

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591381

研究課題名(和文) ネフローゼ発症における糸球体ポドサイトの分子複合体シグナル伝達異常の解明

研究課題名(英文) Dysregulation of interaction between compound molecules in glomerular podocytes induces nephrotic syndrome

研究代表者

三浦 健一郎 (MIURA KENICHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70408483

研究成果の概要(和文)：

MYH9はnonmuscle myosin heavy chain-IIA (NMMHC-IIA)をコードし、巨大血小板減少症、感音性難聴、進行性腎障害（巣状糸球体硬化症；FSGS）を主徴とするEpstein症候群の原因遺伝子である。近年、MYH9の遺伝子多型が成人のFSGSや腎障害の進行に関連していることが明らかにされた。FSGSは小児の難治性ネフローゼ症候群の代表であり、われわれはNMMHC-IIAのFSGSにおける役割を明らかにするために、動物およびヒトの腎組織を用いて研究を行った。正常ラット腎の電顕では、NMMHC-IIAがポドサイトの一次突起に局在することが明らかにされた。ヒト特発性FSGS患者ではNMMHC-IIAの発現が著明に低下していたが、高度蛋白尿を呈する他の慢性糸球体腎炎患者では発現が保たれていた。ネフローゼモデルのラット（puromycin aminonucleoside腎症）においてもNMMHC-IIAの発現が著明に低下した。以上のことから、NMMHC-IIAが特発性ネフローゼ症候群の蛋白尿発症あるいはポドサイトの細胞形態の維持において重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

MYH9 encodes nonmuscle myosin heavy chain-IIA (NMMHC-IIA) and causes Epstein syndrome characterized by macrothrombocytopenia, sensorineural hearing loss, and progressive renal failure (focal segmental glomerulosclerosis; FSGS). Recent studies have revealed that MYH9 polymorphisms are associated with adult FSGS and progressive renal failure. FSGS is a leading cause of refractory nephrotic syndrome in children, and we investigated animal and human renal specimens to determine whether NMMHC-IIA was involved in development of FSGS. Electron microscopy immunogold labeling studies revealed that NMMHC-IIA was located primarily at primary processes of podocytes. Immunohistochemical analysis revealed that the expression level of NMMHC-IIA markedly decreased in steroid-resistant FSGS, whereas it did not change in chronic glomerulonephritis with heavy proteinuria. A marked decrease in the expression level of NMMHC-IIA was also observed in the glomerulus of puromycin aminonucleoside-treated rat, which presents with nephrotic syndrome. These results suggest that NMMHC-IIA has an important role in development of proteinuria in idiopathic nephrotic syndrome and architectural maintenance of podocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

1. 研究開始当初の背景

小児特発性ネフローゼ症候群の約 90%はステロイド感受性であり、腎組織にほとんど異常を認めない微小変化群 (MCNS) である。しかしその約 30~40%の例は頻回に再発をきたし、長期間のステロイド内服にともなう合併症が顕著に現れ、患児の成長発達に重大な影響をもたらす。また、特発性ネフローゼ症候群の約 10%はステロイド抵抗性であり、組織学的に巣状糸球体硬化症 (FSGS) を呈し、数年のうちに末期腎不全に至る。

ステロイドやカルシニューリン阻害薬がある程度有効なことから、FSGS 患者が腎移植後にネフローゼの再発をきたすことから、小児ネフローゼ症候群に関して T 細胞の免疫異常や何らかの循環因子 (液性因子) の影響が検討され研究されてきたが、いまだに決定的な知見は得られていない。

一方、1990 年代後半から欧州を中心に遺伝性ネフローゼ症候群の疾患遺伝子検索が行われ、nephrin, podocin, phospholipase C epsilon-1, TRPC6 などコードする遺伝子が次々と同定された。これらの蛋白は主として糸球体上皮細胞 (ポドサイト) の足突起または足突起間をつなぐスリット膜に発現しており、ネフローゼ症候群における蛋白尿発症にポドサイトおよびスリット膜が決定的な役割を果たしていることが明らかになった。

このように、遺伝性ネフローゼ症候群の責任分子はその多くが明らかになったが、日常診療でよくみられる特発性ネフローゼ症候群に関してはその発症機序はいまだにほとんど解明されていない。

2008 年、全ゲノム関連解析の手法を用いて、アフリカ系アメリカ人の FSGS の発症に MYH9 の遺伝子多型が関与していることが示され、その後ヨーロッパ系アメリカ人においても同様の知見が得られた。こうした研究とは独立して、私たちは、巨大血小板減少症、進行性腎障害、感音難聴を特徴とする MYH9 異常症 (Epstein 症候群) の研究を行っており、(1)MYH9 に特定の変異 (R702 変異) を有する Epstein 症候群患者の腎病理像が FSGS であること、(2)本来糸球体ポドサイトに発現している NMMHC-IIA (MYH9 によってコードされる蛋白) が発症早期から発現が低下していることを見出した。

NMMHC-IIA はこれまで特発性 FSGS 発症との関与が指摘された唯一の分子である。ヒ

ト特発性 FSGS における NMMHC-IIA の機能を解析することは、これまで一部の遺伝性疾患の知見に限られていたネフローゼ症候群の蛋白尿発症機序の解明にきわめて重要な情報を与えることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトおよび動物モデルのネフローゼ症候群の腎組織において NMMHC-IIA の発現変化を解析するとともに、細胞レベルでの NMMHC-IIA とポドサイト細胞骨格との関連性を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

まず、正常ラットおよびヒトの正常コントロール腎組織において、免疫電顕の手法を用いて、NMMHC-IIA のポドサイト内での局在を決定する。ヒトの正常コントロールとしては腎移植のためにドナーから摘出された腎臓の 0hr 生検を用いる。次に、ヒト特発性ネフローゼ症候群患者、慢性糸球体腎炎患者における NMMHC-IIA の発現・局在変化の解析を行う。また、動物モデル (ネフローゼモデル) のポドサイトにおける NMMHC-IIA の発現・局在変化を解析し、他のポドサイト関連分子の挙動との比較および関連性の検討を行う。

4. 研究成果

- (1) 正常ラット腎組織の二重染色において、NMMHC-IIA は synaptopodin (足突起に局在) とは共局在せず、一次突起に局在する nestin と共局在していた。
- (2) 正常ラット腎組織の電顕において、NMMHC-IIA はポドサイトの一次突起に局在していた (図 1)。
- (3) ヒト正常腎組織の電顕において、NMMHC-IIA はポドサイトの足突起近傍に位置し、足突起の形態保持に重要な役割を果たしていることが考えられた。
- (4) ヒト特発性 FSGS 患者では NMMHC-IIA の発現が低下し、高度蛋白尿を呈する他の慢性糸球体腎炎患者では発現が保たれていた (図 2)。
- (5) ネフローゼモデルのラット (Puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症) において、蛋白尿が極期となる day 11 にポドサイトにおける NMMHC-IIA の発現が著明に低下した (図 3)。Western blot 解析でも NMMHC-IIA 蛋白発現が低下していることを証明した。

以上のことから、NMMHC-IIAが特発性ネフローゼ症候群の蛋白尿発症あるいはポドサイトの細胞形態の維持において重要な役割を果たしていることが示唆された。



図1 正常ラットにおける NMMHC-IIA の局在 (免疫電顕) : ポドサイトの一次突起に局在している (矢印)。

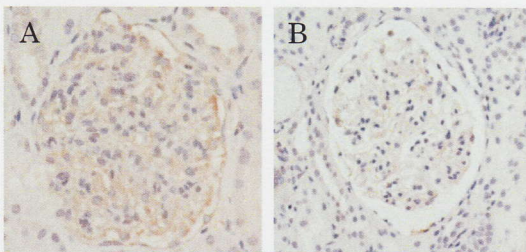


図2 IgA腎症とFSGS患者の腎組織におけるNMMHC-IIA
IgA腎症(A)ではNMMHC-IIAの発現が保たれているのに対し、FSGS(B)では発現が著明に低下している。いずれも高度蛋白尿を呈する患者の腎生検組織。

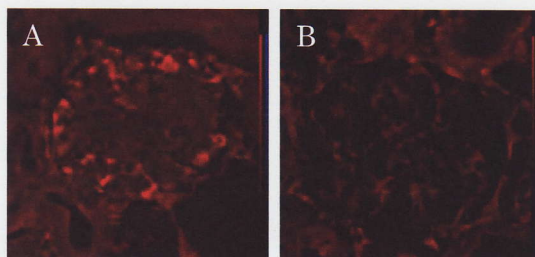


図3 PAN腎症におけるNMMHC-IIA
正常ラット腎(A)ではNMMHC-IIAがポドサイトに強く発現している(赤)が、PAN腎症ラット腎(B)ではNMMHC-IIAの発現が著明に低下している。

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31件)

1. Miura K, Sekine T, Takamizawa M, Terashima H, Furuya A, Koh K, Takita J, Ida K, Igarashi T. Early occurrence of nephrotic syndrome associated with cord blood stem cell transplantation. *Clin Exp Nephrol*. 16: 180-182, 2012 (査読有)
2. Takahashi K, Makita N, Manaka K, Hisano M, Akioka Y, Miura K, Takubo N, Iida A, Ueda N, Hashimoto M, Fujita T, Igarashi T, Sekine T, Iiri T. V2 vasopressin receptor (V2R) mutations in partial nephrogenic diabetes insipidus highlights protean agonism of V2R antagonists. *J Biol Chem*. 287: 2099-2106, 2012 (査読有)
3. Miura K, Sekine T, Nishimura R, Kanamori Y, Yanagisawa A, Sakai K, Nagata M, Igarashi T. Morphological and functional analyses of two infants with obstructive renal dysplasia. *Clin Exp Nephrol*. 15: 602-606, 2011 (査読有)
4. Takita J, Chen Y, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S: Aberrations of *NEGR1* on 1p31 and *MYEOV* on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Science* 102: 1645-1650, 2011 (査読有)
5. Sekine T, Konno M, Sasaki S, Moritani S, Miura T, Wong WS, Nishio H, Nishiguchi T, Ohuchi MY, Tsuchiya S, Matsuyama T, Kanegane H, Ida K, Miura K, Harita Y, Hattori M, Horita S, Igarashi T, Saito H, Kunishima S. Patients with Epstein-Fechtner syndromes owing to *MYH9* R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease. *Kidney Int* 78: 207-214, 2010 (査読有)
6. Miura K, Sekine T, Iida A, Takahashi K, Igarashi T. Salt-losing nephrogenic diabetes insipidus caused by fetal exposure to angiotensin receptor blocker. *Pediatr Nephrol*. 24: 1235-1238, 2009 (査読有)
7. Igarashi T: Fanconi syndrome, pp1039-1068, *Pediatric Nephrology sixth edition, vol 1*, Edited by Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N,

- Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009
8. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Hattori S: Phosphorylation of nephrin triggers Ca²⁺ signaling by recruitment and activation of phospholipase C-γ1. *J Biol Chem* 284: 8951-8962, 2009 (査読有)
 9. Sekine T, Miura K, Takahashi K, Igarashi T. Children's toxicology from bench to bed--Drug-induced renal injury (1): The toxic effects of ARB/ACEI on fetal kidney development. *J Toxicol Sci* 34:245-250, 2009 (査読有)
 10. 三浦健一郎:重症化した病態・疾患別対応—急性腎不全:溶血性尿毒症症候群、RPGNなど. *小児内科* 43: 86-88, 2011(査読無)
 11. 三浦健一郎:けいれん・意識障害を起こす疾患の治療管理のポイント—溶血性尿毒症症候群. *小児内科* 43: 603-606, 2011 (査読無)
 12. 三浦健一郎:脱水と体液量減少はどちらがうか. *小児内科* 43: 657-660, 2011 (査読無)
 13. 三浦健一郎:脱水症患者の初期輸液に生理食塩液を用いる意義と危険性. *小児内科* 43: 753-754, 2011 (査読無)
 14. 三浦健一郎:低アルブミン血症に対するアルブミン投与量はどのように決めるか. *小児内科* 43 増: 382-383, 2011 (査読無)
 15. 三浦健一郎:遺伝性尿細管間質障害. *小児科* 52: 1873-1879, 2011 (査読無)
 16. 三浦健一郎:低ナトリウム血症. *小児内科* 43: 2073-2076, 2011 (査読無)
 17. 五十嵐隆:小児と小児診療の特徴. *Modern Physician* 31: 147-150, 2011 (査読無)
 18. 五十嵐隆:医療係争事例から学ぶ 83:乳児へのHBウイルスワクチン接種のし忘れ. *日医雑誌* 139: 23598-2359, 2011 (査読無)
 19. 五十嵐隆: Dent 病. *日腎会誌* 53: 146-149, 2011 (査読無)
 20. 三浦健一郎:CAKUT研究の歩みと今後の展望. *腎と透析* 68:137-144, 2010 (査読無)
 21. 三浦健一郎:腎・泌尿器疾患. *治療* 92:1267-1271, 2010 (査読無)
 22. 三浦健一郎: Osmotic demyelination syndrome. *腎と透析* 69: 728-730, 2010 (査読無)
 23. 三浦健一郎:小児のCKDの特徴と治療. *腎と透析* 69 増:310-315, 2010 (査読無)
 24. 五十嵐隆:ACEI/ARB fetopathy. *腎と透析* 68: 1043-1045, 2010 (査読無)
 25. 三浦健一郎、関根孝司、西村力、金森豊、長田道夫、五十嵐隆:生直後に多発性嚢胞および著明な水尿管を呈し、1ヵ月後には嚢胞の消退傾向をみた obstructive renal dysplasia と考えられる1例. *発達腎研究会誌* 17: 13-15, 2009 (査読無)
 26. 塩澤亮輔、井田孔明、三浦健一郎、本村あい、康勝好、滝田順子、佐藤詩子、関根孝司、五十嵐隆:大量MTX療法後に低Ca血漿を呈した急性リンパ性白血病の1例. *日本小児体液研究会誌* Vol.1, 20-22, 2009 (査読無)
 27. 三浦健一郎:尿定量—電解質—Na, K, Cl, Ca, P, Mg. *腎と透析* 67: 779-782, 2009 (査読無)
 28. 三浦健一郎:嚢胞腎(ARPKD). *臨牀透析* 25: 51-58, 2009 (査読無)
 29. 関根孝司:母体・新生児・乳児のNa保持戦略. *小児科* 50: 337-345, 2009 (査読無)
 30. 柳澤敦広、乾健彦、生井良幸、高梨潤一、藤井克則、水口雅、関根孝司、五十嵐隆:溶血性尿毒症症候群に続発した急性壊死性脳症. *日本小児腎臓病学会雑誌* 22: 161-165, 2009 (査読無)
 31. 神田杏子、野津寛大、橋村裕也、貝藤裕史、亀井宏一、中西浩一、吉川徳茂、関根孝司、五十嵐隆、小松博史、宮下律子、飯島一誠、松尾雅文: Bartter 症候群とGitelman 症候群に対する利尿剤負荷試験の有用性についての検討. *日本小児腎臓病学会雑誌* 22: 24-28, 2009 (査読無)
- [学会発表] (計 24 件)
1. Miura K, Mashiko M, Takahashi Y, Hanafusa N, Hattori M, Yamaguchi Y, Kitamura H, Kitano E, Hatanaka M, Igarashi T. Plasma exchange ameliorates exacerbation of dense deposit disease with classical pathway activation—a case report. 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, June 4, 2011

2. 益子美紀、三浦健一郎、高橋由希、花房規男、野入英世、服部元史、山口裕、北村肇、北野悦子、畑中道代、五十嵐隆：Classical pathway の活性化が示唆され血漿交換が奏功した dense deposit disease の1例. 第114回日本小児科学会、東京、2011年8月14日
3. 小川敦、三浦健一郎、伊藤淳、永峯宏樹、生井良幸：晩期循環不全を契機に一過性Fanconi 症候群を発症した早産・低出生体重児の1例. 東京、第33回日本小児体液研究会、2011年8月27日
4. 苗代有鈴、三浦健一郎、張田豊、本村あい、樋渡光輝、滝田順子、井田孔明、宇於崎宏、五十嵐隆：骨髄移植後血栓性微小血管症の1例. 静岡、第33回日本小児腎不全学会、2011年10月21日
5. 五十嵐隆：小児の尿細管機能異常症：異常から正常を知る. 川崎医学講演会、岡山、2011年3月18日
6. Igarashi T：Maternal and child health: Japanese perspectives, Pediatric Academic Society and Asian Society for Pediatric Research, Denver, U.S.A. May 1, 2011
7. Igarashi T：Molecular pathogenesis of primary renal tubular acidosis, 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka-city, June 2, 2011
8. Sekine T：MYH9, the gene responsible for hereditary progressing nephritis, also cause idiopathic FSGS? The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, Japan, June, 2, 2011
9. 三浦健一郎、高橋和浩、関根孝司、柳澤敦広、生井良幸、橋村裕也、岡政史、野津寛大、飯島一誠、内藤一郎、五十嵐隆：常染色体劣性 Alport 症候群女児例におけるIV型コラーゲン $\alpha 1\sim\alpha 6$ 鎖染色の検討、第113回日本小児科学会、岩手、2010年4月25日
10. Miura K, Sekine T, Ida K, Terashima H, Takamizawa M, Furuya A, Takita J, Koh K, Igarashi T. Early onset of nephrotic syndrome after cord blood stem cell transplantation. 8th Korea-Japan Pediatric Nephrology Seminar, Gyeongju, Korea, May 29, 2010
11. 三浦健一郎、関根孝司、堀田茂、近本裕子、服部元史、國島伸治、栗原秀剛、佐々木聡、五十嵐隆：免疫組織染色によるMYH9 と蛋白尿発症との関連性についての検討、第53回日本腎臓学会、兵庫、2010年6月16日
12. 三浦健一郎、高橋和浩、滝田順子、五十嵐隆：常染色体劣性遠位尿細管性アシドーシス患者における ATP6V1B1 および ATP6V0A4 の新規遺伝子変異、第45回日本小児腎臓病学会、大阪、2010年7月2日
13. 三浦健一郎、関根孝司、堀田茂、近本裕子、服部元史、國島伸治、栗原秀剛、佐々木聡、五十嵐隆：特発性 FSGS におけるポドサイト NMMHC-IIA (MYH9)発現の解析、第45回日本小児腎臓病学会、大阪、2010年7月3日
14. Miura K, Sekine T, Nishimura R, Kanamori Y, Yanagisawa A, Sakai K, Nagata M, Igarashi T. Morphologic and functional analyses of two infants with obstructive renal dysplasia. 15th Congress of International Pediatric Nephrology Association, New York, U.S.A., September 1, 2010
15. 三浦健一郎、藤乗嗣泰、小川智也、本島みずき、御手洗哲也、橋村裕也、岡政史、飯島一誠、五十嵐隆：COL4A3 および COL4A4 に変異を認めた常染色体優性 Alport 症候群の1家系、第40回日本腎臓学会東部学術大会、栃木、2010年9月24日
16. Miura K, Kurihara H, Horita S, Chikamoto H, Hattori M, Sasaki S, Igarashi T, Kunishima S, Sekine T. Nonmuscle myosin heavy chain IIA encoded by MYH9 is localized in the primary process of podocytes and its expression significantly decreases in idiopathic FSGS. 43rd American Society of Nephrology Renal Week, Denver, U.S.A., November 19, 2010
17. 三浦健一郎、関根孝司、青木良則、高橋和浩、竹下和秀、五十嵐隆：腎性尿崩症および遠位尿細管性アシドーシスを合併した Fanconi 症候群の1例. 第112回日本小児科学会、奈良、2009年4月19日
18. Miura K, Sekine T, Nishimura R, Takahashi K, Kanamori Y, Yanagisawa A, Sakai K, Nagata M, Igarashi T: Morphologic changes of obstructive renal dysplasia during fetal to

- neonatal period: implications in its pathogenesis. 5th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Hangzhou, May 21-23, 2009
19. 三浦健一郎、関根孝司、西村力、高橋和浩、金森豊、柳澤敦広、坂井清英、長田道夫、五十嵐隆: Obstructive renal dysplasia: 胎生期から新生児期の腎形態の経時的変化. 第 52 回日本腎臓学会, 横浜, 2009 年 6 月 4 日
 20. 三浦健一郎、関根孝司、西村力、高橋和浩、五十嵐隆、金森豊、柳澤敦広、坂井清英、長田道夫: Obstructive renal dysplasia の 2 症例. 第 44 回日本小児腎臓病学会, 東京, 2009 年 6 月 27 日
 21. 三浦健一郎、関根孝司、高橋和浩、五十嵐隆、柳澤敦広、内藤一郎: 常染色体劣性アルポート症候群と考えられる 6 歳女児例～蛍光抗体による IV 型コラーゲン $\alpha 1 \sim \alpha 6$ 鎖発現の検討～. 第 10 回東京腎炎・ネフローゼ研究会, 東京, 2009 年 7 月 25 日
 22. 三浦健一郎、桃井貴裕、細井洋平、磯島豪、小太刀康夫、高橋和浩、狩野博嗣、関根孝司、五十嵐隆: 腎機能正常な SLE 女児に生じたバラシクロビルによる急性腎不全. 第 31 回日本小児腎不全学会, 新潟, 2009 年 10 月 9 日
 23. Takashi Igarashi: Molecular pathogenesis of primary renal tubular acidosis, The 44th European Society of Pediatric Nephrology, Birmingham, UK, September 5, 2009
 24. 関根孝司: 「教育講演」遺伝性腎疾患の責任分子から見る尿細管/糸球体機能, 第 39 回日本腎臓病学会東部学術集会, 東京, 2009 年 10 月 2 日
- 〔図書〕 (計 9 件)
1. Sekine T, Kusuhara H: Organic Anion and Cation Drug Transporters. In Oral Bioavailability, ed. by Hu M and Li X, pp 309-328, Willy and Sons, New Jersey, 2011
 2. 三浦健一郎: 疾患別の栄養療法—腎疾患. 小児臨床栄養学 (児玉浩子、玉井浩、清水俊明 編集) pp.299-303, 診断と治療社, 東京, 2011
 3. 三浦健一郎: Bartter 症候群、Gitelman 症候群、Liddle 症候群. 腎疾患・透析 最新の治療 2011-2013 (榎野博史、秋澤忠男 編集) pp.225-228, 南江堂, 東京, 2011
 4. 三浦健一郎: 小児本人に対する病名の告知. 小児ケア Q&A 第 2 版 (五十嵐隆 編集) pp.36-37, 総合医学社, 東京, 2011
 5. 三浦健一郎: 尿細管性アシドーシス. 小児腎臓病学 (日本小児腎臓病学会 編集) pp.273-276, 診断と治療社, 東京, 2011
 6. 三浦健一郎: Dent 病、Fanconi 症候群、小児科臨床ピクシス「小児のネフローゼと腎炎」、五十嵐隆、伊藤秀一編、pp132-135, 中山書店、東京、2010
 7. 五十嵐隆: 小児腎疾患の臨床、診断と治療社、改訂第 4 版、東京、2010
 8. 三浦健一郎: 腹膜透析液. 新小児薬用量改訂第 5 版 (五十嵐隆、渡辺博、木津純子 編集) pp.398-403, 診断と治療社, 東京, 2009
 9. 三浦健一郎、五十嵐隆: Gitelman 症候群、p553-555, 専門医のための腎臓病学 第 2 版、下条文武監修、内山聖、富野康日己、今井裕一編集、医学書院、東京、2009
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
三浦健一郎 (MIURA KENICHIRO)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 70408483
 - (2) 研究分担者
五十嵐隆 (IGARASHI TAKASHI)
 東京大学・医学部附属病院・教授
 研究者番号: 70151256
 - 関根孝司 (SEKINE TAKASHI)
 東邦大学大橋病院・教授
 研究者番号: 50255402
 - (3) 連携研究者
 なし