

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790721

研究課題名 (和文)

日本人先天性ネフローゼ症候群発症機序の解明と蛋白尿改善物質の探索

研究課題名 (英文)

The clarification of pathogenesis of Japanese congenital nephrotic syndrome and the search for molecule to ameliorate proteinuria

研究代表者

綾 邦彦 (AYA KUNIHICO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20379762

研究成果の概要：

NPHS1 は、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子の一つで、NPHS1 遺伝子からネフリンという蛋白がつくられる。これは、糸球体上皮細胞が作るスリット膜（血液から尿へ大きな蛋白がもれないようにしている濾過装置）の構成分子と考えられている。日本人の先天性ネフローゼ症候群患者 6 人が両方の NPHS1 遺伝子に異常を持ち、2 人が片方の遺伝子異常を持っていた。8 人中 4 人に同じ変異が、2 人に別の同じ変異があった。今回みつかったすべての遺伝子変異をそれぞれ人工的に作り、細胞の中に入れて、異常なネフリン蛋白を作らせた。その蛋白は、遺伝子変異から予想される大きさであることをネフリン蛋白に対する抗体を使って確かめた。現在、それぞれの変異蛋白と細胞の中の各器官との位置関係の違いや変異蛋白の細胞死に関する蛋白への影響や細胞の形に関する蛋白への影響などを調べている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児腎・泌尿器学 遺伝子 細胞・組織 シグナル伝達 ネフリン ポドシン
ネフローゼ症候群

1. 研究開始当初の背景
蛋白尿は、腎疾患の中でも最も遭遇する重要

な症候の一つであり、また、蛋白尿そのものが腎疾患の予後を悪化させることが知られ

ている。蛋白尿をいかにコントロールするかは、临床上とても重要であるが、今まで発症機序は不明な点が多かった。ネフローゼ症候群は、高度の蛋白尿を来す疾患群で、疾患としてだけでなく、蛋白尿の発症機序を考えるモデルという点でも重要である。1998年フィンランド型先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子として、NPHS1(蛋白はネフリン)が同定され、免疫電顕や遺伝子改変マウスなどの研究により、現在、糸球体上皮細胞(タコ足細胞)が作るスリット膜の構成分子であると考えられている。すなわち、ネフリンの異常によるスリット膜の異常が高度蛋白尿を引き起こすと考えられている。これ以後、蛋白尿をひきおこす主体として、基底膜から糸球体上皮細胞に関心が集中し、次々にネフローゼ症候群を引き起こす遺伝子が明らかにされていった。特に、NPHS2(蛋白はポドシン)は、家族性の巣状糸球体硬化症の原因遺伝子としてみつけられ、欧米では変異の頻度が高く、病因として重要である。ポドシンは、ネフリンを支えるアンカー蛋白として機能していると考えられている。我々は、先天性ネフローゼ症候群の日本人患者にもNPHS1遺伝子に変異が存在することをはじめて明らかにした。その後、全国から同疾患患者の遺伝子解析の依頼を受け、解析を行った結果、8例中6例の患者にホモもしくは複合ヘテロの遺伝子変異が認められ、残る2例はヘテロのみの変異を認めた。興味深いことに8例中4例に同じ新規の遺伝子変異が存在していた。また、2例に他国で報告のない同じ変異が存在しており、この2つの変異は日本人特有で頻度の高い変異であると考えられた。

また、ネフリンは同疾患だけでなく、糖尿病性腎症やIgA腎症、他のネフローゼ疾患などの蛋白尿発症にも関与していることがし

めされている。

2. 研究の目的

in vitroの系を用い、先天性ネフローゼ症候群の機序の解明と本疾患の蛋白尿を減少させる物質の探索をすることである。

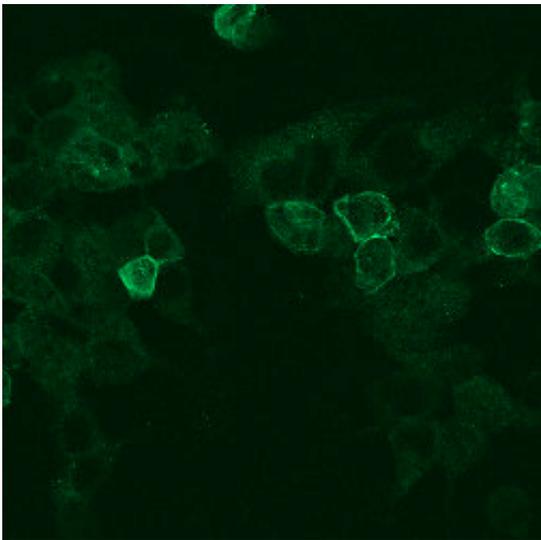
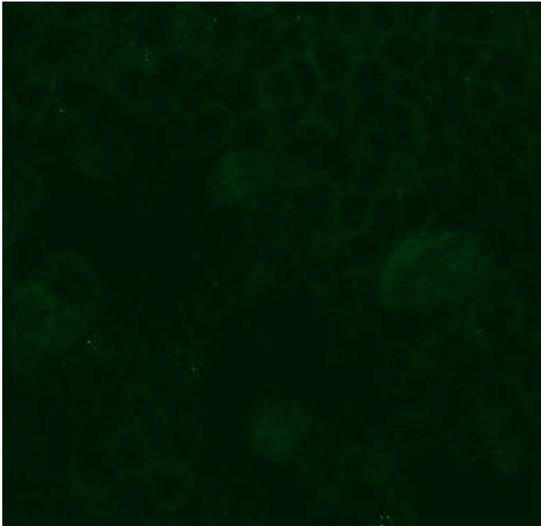
3. 研究の方法

NPHS1 cDNAを持つ発現ベクターに日本人先天性ネフローゼ症候群患者にみつかった遺伝子変異や外国でみつかった特徴的な遺伝子変異を導入し、それを培養細胞にトランスフェクションし、発現蛋白の細胞内での位置、アポトーシス関連蛋白や細胞骨格関連蛋白の発現の違いなどを調べる。

4. 研究成果

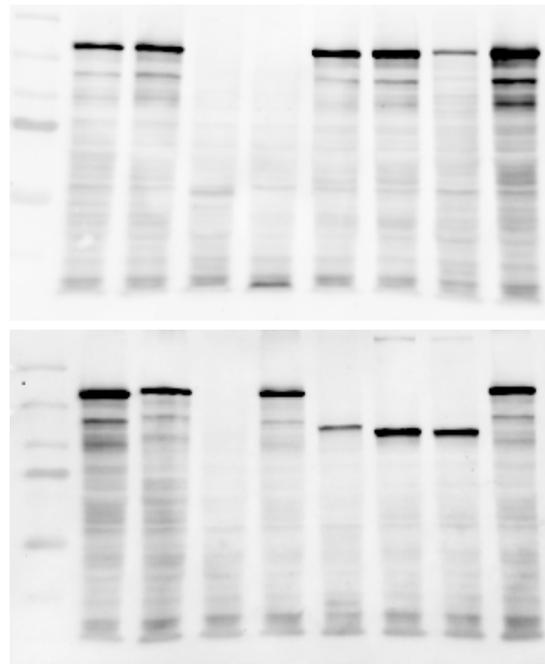
日本人先天性ネフローゼ症候群患者において、我々が同定したNPHS1遺伝子変異を有したNPHS1 cDNAの入ったpcDNA3の発現ベクターをQuikchange site-directed mutagenesis kitを使用してすべて作成した。外国でみつかった特徴的な遺伝子変異を有するものも対照として作成した。

これらのベクターをHEK293細胞にトランスフェクトした。736番のGがTに変異し、246番アミノ酸がストップコドンに変化する変異の場合では、それより下流を認識する抗ネフリン抗体を使った免疫染色で陰性だった(図1)が、野生型の場合(図2)は染色された。



(上 図1 中 図2)

246番アミノ酸より上流を認識する抗体で、ウエスタンブロットを行い、遺伝子変異を導入したすべてのプラスミドが、想定される大きさの蛋白を発現していることを確認した。



(上 lane1:P676R lane2:R379W lane3:E246X
lane6:C160S lane8:野生型

下 lane6:2515del(C) lane7:R827X)

現在、それぞれの変異をもつと考えられるネフリン蛋白と細胞膜 ゴルジ体 粗面小胞体を標識するマーカーとの位置関係のパターンを共焦点レーザー顕微鏡を使って検討したり、変異を導入した場合のAKTのリン酸化への影響やアクチンの変化などを調べている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

- ① Ava K et al. NPHS1 gene mutation in Japanese patients with congenital nephrotic syndrome. Nephrol Dial Transplant 2009 査読有
- ② 綾邦彦 先天性・乳児ネフローゼ症候群 小児内科 40巻増刊 845-849 2008査読無
- ③ 綾邦彦ら 先天性ネフローゼ症候群 腎

と透析 62巻 60-64 2007 査読無

〔学会発表〕(計5件)

- ① 綾邦彦 NPHS2 異常を有した日本人 SRNS 例 日本腎臓学会 2008.5.1 福岡
- ② 綾邦彦 NPHS2(ポドシン)異常を有したステロイド抵抗性ネフローゼ症候群(SRNS)の一例 日本小児科学会 2008.4.1 東京
- ③ Aya K et al. Genetic analysis of Japanese patients with congenital nephrotic syndrome(CNS). 14th Congress of the International Pediatric Nephrology Association. 2007.8.31-9.4. Budapest, Hungary
- ④ 宮澤真理 新生児期に腎不全となったびまん性メサンギウム硬化症の一例 第42回日本小児腎臓病学会学術集会 2007年6月28-30日 横浜市
- ⑤ 綾邦彦 著名な頭蓋骨離開を認めたステロイド抵抗性ネフローゼ症候群(SRNS)の一例 第42回日本小児腎臓病学会学術集会 2007年6月28-30日 横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

綾 邦彦 (AYA KUNIHICO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20379762

(1)分担研究者

なし

(3)連携研究者

なし