博 士 論 文 の 要 旨 及 び 審 査 結 果 の 要 旨

氏　　　名　　高村　紗由里
学　　　位　　博士（医学）
学 位 記 番 号　　新大院博（医）第　927　号
学位授与の日付　　令和２年３月23日
学位授与の要件　　学位規則第４条第１項該当
博 士 論 文 名　　Partitioning-Defectiveness-6-Ephrin-B1 Interaction Is Regulated by Nephrin-Mediated Signal and Is Crucial in Maintaining Slit Diaphragm of Podocyte
（Par-6 と ephrin-B1 の相互作用は nephrin を介するシグナルにより制御され、ポドサイトスリット膜の維持に重要である。）

論文審査委員　　主査　教授　神吉　智丈
副査　教授　味岡　洋一
副査　准教授　後藤　眞

博士論文の要旨

目的：腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の細胞間接着装置であるスリット膜は、蛋白尿発症を防ぐためのバリアとして機能している。多くの糸球体疾患における蛋白尿はスリット膜の傷害に起因しており、これまで nephrin、NEPH1、 podocin などのスリット膜関連分子が同定されている。しかしながら、これらの分子のスリット膜における構成や、スリット膜障害のメカニズムの詳細は未だ明らかではない。申請者らは、以前、Ephrin-B1 がスリット膜機能分子である nephrin と細胞外ドメインを介して相互作用し、スリット膜の機能維持に重要な役割を果たすことを報告した。今回申請者らは、ポドサイト特異的 Ephrin-B1 KO マウス糸球体の次世代シークエンサーを用いた網羅的解析により、Par-6 の mRNA 発現低下を見出し、このことから Par-6 のスリット膜における役割、Ephrin-B1 との相互作用に注目した。Par-6 は、上皮細胞の極性形成を担う tight junction 関連分子の一つで、Par-3、aPKC と複合体を形成することが知られている。本研究では、スリット膜における Ephrin-B1 と Par-6 の相互作用ならびに、スリット膜の機能維持における役割を明らかにすることを目的とした。

方法：ポドサイト特異的 Ephrin-B1 KO マウスにおける Par-6 の発現をリアルタイム PCR、免疫蛍光法（IF）を用いて検討した。マウス培養ポドサイトに Par-6 siRNA を導入し、Par6 ノックダウンによるポドサイトの変化を、ローダミンファロイジン染色により検討した。ヒト、正常ラットの腎糸球体における Par-6 の発現を IF、透過型電子顕微鏡で検討した。抗 nephrin 抗体（Anti-nephrin-antibody：ANA）をラットに静注しスリット膜特異的傷害モデル（ANA 腎症）を作製し、静注 1h 後と蛋白尿がピークとなる day5 に腎を摘出し、糸球体における Par-6、Par-3、ephrin-B1、 nephrin の発現動態を免疫蛍光法（IF）により解析した。HEK 細胞強制発現系を用いた免疫沈降反応により Par-6、Par-3、ephrin-B1、nephrin の相互作用を解析した。

結果：ポドサイト特異的 Ephrin-B1 KO マウス糸球体において Par-6 mRNA 発現量の低下、IF において

Par-6 染色強度の低下を認めた。Par-6 siRNA を導入したマウス培養ポドサイトでは、ローダミンファロイジン染色でアクチン線維の変化を認めた。またヒト、ラット糸球体の免疫蛍光染色で Par-6 は係蹄壁に沿い染色され、電子顕微鏡では主にスリット膜部に発現を認めた。二重染色 IF では、Par-6 は Ephrin-B1 と、Par-3 は nephrin と大部分が共局在していた。HEK 細胞強制発現系を用いた免疫沈降法では、Par-6 は ephrin-B1 と、Par-3 は nephrin と相互作用し、一方 Par-6、 Par-3 はそれぞれ nephrin、ephrin-B1 とは相互作用しなかった。ANA 腎症誘導後 1h の糸球体で既に Par-6 と ephrin-B1 の染色強度の低下を認め、蛋白尿量がピークとなる day5 では染色強度の回復を認めた。一方 Par-3 と nephrin は day5 で染色強度の著明な低下を認めた。これより Par-6 が ephrin-B1 と、Par3 が nephrin と病態形成において動態が一致することが示された。二重染色による解析で、1h では残存する Par6 と nephrin の乖離が、day5 では Par3 と nephrin、Par6 と nephrin の乖離を認めた。以上から、Par-6/ephrin-B1 複合体と Par-3/nephrin 複合体は、病態形成初期から乖離がはじまり、蛋白尿ピーク時にはこれら 4 つの分子が乖離することが示された。HEK 細胞の 2 分子強制発現系における免疫沈降法の解析で、EphB2 刺激によりリン酸化された EphrinB1 と Par-6 は相互作用せず、nephrin とも相互作用しなかった。また Par-3 は、非リン酸化 nephrin とは相互作用するが、抗 nephrin 抗体によりリン酸化された nephrin とは、相互作用しなかった。Par-6、nephrin、ephrin-B1 の 3 分子を強制発現させた HEK 細胞では、抗 nephrin 抗体の結合により nephrin のみならず ephrin-B1 もリン酸化され、リン酸化した ephrin-B は Par-6、nephrin とは相互作用しなかった。nephrin の刺激は nephrin のリン酸化のみならず ephrin-B のリン酸化を促しそれにより ephrin-B1 と Par-6、nephrin の相互作用が抑制されることが示された。

考察・結論：Par-6 はスリット膜に発現しており、ポドサイトの骨格維持に関与していると考えられた。スリット膜において Par-6 は ephrin-B1 と、Par3 は nephrin と複合体を形成し、これら 4 つの分子は、ephrin-B1 と nephrin が細胞外ドメインで結合し、細胞内でそれぞれ Par-6、Par-3 と結合することで複合体を形成していると考えられる。抗 nephrin 抗体による nephrin のリン酸化、それに引き続く ephrin-B1 のリン酸化により、これら 4 つの分子が乖離することがスリット膜障害、蛋白尿の発症に関与していると考えられた。

審査結果の要旨

多くの糸球体疾患における蛋白尿は腎糸球体ポドサイトの細胞間接着装置であるスリット膜の傷害に起因していると考えられているが、スリット膜の分子構造、障害のメカニズムの詳細は明らかではない。本研究は、スリット膜の機能分子である Ephrin-B1 をポドサイト特異的に KO マウス糸球体で Par-6 の発現が著明に低下していることを見出し、Par-6 のスリット膜における役割、Ephrin-B1 との相互作用の解析を行った。培養ポドサイトに Par-6 をノックダウンした系の検討を行い、Par-6 はポドサイトの骨格形成に関与していることを示した。正常、ネフローゼ症候群モデルにおける Par-6、Ephrin-B1 並びに他の Par 複合体構成分子である Par-3、他のスリット膜機能分子である Nephrin の発現動態、４分子の相互作用を解析した。Par-6 はスリット膜に発現しており、スリット膜において Par-6 は Ephrin-B1 と、Par3 は Nephrin と複合体を形成し、これら 4 つの分子は、Ephrin-B1 と Nephrin が細胞外ドメインで結合し、細胞内で Par-6、Par-3 と結合することで複合体を形成していることを明らかにした。Nephrin 刺激により誘導されたネフローゼ症候群モデルでは、Nephrin のリン酸化、それに引き続く Ephrin-B1 のリン酸化により、4 分子複合体が乖離し、この変化が蛋白尿の発症に関与していることを示した。

スリット膜における Par-6 の重要性を初めて提示し、Par-6、Nphrin-B1 結合の乖離が蛋白尿発症の初期イベントとして重要であることを示した点に、学位論文としての価値を認める。