184. 糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞 FERMT2 の役割

山原　真子

滋賀医科大学 医師臨床教育センター

Key words：糖尿病性腎症，糸球体上皮細胞，細胞接着因子，FERMT2

緒　言

糖尿病性腎症（腎症）は末期腎不全の原疾患第１位であり、その患者数の減少や医療経済に及ぼす影響の改善は喫緊の課題といえる。腎症は蛋白尿を呈し、間質障害から腎機能低下をきたして、末期腎不全へと至る進行性の病態である。これまでの治療により腎症初期からの寛解がみられる症例も増加してきた。しかしながら、ひとたび高度蛋白尿を呈するようになると既存の治療法では、蛋白尿を減少させ、腎機能低下を抑制することが難しい。

蛋白尿の主な原因は糸球体上皮細胞の障害である。糸球体上皮細胞は分裂能を有さない高度に分化した細胞であり、一度障害され脱落すると再生できないとされている。糸球体上皮細胞は隣り合う細胞間に足突起構造を有し、糸球体ろ過バリアを形成しているが、糸球体上皮細胞の障害や脱落によりこの機構が破綻すると蛋白尿の出現に繋がる。これまで、糸球体上皮細胞に対する障害機構の検討が行われてきたが、糸球体上皮細胞の基底膜からの脱落機構についての検討は少ない。我々は、これまでにマウス糸球体上皮細胞に多く発現する細胞接着因子 FERMT2（Fermitin family homolog 2）を同定した。FERMT2 が細胞接着斑に存在しインテグリン（ITG）とアクチン線維とを結び付ける働きを持ち、その欠損により糸球体上皮細胞の細胞骨格異常をきたし、易脱落性を示すことを報告した。さらに、ゼブラフィッシュモデルにおいて *FERMT2* 欠損が糸球体濾過機構の破綻を惹起することを明らかとした[1]。以上から、糸球体上皮細胞における FERMT2 の発現低下や機能異常は糸球体上皮細胞の細胞形態維持機構の破綻を惹起し、蛋白尿の原因となることが推測される。

これまでに、糸球体上皮細胞では細胞接着因子である *ITG* の欠損により高度蛋白尿をきたすことが明らかとなっている［2］。興味深いことに、糖尿病の病態では、糸球体上皮細胞において接着因子である ITG の発現は増加しているとの報告があるにも関わらず［3］、細胞骨格は脆弱であることが知られている。とりわけ、FERMT2 は細胞骨格の維持や接着に必須であり、ITG とも直接連携している蛋白である。しかしながら、糖尿病の病態において FERMT2 がどのような発現調節ならびに蛋白修飾を受け、どのように働くのかについては報告がない。そこで腎症における糸球体上皮細胞の基底膜からの脱落に FERMT2 の変化が関与しているとの仮説をたて、その検証を行った。

その結果、糖尿病モデルマウスの糸球体において、FERMT2 の発現局在が変化しており、これは栄養感知シグナルのひとつである mTORC1（mechanistic target of rapamycin complex 1）の過剰亢進モデルにおいても認めることを明らかとした。これまで腎症の発症・進展に mTORC1 の過剰な亢進が関与していることが報告されている［4］が、糸球体上皮細胞の接着機能にも影響を及ぼし得る可能性を示している。また、血管内皮細胞の mTORC1 過剰亢進モデルにおいても糸球体における FERMT2 の局在異常が惹起されたことからは、血管内皮障害と糸球体上皮細胞の接着機構に関連があると考えられ、血管内皮 mTORC1 シグナルと FERMT2 を介した糸球体上皮細胞接着障害との関連の解明は、難治性蛋白尿を呈する腎症に対する新たな治療法の開発に繋がるものと考える。

方 法

1. マウスを用いたFERMT2の *in vivo* 機能解析

これまでの報告から、糸球体上皮細胞特異的 *FERMT2* 欠損マウスは正常出生後、2 週間より蛋白尿の出現および増加を認め、生後8～10週齢で死亡することが報告されている [5]。このことからFERMT2は発生期ではなく成長期に必須な蛋白であることがわかる。FERMT2が糖尿病環境下において、細胞障害的に働いているのか、細胞保護的に働いているのかを検討するために、糸球体上皮細胞特異的FERMT2過剰発現マウスおよびヘテロ欠損マウスを作製し、糖尿病モデル（ストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病モデル、高脂肪食負荷肥満 2 型糖尿病モデル）における蛋白尿の出現程度や糸球体特異的マーカー染色による糸球体上皮細胞数の定量、電子顕微鏡検査による足構造の評価、尿中糸球体上皮細胞数の定量を行うこととした。また、糖尿病モデルでの糸球体上皮細胞におけるFERMT2発現についての評価を行った。

2. 糸球体上皮細胞を用いたFERMT2の *in vitro*・*ex vivo* 機能解析

培養糸球体上皮細胞を用いて、高血糖、高脂肪酸負荷下での FERMT2 蛋白発現量ならびに、細胞内局在の評価を行った。さらに、実験 1 で作製したマウスより糸球体上皮細胞を単離培養し、糖尿病状態における FERMT2 蛋白の発現量の制御機構ならびに糸球体上皮細胞機能に及ぼす影響機序を検索し、病態におけるFERMT2の役割を検討する。

結 果

1. マウスを用いたFERMT2の *in vivo* 機能解析

糸球体上皮細胞特異的 *FERMT2* 遺伝子改変マウスの解析については、マウスの作製および譲渡に時間を要したため、解析結果を得るに至っていない。まずは各種糖尿病モデルマウスを作製し、これらマウスにおける糸球体でのFERMT2発現の評価を行った。その結果、ストレプトゾトシン誘発1型糖尿病モデルの糸球体においては、FERMT2の発現増加の傾向を認めた。2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスおよび高脂肪食負荷2型糖尿病モデルマウスの糸球体では、糸球体におけるネフリンの発現低下とともに基底膜に沿って存在する FERMT2 の細胞内局在異常を認めた（図 1）。この変化が血糖依存的なものか糸球体上皮細胞障害によるものなのかを検討するために、糸球体上皮細胞障害をきたす糸球体上皮細胞特異的 *TSC1* 欠損マウスを用いて検討を行った。このマウスは糸球体上皮細胞特異的に薬剤誘導性に *TSC1* を欠損させることで糸球体上皮細胞の栄養シグナルである mTORC1 過剰亢進を惹起するモデルである。実際に、糖尿病状態では腎臓における mTORC1 の過剰な活性化が報告されているが [4]、このマウスは薬剤誘導後 4 週より蛋白尿を呈し、8 週後には腎不全により死亡する。6 週時点での腎組織において FERMT2 の発現を評価すると、ネフリン発現の低下とともに FERMT2 の発現低下、局在異常を認めた。以上より、糸球体上皮細胞が障害される場合に FERMT2 の発現低下および局在異常を認めることが推測された。さらに、これら糸球体上皮細胞障害に血管内皮細胞の障害が関与しているかを検討するために、血管内皮障害モデルである血管内皮特異的 *TSC1* 欠損マウスを用いて検討を行った。このマウスは薬剤誘導性に血管内皮の *TSC1* を欠損することで血管内皮の mTORC1 を過剰亢進させるモデルである。これまでの報告で、このマウスは全身性の浮腫をきたし、血管新生などを伴いながら生後 3～6 カ月で死亡することが明らかとなっている [6]。薬剤誘導性の遺伝子欠損モデルを用いて検討したところ、薬剤誘導後4週間で糸球体におけるネフリンの発現については変化がなかったが、FERMT2の発現局在の異常を認めた（図 1）。以上の結果からは、糸球体血管内皮の障害と細胞接着因子 FERMT2 の発現局在が関連しており、これによって糸球体上皮細胞の機能に異常をきたしうる可能性が推測できる。

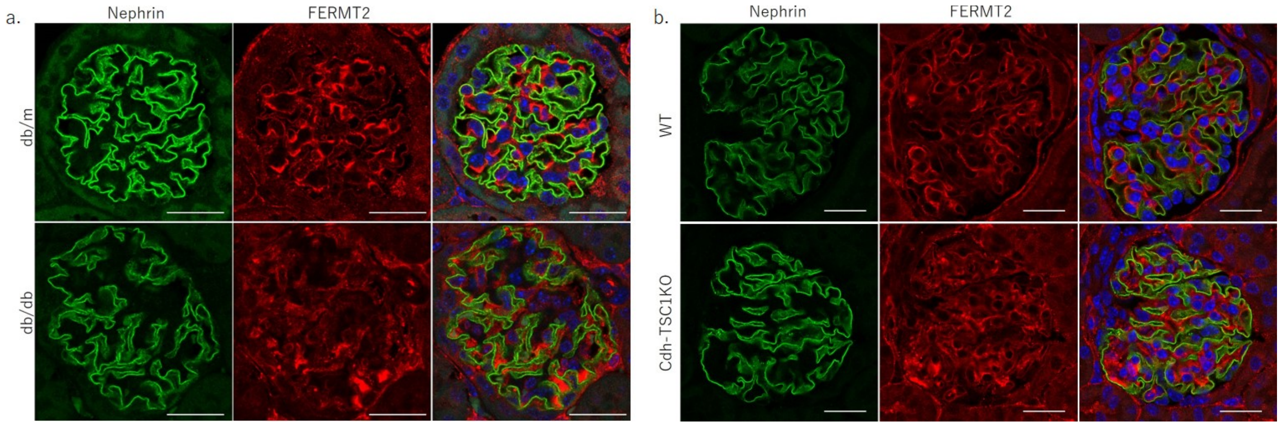

図1．糖尿病モデルマウスおよび血管内皮障害モデルマウスの糸球体におけるFERMT2の発現局在

a）　2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウス糸球体において、コントロールである db/m マウスに比し FETMR2 の発現は、スリット膜蛋白の Nephrin と乖離してより細胞質に局在している。

b）　血管内皮障害モデルである血管内皮細胞特異的 *TSC1* 欠損マウスの糸球体においても同様に FERMT2 は細胞質に局在している（スケールバー：25 μ m）。

2．糸球体上皮細胞を用いた FERMT2 の *in vitro*・*ex vivo* 機能解析

培養糸球体上皮細胞を用いた FERMT2 の発現量および発現局在の評価を行った。糖尿病疑似刺激として高血糖および高飽和脂肪酸状態、TNF α 刺激を行ったが、糸球体上皮細胞における FERMT2 の発現量に変化はなかった。続いて FERTM2 の細胞内局在についての評価を行った。FERMT2 は細胞内の接着斑に発現することがわかっているが、接着斑蛋白である Paxillin との共染色を行ったところ、いずれの状態においても FERMT2 は Paxillin と共局在した（図 2）。接着斑のサイズや接着能にも有意な差は認めなかった。

さらに、糸球体上皮細胞特異的 *TSC1* 欠損マウスより単離した糸球体上皮細胞を用いて同様に mTORC1 過剰亢進糸球体上皮細胞内における FERMT2 の発現量および発現局在について評価を行った。その結果、*TSC1* 欠損糸球体上皮細胞において FERMT2 の発現量は、野生型マウスより単離した糸球体上皮細胞と比べ変化はなく、Paxillin 蛋白との共染色においていずれも共局在を認めた（図 2）。以上の結果から、培養細胞を用いた *in vitro*・*ex vivo* での FERMT2 の局在評価および接着斑機能評価においては、糖尿病モデルにおいて明らかな異常を認めることはできなかった。

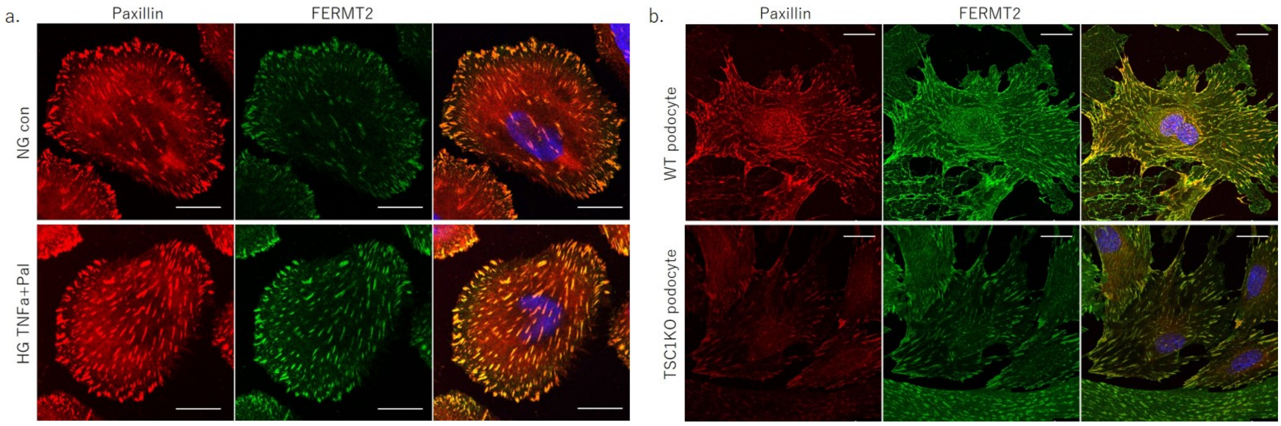

図2．培養糸球体上皮細胞および単離糸球体上皮細胞におけるFERMT2の発現局在

a）　培養糸球体上皮細胞において FERMT2 は接着斑蛋白 Paxillin と共局在している。さらにこれは高糖濃度刺激（50 mM）および TNF α 刺激、飽和脂肪酸刺激（Pal）によっても変化がなかった。

b）　糸球体上皮細胞特異的 *TSC1* 欠損マウスおよびコントロールマウスからそれぞれ単離した糸球体上皮細胞における FERMT2 の発現局在を示す。いずれも接着斑蛋白 Paxillin との共局在を認め、接着斑の形状や大きさに変化を認めなかった（スケールバー：25 μ m）。

考　察

今回、糸球体上皮細胞に多く発現する接着因子蛋白FERMT2に着目し、糖尿病性腎症の発症・進展におけるFERMT2の役割についての検討を行った。これまでに、糸球体上皮細胞における *FERMT2* の欠損は多量の蛋白尿を呈し、腎不全により早期に死亡することが明らかとなっている［1, 5］。今回の研究において、動物モデルを用いた検討からは、1型糖尿病モデルの腎臓では早期に糸球体での FERMT2 の発現が増加すること、また 2 型糖尿病モデルの糸球体においてその発現局在の異常を認めることを明らかとした。さらに、これらの局在異常については、高血糖の有無に関わらず、糸球体上皮細胞の mTORC1 過剰亢進によって惹起されうること、さらには糸球体血管内皮細胞の mTORC1 過剰亢進のみによっても惹起されうることを明らかとした。このことは、これまで報告されてきた糖尿病状態での過剰な mTORC1 シグナルが、接着斑蛋白の機能にも影響を及ぼす可能性、そして糸球体血管内皮細胞の障害が糸球体上皮細胞の FERMT2 局在異常を介して、基底膜への接着機能障害を惹起しうる可能性を示唆している。これまで我々は、糸球体血管内皮細胞の障害と糸球体上皮細胞の細胞内浄化機構のひとつであるオートファジーの障害との関連について、障害されていない糸球体上皮細胞では裏打ちする血管内皮細胞に障害はないが、糖尿病状態でオートファジー欠損により障害された糸球体上皮細胞では、裏打ちする血管内皮細胞に構造的な変化を認め、内皮細胞の障害が存在することを明らかにしてきた。この結果からも、血管内皮細胞と糸球体上皮細胞の間にはクロストークが存在しており、お互いが影響を与え合っている可能性が高い。

今回、細胞実験においては FERMT2 の局在異常や機能異常を惹起する因子を特定するには至らなかったが、引き　続き糖尿病状態における FERMT2 とその他接着斑構成蛋白との局在評価や、FERMT2 蛋白自体の糖鎖修飾の可能性について、また mTORC1 シグナルと FERMT2 の機能との関連について、細胞および動物を用いた研究により明らかにしていきたい。

文　献

1) Yasuda-Yamahara M, Rogg M, Frimmel J, Trachte P, Helmstaedter M, Schroder P, Schiffer M, Schell C, Huber TB. AIF1L regulates actomyosin contractility and filopodial extensions in human podocytes. Matrix Biol. 2018 Aug;68-69:263-279. Epub 2018 Jan 11. PMID: 29337051 DOI: 10.1016/j.matbio.2018.01.003.

2) Kanasaki K, Kanda Y, Palmsten K, Tanjore H, Lee SB, Lebleu VS, Gattone VH Jr, Kalluri R. Integrin beta1-mediated matrix assembly and signaling are critical for the normal development and function of the kidney glomerulus. Dev Biol. 2008 Jan 15;313(2):584-93. Epub 2007 Nov 12. PMID: 18082680 DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.10.047.

3) Sawada K, Toyoda M, Kaneyama N, Shiraiwa S, Moriya H, Miyatake H, Tanaka E, Yamamoto N, Miyauchi M, Kimura M, Wada T, Fukagawa M. Upregulation of α3β1-Integrin in podocytes in early-stage diabetic nephropathy. J Diabetes Res. 2016;2016:9265074. Epub 2016 Jun 1. PMID: 27340677 DOI: 10.1155/2016/9265074.

4) Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S, Blattner SM, Ikenoue T, Rüegg MA, Hall MN, Kwiatkowski DJ, Rastaldi MP, Huber TB, Kretzler M, Holzman LB, Wiggins RC, Guan KL. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. J Clin Invest. 2011 Jun;121(6):2181-96. Epub 2011 May 23. PMID: 21606597 DOI: 10.1172/JCI44771.

5) Sun Y, Guo C, Ma P, Lai Y, Yang F, Cai J, Cheng Z, Zhang K, Liu Z, Tian Y, Sheng Y, Tian R, Deng Y, Xiao G, Wu C. Kindlin-2 association with Rho GDP-dissociation inhibitor α suppresses Rac1 activation and podocyte injury. J Am Soc Nephrol. 2017 Dec;28(12):3545-3562. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28775002 DOI: 10.1681/ASN.2016091021.

6) Sun S, Chen S, Liu F, Wu H, McHugh J, Bergin IL, Gupta A, Adams D, Guan JL. Constitutive activation of mTORC1 in endothelial cells leads to the development and progression of lymphangiosarcoma through VEGF autocrine signaling. Cancer Cell. 2015 Dec 14;28(6):758-772. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26777415 DOI: 10.1016/j.ccell.2015.10.004.