

糸球体上皮細胞障害時における接着阻害分子

ポドカリキシンとアダプター蛋白の役割

(課題番号 16590783)

平成 16 年度～平成 17 年度

科学研究費補助金基盤研究(C)

研究成果報告書

平成 18 年 3 月

新潟大学附属図書館



2060005909

研究代表者 竹 田 徹 朗

(新潟大学 医歯学総合病院 第二内科 助手)

## はしがき

糸球体上皮細胞障害が蛋白尿の出現、分節性糸球体硬化、不可逆的な腎機能廃絶につながるということが明らかにされつつある。すなわち非分裂細胞であるが故にその障害こそが腎機能障害進展の鍵と考えられる。これまで私たちは糸球体上皮細胞の頂側に発現している陰性荷電分子ポドカリキシンは、アダプター蛋白(エズリン、NHERF2)を介して細胞内骨格と密接に繋がっており、腎臓の濾過機能を保つのに寄与していることを報告してきた。また、糸球体上皮細胞障害とポドカリキシンの細胞内骨格からの解離が連関していることを見いだした。従ってその結合・解離メカニズムを明らかにすることは糸球体上皮細胞障害解明につながる。

本研究「糸球体上皮細胞障害時における接着阻害分子ポドカリキシンとアダプター蛋白の役割」において私たちは、1)これら3分子(ポドカリキシン/NHERF2/エズリン)のリン酸化状態が複合体の安定性に関連するかを明らかにし、2)NHERF2のPDZ1に結合する蛋白を同定し、複合体安定に寄与するかどうか解析した。次に培養糸球体上皮細胞を用いてポドカリキシン・アダプター蛋白複合体に対するアンジオテンシン II(AII)の役割を検討した。続いて強制発現系を用いてアダプター蛋白・アクチン細胞内骨格複合体に対するポドカリキシンの役割を検討した。

以下に主な成果の概略を列挙する。

### 1 ポドカリキシン/NHERF2/エズリン分子のリン酸化状態と糸球体障害との関係

ポドカリキシンの細胞内ドメイン、NHERF2、エズリンはいずれもリン酸化を受けるアミノ酸残基が存在する。正常ラットおよび腎臓病モデルラットの腎糸球体を単離した後、それぞれの蛋白を免疫沈降法および低圧クロマトグラフィーを用いて精製し、リン酸化蛋白を検出するシステムを用いて病的状態でのそれぞれのリン酸化の変動を検討した。病的状態ではエズリンは脱リン酸化を受け、同時に複合体から解離していた。

### 2 アダプター蛋白 NHERF2 の PDZ1 に結合する蛋白の同定

NHERF2の1番目のPDZドメイン(PDZ1)に結合する蛋白を同定するため、酵母2ハイブリッドシステムとラット糸球体由来cDNAライブラリーを用いて、NHERF2のPDZ1領域cDNAをbaitとしてスクリーニングを行った。得られた陽性クローンcDNAのシークエンスを決定したところ、NHERF2のPDZ1そのものであった。GST pull-down法と免疫共沈によりNHERF2のPDZ1同士が結合することを確認した。病的状態のラット腎糸球体においてはその結合が減弱していた。

### 3 培養糸球体上皮細胞の形質評価

これまで糸球体上皮細胞の安定した培養細胞系がなかったが、Dr. Mundelによりマウス由来温度感受性糸球体上皮細胞が樹立された。同細胞を供与して頂き、まず生体内の糸球

体上皮細胞と同様の機能を発現しているかを評価した。ハイマン腎炎責任抗原メガリンがこの分化状態の培養細胞に発現し、かつエンドサイトーシス受容体として生体内と同様に機能していることを確認した。

#### 4 培養系球体上皮細胞におけるポドカリキシン・アダプター蛋白・アクチン複合体の相互作用に対する AII の効果

AII、AII 拮抗薬添加の有無によりポドカリキシンと免疫共沈するアダプター蛋白(エズリン、NHERF2)の量を検討したところ、AII 依存的にこれらの複合体が解離することが明らかとなった。

#### 5 ポドカリキシンの強制発現によるアダプター蛋白・アクチン複合体が再構築

MDCK 培養細胞にポドカリキシンを強制過剰発現するとアダプター蛋白の再構築(頂側への再分布)が認められた。また、細胞内骨格のシグナルに関与する RhoA が活性化していた。これらよりポドカリキシンを強制発現すると RhoA が活性化され、エズリン、NHERF2 の頂側への再分布が行われると考えられる。

得られた成果の詳細は本冊子に示す通りであるが、読まれた方々のご批判、ご叱正を頂ければ幸いである。

## 研究組織

研究代表者：竹田 徹朗 (新潟大学医歯学総合病院 助手)

研究分担者：斎藤 亮彦 (新潟大学大学院医歯学総合研究科 客員助教授)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	3000	0	3000
平成 17 年度	700	0	700
総計	3700	0	3700

## 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし

## 研究成果

次ページ以降の研究発表をもって研究成果報告に代える。

研究発表

(1) 学会誌等

Hajime yamazaki, Akihiko Saito, Hidemi Ooi, Naoto kobayasi, Peter Mundel, Fumitake Gejyo:

Differentiation-Induced Cultured Podocytes Express Endocytically Active Megalin, a Heymann Nephritis Antigen

Nephron Exp Nephrol.2004;96(2):e52-58

斎藤 亮彦、竹田 徹朗、田沼 厚人、濱 ひとみ、佐藤 聖子、高田 拓磨、田中 由紀子、鈴木 芳樹、下条 文武：

高血圧合併糖尿病患者におけるニルバジピンの抗酸化作用

新薬と臨床 53(9) : 25-33(2004)

Hitomi Hama, Akihiko Saito, Teturo Takeda, Atuhito Tanuma, Yuansheng Xie, Kitoko Sato, Junichiro J. Kazama, Fumitake Gejyo:

Evidence Indicating that Renal Tubular Metabolism of Leptin is Mediated by Megalin but not by the Leptin Receptors.

Endocrinology. 2004 Aug;145(8):3935-40.

Yuansheng Xie, Sinichi Nishi, Sachiko Fukase, Hiroaki Nakamura, Aiangmei Chen, Naofuni Imai, Minoru Sakatsume, Akihiko Saito, Mitsuhiro Ueno, Ichiei Narita, Toshio Yamoto, Fumitake Gejyo:

Different type and localization of CD44 on surface membrane of regenerative renal tubular epithelial cells *in vivo*.

American Journal of Nephrology 2004;24(2):188-97.

Sandra Schmieder , Masaaki Nagai , Robert A. Orlando , Testsuro Takeda , Marilyn G. Farquhar :

Podocalyxin Activates RhoA and Induces Actin Reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK Cells.

Journal of the American Society of Nephrology 15: 2289-2298, 2004

竹田 徹朗、鈴木 芳樹、下条 文武：  
糖尿病性腎症の予防と治療戦略  
糖尿病と妊娠 4：8-13 (2004)

斎藤 亮彦、竹田 徹朗、下条 文武：  
Heymann 腎炎  
腎と透析 57(6)：733-6 (2004)

Akihiko Saito , Tetsuro Takeda , Kiyoko Sato , Hitomi Hama , Atsuhito Tanuma ,  
Ryohei Kaseda , Yoshiki Suzuki , Fumitake Gejyo :  
Significance of Proximal Tubular Metabolism of Advanced Glycation End Products in  
Kidney Diseases.  
The Annals of the New York Academy of Sciences 1043:637-643 (2005)

Yuko Oyama , Tetsuro Takeda , Hitomi Hama , Atsuhito Tanuma , Noriaki Iino , Kioko  
Sato , Ryohei Kaseda , Kunihiro Mizuta, Fumitake Gejyo , Akihiko Saito :  
Evidence for megalin-mediated proximal tubular uptake of L-FABP , a carrier of  
potentially nephrotoxic molecules.  
Laboratory Investigation (2005) 85, 522-531

Akihiko Saito , Tetsuro Takeda , Hitomi Hama , Yuko Oyama , Kiyoko Hosaka ,  
Atsuhito Tanuma , Ryohei Kaseda , Mitsuhiro Ueno , Shinichi Nishi , Shinya  
Ogasawara , Fumio Gondaira , Yoshiki Suzuki , Fumitake Gejyo :  
Role of megalin , a proximal tubular endocytic syndrome-related nephropathies: protein  
metabolic overload hypothesis.  
NEPHROLOGY 2005; 10,S26-S31

竹田 徹朗：  
腎糸球体上皮細胞の形態および機能保持に関する抗接着分子ポドカリキシンと  
そのアダプター蛋白との相互作用の重要性  
上原記念生命科学財団研究報告集 18:360-2(2004)

斎藤 亮彦、竹田 徹朗：  
エンドサイトーシス受容体メガリン：糖尿病性腎症・メタボリック症候群関連  
腎症および尿毒症病態における役割  
新潟医学会雑誌別刷 119 (1)：1-9 (2005)

竹田 徹朗、下条 文武：  
HIVに伴う腎症  
腎と透析 臨時増刊号：509-17 (2005)

竹田 徹朗、齋藤 亮彦、下条 文武：  
メガリン・キュービリン：尿細管での蛋白再吸収における役割  
日本臨床 64 (増刊 2)：332-8 (2006)

(2) 口頭発表

齋藤 亮彦：  
細胞移植による腎機能の再生  
第 92 回 日本泌尿器科学会総会  
2004.4.10～13 大阪

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、濱 ひとみ、田沼 厚人、佐藤 聖子、永井 雅昭、鈴木 芳樹、竹内 正義、山岸 正一、堀内 正公、下条 文武：  
各種 AGE の結合・細胞取り込みに関わる近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンの役割  
第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会  
2004.5.13～15 東京

竹田 徹朗、齋藤 亮彦、下条 文武：  
糖尿病による血管内皮細胞における接着阻害分子 podocalyxin/CD34 の役割  
第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会  
2004.5.13～15 東京

齋藤 亮彦、濱 ひとみ、佐藤 聖子、田沼 厚人、永井 雅昭、竹田 徹朗、下条 文武：  
水晶発振子マイクロバランス法 (AffinixQ) を用いたメガリンの尿毒素リガンドとの結合解析  
第 47 回日本腎臓学会 学術総会  
2004.5.27～29 栃木

竹田 徹朗、永井 雅昭、斎藤 亮彦、下条 文武：

糸球体上皮の形態保持におけるアダプター蛋白 NHERF2 の役割

第 47 回日本腎臓学会 学術総会

2004.5.27-29 栃木

田沼 厚人、斎藤 亮彦、濱 ひとみ、佐藤 聖子、永井 雅昭、竹田 徹朗、吉田 豊、  
戸田 年総、堀内 正公、下条 文武：

ラミニンA鎖コア蛋白は advanced glycation end product (AGE)結合性を有する

第 47 回日本腎臓学会 学術総会

2004.5.27-29 栃木

永井 雅昭、竹田 徹朗、斎藤 亮彦、下条 文武：

メガリンのエンドサイトーシスにおけるアダプター蛋白 ARH の役割

第 47 回日本腎臓学会 学術総会

2004.5.27-29 栃木

佐藤 聖子、斎藤 亮彦、竹田 徹朗、濱 ひとみ、田沼 厚人、永井 雅昭、鈴木  
芳樹、下条 文武：

近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンによる各種 AGE の結合および細  
胞内取り込み機構

第 47 回日本腎臓学会 学術総会

2004.5.27-29 栃木

濱 ひとみ、竹田 徹朗、田沼 厚人、佐藤 聖子、永井 雅昭、下条 文武、斎藤 亮  
彦：

メガリン-キュビリン共役系の解析：トランスフェリン取り込みに関与するキュ  
ビリンの機能的領域の同定

第 47 回日本腎臓学会 学術総会

2004.5.27-29 栃木

斎藤 亮彦：

糖尿病性腎症の発症機序と対策

2004 年 上越地区糖尿合併腎症研究会

2004.7.3 上越

齋藤 亮彦：

エンドサイトーシス受容体メガリン：糖尿病性腎症および尿毒症病態における役割と臨床的応用性

第 604 回新潟医学会

2004.7.17 新潟

Saito A, Sato K, Takeda T, Tanuma A, Hama H, Nagai M, Takeuchi M, Horiuchi S, Gejyo F:

Cellular uptake of Glyceraldehyde-and Glycolaldehyde-modified AGE via mwgalin, a proximal tubular endocytosis receptor.

8th International symposium on the Maillard Reaction

2004.8.28-9.1 Charleston, U.S.A

佐藤 聖子、竹田 徹朗、田沼 厚人、濱 ひとみ、俣田 亮平、今井 直史、鈴木 芳樹、下条 文武、齋藤 亮彦：

近位尿細管上皮細胞におけるアルデヒド由来 AGE の取り込み・代謝機構とメガリンの役割

第 11 回新潟糖尿病性腎症研究会

2004.9.16 新潟

齋藤 亮彦：

近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンを介する AGE 代謝経路：治療のターゲットとなるか？

第 19 回日本糖尿病合併症学会

2004.10.2-3 横浜

齋藤 亮彦：

糖尿病の薬物療法

三市中蒲東蒲医師会学術講演会

2004.10.13 新潟

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、田沼 厚人、濱 ひとみ、佐藤 聖子、永井 雅昭、鈴木 芳樹、下条 文武：

高血圧合併糖尿病患者におけるニルバジピンの抗酸化作用

第 34 回日本腎臓学会東部学術大会

2004.11.5-6 東京

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、佐藤 聖子、濱 ひとみ、田沼 厚人、俣田 亮平、下条 文武、竹内 正義、鈴木 芳樹：

培養近位尿細管上皮細胞を用いたアルデヒド由 AGE の取り込み経路の検討

第 16 回日本糖尿病性腎症研究会抄録集

2004.12.4-5 東京

齋藤 亮彦：

実験膜性腎症抗原メガリン：エンドサイトーシス受容体としての特性と病的役割

新潟県医師会生涯教育講座 大学院特別講義

2005.1.24 新潟

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、小山 裕子、濱 ひとみ、田沼 厚人、保坂 聖子、俣田 亮平、上野 光博、西 慎一、鈴木 芳樹、下条 文武：

メタボリック症候群に関連する腎症：蛋白代謝過剰負荷の分子機構

第 11 回 動脈硬化症成因治療研究会

2005.3.11 新潟

Akihiko Saito, Tetsuro Takeda, Hitomi Hama, Yuko Oyama, Kiyoko Sato, Atsuhito Tanuma, Ryohei Kaseda, Mitsuhiro Ueno, Shinichi Nishi, Yoshiki Suzuki, Fumitake Gejyo:

Role of megalin, a proximal tubular endocytotic receptor, in the pathogenesis of diabetic and metabolic syndrome-related nephropathies.

The 3rd Korea-Japan Nephrology Forum

2005.3.19 韓国

齋藤 亮彦、下条 文武：

メガリン発現細胞を用いた透析アミロイドーシスの予防法を開発するための基礎的検討

厚生労働省 特定疾患対策研究事業 平成 14 年度 合同研究報告会

2003.1.30-31 東京

濱 ひとみ、斎藤 亮彦、竹田 徹朗、田沼 厚人、保坂 聖子、悴田 亮平、鈴木 芳樹、下条 文武：

腎臓におけるレプチンの代謝と作用機序

第9回 新潟県糖尿病勉強会

2005.4.16 新潟

佐伯 敬子、斎藤 亮彦、山崎 肇、上野 光博、宮村 祥二、下条 文武：

IgG4 関連リンパ球、形質細胞増殖性疾患

第49回 日本リウマチ学会総会・学術集会

2005.4.17-20 横浜

斎藤 亮彦、竹田 徹朗、濱 ひとみ、小山 裕子、田沼 厚人、佐藤 聖子、悴田 亮平、鈴木 芳樹、下条 文武：

メガリンを介するレプチン、L-FABP の近位尿細管での取り込み代謝：糖尿病・メタボリック症候群における腎代謝負荷機構

第48回日本糖尿病学会年次学術集会

2005.5.12-14 神戸

斎藤 亮彦、上野 光博、西 慎一、深瀬 幸子、森 穂波、井口 清太郎、今井 直史、竹田 徹朗、鈴木 芳樹、下条 文武：

非免疫性糸球体肥大を呈する症例の臨床病態解析：メタボリック症候群関連腎症？

第48回日本腎臓学会学術総会

2005.6.23-25, 2005.7.9-10 横浜・新潟

斎藤 亮彦、竹田 徹朗、小山 裕子、濱 ひとみ、田沼 厚人、下条 文武：

近位尿細管における蛋白再吸収・代謝機構とメガリンの役割

第48回日本腎臓学会学術総会

2005.6.23-25, 2005.7.9-10 横浜・新潟

竹田 徹朗、小山 裕子、濱 ひとみ、田沼 厚人、悴田 亮平、佐藤 聖子、下条 文武、斎藤 亮彦：

肝から血中に放出された肝型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) の腎臓への集積機序

第48回日本腎臓学会学術総会

2005.6.23-25, 2005.7.9-10 横浜・新潟

Tetsuro Takeda, Marilyn G Farquhar:

Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein, podocalyxin.

第 48 回日本腎臓学会学術総会

2005.6.23-25, 2005.7.9-10 横浜・新潟

齋藤 亮彦:

エンドサイトーシス受容体メガリンを利用した腹膜透析合併症の予防法の開発  
2004 年度 腹膜機能リサーチ 研究報告会

2005.7.2 東京

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、小山 裕子、濱 ひとみ、田沼 厚人、保坂 聖子、悴田 亮平、細島 康宏、飯野 則昭、鈴木 芳樹、下条 文武:

メタボリックシンドロームに関連する腎症と高血圧の発症機序: 蛋白代謝過剰負荷仮説

第 12 回新潟糖尿病性腎症研究会

2005.9.15 新潟

竹田 徹朗、成田 一衛、上野 光博、西 慎一、近藤 大介、坂爪 実、風間 順一郎、丸山 弘樹、齋藤 亮彦、下条 文武、濱 齊:

腎障害合併高血圧症患者の蛋白尿に対するシルニジピンの効果

第 28 回日本高血圧学会総会

2005.9.15-17 旭川

齋藤 亮彦:

尿酸代謝と腎-メタボリックシンドロームの観点から-

第 3 回 新潟尿酸代謝フォーラム ミニレクチャー

2005.10.13 新潟

Teturo Takeda, Kiyoko Hosaka, Asako Kobayasi, Ryohei Kaseda, Fumitake Gejyo, Akihiko Saito:

Non-Muscle Myosin Heavy Chain II A Is Involved in Endocytosis of Megalin through the Interaction with Dab2 in Proximal Tubular Cells

38th Annual Meeting and Scientific Exposition.

2005.11.10-13 Pennsylvania, U.S.A

齋藤 亮彦：

ARI-Diabetes Complications Trial(ADCT)結果報告

新潟糖尿病合併症フォーラム

2005.11.12 新潟

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、永井 雅昭、下条 文武：

エンドサイトーシス受容体メガリンと関連分子の相互作用：腎臓の蛋白代謝とその病態

文部科学省 科学研究費補助金 特定領域研究 「メンブレントラフィック-分子機構から高次機能への展開-」 第3回全体班会議

2005.11.16-19 群馬

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、小林 麻子、小山 裕子、濱 ひとみ、田沼 厚人、保坂 聖子、倅田 亮平、細島 康宏、飯野 則昭、上野 光博、西 慎一、鈴木 芳樹、下条 文武：

メタボリックシンドローム関連腎症の病態：蛋白代謝過剰負荷説

第17回 日本糖尿病性腎症研究会

2005.12.3-4 東京

齋藤 亮彦：

尿毒素蛋白代謝を目的とした腎臓機能再生

ハニカムフィルムのメディカル応用に関するフォーラム

2005.12.8 札幌

齋藤 亮彦：

近位尿細管のエンドサイトーシス機構と関連疾患

関東小児腎臓研究会

2005.12.10 東京

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、下条 文武：

尿毒素蛋白を目的とした細胞移植療法の基礎検討

新潟細胞・再生療法シンポジウム

2006.1.28 新潟

竹田 徹朗、成田 一衛、下条 文武：

糖尿病性腎症による慢性腎不全を合併したキサントチン尿症Ⅱ型の一例

第39回日本痛風・核酸代謝学会総会

2006.2.9～10 京都

齋藤 亮彦：

メタボリックシンドロームと腎障害

第15回糖尿病性腎症セミナー

2006.2.15 岡山

### (3) 出版物

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、山本 卓、下条 文武：

AGEs と腎不全、透析アミロイドーシスおよびメガリン

AGEs 研究の最前線-糖化蛋白関連疾患研究の現状- (今泉 勉 監修, 山岸 昌一  
編集), メディカルレビュー社・東京

163-9, 2004

竹田 徹朗、下条 文武：

糸球体上皮細胞でのポドカリキシンの役割

Annual Review 腎臓 2004 (伊藤 克己、遠藤 仁、御手洗 哲也、東原 英二、秋  
澤 忠男 編), 中外医学社・東京

9-14, 2004

齋藤 亮彦：

生体機能分子のトランスレーショナルリサーチ

新潟大学アイソトープ総合センターニュース No.8 2004

齋藤 亮彦、竹田 徹朗、下条 文武：

腎外性β2-ミタログロブリン代謝の可能性

Annual Review 腎臓 2005 (伊藤 克己、遠藤 仁、御手洗 哲也、東原 英二、秋  
澤 忠男 編), 中外医学社・東京

121-5, 2005

斎藤 亮彦、竹田 徹朗：

糖尿病性腎症治療の最近の進歩- 1. 近位尿細管エンドサイトーシス受容体メカ  
リンを介する AGE 代謝経路：治療のターゲットとなるか？-

糖尿病合併症 19 (2), 株式会社 メディカル・ジャーナル社  
145-7, 2005