

综述

肾连蛋白的研究进展

钱国清^{1,2,*}, 杨乃彬², 石洁君²

¹浙江大学宁波医院呼吸内科; ²宁波大学附属宁波市第一医院内科, 宁波 315010

摘要: 肾连蛋白(nephronectin, NPNT)是一种新型细胞外基质, 为整合素 $\alpha 8\beta 1$ 的新型配体, 在肾、肺和甲状腺等组织器官中均高表达。NPNT参与肾脏发育和急性肾损伤过程, 调控成骨细胞增殖和分化过程, 介导血管生成, 可能在病理性骨质疏松症中起关键作用, 也是骨骼疾病和创伤治疗的新靶点。NPNT基因位点变异被发现与肺功能相关, 其可能参与慢性气道炎症形成过程等。另外, NPNT在心脏、皮肤、乳腺、肝脏和牙齿等多种组织或器官疾病的发生、发展中发挥重要作用。本文对肾连蛋白的结构、分布、生理与病理生理学功能的研究进展作一综述。

关键词: 肾连蛋白; 组织分布; 生理功能

中图分类号: R34

Recent advances in nephronectin

QIAN Guo-Qing^{1,2,*}, YANG Nai-Bin², SHI Jie-Jun²

¹Department of Respiratory Medicine, Ningbo Hospital of Zhejiang University; ²Department of General Internal Medicine, Ningbo First Hospital, Ningbo University, Ningbo 315010, China

Abstract: Nephronectin (NPNT) is a novel extracellular matrix protein and a new ligand of integrin $\alpha 8\beta 1$. Recent studies showed that NPNT is highly expressed in kidney, lung, thyroid, etc, and it may play an important role in many pathological conditions. NPNT is involved in the process of kidney development and acute kidney injury, regulates proliferation and differentiation of osteoblast, and induces the vasculogenesis *in vitro*. NPNT may play a key role in pathological osteoporosis and therefore be a new therapeutic target of bone diseases. NPNT gene variants are not only associated with lung function, but also potentially implicated in chronic airway diseases development. Moreover, NPNT is also an important factor that mediates pathology of cardiac, epidermis, breast, liver and teeth diseases. In this paper, we reviewed some research progresses on the structure, distribution, physiological and pathophysiological functions of NPNT.

Key words: nephronectin; tissue distribution; physiological function

肾连蛋白(nephronectin, NPNT), 也称为 POEM (preosteoblast epidermal growth factor-like repeat protein with meprin) 或 EGFL6L, 是在小鼠胚胎肾脏中发现的一种新型细胞外基质, 分子量为 70~90 kDa, 为整合素 $\alpha 8\beta 1$ 的新型配体^[1,2]。NPNT 由 561 个氨基酸残基组成, 包含 5 个重复的表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)样结构域、1 个 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列和带 COOH-末端的 MAM 域^[1]。NPNT 基因位于染色体 4q24, 含有 13 个外显子,

它的转录表达在细胞增殖、分化、黏附、凋亡和生物代谢等生理功能及多种组织或器官疾病病理过程中具有重要的意义。本文就 NPNT 的近期研究进展进行综述。

1 NPNT表达及功能

1.1 NPNT表达

NPNT 参与人体发育过程, 并在胚胎、新生儿和成人的多个器官和组织中表达, 如胚胎尿生殖脊、

Received 2019-02-27 Accepted 2019-04-09

*Corresponding author. Tel: +86-574-87089875; E-mail: guoqing.qian@foxmail.com

输尿管上皮细胞^[1]。NPNT mRNA 呈年龄相关性表达;在胚胎发育第 13.5 天 (E13.5), NPNT 在脉络丛、颚、外胚层、发育的牙齿、肺基层、胃、食管、耳等组织器官中均有表达;在新生儿中, NPNT 还在晶状体、味蕾中表达^[1];在成人中, NPNT 在肾、肺、脑、血管和甲状腺中均有表达^[3] (图 1)。

1.2 NPNT的功能

NPNT 的功能研究尚处于初始阶段。目前有诸多研究表明, NPNT 在肾损伤、骨质疏松、慢性气道炎症、急性和慢性肝炎、肿瘤等疾病中均发挥重要作用。

1.2.1 NPNT参与肾脏发育和肾损伤过程

Linton 等研究显示, NPNT 在肾脏发育过程中持续高表达;而 NPNT 或整合素 $\alpha 8 \beta 1$ 敲除小鼠通常表现为肾发育不全或器官缺陷, 提示 NPNT 可能通过结合整合素 $\alpha 8 \beta 1$ 参与肾脏发育过程; NPNT 基因敲除小鼠中胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, Gdnf) 表达明显下降^[4], 提示 NPNT 基因具有激活 Gdnf 的作用。

Nakatani 等通过对 190 例不同类型肾病活检标本研究发现, NPNT 在 18 例糖尿病肾病肾小球系膜基质扩张中高表达, 在其他肾病 (如, IgA 肾小球肾炎、膜增生性肾小球肾炎、狼疮肾炎和膜性肾小球肾炎等) 中均阴性表达, 该结果提示 NPNT

可辅助糖尿病肾病诊断^[5]。Cheng 等^[6] 研究显示, NPNT 可能参与急性肾小管坏死的细胞再生修复、促进肾小管上皮细胞增殖等病理生理过程; NPNT 在急性肾小管坏死和恢复期的再生肾小管上皮细胞中表达增多, 提示 NPNT 可能是一种潜在的生物标志物。还有研究显示 NPNT 是肾小球系膜细胞数量和基质生成的内源性调节剂, 缺乏 NPNT 将破坏其黏附结构, 导致 $\alpha 8 \beta 1$ 的定位错误^[7]。

2018 年, Watany 等^[8] 用酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测激素敏感型和抵抗型肾病综合征患者血清 NPNT 蛋白表达, 并用 PCR 检测 NPNT mRNA 表达, 发现 NPNT 在激素敏感型患者中过表达, 而在激素抵抗型患者中表达明显减少, 表明在肾病综合征患者中, NPNT 蛋白与 mRNA 表达均具有良好的诊断性能, 提示 NPNT 是肾小球再生的标志物, 而血清 NPNT 可作为激素抵抗型肾病综合征的非侵入性生物标志物。

以上研究提示 NPNT 可能参与肾脏发育过程, 可作为糖尿病肾病、急性肾损等疾病的一种潜在的生物标志物, 并参与肾脏病和肾损伤形成过程。因此, 未来的研究可通过收集肾脏病患者标本, 进一步探讨 NPNT 在肾脏病中的表达和作用机制等。

1.2.2 NPNT在成骨细胞中的表达和功能

Kahai 等用 siRNA 转染沉默成骨细胞的 NPNT

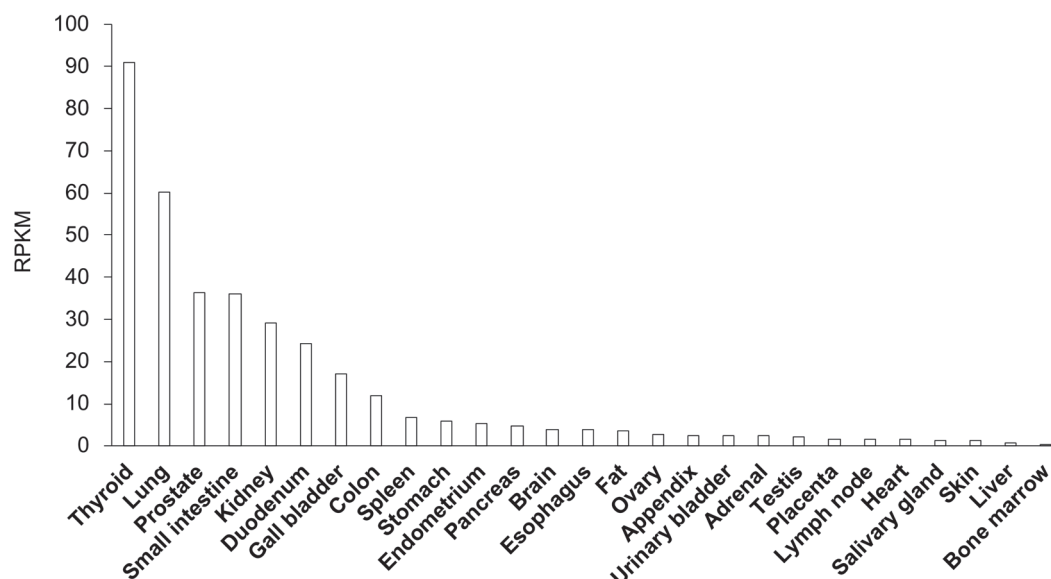


图 1. 肾连蛋白(NPNT)在人体各组织中的表达

Fig. 1. The expression of nephronectin (NPNT) in wide range of human tissues. It is highly expressed in thyroid, lung, prostate, small intestine, and kidney. RPKM, reads per kilobase per million mapped reads. Data are from NCBI Gene Database (HPA RNA-seq normal tissues, Accession: PRJEB4337).

表达, 发现沉默 NPNT 表达可抑制成骨细胞分化, 而 NPNT 过表达可促进成骨细胞分化, 提示 NPNT 参与成骨细胞分化过程^[9]; 而且, 研究表明 EGF 样结构域参与成骨细胞分化过程^[10]。Fang 等研究显示, 转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 能显著抑制成骨细胞株 MC3T3-E1 的 NPNT 表达, 并且抑制 NPNT 诱导细胞分化的作用^[11], 验证了 NPNT 参与成骨细胞分化过程。

另外, TGF- β 可通过多条信号通路调节 NPNT 的表达。Kahai 等通过芯片检测发现, TGF- β 干预 MC3T3-E1 细胞后, 骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号转导通路基因表达上调^[12]。Miyazono 等还报道, TGF- β 受体 I (TGF- β RI) 参与 TGF- β 调节 NPNT 的过程, 并可激活细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2) 和 c-Jun N 端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路^[13]。在成骨细胞中, Wnt/ β -catenin 可上调 NPNT 的表达^[14]。相反, 在成骨细胞中, 多种炎症因子 [包括 TGF- β 、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和抑癌蛋白 M (oncostatin M, OSM)] 通过 MAPK、核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 和 JAK/STAT 信号转导通路呈时间、浓度依赖性地下调 NPNT 表达。

血管生成在骨发育、骨折修复和骨质疏松过程中发挥重要作用, 研究表明 NPNT 可参与血管生成过程。NPNT 可促进血管内皮细胞 ERK1/2 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 磷酸化; 抑制 ERK1/2 信号转导通路, 可抑制 NPNT 诱导的内皮细胞迁移、管样结构形成和血管生成^[15], 提示 NPNT 是一种旁分泌血管生成因子, 可介导血管生成, 因此其可能在病理性骨质疏松症中起重要作用, 从而可能是骨骼疾病和创伤治疗的新靶点。

miRNAs 可结合靶基因 NPNT 的 3'UTR 而调控其转录后水平, 介导成骨细胞活性。Kahai 等研究发现, miR-378 调控靶基因 NPNT, 并介导成骨细胞分化和骨再生^[9]。另外, miR-23a、miR-101s、miR-296-5p、miR-328、miR-340-3p 和 miR-425 均可结合靶基因 NPNT 的 3'UTR, 促进成骨细胞分化^[16]。以上研究提示 miRNAs 可通过调控 NPNT 在成骨细胞中发挥关键作用, 具体机制需进一步深入研究。

1.2.3 NPNT参与心脏形成

Patra 等在斑马鱼胚胎发育过程中发现 NPNT 参与心脏发育过程。在斑马鱼中, NPNT 基因敲除导

致 BMP4、Has2 和 *tbx2b* 表达上调, 并使心胶质透明质酸合成增多, 导致心脏发育不良、死亡率升高; 而 Has2 基因敲除可阻止该过程, 提示 Has2 为 NPNT 的作用靶点, NPNT 可能通过 BMP4-Has2 信号通路调节心肌细胞分化, 参与斑马鱼心脏形成过程^[17]。Patra 等进一步研究发现 NPNT 具有优异的心肌细胞黏附和特性, 提示 NPNT 有可能成为心脏组织工程的新粘合材料^[18]。

1.2.4 NPNT参与慢性气道炎症过程

全基因组关联分析研究 (genome-wide association analysis, GWAS) 作为一种复杂疾病遗传研究新方法, 已在慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 的研究中被广泛应用^[19]。Hancock 等对 4 个 GWAS 结果进行 meta 分析, 并对吸烟状态进行人群分层, 发现 NPNT 基因与肺功能第一秒用力呼气容积 (forced expiratory volume in the first second, FEV₁) 相关^[20]。2015 年, Wain 等^[19]研究发现 NPNT、KANS1 等基因位点存在变异, 并且与吸烟、低 FEV₁ 相关; rs34712979 位于 NPNT, 其跨越 INTS12、GSTCD 和 NPNT 三个基因, rs34712979 的关联信号在未吸烟者中最强。

NPNT 是否参与人类支气管上皮细胞增殖、迁移和分化等过程, 目前尚不清楚。Qian 等在 NPNT 基因沉默人类支气管上皮细胞 (human bronchial epithelial cells, HBECs) 模型上的研究显示, NPNT 具有促进 HBECs 增殖的功能, 但对 HBECs 细胞迁移影响可能较小^[21]; 分化的 HBECs 中 NPNT 表达高于培养液中未分化的 HBECs 和平滑肌细胞等^[21]。以上研究提示 NPNT 可能参与 COPD 患者慢性气道炎症、气流受限等过程。

1.2.5 NPNT在皮肤中的表达和功能

Fujiwara 等^[22]通过原位杂交证实, NPNT 在胚胎和成人皮肤的表皮细胞中表达; 毛囊干细胞作为立毛肌的肌腱细胞, 通过 NPNT 介导 α 8 整合素阳性的真皮细胞与隆起基底膜的黏附, 并上调平滑肌标志物, 如 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和平滑肌 22 α (smooth muscle 22 α , Sm22 α)^[22]。Fujiwara 等^[22]通过使用 4-羟基他莫昔芬 (hydroxy-tamoxifen, OHT) 激活 Wnt/ β -catenin 信号转导通路, 结果显示 4-OHT 呈剂量依赖性地上调表皮细胞中的 NPNT 和 Wnt 效应器 Tcf3 和 Tcf4 的表达; β -catenin 活化可上调表皮细胞 NPNT 和真皮细胞 α 8 整合素的表达, 表明 NPNT 是 Wnt 的作用靶点, Wnt/

β -catenin 信号通路还决定 NPNT 在特异性区域沉积。

1.2.6 NPNT参与肿瘤过程

Dilmac 等研究显示, NPNT 在小鼠转移性乳腺癌模型中表达降低, 并与器官转移相关; NPNT 在对照组动物的肺、肝组织中表达, 而在第 25 天的转移性肿瘤中 NPNT 表达缺失, 提示 NPNT 缺失可能有助于形成癌细胞的转移环境^[23]。然而, Eckhardt 等^[24]建立乳腺癌自发性骨转移模型, 通过基因组分析细胞外基质 NPNT 的作用, 发现其在高度转移肿瘤上皮细胞中特异性表达, 而抑制 NPNT 表达可明显降低肿瘤细胞在肺、骨和肾中的自发性转移。Steigedal 等对 842 例乳腺癌患者组织微阵列中 NPNT 的表达模式和分布进行综合分析, 发现细胞质颗粒染色 (< 10% 的肿瘤细胞) 与不良预后间存在关联; NPNT 通过其整合素结合和增强子基序, 促进黏附和锚定非依赖性生长, 并且促进乳腺肿瘤细胞在肺部的定植, 提示 NPNT 可能是乳腺癌患者的一种新型预后指标^[25]。

Kuphal 等研究显示, NPNT 在多数黑色素瘤细胞系和恶性黑色素瘤组织中均表达减少或缺失; NPNT 增加细胞黏附, 降低细胞迁移和侵袭, 而 NPNT 缺失则促进肿瘤进展^[26]。

1.2.7 NPNT参与肝炎形成过程

Cartularo 等研究显示, 3 周慢性镉处理可显著上调人肝癌细胞 NPNT 和 CYP3A7 等基因表达^[27]。Inagaki 等研究显示, NPNT 定位于肝脏炎症病灶, 可能在炎症中发挥重要作用^[28]; 但由乙型肝炎病毒感染引起的炎症中, NPNT 是否表达上调仍需进一步研究确定^[27]。在由伴刀豆球蛋白 A (ConA) 和 3,5-二乙基羰基-1,4-二氢可的松诱导的急性和慢性肝炎的小鼠模型中, NPNT 表达均上调, 定位于炎症灶, 主要由间充质细胞和胆管细胞分泌; 另外, NPNT 可加重 Con A 诱发的急性肝炎; 进一步研究表明, NPNT 通过募集 CD4⁺T 细胞或 NKT 细胞进入炎症灶而在肝炎的初始发生中起重要作用^[28]。

1.2.8 NPNT与牙齿发育

Tang 等研究显示, NPNT 显著促进小鼠牙乳头细胞系 MDPC-23 细胞增殖, 明显上调牙源性相关基因 mRNA 表达, 诱导该成牙质细胞前体细胞系分化为矿化表型^[29]。

Arai 等^[30]研究发现, EGF 样重复序列对于 Sox2 表达和细胞增殖至关重要; NPNT 通过 EGF

样重复结构域激活 EGF 受体, 并诱导活化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-Akt 信号转导通路; NPNT 在牙齿上皮干细胞分化和增殖中起着重要的支架作用, 并调节牙齿发育过程中 Sox2 的表达。

1.2.9 其他

Abu-Daya 等研究发现, NPNT 是非洲爪蟾的前肢形成所必需的基质, 但具体机制不清楚^[31]。

2 NPNT的调控因素及信号通路

2.1 多种细胞因子和信号转导通路参与下调NPNT表达

值得关注的是, 多条个信号转导通路参与 NPNT 调节 (图 2)。炎症因子 TNF- α 、OSM 可分别通过 NF- κ B、JAK/STAT 和 MAPK 信号转导通路介导, 呈时间、浓度依赖性地下调 NPNT 表达, 抑制小鼠成骨细胞分化^[32, 33]。TGF- β 可通过 ERK1/2、JNK 和 Smad-2 信号通路介导下调 NPNT 表达, 并呈时间和浓度依赖性地抑制成骨细胞分化; 在成骨细胞中, NPNT 的 mRNA 表达可被 TGF- β 受体 ALK5-Smad 信号通路调节^[13], 使用 ALK5 抑制剂抑制 MAPK 和 Smad 信号通路, 可使 NPNT 表达增加, 促进成骨细胞分化^[11, 13], 而 ALK5 的抑制可以呈时间、剂量依赖性地提高 NPNT 表达^[34]。白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 通过 ERK1/2 和 JNK 信号通路呈时间依赖性地抑制成骨细胞中的 NPNT 表达^[35]。Kurosawa 等^[32]研究显示, OSM 在 MC3T3-E1 细胞中通过 JAK/STAT 和 MAPK 信号转导通路抑制 NPNT 表达; 还有研究报道, 在 MC3T3-E1 细胞中, 成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 通过 JNK 和 PI3K 信号通路抑制 NPNT 表达, 且该作用呈剂量和时间依赖性^[36]。

2.2 多种因子和信号转导通路参与上调NPNT表达

不仅有多种细胞因子和信号转导通路参与介导 NPNT 下调, 同时也有多种细胞因子和信号转导通路促进 NPNT 上调。研究表明, 在小鼠骨骼肌肉细胞 (C2C12) 系中, BMP-2 作为一种成骨诱导细胞因子, 通过 BMP-Smad 信号通路显著上调 C2C12 细胞中 NPNT 的 mRNA 表达^[37]。1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 可显著促进 MC3T3-E1 细胞中的 NPNT 表达, 其作用呈时间、剂量依赖性, 并且由维生素 D 受体 (VDR) 介导^[38]。在 MC3T3-T2 细胞中, Wnt3a 可呈时间、剂量依赖性地促进 NPNT mRNA 表达^[14]。

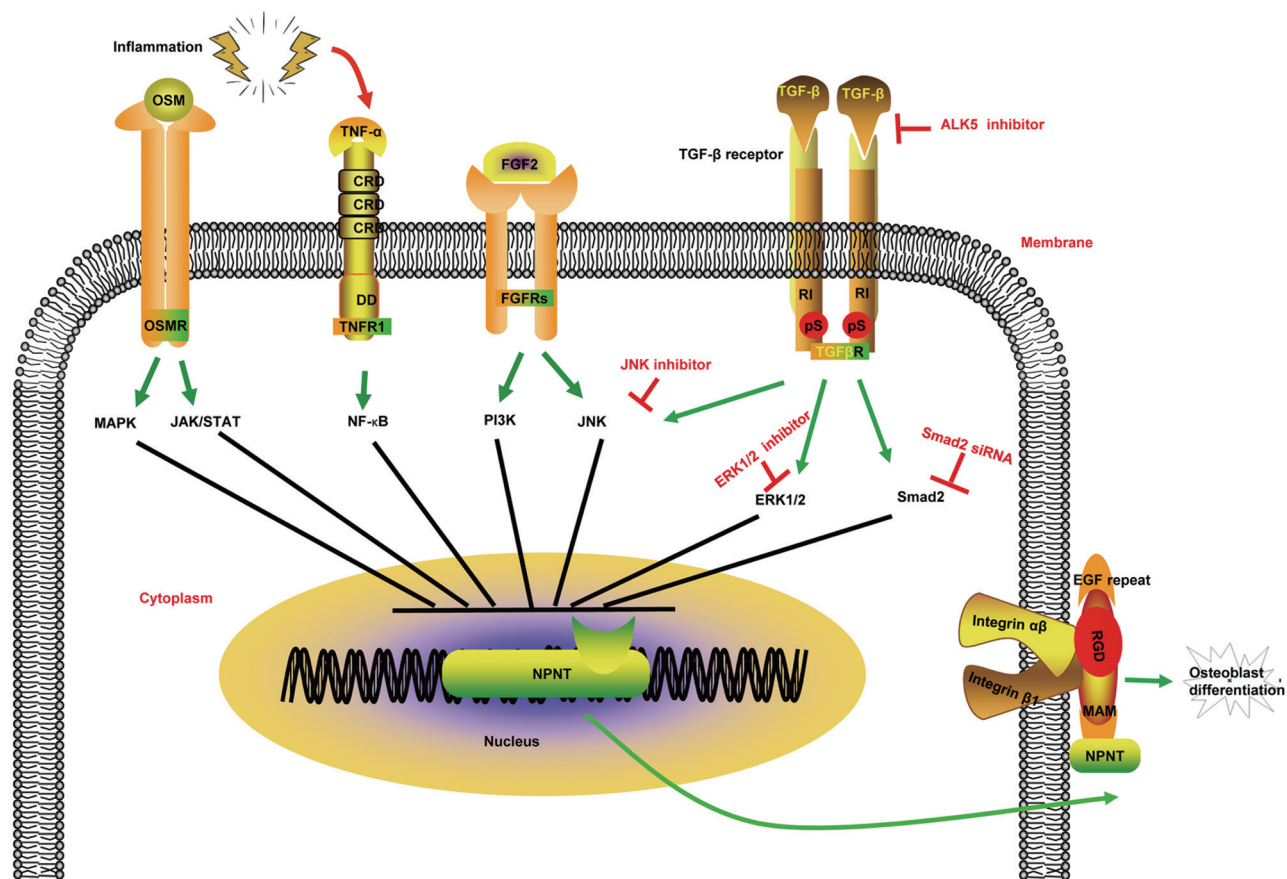


图 2. 多条信号转导通路参与肾连蛋白(NPNT)表达调节
Fig. 2. Nephronectin (NPNT) was regulated by various factors and signal transduction pathways. OSM (oncostatin M), TNF- α , FGF2 and TGF- β regulate NPNT expression via MAPK, PI3K, Smad2 signal transduction pathways.

3 结语与展望

综上所述，本文对 NPNT 在多种组织和器官中的表达、功能、调控因素、信号转导通路等方面进行综述，旨在加深研究者们对 NPNT 的认识和理解。NPNT 在急性肾损伤、肾病综合征和骨质疏松症等疾病中可作为一种潜在的生物标志物，也是多种肿瘤、组织再生、组织工程中潜在的治疗靶点。目前的研究提示 NPNT 可能参与肾脏、肺脏、心脏和骨骼等多种组织器官的发生、发展过程，但 NPNT 在这些组织器官中的表达变化、信号转导通路的调节和调控变化因素等仍未阐明，未来可进一步深入探讨。

* * *

致谢：本综述受浙江省自然科学基金 (No. Q17H-010001)、宁波市自然基金项目 (No. 2017A610246)、浙江省医药卫生科技计划项目 (No. 2017KY573) 和

北京医卫基金会 (No. YWJKJJHKYJJ-HX29) 资助。

参考文献

- 1 Brandenberger R, Schmidt A, Linton J, Wang D, Backus C, Denda S, Müller U, Reichardt LF. Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin $\alpha 8 \beta 1$ in the embryonic kidney. *J Cell Biol* 2001; 154(2): 447–458.
- 2 Morimura N, Tezuka Y, Watanabe N, Yasuda M, Miyatani S, Hozumi N, Tezuka Ki K. Molecular cloning of POEM a novel adhesion molecule that interacts with $\alpha 8 \beta 1$ integrin. *J Biol Chem* 2001; 276(45): 42172–42181.
- 3 Huang JT, Lee V. Identification and characterization of a novel human nephronectin gene in silico. *Int J Mol Med* 2005; 15(4): 719–724.
- 4 Linton JM, Martin GR, Reichardt LF. The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin $\alpha 8 \beta 1$ -mediated stimulation of Gdnf expression. *Development* 2007; 134(13): 2501–2509.

- 5 Nakatani S, Ishimura E, Mori K, Fukumoto S, Yamano S, Wei M, Emoto M, Wanibuchi H, Inaba M. Nephronectin expression in glomeruli of renal biopsy specimens from various kidney diseases: nephronectin is expressed in the mesangial matrix expansion of diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2012; 122(3–4): 114–121.
- 6 Cheng CW, Ka SM, Yang SM, Shui HA, Hung YW, Ho PC, Su YC, Chen A. Nephronectin expression in nephrotoxic acute tubular necrosis. *Nephrol Dial Transpl* 2008; 23(1): 101–109.
- 7 Zimmerman SE, Hiremath C, Tsunazumi J, Yang Z, Finney B, Marciano DK. Nephronectin regulates mesangial cell adhesion and behavior in glomeruli. *J Am Nephrol* 2018; 29(4): 1128–1140.
- 8 Watany MM, El-Horany HE. Nephronectin (NPNT) and the prediction of nephrotic syndrome response to steroid treatment. *Eur J Hum Genet* 2018; 26(9): 1354–1360.
- 9 Kahai S, Lee SC, Lee DY, Yang J, Li M, Wang C-H, Jiang Z, Zhang Y, Peng C, Yang BB. MicroRNA miR-378 regulates nephronectin expression modulating osteoblast differentiation by targeting GalNT-7. *PLoS One* 2009; 4(10): e7535.
- 10 Kahai S, Lee SC, Seth A, Yang BB. Nephronectin promotes osteoblast differentiation via the epidermal growth factor-like repeats. *FEBS Lett* 2010; 584(1): 233–238.
- 11 Fang L, Kahai S, Yang W, He C, Seth A, Peng C, Yang BB. Transforming growth factor-beta inhibits nephronectin-induced osteoblast differentiation. *FEBS Lett* 2010; 584(13): 2877–2882.
- 12 Kahai S, Vary CP, Gao Y, Seth A. Collagen, type V, $\alpha 1$ (COL5A1) is regulated by TGF- β in osteoblasts. *Matrix Biol* 2004; 23(7): 445–455.
- 13 Miyazono A, Yamada A, Morimura N, Takami M, Suzuki D, Kobayashi M, Tezuka K, Yamamoto M, Kamijo R. TGF- β suppresses POEM expression through ERK1/2 and JNK in osteoblasts. *FEBS Lett* 2007; 581(27): 5321–5326.
- 14 Ikehata M, Yamada A, Morimura N, Itose M, Suzawa T, Shiota T, Chikazu D, Kamijo R. Wnt/beta-catenin signaling activates nephronectin expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 484(2): 231–234.
- 15 Kuek V, Yang Z, Chim SM, Zhu S, Xu H, Chow ST, Tickner J, Rosen V, Erber W, Li X, An Q, Qian Y, Xu J. NPNT is expressed by osteoblasts and mediates angiogenesis via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Sci Rep* 2016; 6: 36210.
- 16 Lee SC, Fang L, Wang CH, Kahai S, Deng Z, Yang BB. A non-coding transcript of nephronectin promotes osteoblast differentiation by modulating microRNA functions. *FEBS Lett* 2011; 585(16): 2610–2616.
- 17 Patra C, Diehl F, Ferrazzi F, van Amerongen MJ, Novoyatleva T, Schaefer L, Muhlfeld C, Jungblut B, Engel FB. Nephronectin regulates atrioventricular canal differentiation via Bmp4-Has2 signaling in zebrafish. *Development* 2011; 138(20): 4499–4509.
- 18 Patra C, Ricciardi F, Engel FB. The functional properties of nephronectin: an adhesion molecule for cardiac tissue engineering. *Biomaterials* 2012; 33(17): 4327–4335.
- 19 Wain LV, Shrine N, Miller S, Jackson VE, Ntalla I, Artigas MS, Billington CK, Kheirallah AK, Allen R, Cook JP, Probert K, Obeidat Me, Bossé Y, Hao K, Postma DS, Paré PD, Ramasamy A, Mägi R, Mihailov E, Reinmaa E, Melén E, O'Connell J, Frangou E, Delaneau O, Freeman C, Petkova D, McCarthy M, Sayers I, Deloukas P, Hubbard R, Pavord I, Hansell AL, Thomson NC, Zeggini E, Morris AP, Marchini J, Strachan DP, Tobin MD, Hall IP. Novel insights into the genetics of smoking behaviour, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease (UK BiLEVE): a genetic association study in UK Biobank. *Lancet Respir Med* 2015; 3(10): 769–781.
- 20 Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, Marcianti KD, Franceschini N, van Durme YM, Chen TH, Barr RG, Schabath MB, Couper DJ, Brusselle GG, Psaty BM, van Duijn CM, Rotter JI, Uitterlinden AG, Hofman A, Punjabi NM, Rivadeneira F, Morrison AC, Enright PL, North KE, Heckbert SR, Lumley T, Stricker BH, O'Connor GT, London SJ. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat genet* 2010; 42(1): 45–52.
- 21 Qian G, Henry A, Liu B, Miller S, Billington C, Hall IP. Inhibition of nephronectin expression in human bronchial epithelial cells using siRNA knock-down. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193: A5866.
- 22 Fujiwara H, Ferreira M, Donati G, Marciano DK, Linton JM, Sato Y, Hartner A, Sekiguchi K, Reichardt LF, Watt FM. The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* 2011; 144(4): 577–589.
- 23 Dilmac S, Erin N, Demir N, Tanriover G. Nephronectin is decreased in metastatic breast carcinoma and related to metastatic organs. *Pathol Oncol Res* 2018; 24(3): 679–688.
- 24 Eckhardt BL, Parker BS, van Laar RK, Restall CM, Natoli AL, Tavarria MD, Stanley KL, Sloan EK, Moseley JM, Anderson RL. Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 2005; 3(1): 1–13.
- 25 Steigedal TS, Toraskar J, Redvers RP, Valla M, Magnussen SN, Bofin AM, Opdahl S, Lundgren S, Eckhardt BL, Lamar JM. Nephronectin is correlated with poor prognosis in breast cancer and promotes metastasis via its integrin-binding motifs. *Neoplasia* 2018; 20(4): 387–400.

- 26 Kuphal S, Wallner S, Bosserhoff AK. Loss of nephronectin promotes tumor progression in malignant melanoma. *Cancer Sci* 2008; 99(2): 229–233.
- 27 Cartularo L, Laulicht F, Sun H, Kluz T, Freedman JH, Costa M. Gene expression and pathway analysis of human hepatocellular carcinoma cells treated with cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 288(3): 399–408.
- 28 Inagaki FF, Tanaka M, Inagaki NF, Yagai T, Sato Y, Sekiguchi K, Oyaizu N, Kokudo N, Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430(2): 751–756.
- 29 Tang J, Saito T. Nephronectin stimulates the differentiation of MDPC-23 cells into an odontoblast-like phenotype. *J Endod* 2017; 43(2): 263–271.
- 30 Arai C, Yoshizaki K, Miyazaki K, Saito K, Yamada A, Han X, Funada K, Fukumoto E, Haruyama N, Iwamoto T, Takahashi I, Fukumoto S. Nephronectin plays critical roles in Sox2 expression and proliferation in dental epithelial stem cells via EGF-like repeat domains. *Sci Rep* 2017; 7: 45181.
- 31 Abu-Daya A, Nishimoto S, Fairclough L, Mohun TJ, Logan MP, Zimmerman LB. The secreted integrin ligand nephronectin is necessary for forelimb formation in *Xenopus tropicalis*. *Dev Biol* 2011; 349(2): 204–212.
- 32 Kurosawa T, Yamada A, Takami M, Suzuki D, Saito Y, Hiranuma K, Enomoto T, Morimura N, Yamamoto M, Iijima T. Expression of nephronectin is inhibited by oncostatin M via both JAK/STAT and MAPK pathways. *FEBS Open Bio* 2015; 5: 303–307.
- 33 Tsukasaki M, Yamada A, Suzuki D, Aizawa R, Miyazono A, Miyamoto Y, Suzawa T, Takami M, Yoshimura K, Morimura N, Yamamoto M, Kamijo R. Expression of POEM, a positive regulator of osteoblast differentiation, is suppressed by TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 410(4): 766–770.
- 34 Tsukasaki M, Yamada A, Yoshimura K, Miyazono A, Yamamoto M, Takami M, Miyamoto Y, Morimura N, Kamijo R. Nephronectin expression is regulated by SMAD signaling in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 425(2): 390–392.
- 35 Iezumi Y, Yamada A, Minami E, Ikehata M, Yoshida Y, Kato T, Morimura N, Ogata H, Sakashita A, Iijima T. IL-1 β suppresses nephronectin expression in osteoblasts via ERK1/2 and JNK. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 493(1): 773–775.
- 36 Kato T, Yamada A, Ikehata M, Yoshida Y, Sasa K, Morimura N, Sakashita A, Iijima T, Chikazu D, Ogata H. FGF-2 suppresses expression of nephronectin via JNK and PI3K pathways. *FEBS Open Bio* 2018; 8(5): 836–842.
- 37 Kurosawa T, Yamada A, Suzuki D, Morimura N, Sasagane Y, Itabe H, Kamijo R. Nephronectin expression is up-regulated by BMP-2. *Biol Pharm Bull* 2016; 39(7): 1211–1215.
- 38 Hiranuma K, Yamada A, Kurosawa T, Aizawa R, Suzuki D, Saito Y, Nagahama R, Ikehata M, Tsukasaki M, Morimura N, Chikazu D, Maki K, Shiota T, Takami M, Yamamoto M, Iijima T, Kamijo R. Expression of nephronectin is enhanced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *FEBS Open Bio* 2016; 6(9): 914–918.