

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860648

研究課題名(和文)腎臓の発生に必須なSall1蛋白のポドサイト障害からの回復期・再生期における役割

研究課題名(英文) Re-expression of Sall1 in podocytes protects against adriamycin-induced nephrosis

研究代表者

細江 佳子 (Yoshiko, Hosoe-Nagai)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：30722764

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)：分化したポドサイトにおける傷害時のSall1の役割を明らかにすることを目的として、分化後にsall1が欠損するモデル(Sall1 KO p/p)マウスと培養分化ポドサイト(Sall1KD)を作成した。Sall1 KO p/pマウスは蛋白尿をきたすことはないが、アドリアマイシン傷害モデル(ADRTx)において有意に蛋白尿の増加を認め、糸球体硬化も多く認められ、ポドサイトがアポトーシスに陥っていた。Sall1KD細胞でもSall1KO p/pマウスと同様の結果が得られた。ポドサイト特異的蛋白質シナプトポジンがSall1によって分解が抑制され、GRP78の発現も抑制していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Sall1 has a crucial role in kidney development. To explore this role in differentiated podocytes, we generated podocyte-specific Sall1-deficient mice (Sall1 KO p/p) and siRNA Sall1 knock down (Sall1 KD) podocytes. Sall1 KO p/p mice showed no proteinuria, however after adriamycin treatment (ADRTx) they showed much of proteinuria and many sclerotic glomeruli. Sall1 KD podocytes showed a loss of synaptopodin following ADRTx. These results indicated that Sall1 has a protective role in podocytes; to explore this mechanism we focused on GRP78. GRP78 expression was higher in ADRTx-Sall1 KO p/p mice than in control mice. Sall1 appeared to influence the expression of GRP78 in injured podocytes. These results suggest that Sall1 is associated with actin re-organization, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in injured podocytes. These protective aspects of Sall1 re-expression in injured podocytes may have the potential to reduce apoptosis and possibly glomerulosclerosis.

研究分野：糸球体腎炎

キーワード：ポドサイト Sall1 糸球体腎炎 アポトーシス シナプトポジン GRP78

## 1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群に代表される慢性糸球体腎炎は様々な疾患を内包し、各々の治療には免疫抑制剤を中心とした薬剤が使用される。しかし、その病態については未知の部分が多い。腎炎の進行は不可逆的な糸球体硬化を引き起こし、最終的には腎不全に至る。

我々はこれまで糸球体硬化に至るメカニズムを、糸球体上皮細胞(ポドサイト)の傷害を中心に研究し、傷害モデルを利用して解明してきた。特にアドリアマイシン(一般名;ドキシソルピシン)を使用した傷害モデルはポドサイト傷害を引き起こし、最終的に糸球体硬化に陥っていることが判明している。我々はこのモデルを使用してポドサイト傷害のメカニズムを解明している。

Sall1 遺伝子は spalt (sall) 遺伝子群の一つで多様な生物種で保存され、C2H2 zinc finger motif を有した特有の蛋白質群を形成する重要な遺伝子である。その中で、Sall1 蛋白質は(腎発生段階において)欠損していると腎臓自体が形成されない(無腎臓)。しかしこの蛋白質の腎臓分化後の傷害時の役割については未解明の状態であった。

そこで我々は、腎臓が中等度の分化段階で出現する蛋白質:ポドシンをプロモーターとする、Sall1 コンベンショナル欠損マウスを作成した。つまり、ポドシン出現後に Sall1 が欠損するマウスであり、腎臓は正常に形成されるが、その後は、Sall1 蛋白質は一切働いていない状態となる。

これらのマウスの表現系や、腎傷害モデルによる病理学的結果を考察することにより、Sall1 蛋白質の役割を解明することが必要であると考へた。

## 2. 研究の目的

腎分化後における Sall1 蛋白質の役割を解明し、糸球体硬化に陥る病態を解明して腎障害を改善する創薬研究につなげること。

## 3. 研究の方法

まず、我々はポドシンをプロモーターとする Cre-loxp システムを利用して、ポドシン発現後に Sall1 が欠損するマウス(Sall1 KO<sup>pod/podo</sup> マウス)を作成した。それらの表現系を蛋白尿の出現と腎組織にて検討した。

我々はポドサイト傷害モデルとしてドキシソルピシン(商品名:アドリアマイシン(ADR))を利用しており、このモデルを利用して野生型と Sall1 KO<sup>pod/podo</sup> マウスの両者を比較し、両者の蛋白尿の出現と腎組織の障害の程度について考察した。Sall1 KO<sup>pod/podo</sup> マウスの

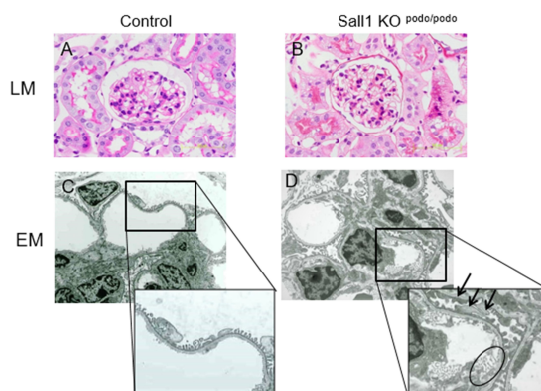
糸球体硬化が強く、それらを確認するために、WT-1 陽性細胞の数を計測し、ポドサイトスリット膜蛋白質であるネフリンの発現についても計測した。

次に培養分化ポドサイトで ADR 傷害モデルを利用して Sall1 の発現を検証した。

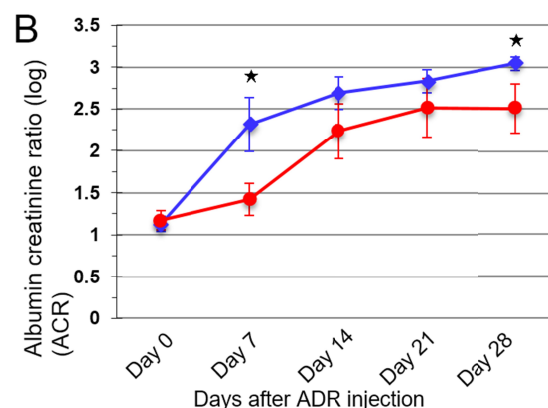
また、pSUPER システムを利用して培養ポドサイトにおける Sall1 ノックダウンポドサイトを作成し、それらの表現系や ADR モデルにおける各種蛋白質の発現を検証し、Sall1 の役割について多角的に調査した。

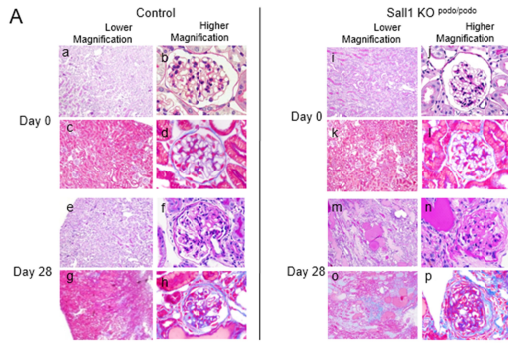
## 4. 研究成果

Sall1 KO<sup>pod/podo</sup> マウスの表現系を調べたところ、蛋白尿の出現はなく、体重も野生型と違いはなかった。そこで 12 週令のマウスの腎組織を調査した。光学顕微鏡所見では違いはなかったが、電子顕微鏡ではポドサイトのフットプロセスの融合と糸球体内皮細胞における回廊構造の形成が、有意ではないものの多く認められた。

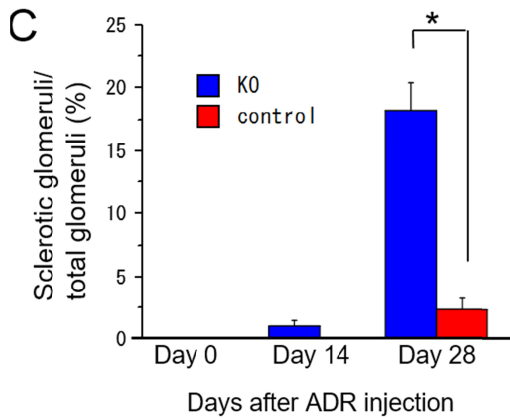


ADR 傷害モデルにおいては、Sall1 KO<sup>pod/podo</sup> マウスは、day 7 と day 28 において有意に蛋白尿が多く、腎臓組織においても糸球体硬化が有意に増えていた。血尿は両者共に認められなかった。

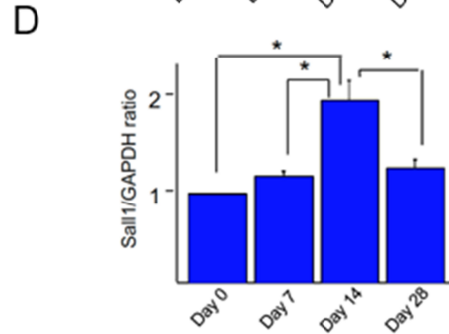
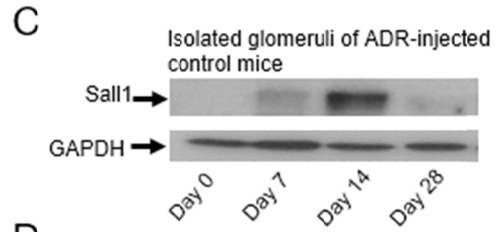
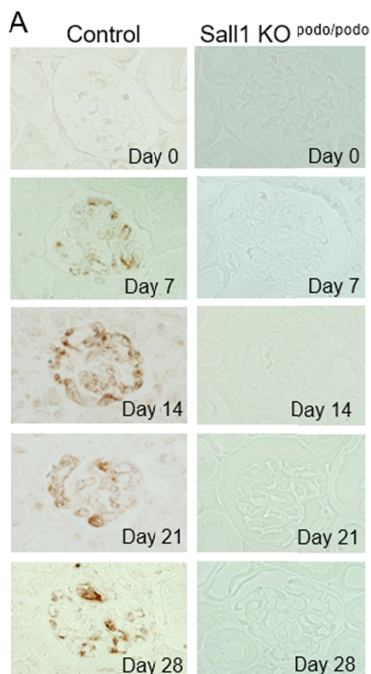




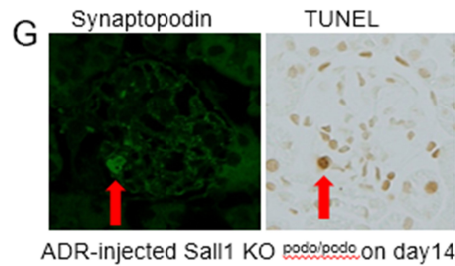
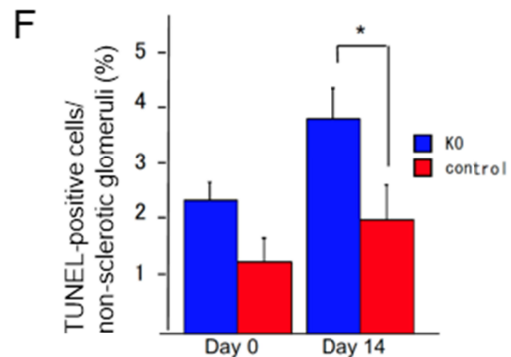
糸球体内のポドサイト数を WT-1 染色にて計測したところ、Sall1 KO *podo/podo* マウスにおいて day 14, 28 では有意に WT-1 陽性細胞が減少していた。つまり、ポドサイトが Sall1 KO *podo/podo* において、有意に減少していたことを示している。



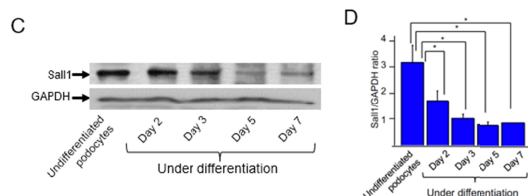
一方、野生型マウスにおいて、ADR 傷害モデルでの Sall1 の発現を調べたところ、day14 をピークとして発現が上昇することが判明した。もちろん Sall1 KO *podo/podo* マウスでは Sall1 の発現は全く認められなかった。



ポドサイトの減少と糸球体硬化の検証のために TUNEL 染色を行ってポドサイトのアポトーシスを検証したところ、TUNEL と synaptopodin (ポドサイトに特異的な蛋白質) が共発現し、ポドサイトに有意にアポトーシスが誘導されていることが判明した。同様の結果は cleaved caspase3 でも確認した。

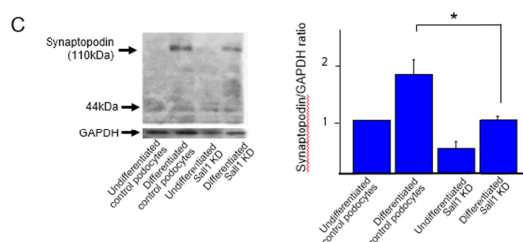


培養ポドサイトにおいて Sall1 の発現を検証したところ、未分化の段階では発現はあるものの、分化するに従い発現が減少することがわかった。



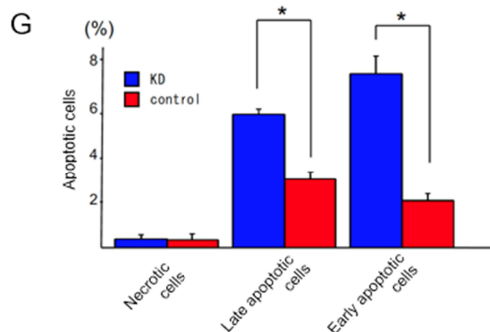
一方 ADR 傷害モデルにおける発現を検証すると、in vivo の実験同様、ADR 傷害によって Sall1 の発現が増加することが判明した。Day 2 において cleaved caspase 3 の発現も最大となる一方、ポドサイトの正常なスリット膜蛋白質（ポドシン）の発現は、ADR によって低下していった。

また、pSUPER システムを利用して Sall1 を knock down (KD) させた培養分化ポドサイトを作成したところ、コントロールに比べて胞体が小さく全体的にこごもりとした形態が形成された。ポドサイトの細胞骨格関連蛋白質である synaptopodin の発現を確認したところ、Sall1KD ポドサイトでは synaptopodin の発現が低下していることが

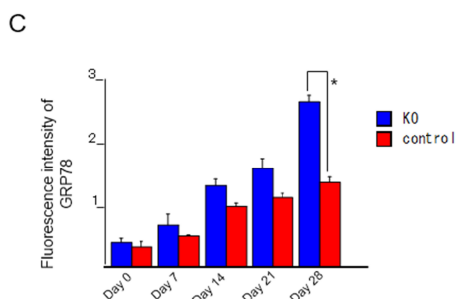


判明した。

同様に ADR 障害モデルを、培養分化ポドサイトの野生型と Sall1KD の両者に使用したところ、Sall1KD ポドサイトにおいて synaptopodin の発現が著明に低下していると同時にアポトーシスに陥った細胞が有意に多いことがわかった。



それらの原因を調べるために小胞体ストレスである GRP78 に着目し、検証したところ、Sall1KD ポドサイトでは GRP78 が有意に増えていることが蛋白質レベルで確認された。



以上の結果から Sall1 は正常時には大きな役割はないものの、傷害時には GRP78 といった小胞体ストレスを減少させ、最終的には細胞骨格関連蛋白質である synaptopodin を安定化させてポドサイトのアポトーシスを抑制する作用があることが判明した。

以上の結果について論文として Laboratory Investigations に投稿し、accept 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 1件)

### Re-expression of *Sall1* in podocytes protects against adriamycin-induced nephrosis

*Laboratory Investigations in press*  
(accepted in 2017)

Yoshiko Hosoe-Nagai, Teruo Hidaka, Ayano

Sonoda, Yu Sasaki, Kanae Yamamoto-Nonaka,

Takuto Seki, Rin Asao, Eriko Tanaka, Juan

Alejandro Oliva Trejo, Fumiko Kodama, Miyuki

Takagi, Nobuhiro Tada, Takashi Ueno, Ryuichi

Nishinakamura, Yasuhiko Tomino, and Katsuhiko

Asanuma

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

細江 佳子 (HOSOE-NAGAI, Yoshiko)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号: 01234567