

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650065

研究課題名(和文)系球体内皮細胞“孔”を構成する蛋白質の特定

研究課題名(英文) Identification of specific protein composes "fenestration" of glomerular endothelial cells

研究代表者

恩田 紀更(ONDA, Kisara)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：60465044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎不全とは系球体濾過量の低下であり、その系球体濾過は系球体基底膜、上皮細胞スリット膜、そして系球体内皮細胞(GEnC)に存在する“孔”の三因子によって構成される。今回の我々の研究は、この『“孔”を構成する蛋白質を特定すること』を目的とした。まずはIgA腎症を対象とし、「孔」を含めた内皮細胞の微細構造を電子顕微鏡を用いて検討した。またマウスの腎臓から系球体内皮細胞を分離するため、Immortomouseより系球体内皮細胞を単離培養し、さらに抗CD31抗体を用いて系球体内皮細胞の純度をあげ、FACSで解析した。系球体内皮細胞のカベオラをキットを用いて単離し、今後は質量分析を行う。

研究成果の概要(英文)：Renal dysfunction means declining of glomerular filtration which consists of glomerular basement membrane, podocyte slit diaphragm, and glomerular endothelial cell (GEnC) fenestrations. In this study, we aimed to identify specific proteins compose the fenestration. First, morphology of ultrastructure of human GEnC including fenestration was observed using electroscopy. To isolate GEnC from mice glomeruli, GEnC was cultured from Immortomouse glomeruli and purified by positive selection using anti-CD31 antibody. The selected GEnC was analyzed by FACS. Mass spectrometry should be done in next.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：系球体内皮細胞 fenestration 質量分析 新規蛋白質の同定 カベオラ

1. 研究開始当初の背景

腎不全とは糸球体濾過量の低下であり、その糸球体濾過は糸球体基底膜、上皮細胞スリット膜、そして糸球体内皮細胞(GEnC)に存在する“孔”(窓、fenestra)の三因子によって構成される。上皮細胞スリット膜に関する研究は、スリット膜を構成する蛋白質(ポドシン・ネフリン)が発見されたことにより、最近10年間で飛躍的に進歩し、治療法にも大きな影響を与えた。一方、孔を構成する蛋白質は未だに発見されていない。

2. 研究の目的

(1) 学術的背景

上皮細胞スリット膜に関する研究は、ポドシンやネフリンといった構成蛋白質が同定されたことで飛躍的に進歩した。一方、現在の技術ではGEnCの孔を単離することが極めて困難であることから、孔を構成する蛋白質は同定されていない。今回我々は、孔の構成蛋白質を同定することが、そのメカニズムを理解する上での重要課題であると考え、GEnCに豊富に発現している“カベオラ”に着目した。

孔は、カベオラの融合によって形成され(図)(Am J Physiol Cell Physiol. 2002;282:1053-63)、修復や維持にも深く関わっており(J Am Soc Nephrol. 2008;19:1463-71)、カベオラを構成する蛋白質と、孔を構成する蛋白質の一部が同一である可能性を強く疑わせる。

また、カベオラの単離は孔の単離と比すれば容易である。以上から我々は、孔を構成する蛋白質を発見するためには、まずカベオラを構成する蛋白質を解析することが有用であると考え、研究を計画した。

(2) 研究期間内の目標

□ マウスGEnCよりカベオラを単離後、プロテオーム解析を用いてカベオラの構成蛋白質を同定する。

その中から、孔を構成する蛋白質の候補を選定する。

□ 選定された蛋白質が、孔にも存在しているか否かの検討を電子顕微鏡を用いた免疫染色で行う。孔を構成する蛋白質を同定し、さらにヒト検体で相同体(human homolog)を検証する。

(3) 学術的な特色及び予想される結果と意義

孔やカベオラに関する情報が少ない理由はその微細構造にある。光学顕微鏡での観察は困難を極めるため、電子顕微鏡(電顕)での観察研究が主体となる。電顕を用いた研究を行うことができる施設は限られるため、自ずと研究対象から外れてしまうことが多いのが現状である。

我々順天堂大学には、研究室と同じ敷地内に、透過型電顕を計3台(JEM1230、H7100、

JEM1200EX)、走査型電顕を1台(S-800)備えた『超微形態研究部門』がある。さらに電顕専門のスタッフが常駐しており、固定・包埋処理・観察・撮影に関する、的確で包括的な指導を受けることが可能である。

また、『生体分子研究部門』にはプロテオーム解析に必要な質量分析器を初め、その周辺設備が備えられている。我々は、日本でも数少ない、高性能な電子顕微鏡及び質量分析器を備えるこの施設を、24時間自由に使える環境にあり、この利点を生かせば、期間内に目標を達成することは十分に可能である。

もし孔を構成する蛋白質が同定されれば、学界に与えるインパクトは大きく、孔に関する研究は飛躍的に進展する。また、糸球体障害における孔の役割がさらに解明され、同定された蛋白質をターゲットにした創薬が期待できる。さらに、腎不全の予防もしくは症状の軽減化が実現でき、腎不全患者の増加によって膨大となっている医療費の削減にもつながる。

(4) 新しい原理の発展

□ 近年まで、主として糸球体基底膜が濾過率を規定しており、上皮細胞スリット膜は、基底膜を通過したわずかな蛋白をせき止める“モニター”の役割をしているのに過ぎない、とする学説が有力であった。

しかし現在では、スリット膜は、基底膜と同等もしくはそれ以上の蛋白透過性を防御する障壁である、と考えられるようになっていく。その理由の一つに、ポドシンやネフリンなどのスリット膜を構成する蛋白質が同定されたことにより、研究が飛躍的に進歩したことが挙げられる(J Am Soc Nephrol. 2002;13:3005-15)。

□ 一方、GEnCにおける孔は、血流中の大部分の蛋白分子が自由に通過しうる“只の穴”とする説がいまだ有力である(Simon C et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2009)。

しかしながら本研究により、孔を構成する蛋白質が同定されれば、上皮細胞スリット膜研究と同様に、孔における研究も飛躍的に進歩し、蛋白透過性の防御において新たな知見が得られ、糸球体濾過における孔の役割が重要視されるであろう。

このことは、従来からの“孔は只の穴である”とする通説を打破することに相違ない。よって本研究は、GEnC研究において新しい原理の発展を促すものである。

(5) 成功した場合の卓越した成果、学術的な波及効果

□ 約30年前に、孔はアクチン・マイクロフィラメントネットワークによって囲まれていることが示唆されたのみで(Vasmant D et al. Anat Rec. 1984)、その後、孔を構成する成分をプロテオーム解析した報告は無い。

もし我々が孔を構成する蛋白質を一つでも同定できれば、それは世界初の報告となる。また、同定された蛋白質のなかで、孔に特異的な未知の蛋白質が発見できれば、コンディショナルノックアウトマウスを作製することも可能となり、これまでになされた上皮細胞の研究成果と合わせて、糸球体濾過の機序が飛躍的に解明され、短期に効果的で、副作用の少ない創薬が可能になる。

□ また、本研究が成功すれば次のような波及効果が期待される。

1. 孔に対する特定の抗体を用いることにより、孔の単離が容易となり、一般的な設備を備える研究室であれば、世界中で孔の単離ができる。よって孔に関する研究が進展する。

2. 蛋白質の過剰発現、発現抑制により GEnC の形態や機能にどのような影響を与えるかの検討が可能となる。

3. 糸球体濾過における孔の役割が解明される。

4. 孔に濾過障壁としての重要性が明らかとなれば、蛋白尿の発症機序がさらに解明される。

5. 動物実験により、腎不全に対する治療効果が期待できる薬物が選定できれば、ヒトへの応用が可能となる。

6. 孔を構成する蛋白質をターゲットとした創薬が可能となる。

7. 糖尿病腎症、腎硬化症、様々な糸球体腎炎における早期発見もしくは予防、症状軽減化が可能となる。増大する医療費の抑制につながる。

3. 研究の方法

目標：孔を構成する蛋白質の候補を選定する

(1) 『カベオラ単離』

カベオラ単離キットを用いて、GEnC (Immortomouse®より単離培養)からカベオラを分離する。

密度勾配遠心後、回収した低密度画分にカベオラが含有されていることを確認するため、カベオリン-1 の発現の有無を電気泳動にてチェックする。

カベオラの純度を評価するため、低密度画分をエポキシ樹脂へ包埋し、電顕にて観察する。

*ピットフォール：次ステップ、プロテオーム解析でのコンタミネーションを極力減らすため、単離カベオラの純度が重要となる。

キットを用いた場合の純度が低かった場合、以下の細胞溶解方法を試みる。

□ 浸透圧ショック法(サンプルを滅菌水などの低張溶液に懸濁する方法)

□ 凍結融解法(サンプルを液体窒素で急速に凍結したのち、解凍させる方法)

□ 酵素消化法(酵素処理により難溶性の細胞壁を破壊する手法)

□ TritonX 以外の非イオン性界面活性剤の使用(Tween-20、Pluronic など)

□ 超音波処理(超音波のせん断力により細胞を破壊する方法)

□ フレンチプレス(サンプルを高圧下で強制的に小穴から押し出して、せん断力により細胞を破壊する方法)もしくはダウンス型ホモジナイザーによる破碎

(2) 『プロテオーム解析』

上記ステップで単離したカベオラから、蛋白質を抽出し、二次元電気泳動で分離する。

電気泳動で得た各スポットに対して質量分析(LC-MS/MS)を行い、蛋白質の網羅的解析をする。

また、化学的に孔を消失させた GEnC を陰性対照として、プロテオミックアレイを行う。

質量分析後のデータベース解析でスコアが高く、かつプロテオミックアレイで発現の差が大きかった蛋白質は、孔を構成する蛋白質である可能性が高いため、候補として選定する。

さらにこの過程で未知のタンパク質が発見されれば、それは GEnC におけるカベオラに特異的な蛋白質である可能性がある。

*ピットフォール：

□ カベオラを構成する蛋白質を網羅的に解析した報告はなされていないため、構成蛋白質の概要が明らかとなるだけで、それ自体が全く新しい知見であり、今後の研究進展のための大切なデータとなり、社会に貢献できる。

(3) 『免疫電顕(金コロイド法)』

選定された候補蛋白質に対する抗体を用いて GEnC を染色し、孔(とカベオラ)にのみ染色されれば、その抗体に対応する蛋白質が孔に存在することを証明できる。

孔は微小構造のため、光学顕微鏡や共焦点顕微鏡では確認できない。そこで金コロイド法を用いた免疫電顕 (Med Mol Morphol. 2012;45:29-34)を行う。孔の構成蛋白質であった場合は、金コロイドが孔に限局するはずである。また、プロテオーム解析で未知の蛋白質を発見した場合は、得られたアミノ酸配列からペプチド合成を行った後、新たに抗体

を作製し(業務委託の予定)、局在の評価に焦点を絞るとともに、新しい知見として世界に発信する。

(4)『免疫電顕(金コロイド法)』

マウスの孔を構成する蛋白質が同定されれば、ヒト腎組織を用いて相同体(homolog)を上記と同様に免疫電顕で検証する。ヒト腎組織は、インフォームド・コンセントを得てすでに採取した、巣状糸球体硬化症患者の正常糸球体を用いる。ヒトの孔でも蛋白質が確認されれば、ヒトにおける孔の構成蛋白質が世界で初めて発見されたことになる。

4. 研究成果

まずはヒト Homologue 検討の下地となる研究から着手した。

血尿や蛋白尿の出現する腎炎では糸球体内皮細胞の形態学的な変化が予想される。そこで成人で最も多い糸球体腎炎である IgA 腎症を対象とし、感染を契機に肉眼的血尿の見られる群と、肉眼的血尿のない IgA 腎症を対比することで、「孔」を含めた内皮細胞、上皮細胞などの微細構造を電子顕微鏡を用いて検討した。

さらにこの研究結果に基づいて、マウスの腎臓から糸球体内皮細胞を分離するため、様々な角度から検討を重ねた。

Immortomouse®よりマグネットビーズを使用して、腎皮質から糸球体を分離した。分離した糸球体をシャーレに入れて 33 で特殊な条件を用いて糸球体内皮細胞を単離培養した。

さらに内皮細胞に対する特異的な抗体である抗 CD31 抗体を用いて、糸球体内皮細胞の純度をあげ、FACS で解析したところ、90%近い分離率であった。

糸球体内皮細胞のカベオラをキットを用いて単離し、今後は質量分析を行い、新規の蛋白質が存在するか否かを検討する。もしプロテオーム解析で未知の蛋白質を発見した場合は、得られたアミノ酸配列からペプチド合成を行った後、新たに抗体を作製し、局在の評価に焦点を絞るとともに、新しい知見として世界に発信する。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

D Honda, K Onda-Tsueshita, I Ohsawa, H Inoshita, S Horikoshi, Y Tomino. "Severe renal interstitial fibrosis can be a predictor of renal function in patients with lupus nephritis, especially in cases with the international society of nephrology/renal pathology society Class IV" *Kidney Week アメリカ腎臓学*

会,2015/11/5, San Diego, CA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

恩田 紀更 (ONDA, Kisara)

順天堂大学 医学部 助教

研究者番号: 60465044

(3)連携研究者

井下 博之 (INOSHITA, Hiroyuki)

順天堂大学 医学部 准教授

研究者番号: 80646117

(4)研究協力者

草場 岳 (KUSABA, Gaku)

順天堂大学 医学部

研究者番号: