

ポドシンのエンドサイトーシスにおける SNX9 および NPC2 の役割

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ササキ ユウ 佐々木 有
所属等	順天堂大学医学部腎臓内科学講座
プロフィール	平成 28 年 4 月～現在 順天堂大学医学部 腎臓内科学講座 助手 糸球体足細胞（ポドサイト）の研究に従事 平成 28 年 3 月 順天堂大学大学院医学研究科 医学専攻課程 腎臓内科学 博士課程修了 ポドサイトにおけるポドシンのエンドサイトーシスについての研究 学位論文：Sorting Nexin 9 facilitates podocin endocytosis in the injured podocyte (Scientific Reports) 平成 24 年 4 月 The 9th International Podocyte Conference Scholarship, The Neph Cure Foundation

1. 研究の概要

本研究は糸球体足細胞（ポドサイト）の障害機序を明らかにすることを目的としており、SNX9発現抑制細胞や過剰発現細胞における検討を行い、またNPC2とポドシンの相互作用について検討する予定であった。糸球体足細胞障害の最終段階である糸球体硬化において、細胞内蛋白の Rac1とmTOR が足細胞の構造を維持し、糸球体硬化を抑制することを論文化することができた。また、蛋白分解酵素であるカテプシンLは腎障害時にポドサイトで発現が亢進しスリット膜や細胞骨格関連蛋白を過剰に分解し蛋白尿をもたらすことが知られているが、ネフローゼ・糸球体硬化モデルであるピューロマイシン腎症ラットにおいて、カテプシンLの発現が亢進しているが、カテプシンLの阻害物質であるシスタチンCの発現とは一致しないことを論文化した。

2. 研究の動機、目的

腎臓糸球体足細胞間に存在するスリット膜の異常は、蛋白尿を出現させ、ひいては持続的な糸球体障害に基づく不可逆性の腎障害を誘導する。我々のグループは、足細胞障害時に、スリット膜蛋白の一つであるポドシンがエンドサイトーシスにより足細胞内で局在変化することを、腎障害モデルラットと IgA 腎症の腎生検検体にて見出した(Cell Tissue Res. 360:391-400, 2015)。さらに yeast two hybrid 法を用いて、ポドシンと接着する蛋白質の同定を行い、エンドサイトーシスの制御蛋白である Sorting Nexin 9 (SNX9) を糸球体上皮細胞で初めて同定した。ネフローゼを呈する糸球体腎炎は、微小変化群に認める可逆的な変化から、巣状糸球体硬化症に認める不可逆的な変化を引き起こすものまで多彩である。可逆的病態では、SNX9 の発現は弱くポドシンとは一致しなかった。一方、不可逆的病態においては SNX9 の発現が著しく強くなり、ポドシンと極めてよく一致することが明らかとなった。今回の研究で SNX9 の機能的役割をさらに詳細に調べるため、発現抑制あるいは過剰発現細胞における検討を行う予定と

した。そのうえで、SNX9 の発現欠失マウスを作成し、糸球体硬化モデルを惹起しその病態の進行を詳細に観察することで、蛋白質の役割を解析したいと考えた。

さらに yeast two hybrid 法にてポドシンと接着する蛋白質として Niemann-Pick Disease Type C2 (NPC2) にも注目しており、検討を行う予定とした。NPC2 は後期エンドソーム/ライソゾームからのコレステロール等の脂質輸送に関与している蛋白で、NPC2 の遺伝子変異によりライソゾーム内に遊離型コレステロール、糖脂質が蓄積するライソゾーム病であるニーマンピック病が引き起こされる。SNX9 および NPC2 の解析により足細胞におけるエンドサイトーシスを含めたメンブレントラフィックの経路を明らかにし、正常状態における機能の解明を行う。さらに、ネフローゼに伴う不可逆的病態形成のメカニズムを明らかにすることは、治療薬開発の突破口となる可能性を秘めており、難治性ネフローゼから慢性腎不全へと移行する患者数を減少させるための基盤研究として重要と考えた。

3. 研究の結果

糸球体足細胞障害の最終段階である糸球体硬化において、細胞内蛋白の Rac1 と mTOR が足細胞の構造を維持し、糸球体硬化を抑制することを論文化することができた。Rac1 のポドサイト特異的ノックアウトマウスにおいてネフローゼ・糸球体硬化モデルであるアドリアマイシン腎症を引き起こすと、硬化糸球体が増加し糸球体上のポドサイトの数はコントロールマウスと Rac1 ノックアウトマウスで差はないにもかかわらず、その細胞の大きさは Rac1 ノックアウトマウスでは小さくなっていった。さらに Rac1 と細胞の大きさに関するキナーゼタンパクの mTOR との関係性を調べ、コントロールマウスにアドリアマイシンを投与するとポドサイトにおいて mTOR の活性化が見られたが、Rac1 ノックアウトマウスでは抑えられており、ポドサイトが障害を受けると Rac1 が存在することで mTOR が活性化され、ポドサイトの大きさが保持される分子メカニズムが明らかになった。また、蛋白分解酵素であるカテプシン L は腎障害時にポドサイトで発現が亢進しスリット膜や細胞骨格関連蛋白を過剰に分解し蛋白尿をもたらすことが知られているが、ネフローゼ・糸球体硬化モデルであるピューロマイシン腎症ラットにおいて、カテプシン L の発現が亢進しているが、カテプシン L の阻害物質であるシスタチン C の発現とは一致しないことを論文化した。蛋白分解酵素とその阻害物質の分泌のバランス変化が糸球体基底膜からの糸球体足細胞の脱落だけでなく、糸球体の透過性亢進につながる糸球体基底膜分解を誘発する可能性があると考えている。

4. これからの展望

当初目的としていた、SNX9 および NPC2 の機能的役割を詳細に調べるため、SNX9 の過剰発現モデルを作成し培養足細胞における SNX9 の役割を解析し、足細胞特異的な SNX9 knock out マウスを作成し、足細胞における SNX9 の役割を解明する。正常状態での様子をスリット膜関連蛋白質、足細胞骨格形成の蛋白質、エンドサイトーシス関連蛋白質との発現を蛍光免疫染色と Western Blot 法において解析する。さらにアドリアマイシン投与により糸球体硬化を誘発し、上記蛋白質の動態を評価する予定である。

また NPC2 に関しては、ポドシンの相互作用について検討する。ポドシンとの HEK T293 細胞での遺伝子導入後の共免疫沈降法による結合を確認できており、本研究ではポドシンとの足細胞内因性蛋白質での共免疫沈降法による結合の確認、さらにポドシンの蛋白精製を行い、直接相互作用があるかを確認する。本研究でえられた結果は、学内の研究協力者と適宜討論を行い、研究成果を学会、欧米紙等に随時発表していくことを考えている。

5. 社会に対するメッセージ

学術研究は、人文・社会・自然科学のあらゆる学問分野における幅広い知的創造の活動である。創薬をターゲットとした臨床研究も重要であるが、その基盤となる基礎研究への理解、支援を期待したい。