

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業  
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation
- 研究開発課題名： (日本語) 腎糸球体ポドサイトのメカノバイオロジーの解明と糸球体内圧評価法の開発  
(英語) Elucidation of the mechanobiology of renal glomerular podocytes and development of evaluation method for intraglomerular pressure
- 研究開発担当者 (日本語) 順天堂大学大学院医学研究科解剖学・生体構造科学専攻 准教授 長瀬 美樹  
所属 役職 氏名： (英語) Juntendo University Faculty of Medicine, Department of Anatomy and Life Structure, Associate Professor, Miki Nagase
- 実施期間： 平成28年10月 1日 ～ 平成29年 3月31日
- 分担研究 (日本語)  
開発課題名： (英語)
- 研究開発分担者 (日本語)  
所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

近年、慢性腎臓病（CKD）が新たな国民病として注目されている。CKDの原因としては、糖尿病や高血圧などに伴う腎糸球体ポドサイト傷害が重要である。ポドサイトはアクチン細胞骨格が発達した細胞で、傷害刺激が加わると足突起のアクチン束の断片化、足突起退縮、スリット膜消失といった形態変化とともに蛋白尿を生じる。糸球体基底膜からはがれ落ちると、残存ポドサイトは再生能を持たないため細胞体を広げて基底膜を覆うが、覆いきれなくなると糸球体硬化病変の進展をトリガーする。

培養ラット・ヒトポドサイト細胞株を分化型条件で培養してタイプ I コラーゲンでコートしたシリコンチャンバーにまき、培養細胞伸展装置を用いて一方向性の周期的伸展刺激（0.5 Hz、10%伸展）を負荷した。遺伝子発現は real time qPCR にて、蛋白発現は Western にて、Rac1 活性は GST pull down assay にて解析した。

多種のポドサイト株の中からメカノ応答性の良好な細胞株としてラット C7 株を選定した。C7 株では ERK のリン酸化が認められ、伸展方向と垂直に細胞が配向した。ポドサイト関連分子や細胞骨格関連分子、圧応答関連分子の発現プロファイルは、細胞株やその分化状態により大きく異なっており、C7 株では TRPC6 の遺伝子発現が他の細胞株に比し 100 倍以上と高く、メカノセンサー・トランスデューサーとして作用しうる Piezo 1、Piezo 2 分子、ネフリン、シナプトポディンなどのポドサイト特異的分子、鋳質コルチコイド受容体が高発現していた。伸展負荷により早期に低分子量 G 蛋白質 Rac1 の著明な活性化を認め、鋳質コルチコイド受容体 (MR) 関連分子 (Sgk1、PAI-1、MCP-1 など) の発現が誘導され、スリット膜構成蛋白ネフリンやアクチン結合蛋白シナプトポディンの発現が低下した。Rac 阻害薬 EHT1864 により Sgk1、PAI-1、MCP-1 などの誘導、ネフリン発現低下はいずれも抑制された。今回観察された細胞培養系での反応 (Rac1-MR シグナル活性化) は、研究代表者がこれまで生活習慣病関連糸球体障害モデルで報告してきた生体での変化を再現しており、生体モデルで観察された Rac1 活性化、Sgk1、PAI-1、MCP1 などの誘導について、少なくとも一部はメカニカルストレスを受けたポドサイトにおける変化であることが示唆された。次年度は本系を用いてメカニカルストレスのセンシング・応答機構の解明を進めていく。

## 英文

Renal glomerular podocyte injury is implicated in the pathogenesis of proteinuria and glomerulosclerosis associated with diabetes, hypertension, and metabolic syndrome. Podocytes have well-organized actin cytoskeletal architecture, and when injured, proteinuria occurs together with morphological changes such as fragmentation of the actin bundles, effacement of foot processes, and loss of slit diaphragm. When podocytes detach from the glomerular basement membrane, the remaining podocytes spread their cell body to cover the basement membrane, which triggers the development of the glomerulosclerotic lesion.

Podocytes are known to be susceptible to mechanical stresses in clinical conditions such as glomerular hypertension, hyperfiltration, hypertrophy, and hyperextension of remaining podocytes. It had long been difficult to study podocyte mechanobiology, in part due to the shortage of good *in vitro* system. My department established several immortalized podocyte cell lines of high quality. Here, I compared the properties of multiple podocyte cell lines, and constructed the *in vitro* model systems that mimic the mechanical stress-mediated podocyte injury seen *in vivo*.

Several podocyte cell lines were incubated under non-permissive condition, replated on a silicon chamber coated with type I collagen, and stimulated with unidirectional cyclic stretch (0.5 Hz, 10% elongation). Gene expression was analyzed using real time qPCR, protein expression using Western blot, and Rac1 activity by GST pull down assay.

I selected the rat C7 podocyte cell line as a good responder to mechanical stress among various podocytes. Stretch rapidly increased phosphorylation of ERK1/2 in the C7 podocytes, and cells were oriented perpendicular to the stretch direction. Expression profiles of podocyte-specific molecules and mechanobiology-related molecules differed greatly depending on cell line and differentiation state. Gene expression of TRPC6 was 100 times higher in the C7 cell line than other podocytes. Piezo 1, Piezo 2 (mechanosensor, mechanotransducer), nephrin, synaptopodin (podocyte-specific molecules), and mineralocorticoid receptor (MR) were also abundantly expressed. Small G protein Rac 1 was activated early in response to stretch, followed by induction of MR-related molecules (Sgk1, PAI-1, MCP-1). Stretch finally reduced expression of nephrin and synaptopodin. These changes were all suppressed by the Rac inhibitor EHT1864. I demonstrated that stretch activated the Rac1-MR signaling pathway in the *in vitro* podocyte culture system, which recapitulated the *in vivo* changes seen in the glomeruli of various chronic kidney disease animal models. The present findings also suggest that mechanical stress in podocytes plays a pivotal role in the pathogenesis of glomerular injury associated with life-style related diseases.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 培養腎系球体ポドサイト細胞株のメカノ刺激に対する応答性ならびにメカノ関連分子発現の比較解析, 口頭, 長瀬美樹, 栗原秀剛, 坂井建雄, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017/3/29, 国内.
2. 高血圧、腎臓病とメカノバイオロジー, 口頭, 長瀬美樹, 東京大学先端科学技術研究センター 第 38 回招聘講演, 2017/2/13, 国内.
3. 培養ポドサイト細胞株の物理的刺激に対する応答機構の解析, ポスター, 長瀬美樹, 栗原秀剛, 坂井建雄, 第 60 回日本腎臓学会学術総会, 2017/5/26, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願