

論文名 : Par-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。)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 高村 紗由里

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ケ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 は糸球壁に沿って染色され、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、

【別紙2】

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。

