

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591273
 研究課題名 (和文) アルポート症候群の分子病態の解明と新規治療法の開発に向けた基礎的研究
 研究課題名 (英文) Basic study for molecular mechanisms and novel therapy of Alport syndrome
 研究代表者
 小林 武弘 (KOBAYASHI TAKEHIRO)
 新潟大学・医歯学系・准教授
 研究者番号：90311670

研究成果の概要 (和文)：

アルポート症候群 (AS) は、IV 型コラーゲン $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖遺伝子の遺伝的欠損に起因する進行性腎炎である。本研究では AS 患者でみられる種々の変異を導入した $\alpha 5$ (IV) 鎖を作成、 $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 4$ (IV) 鎖との複合体形成について検討することにより、ヘテロ三量体の形成不全ないし細胞からの分泌不全が AS の主たる分子病態であることを明らかにした。一方で、正常にヘテロ三量体を形成する変異 $\alpha 5$ (IV) 鎖があることから他の分子病態の存在も推察された。また、このヘテロ三量体形成に分子シャペロンである HSP47 が重要な働きをしていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Alport syndrome (AS), or progressive hereditary nephritis, is caused by mutations in type IV collagen $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains. In this study, we introduced a variety of AS mutations into the $\alpha 5$ (IV) chain and characterized the resulting mutants. The results showed that a defect in the heterotrimer formation of $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV), and $\alpha 5$ (IV) chains and/or a defect in secretion of the heterotrimer from cells, is the major molecular mechanism that defines the pathogenesis of AS. In contrast to these findings, other studies have demonstrated that some mutant $\alpha 5$ (IV) chains form the heterotrimer in the correct conformation, suggesting the involvement of other molecular mechanisms. Moreover, we elucidated that molecular chaperone HSP47 plays a critical role in heterotrimerization of the three chains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：アルポート症候群、IV型コラーゲン、ヘテロ三量体、HSP47、NC1ドメイン、コラーゲンドメイン、変異

1. 研究開始当初の背景

(1) アルポート症候群は、IV型コラーゲン $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖遺伝子 (*COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*) の遺伝的欠損に起因する進行性糸球体腎炎であり、神経性難聴や眼症状をしばしば伴う。アルポート症候群において *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5* 遺伝子のいずれか一つの異常で $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 4(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖全てが糸球体基底膜から欠損することから、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 4(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖はヘテロ三量体を形成、更にそれらが高次構造をとりIV型コラーゲンの網目状のネットワークが構成されることが予想されてきた。われわれは、ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5* 遺伝子を導入し、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 4(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖を単独ないし複数強発現する細胞株を樹立、解析することにより、 $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 4(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖がヘテロ三量体を形成すること、ヘテロ三量体は細胞内で形成された後、細胞外へ分泌されることを明らかにしてきた。

(2) アルポート症候群の分子病態としては、 $\alpha 3(\text{IV})$ $\alpha 4(\text{IV})$ $\alpha 5(\text{IV})$ ヘテロ三量体の形成不全やヘテロ三量のプロテアーゼ（特にマトリックスメタロプロテアーゼ：MMP）への感受性亢進などが予想される。

(3) われわれが樹立した $\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 4(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖発現株では、ヘテロ三量体形成の効率や細胞からの分泌能が低い。コラーゲン分子の修飾に関わるシャペロン蛋白であるHSP47の発現が低いことをその理由として考えていた。

2. 研究の目的

(1) $\alpha(\text{IV})$ 鎖は、約 1,400 アミノ酸のコラーゲンドメインと約 230 アミノ酸のNC1ドメインから成っている。アルポート症候群で報告されている種々の変異を導入した $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖を作成し、ヘテロ三量体形成能、細胞からの分泌能、あるいはプロテアーゼ感受性について解析する。これらの結果と臨床症状や組織所見との相関について検討し、アルポート症候群の分子病態を明らかにする。

(2) $\alpha 3(\text{IV})$ $\alpha 4(\text{IV})$ $\alpha 5(\text{IV})$ ヘテロ三量体形成におけるHSP47の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アルポート症候群で報告されている種々の変異を有する *COL4A5* cDNA を作成、既

に樹立してある $\alpha 34$ 細胞 ($\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖を発現する) に導入して安定形質転換株を得る。それぞれの変異蛋白についてヘテロ三量体形成と三量体の細胞からの分泌について解析する。また、精製したヘテロ三量体のプロテアーゼ感受性について解析する。複合体形成能やプロテアーゼ感受性についての結果と臨床症状・組織所見との相関について検討する。

(2) $\alpha 345$ 細胞 ($\alpha 3(\text{IV})$ 、 $\alpha 4(\text{IV})$ 、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖を発現する) においてHSP47遺伝子の発現が増強 (HSP47強発現プラスミドの導入) ないし減弱 (HSP47 siRNA 発現プラスミドの導入) した細胞株を樹立する。これらの細胞におけるヘテロ三量体の形成および細胞からの分泌、ヘテロ三量体のプロテアーゼ感受性について検討し、HSP47のヘテロ三量体形成への関与について検討する。

4. 研究成果

(1) X連鎖型アルポート症候群患者で報告されている 12 種類のミスセンス変異および 3 種類のナンセンス変異、C末端側の1~4アミノ酸の欠失を $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖に導入し、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖との複合体形成について検討し、以下の結果を得た。

- ① 3種類のミスセンス変異 (A1498D、P1517T、R1677Q) を有する $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖では、細胞内でヘテロ三量体を形成したが、その三量体は分泌されなかった。
- ② その他のミスセンス・ナンセンス変異を有する $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖は細胞内でもヘテロ三量体を形成しなかった。
- ③ これらの障害のパターンと臨床所見との間で明らかな相関はなかった。
- ④ C末端側の1アミノ酸を欠失するとヘテロ三量体の形成は減弱し分泌されず、2アミノ酸を欠くとヘテロ三量体は全く形成されなかった。

以上のことから、NC1ドメインに変異を有する $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖は $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖との複合体形成に障害があり、これがアルポート症候群の分子病態の一つと考えられた。また、機能を維持する上で $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖C末端側アミノ酸は重要と考えられた。

(2) 症状が軽微で、腎組織でも $\alpha 3$ ~ $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖が残存する大家系において最近報告されたNC1ドメインのC1638Y変異を導入した $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖の複合体形成について解析した。変異 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖は、正常に比べ量は減少してい

たが、細胞内でヘテロ三量体を形成し細胞外に複合体として分泌されていた。また、複合体のプロテアーゼに対する感受性は変異 $\alpha 5$ (IV)鎖と正常 $\alpha 5$ (IV)鎖でほぼ同等であった。C1638Y変異 $\alpha 5$ (IV)鎖ではヘテロ三量体形成能および複合体としての分泌能が若干残存しており、そのためアルポート症候群としての症状が軽微であると考えられた。

(3) コラーゲンドメインはGly-X-Yの繰り返し構造を持っているが、アルポート症候群ではこのグリシンについて数多くのミスセンス変異が報告されている。このうち末期腎不全に比較的早く至った6種類の変異、比較的遅く至った6種類の変異についてそれぞれ $\alpha 5$ (IV)鎖に導入し、ヘテロ三量体形成能について解析し、以下の結果を得た。

- ① 9種類の変異 $\alpha 5$ (IV)鎖ではヘテロ三量体形成能が減弱していたが、3種類では野生型と差異がなかった。
- ② 複合体形成のパターンと臨床症状との相関は明らかでなかった。
- ③ 複合体形成能が野生型と同等であった3種類の変異 $\alpha 5$ (IV)鎖を含むヘテロ三量体におけるプロテアーゼ(ペプシン、トリプシン)抵抗性は野生型と差異がなかった。

コラーゲンドメインに変異を有する $\alpha 5$ (IV)鎖においては、ヘテロ三量体形成能が部分的ないし完全に残存しているものがあり、ヘテロ三量体形成障害以外の分子病態の存在が想定された。野生型ないし変異 $\alpha 5$ (IV)鎖を含むヘテロ三量体のコラーゲン特異プロテアーゼに対する抵抗性について更なる検討が必要である。

(4) HSP47の $\alpha 3$ (IV) $\alpha 4$ (IV) $\alpha 5$ (IV)鎖複合体形成への関与について検討し以下の結果を得た。

- ① $\alpha 345$ 細胞におけるHSP47蛋白量は正常ヒト線維芽細胞の20%程度であった。
- ② $\alpha 345$ 細胞にHSP47遺伝子を導入することによりその蛋白量を線維芽細胞と同程度にまで高めたが、ヘテロ三量体形成能、分泌能に変化がなかった。
- ③ HSP47のsiRNAを発現するプラスミドを $\alpha 345$ 細胞に導入しHSP47の発現をもとの5%(線維芽細胞の1%)程度にまで減弱したところ、形成・分泌されるヘテロ三量体は5~10%まで少なくなった。この複合体形成にHSP47が必須と考えられた。
- ④ 前記(2)におけるC1638Y変異を有する $\alpha 5$ (IV)鎖では、HSP47の過剰発現により、細胞中でのヘテロ三量体形成能に変化は見られなかったが、細胞から分泌されるヘテロ三量体が減少し、HSP47が異常

コラーゲンの分泌を抑制することが示唆された。

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5件)

1. Kobayashi T and Uchiyama M. Effect of HSP47 expression levels on heterotrimer formation among type IV collagen $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains. Biomedical Research 31, 371-377, 2010. (査読有)
2. Kobayashi T and Uchiyama M. Mutant-type $\alpha 5$ (IV) collagen in a mild form of Alport syndrome has residual ability to form a heterotrimer. Pediatric Nephrology 25, 1169-1172, 2010. (査読有)
3. 小林武弘. 遺伝性腎炎の分子病態. 新潟医学会雑誌 124, 301-306, 2010. (査読有)
4. Firtina Z, Danysh BP, Bai X, Gould DB, Kobayashi T, Duncan MK. Abnormal expression of collagen IV in lens activates the unfolded protein response resulting in cataract. Journal of Biological Chemistry 284, 35872-35884, 2009. (査読有)
5. Kobayashi T, Kakiyama T, Uchiyama M. Mutational analysis of type IV collagen $\alpha 5$ chain, with respect to heterotrimer formation. Biochemical and Biophysical Research Communications 366, 60-65, 2008. (査読有)

[学会発表] (計2件)

1. 小林武弘. 遺伝性腎炎の分子病態. 第651回新潟医学会例会. 2009年7月18日. 新潟市.
2. 小林武弘. C1638Y変異を有するIV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖の $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖との複合体形成に関する解析. 第112回日本小児科学会学術集会. 2009年4月18日. 奈良市.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 武弘 (KOBAYASHI TAKEHIRO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90311670

(2) 研究分担者

内山 聖 (UCHIYAMA MAKOTO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80108050

池住 洋平 (IKEZUMI YOHEI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：70361897