現の増加を認めた。この変化は、Angiotensin II、PolyI:C 刺激とともに同様に認められた。



ポドサイト細胞株を Poly I;C (500ng/mL) で刺激し、CD80 及び CD28 mRNA の発現をリアルタイム PCR によって確認した。

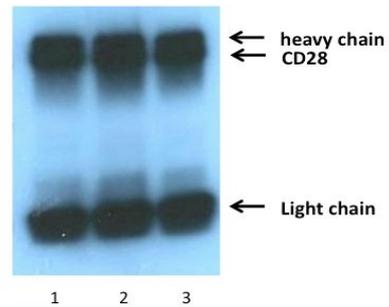


CD80 mRNA は刺激開始後 3 時間には発現の亢進を認め、24 時間まで持続していた。一方、CD28 mRNA は 3 時間で発現の亢進を認めるが、6 時間をピークに 24 時間では発現は低下していた。

2) CD80 と CD28 免疫沈降

ポドサイト細胞株から得られたタンパ

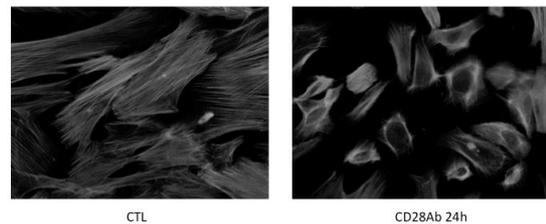
クを CD80 抗体で免疫沈降し、CD28 抗体でウエスタンブロットを行った。



CD80 タンパクと CD28 タンパクが結合していることが示唆された。

3) CD28 刺激抗体投与による細胞骨格の変化

ポドサイト細胞株を CD28 刺激抗体である抗 CD28 抗体 (CD28.2) で刺激し、24 時間後の細胞骨格の変化を蛍光免疫染色で確認した。

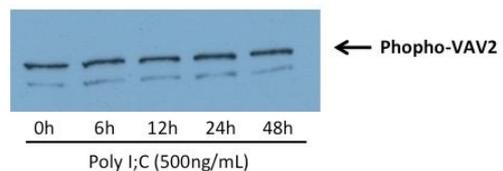


抗 CD28 抗体 (CD28.2) 投与により、アクチンストレスファイバーの著名な減少が認められた。

4) CD28 細胞内シグナルの変化

VAV2 のリン酸化

ポドサイト細胞株を Poly I;C (500ng/mL) で刺激し、経時的に VAV2 にリン酸化をウエスタンブロットで確認した。

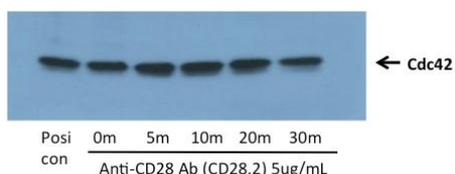


VAV2 のリン酸化は、polyI;C 刺激によっても明らかな変化は認められなかった。

Cdc42 の活性化

ポドサイト細胞株を抗 CD28 抗体 (CD28.2) 5ug/ml で刺激し、経時的にタンパクを採取し、cdc42 活性化

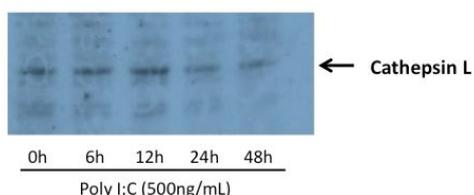
測定キットを用いて、ウエスタンブロットにより確認した。



Cdc42 活性化は、CD28 刺激抗体によっても明らかな変化は認められなかった。

cathepsin L タンパク発現

ポドサイト細胞株を Poly I;C (500ng/mL) で刺激し、経時的に cathepsin L をウエスタンブロットで確認した。



Cathepsin L のタンパク発現は、polyI;C 刺激によっても明らかな変化は認められなかった。

【まとめ】

ポドサイト培養細胞を用いて、CD80-CD28 シグナルのポドサイト傷害における役割を検討した。ポドサイトを傷害する種々の刺激 (angiotensin , PolyI;C) によって CD80 分子及び CD28 分子の発現が亢進した。また、その発現は、ポドサイト傷害刺激によって CD80mRNA 発現は速やかに上昇し持続し、一方 CD28mRNA 発現亢進は刺激後6時間をピークに減少することが示された。

また、免疫沈降法によって CD80 分子と CD28 分子はポドサイトにおいても結合していることが示された。

ポドサイトにおいて CD28 を CD28 刺激抗体で活性化すると、アクチンストレスファイバーの減少が認められ、細胞骨格の変化が起こることが示されたが、細胞内シグナルの検討では、CD28 の活性化によって優位に変化(活性化、増加)するものを見出すことはできなかった。

ポドサイトにおける、CD80/CD28 シグナル伝達は細胞骨格の変化を誘導する可能性があり、今後も継続して検討が必要であると思われる。

引用文献

Garin EH, Mu W et al. Urinary CD80 is elevated in minimal change

disease but not in focal segmental glomerulosclerosis, *Kidney Int*, 78, 2010, 296-302

Reiser J, von Gersdorff G et al., Induction of B7-1 in podocyte is associated with nephrotic syndrome, *J Clin Invest*, 2004, 113, 1390-1397

Shimada M, Ayara C et al., Minimal change disease: a "two-hit" podocyte immune disorder?, *Pediatr Nephrol*, 26, 2011, 645-649

Acuto O, Michel F, CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signaling, *Nat Rev Immunol*, 3, 2003, 939-951

Kistler AD, Altintas MM et al., Podocyte GTPase regulate kidney filter dynamics, 81, 2012, 1053-1055

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 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

此元隆雄 (KONOMOTO, Takao)

宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：80315366

(2)研究分担者

福田顕弘 (FUKUDA, Akihiro)
宮崎大学・医学部・医員
研究者番号：30628889

藤元昭一 (FUJIMOTO, Shouichi)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：80173467

(3)連携研究者

()

研究者番号：