

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461219

研究課題名(和文)系球体足細胞傷害におけるギャップ結合タンパクconnexin43の役割

研究課題名(英文)Role of gap junction protein connexin43 in podocyte injury

研究代表者

姚 建(YAO, Jian)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：50303128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：足細胞の傷害は、多くの腎疾患や様々な実験腎炎モデルに報告されている。しかし、その傷害の分子メカニズムについては十分に解明されていないだけでなく、有効な対処方法も限られている。本研究の目的は、足細胞傷害におけるギャップ結合の役割及び作用機構を解明することである。In vitro培養ポドサイトにおいて、足細胞傷害を引き起こす原因とされる酸化ストレスがポドサイトのコネキシン43の発現レベルを促進すること、また、コネキシン43の発現を抑制することで、足細胞の傷害を抑えることを見出した。コネキシン分子による酸化ストレスの調節メカニズムはTXNIPの変化及びへ細胞外GSHの流失と関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Podocyte injury have been implicated in many types of human and experimental glomerulonephritis. Currently, the molecular mechanisms involved are still incompletely understood. In this study, we investigated the potential roles and mechanisms of gap junction protein connexin43 in podocyte injury. We found that induction of podocyte injury was associated with a marked increased expression of connexin43 that could be prevented by antioxidants. Conversely, inhibition or downregulation of Cx43 improved cellular oxidative status and attenuated oxidative injury. This effect of Cx43 could be related to the altered expression of TXNIP, a negative regulator of thioredoxin, and hemichannel-mediated extracellular release of GSH. Our study thus characterizes Cx43 as an important molecule involved in the regulation of oxidative podocyte injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腎臓 足細胞 ギャップ結合 細胞傷害 酸化ストレス TXNIP P38 ヘミチャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎臓の糸球体足細胞は、高度に分化した細胞であり、糸球体基底膜(GBM)を外側から覆い、血液濾過の最終バリアとして重要な役割を担っている。足細胞の傷害は、濾過バリアの機能障害を引き起こし、結果として著明な蛋白尿を生じる。足細胞の傷害は、多くの腎疾患や様々な実験腎炎モデルにおいて認められている。しかしながら、足細胞障害の分子メカニズムは、十分に解明されてはならず、有効な対処方法も限られている。

(2) 糸球体上皮細胞障害には、スリット膜複合体の障害及び足突起内のアクチン骨格の障害とが深く関わっている。スリット膜複合体は多くの膜蛋白により構成され、透過性の制御に重要な機能をもっている。構成する蛋白のノックアウトマウスの多くは、蛋白尿を生じ糸球体硬化を引き起こす。

(3) ギャップ結合は細胞間結合様式の一つであり、細胞膜に形成されることで、細胞間シグナル伝達に直接関与している。ギャップ結合を構成するヘミチャンネルをコネクソンといい、コネクソンはconnexin(Cx)蛋白によって構成されている。ギャップ結合の機能としては分子量1.2kDa以下の細胞内シグナル伝達物質を隣接する細胞へ直接輸送することが可能で、細胞の分化・増殖を制御し、ホメオスタシスを維持している。最近、ギャップ結合タンパクは、細胞内の細胞骨格と連結しており、細胞接着構造の安定化及び細胞形態・構造の維持に関わっていることが報告されている。

(4) 我々は、これ数年間、腎におけるギャップ結合構成蛋白の組織局在、機能、機能制御に関して研究を行ってきた。その結果、connexin 構成チャンネルは、腎細胞の機能調節及び腎細胞傷害に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。最近我々は、糸球体足細胞培養実験モデルにおいて、足細胞傷害を引き起こす原因とされる酸化ストレスが足細胞のコネキシン43の発現レベルを促進すること、また、コネキシン43の発現を抑制することで、足細胞の傷害を抑えることを見出した。しかしコネキシン43はin vivoでも足細胞傷害に関与しているか、さらにどのような分子メカニズムを介して足細胞の傷害に影響しているかは不明である。

2. 研究の目的

本研究は、in vivo足細胞傷害におけるコネキシン43の役割及び作用機構の解明を目的として、以下の具体的な問題について解決するこ

とである。

- (1) コネキシンCx43のin vivo足細胞の傷害への関与
- (2) コネキシン43の糸球体足細胞の傷害の発症に関わる分子メカニズム
- (3) コネキシン43の機能及び発現レベルを調節することによる足細胞傷害の抑制の可能性

3. 研究方法

(1) マウス腎臓糸球体足細胞(ポドサイト, ドイツ・ハイデルベルグ大学の Dr.W Kriz より供与)は、10% fetal bovine serum (FBS)を含むRPMI-1640培地を用いて培養した。

(2) 足細胞を培養し、培養細胞におけるコネキシン43(Cx43)の局在を蛍光抗体法により検索した。マイクロインジェクションした蛍光色素の隣接細胞への拡散により、機能的ギャップ結合の有無を評価した。Cx43ヘミチャンネルの開閉を細胞膜内外の小分子量物質の流動実験で測定した。

(3) 細胞傷害は、細胞形態の変化、LDHの放出、Calcein-AM/Propidium Iodide染色、Cell Counting Kit-8 assay及びカスパーゼ3活性化を用いて評価した。

(4) 培養細胞の蛋白を抽出し、SDS-PAGEにて分離し、PVDF membraneへの転写後、一次、二次抗体を反応させ、化学発光法を用いて検出した。

(5) 上皮細胞をセルカルチャーインサートにコンフルエントまで培養し、経上皮電気抵抗値の測定によりタイトジャンクション形成を評価した。E-cadherin、zo-1の発現量もバリア機能を評価するマーカーとして測定した。

(6) Cx43野生型(Cx43+/+)とCx43ヘテロマウス(Cx43+/-)を用いてアドリアマイシン腎症(ADR腎症)を惹起し、病態誘導1日目、3日目、5日目、7日目の尿、腎組織を採取することにより、尿蛋白レベル及び糸球体の病理的な変化について検討した。

4. 研究成果

(1) 培養マウス足細胞にコネキシン43が発現していることを免疫染色およびウェスタン blotで明らかにした。足細胞のコネキシン43が、主に核の周辺に局在し、機能的な細胞間ギャップ結合チャンネルを形成していなかったことをdye-transfer実験で、明らかにした。

(2) 酸化ストレス刺激によってマウス足細胞のコネキシン43の発現量が増加し、酸化スト

レスによる細胞死と深くかかわっていることが観察された。ギャップ結合の阻害剤を添加することで、酸化ストレスによるP38の活性化および足細胞のapoptosisが抑制された。ギャップ結合の阻害剤が、足細胞のTXNIPの発現量を強く抑制した。結果として、抗酸化分子であるthioredoxinが活性化されることで、P38の活性化を抑制し、細胞死を抑えることとなった。

(3) 低カルシウム濃度で培養すると、培養腎上皮細胞の細胞間接着は緩み、細胞間の接着分子であるcadherinが接着部位より消失し、バリア機能も低下した。これらの変化はヘミチャネルの活性化を伴っており、ヘミチャネルを介した細胞外ATP放出及び蛍光色素の取り込みが増加した。ヘミチャネルを阻害することで、低カルシウムによる細胞間接着の破綻は軽減した。これらによりヘミチャネルが細胞間接着を調節していることが明らかになった。

(4) 低カルシウム濃度による細胞間接着の破綻は、酸化ストレス及びP38活性化と深く関わっていることが明らかになった。抗酸化物質GSH及びP38ブロックを投与することで、細胞間接着の破壊は抑えられた。ヘミチャネルが開放することで、抗酸化物質であるGSHの細胞外への流出を引き起こし、結果としてP38の活性化に繋がったと考えられる。

(5) マウスに足細胞傷害の実験モデルとして多用されているアドリアマイシン腎症(ADR腎症)をCx43+/+及びCx43+/-マウスに惹起し、病態誘導1日目、3日目、5日目、7日目の尿、腎組織を採取し、尿蛋白レベル及び糸球体の病理的な変化について検討した。結果としては、ADR投与によって、腎臓組織のCx43の発現レベルが著しく増加した。しかし、ADR腎症マウスにおけるNephrin、Podocin発現の低下、タンパク尿の増加、及びP38の活性化に関する病理的な指標に関して、Cx43+/-マウスとCx43 wildtypeマウスの間には大きな差はなかった。Cx43+/-マウスを用いた結果では、in vivo足細胞傷害モデルにCx43の参与が認められなかった。同じ実験モデルマウスに、ギャップ結合インヒビター、また薬物性細胞傷害に深く関わっている分子機構であるinflammasomeのインヒビターを投与することで、尿タンパクの増加及び糸球体P38の活性化が抑制された。

以上の結果から、コネキシン43が酸化ストレスによる足細胞の細胞傷害に深くかかわることが明らかになった。コネキシン43が、抗酸化分子thioredoxinの抑制物質であるTXNIPを調節していることを初めて発見した。Cx43へ

ミチャネル活性化することで、上皮細胞の細胞間接着及びバリア機能を調節していることも明らかにした。Cx43+/-マウスを用いた結果では、in vivo足細胞傷害モデルにCx43の参与が認められなかった。In vivo足細胞傷害にCx43の役割の検討に関して、将来強力的なギャップ結合抑制剤の使用、及び足細胞特的なCx43 knockoutマウスが必要となる。

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10件)

Zhang X, Gao S, Tanaka M, Zhang Z, Huang Y, Mitsui T, Kamiyama M, Koizumi S, Fan J, Takeda M, Yao J: Carbenoxolone inhibits TRPV4 channel-initiated oxidative urothelial injury and ameliorates cyclophosphamide-induced bladder dysfunction. *J Cell Mol Med*, 査読有, 2017 (in press)
doi: 10.1111/jcmm.13100.

Zhang Z, Zhang X, Fang X, Niimi M, Huang Y, Piao H, Gao S, Fan J, Yao J: Glutathione inhibits antibody and complement-mediated immunologic cell injury via multiple mechanisms. *Redox Biol*, 査読有, Vol. 12, 2017, pp. 571-581
doi:10.1016/j.redox.2017.03.030

Chi Y, Zhang X, Zhang Z, Mitsui T, Kamiyama M, Takeda M, Yao J: Connexin43 hemichannels contributes to the disassembly of cell junctions through modulation of intracellular oxidative status. *Redox Biol*, 査読有, Vol. 9, 2016, pp. 198-209
doi: 10.1016/j.redox.2016.08.008,

Piao H, Chi Y, Zhang X, Zhang Z, Gao

K, Niimi M, Kamiyama M, Zhang J, Takeda M, Yao J: Suramin inhibits antibody binding to cell surface antigens and disrupts complement-mediated mesangial cell lysis. *J Pharmacol Sci*, 査読有, 2016, Vol. 132, No. 4, pp. 224-234
doi: 10.1016/j.jphs.2016.03.011,

Zhang X, Yao J, Gao K, Chi Y, Mitsui T, Ihara T, Sawada N, Kamiyama M, Fan J, Takeda M: AMPK Suppresses Connexin43 expression in the bladder and ameliorates voiding dysfunction in cyclophosphamide-induced mouse cystitis. *Sci Rep*, 査読有, Vol. 6, 2016, pp. 19708
doi: 10.1038/srep19708.

Li G, Gao K, Chi Y, Zhang X, Mitsui T, Yao J, Takeda M: Upregulation of connexin43 contributes to PX-12-induced oxidative cell death. *Tumor Biol*, 査読有, Vol. 37, No. 6, 2016, pp. 7535-7546
doi: 10.1007/s13277-015-4620-7

Nakajima S, Chi Y, Gao K, Kono K, Yao J: eIF2 γ -independent inhibition of TNF α -triggered NF- κ B activation by salubrinal. *Biol Pharm Bull*, 査読有, Vol.38, No. 9, 2015, pp. 1368-1374
doi: 10.1248/bpb.b15-00312

Gao K, Chi Y, Zhang X, Zhang H, Li G, Sun W, Takeda M, Yao J. A novel TXNIP-based mechanism for Cx43-mediated regulation of oxidative drug injury. *J Cell Mol Med*, 査読有, Vol. 19, No. 10, 2015, pp. 2469-2480.

doi: 10.1111/jcmm.12641,

Zhang H, Chi Y, Gao K, Zhang X, Yao J: p53 protein-mediated up-regulation of MAP kinase phosphatase 3 (MKP-3) contributes to the establishment of the cellular senescent phenotype through dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem*, 査読有, Vol. 290, No. 2, 2015, pp. 1129-1140.
doi:10.1074/jbc.M114.590943,

Chi Y, Gao K, Zhang H, Takeda M, Yao J. Suppression of cell membrane permeability by suramin: involvement of its inhibitory actions on connexin 43 hemichannels. *Br J Pharmacol*, 査読有, Vol. 171, No. 14, 2014, pp. 3448-62. doi: 10.1111/bph.12693

〔学会発表〕(計7件)

Xiling Zhang, Manabu Kamiyama, Zhen Zhang, Yanru Huang, Shan Gao, Xin Fang, Masayuki Takeda, Jian Yao. Connexin43 channel contributes to TRPV4 activation-elicited oxidative cell injury. 第39会日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016年11月30日 ~ 2016年12月02日

Yanru Huang, Xiling Zhang, Zhen Zhang, Shan Gao, Xin Fang, Jian Yao. Pannexin channels contribute to air exposure-elicited oxidative injury in bronchial epithelial cells. 第39会日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016年11月30日 ~ 2016年12月02日

姚 建: Pathophysiological roles of gap junction-mediated intercellular communication in kidney, 第38回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015年12月01日 ~ 2015年12月04日

Zhang X, Yao J, Ihara T, Sawada N, Mitsui T, Takeda M: AMP-activated protein kinase suppresses connexin43 in bladder smooth muscle cells and ameliorates voiding dysfunction in cyclophosphamide-induced mouse cystitis. ICS2015 (International Continence society), Conventional Center (Montreal, Canada), 2015年10月06日 ~ 2015年10月09日1

Yao J, Chi Y, Gao K, Zhang XL, Yoda R: Regulation of tight junction and adherent junction disassembly by connexin43 hemichannels. 2015 Experimental Biology, Boston Convention & Exhibition Center 「ボストン(アメリカ)」, 2015年03月28日 ~ 2015年04月01日

Zhang H, Chi Y, Gao K, Yoda R, Yao J: P53-mediated upregulation of MKP-3 contributes to the maintenance of cellular senescent phenotype through dephosphorylation of ERK1/2. 第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014年11月25日 ~ 2014年11月27日

Chi Y, Zhang H, Gao K, Yao J: Regulation of tight junction disassembly by gap junction hemichannels. 第37回日本分子生物

学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014年11月25日 ~ 2014年11月27日

〔その他〕
ホームページ等
山梨大学 研究者総覧
http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Display.Scholar/4_2_1/F425C32CE9837753.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姚 建 (YAO, Jian)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号: 50303128