

東海大学大学院令和 3 年度博士論文

糖尿病性腎症における β 1-インテグリンの
リン酸化と血圧調節に関する研究

指導 深川 雅史 教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻

齊藤 仁通

- ・この学位申請論文は、The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicineに掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- ・The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicineに掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

Summary

背景：糖尿病性腎症(以下：DN)による高血圧の誘導は、傍糸球体細胞（以下：JG 細胞）からのレニン分泌量が増加するものと考えられているが、JG 細胞自身が輸入細動脈の血圧変化を感知してレニンを分泌するメカニズムについては、まだ明らかにされていない部分が多い。

我々は、 $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化に伴う細胞接着と運動性のメカニズムが JG 細胞の圧力感知に関与していることを明らかにするために、腎組織における $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化レベルと、 $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化とレニンの発現との関係を検証した。

方法：DN モデルラットは、ストレプトゾトシン（60 mg/kg）の静脈内注射により作製した。腎組織における $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化レベルを検出し評価するために、免疫組織化学と画像解析を行った。また、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を行い、レニンの mRNA レベルを評価した。

結果： $\beta 1$ -インテグリンのセリン-785 部位とスレオニン-788/789 部位が、それぞれ緻密斑と JG 細胞で特異的にリン酸化されていること、また DN の進行に伴いこれらは継時的に変化しレニンの産生と関連していることを確認した。これら $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化は、DN の進行に伴うレニンの発現量の変化に伴い増加、あるいは減少し、特にスレオニン-788/789 部位のリン酸化は、レニンの発現と負の相関を認めた。

結論：以上の結果から、JG 細胞では $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化がレニン産生の調節機構に関与している可能性が示唆された。

Introduction

糖尿病性腎症（以下：DN）と高血圧が互いに増悪因子であることは広く知られている。糖尿病は自律調節機能である筋原性反応や transforming growth factor (以下：TGF) 反応が障害されることで、輸入細動脈が拡張し、糸球体過濾過や糸球体毛細血管高血圧を誘発する。高血圧は腎臓に酸化ストレスと炎症を引き起こし、DN の発症につながる。腎機能の悪化に伴う RAAS の活性化、エンドセリン-1 のアップレギュレーション、活性酸素種のアップレギュレーション、一酸化窒素（NO）のダウンレギュレーションは、さらに血圧上昇の一因となり、高血圧と糸球体損傷の悪循環を引き起こす。

RAAS による血圧調節の律速酵素はレニンであり、腎機能の低下と高血圧の悪循環の鍵となる。傍糸球体細胞（以下：JG 細胞）の研究により、レニン分泌のメカニズムは以下の (a-d) が明らかにされている。(a) 血流や血圧の低下を感知した腎交感神経の興奮による β -アドレナリン受容体を介したレニン分泌刺激、(b) 原尿中 NaCl 濃度を感知するマクラデンサから放出されるプロスタグランジン-E2/アデノシン/ATP/NO によるレニン分泌の制御、(c) アンジオテンシン II などの体液性因子によるレニン分泌のフィードバック制御、(d) JG 細胞の圧受容体に関する血圧感知による制御である。JG 細胞以外の他臓器から分泌される調節因子を受けるメカニズムについては多くの集中的な研究が明らかにされてきた (a-c)。その一方で、単離された糸球体を用いた灌流実験では、JG 細胞自体が血圧と血流を感知し、レニン分泌を調節すると報告されているが、圧受容器により輸入細動脈の血圧変化を感知し、レニンの産生と分泌を調節する JG 細胞の独立したメカニズムは完全には解明されていない (d)。

β 1-インテグリンは、さまざまなサブタイプの α 1-インテグリンと二量体化することで、細胞や細胞と基質の接着に機能する分子である。例えば、 α 3 β 1 インテグリンは、主にポドサイトに発現していることが知られており、ポドサイトの糸球体基底膜への接着に重要な役割を果たしていると考えられている。また、その機能が失われると、ポドサイトの減少が起こると考えられている。そのメカニズムとして、インテグリン二量体の構造は、細胞内ドメインのリン酸化・脱リン酸化によって変化することが知られている。

我々は、 β 1-インテグリンのリン酸化に伴う細胞接着や運動性のメ

カニズムが JG 細胞の圧力感知に寄与していること、すなわち、輸入細動脈の血圧変化を JG 細胞の圧受容器が感知してレニンの産生・分泌に影響すると仮定した。 $\beta 1$ -インテグリンは複数のリン酸化部位を持つことから、腎組織における $\beta 1$ -インテグリンのそれぞれリン酸化部位の発現を確認すると共に、レニンの発現との関連を調査した結果を発表した。本論文では、 $\beta 1$ -インテグリンを用いて行った研究をまとめて、今後の研究の展望や、臨床応用について検討した。

Discussion

本研究では、JGA に特異的な $\beta 1$ -インテグリンのセリン（以下：Ser）-785 部位および Thr-788/789 部位のリン酸化が初めて検出され、DN の進行過程で $\beta 1$ -インテグリンのこれらの部位のリン酸化/脱リン酸化が血圧調節機構の一部である可能性が示唆された。

$\beta 1$ -インテグリンにおける Thr-788/789 部位のリン酸化が細胞接着や運動に及ぼす影響については様々な報告があり、最近の報告では、 $\beta 1$ -インテグリンにおけるこの部位がインテグリン二量体を活性化/非活性化するホスホスイッチとして機能し、細胞接着強度などのインテグリン機能を制御していることが示唆されている。このメカニズムは JG 細胞に特異的なレニンの産生・分泌に寄与していると考えられる。

一方 Ser-785 リン酸化 $\beta 1$ -インテグリンは、マクロファージと腫瘍細胞の浸潤や転移時の細胞骨格の再編成に必須であることが報告されており、緻密斑領域の遠位尿細管上皮細胞での発現は、遠位尿細管細胞の形態変化を促進する可能性があると考えられる。DN 発症後の原尿中の NaCl 濃度の変化を感知した緻密斑細胞が水分を吸収して細胞の膨潤圧を高め、 $\beta 1$ -インテグリンの Ser-785 部位のリン酸化による細胞骨格の変化が、その膨潤圧を輸入細動脈に伝達し血流量を調節することで、糸球体の保護に影響を与える可能性がある。さらに、緻密斑細胞は JG 細胞と接触してレニン分泌の調節因子を分泌し、また細胞骨格の再構成によりこれらの因子の伝達速度を調節する可能性がある。DN 進行に伴う $\beta 1$ -インテグリンの Ser-785 部位のリン酸化の急速な増加は、これらの機能の活性化に関与している可能性が考えられる。

Everett らは、進行した糖尿病ではレニン産生が低下すると報告している。また、自然に糖尿病を発症したラットの JGA 付近のレニン陽性細胞数を確認し、その数が糖尿病発症後 2 ヶ月でピークに達したと報告しており本研究の結果と一致している。STZ ラットでは、糖尿病発症後も血圧の上昇が続いていたが、糖尿病発症後 2 ヶ月以降でレニン産生量は減少し始め、それに伴い血圧も徐々に低下していった。この間、 $\beta 1$ -インテグリンの Thr-788/789 部位におけるリン酸化レベルはレニン産生量の変化と負の相関を示したが、 $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化とレニン産生量の因果関係は不明であった。今回の結果から、レニン産生の抑制には、リン酸化によるインテグリン二量体の活性化が必要であり、STZ ラットの DN 発症後にホスホスイッチを不活性化することで、血圧上昇に伴うレニン産生の抑制を防ぐことができると考えられる。DN におけるプロテインキナーゼ C ϵ とホスファターゼ活性の優位性は、時間に依存することが予測される。

活性化されたインテグリン二量体がレニン産生を抑制するメカニズムは、JG 細胞の圧力感知を調節することによるものと考えられる。JG 細胞はそれ自体で輸入細動脈の血流と圧力を感知することができるが、細胞間接着因子 Cx40 のノックアウトマウスがレニン分泌を抑制できないことから、Cx40 は JG 細胞の圧受容器機能に必須であり、すなわち Cx40 は JG 細胞の圧受容器とみなされている。一方、 $\beta 1$ -インテグリンの Thr-788/789 部位のリン酸化は、多くの種類の細胞で細胞-基質間の接着を変化させることが知られており、その結果として生じる膜張力の変化が、細胞膜上の圧受容器の圧力感知閾値を変化させることで、レニン発現の調節に関与している可能性がある。Cx とインテグリンの両者が、細胞膜上で接着因子として互いに密接に関係している可能性も考えられ、実際に機械的刺激に反応する骨細胞を対象とした研究では、機械的ストレスで活性化されたインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ が Cx43 と相互作用して、ヘミチャネルの開口を誘導することが報告されている。活性化されたインテグリンと Cx40 で、同様の相互作用が JG 細胞の圧力感知の制御に寄与している可能性が考えられる。

JG 細胞において、パートナーとなる α -インテグリンの役割は不明であるが、我々は、DN 進行中の腎 $\beta 1$ -インテグリンの発現の変化が $\alpha 3$ -、 $\alpha 5$ -および αv -インテグリンの発現の変化を伴っている

ことを発見した（データは示されていない）。 $\alpha 3\beta$ インテグリンはポドサイトに特異的であることが知られており、 $\alpha 5$ -と αv -インテグリンは JGA の機能に寄与している可能性がある。

本研究における Cx40 のノックダウンは、Cx40 ノックアウトマウスと同様にレニン産生は増加し、 $\beta 1$ -インテグリンのノックダウンでも同様であったことから、これらの分子がレニン産生に関与している可能性を強く示唆している。これは、 $\beta 1$ -インテグリンが JG 細胞における Cx40 の圧力感知に関与している可能性があることを示唆する。例えば、細胞と基質の接着強度を変化させることにより、細胞膜上の Cx40 による圧力検知の感度を制御するメカニズムが存在する可能性があり、これらの結果は、インテグリンと Cx40 の相互作用が JG 細胞での血圧感知とレニン産生による血圧調節を制御していることが示唆される。

今後の展望として、DN 進行に伴うインテグリンのリン酸化/脱リン酸化を含む調節機構のさらなる解析は、圧受容器 Cx40 を介した血圧感知メカニズムとインテグリンによる血圧調節メカニズムの解明と、このメカニズムを標的とした新しい DN 治療法の開発につながる可能性がある。

Conclusion

レニン分泌のメカニズムとしては、(a) 血流や血圧の低下を感知した腎交感神経の興奮による β -アドレナリン受容体を介したレニン分泌刺激、(b) 原尿中 NaCl 濃度を感知するマクラデンサから放出されるプロスタグランジン-E2/アデノシン/ATP/NO によるレニン分泌の制御、(c) アンジオテンシン II などの体液性因子によるレニン分泌のフィードバック制御、(d) JG 細胞の圧受容体による血圧感知に関する制御が知られている。

我々は糖尿病モデルラット（STZ ラット）の腎臓組織において、細胞基質間接着因子である $\beta 1$ -インテグリンの Ser-785 部位および Thr-788/789 部位のリン酸化を初めて検出した。DN の進行過程でこれらは継時的に変化を示し、Thr-788/789 $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化/脱リン酸化はレニン産生と負の相関を示した。また、JG 細胞の培養細胞である As4.1 細胞において、インテグリンや細胞間接着因子 Cx40 の siRNA を用いたノックダウン実験によりレニン発現は亢

進を示した。

本研究は $\beta 1$ -インテグリンのリン酸化/脱リン酸化や Cx40 が、レニン分泌のメカニズムの (d) JG 細胞の圧受容体による血圧感知に関する制御に寄与している可能性が示唆された。