

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 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591387

研究課題名（和文） 遺伝性ネフローゼ症候群原因分子と相互作用する蛋白群の同定と発症機序の解析

研究課題名（英文） identification of proteins interacting with causative molecules for hereditary nephrotic syndrome and analysis of pathogenesis of it.

研究代表者

綾 邦彦 (AYA KUNHIKO)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：20379762

研究成果の概要（和文）：免疫沈降法、質量分析法を利用して、蛋白尿発症に重要なポドシンに結合する輸送蛋白 x を同定した。糸球体内皮細胞マーカーと輸送蛋白 x の2重染色により x がポドサイトに存在することを証明した。

siRNA による x の発現抑制により、ポドシンの細胞膜での発現が著明に低下し、細胞形態の変化も伴った。x の過剰発現により異常ポドシン蛋白の細胞膜への発現の低下が改善した。これらから、輸送蛋白 x は、ポドシンの細胞膜への輸送に関係すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We identified transport protein x bounded to podocin, important molecule for proteinuria, with immunoprecipitation and LC/MS. The double staining with endothelial marker and anti-x antibody indicated that protein x was expressed in podocyte. When protein x was suppressed with siRNA in cells, podocin expression along cell membrane was much lower than control and cell shape was changed. Overexpression of protein x improved expression of mutated podocin along cell membrane. These data indicated protein x play role in membrane trafficking of podocin.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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 蛋白尿 輸送蛋白 細胞内輸送 質量分析 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

1998年以降、遺伝性ネフローゼ症候群（ネ症）の原因遺伝子（蛋白）として、NPHS1（蛋白ネフリン）NPHS2（蛋白ポドシン）などが同定された。当初、糸球体上皮細胞のスリット膜構

成蛋白としてだけ考えられていたが、近年これらの正常蛋白からシグナルが入り、細胞骨格や細胞のアポトーシスを制御していることもわかってきていた。遺伝性ネ症患者でみつけた遺伝子異常により、ネフリンやポドシンの細胞膜への輸送障害がおこることが

in vitro で示されているが、具体的にどうい
う機序でおこるのかはまったくわかってい
なかった。我々は、日本人先天性ネ症患者で
初めて遺伝子異常を報告 (Aya et al. Kidney
Int (2000) 57:401-) して以来、全国から依
頼を受けネ症患者の遺伝子解析を行いなが
ら、明らかになった遺伝子異常について機能
解析も行っていった。

当院で1歳半時に診断がついたネ症患者の
腎組織を抗ポドシン抗体で免疫染色した所、
普通なら係蹄に沿って染色されるはずが、ま
ったく染色されず、糸球体上皮細胞体部にの
み限局して染色されていた。続いてNPHS2の
遺伝子解析を行ったところ両親から R168H
と R168C の遺伝子変異を受け継いだ複合ヘテ
ロ変異を有していた。(Zhang et al. Kidney
Int (2004) 66:945-) らの報告などと比較し、
168番アルギニン変異は、他の変異に比べ、
ポドシン蛋白輸送障害と関連が強いと考え
られた。

2. 研究の目的

遺伝性ネ症に罹患した日本人患者より同定
した NPHS2 遺伝子異常 (蛋白はポドシン) を
もとに、ポドシン蛋白の機能発現に必要な蛋
白 (特にポドシン蛋白を輸送するのに必要な
可能性のある蛋白) を同定し、性質を明らか
にすることで蛋白尿発症機序を解明し、蛋白
尿を発症する新たな病因の探索にもつなげ
る。

3. 研究の方法

(1)細胞にベクターを使用してポドシンを発
現させて免疫沈降を行い、正常ポドシンに結
合していた可能性のある蛋白を質量分析に
より同定

(2)輸送蛋白 x に対する抗体 発現したポドシ
ンと結合する抗体を使用した免疫沈降法に
より、輸送蛋白 x がポドシンと結合するこ
とを証明

(3)免疫組織二重染色と共焦点顕微鏡による
解析により、x の発現部位を同定

(4)siRNA による輸送蛋白 x の正常発現の抑制
による輸送蛋白 x の機能解析

(5) x の過剰発現による輸送蛋白 x の機能解
析

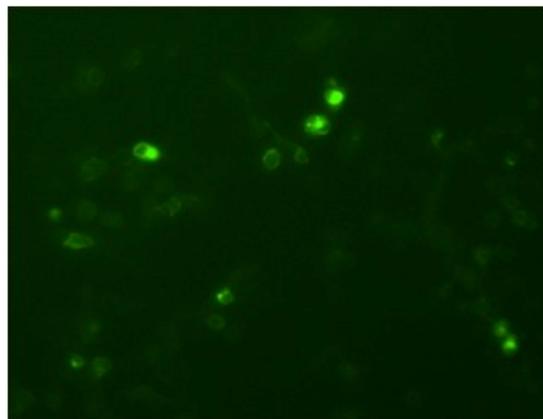
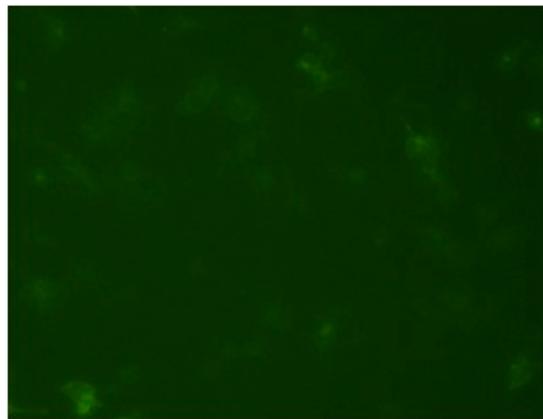
4. 研究成果

(1)正常ポドシンに結合する可能性のある蛋
白を同定し、その中に輸送蛋白 x が存在した。

(2)輸送蛋白 x に対する2種類の抗体を使用し
た免疫沈降法により、輸送蛋白 x がポドシン
と結合することが証明された。また、FLAG タ
グのついたポドシンに対して抗FLAG抗
体を用いた免疫沈降法により、ポドシンが輸
送蛋白 x と結合することも証明された。

(3)糸球体内皮細胞のマーカーと輸送蛋白 x
の2重染色を行ったあと共焦点顕微鏡で解
析し、x がポドサイトに存在することを示し
た。

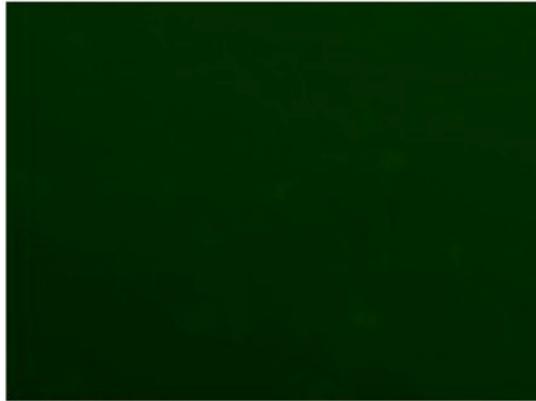
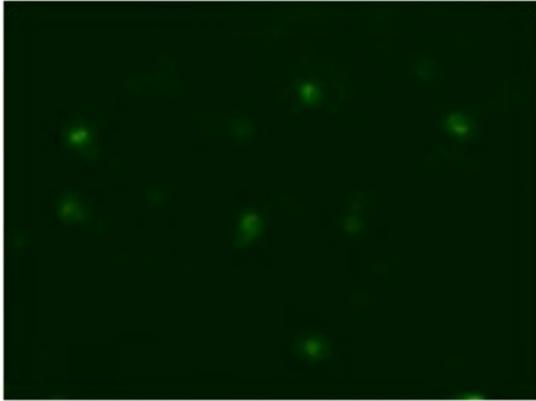
(4)siRNA で細胞内の x の発現を抑制したと
ころ、遺伝子導入により発現させたポドシンの
細胞膜での発現が著明に低下し、細胞形態の
変化も伴った。



上図 siRNA と GFP 正常ポドシン発現ベクター
を遺伝子導入

下図 control と GFP 正常ポドシン発現ベク
ターを遺伝子導入

(5)遺伝性ネ症に罹患した日本人患者に発現
する変異ポドシン蛋白 (R168H R168C) は細
胞膜への発現が非常に低下するが、x を培養
細胞内で過剰発現させたところ、それが改善
した。



上図 x 発現ベクターと GFP 変異ポドシン発現ベクターを遺伝子導入
下図 control ベクターと GFP 変異ポドシン発現ベクターを遺伝子導入

(1)-(5)の結果から、輸送蛋白 x は、ポドシンの細胞膜への輸送に関係すると考えられた。今までまったくわかっていないポドシンの細胞膜への輸送メカニズムを解明する手がかりがえられた。

これにより、輸送蛋白 x が、重症度マーカーや治療標的になる可能性

輸送蛋白 x そのものの異常で尿蛋白をきたす腎疾患が発症する可能性もあり、その場合新しい病気の発見の可能性

siRNA と正常・変異ポドシンの発現系は、薬効のスクリーニングシステムとして使える可能性がうまれた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 11 件)

①宮原宏幸 綾邦彦ら ポドシンの輸送システムの探索 分子腎臓フォーラム 2012. 1. 21 京都

②宮井貴之 綾邦彦ら 日本人先天性ネフローゼ症候群患者が持つ NPHS1 遺伝子変異の機能解析 日本小児科学会 2011. 8. 12-14 東京

③宮井貴之 綾邦彦ら 日本人先天性ネフローゼ症候群患者が持つ NPHS1 遺伝子変異の機能解析 日本腎臓学会 2011. 6. 15-17 横浜

④Aya K, et al. NPHS2 gene mutations in a Japanese patient with steroid resistant nephrotic syndrome アジア小児腎臓病学会 ACPN 2011. 6. 2-4 Fukuoka

⑤ Miyai T, Aya K, et al. Functional analysis of NPHS1 gene mutations with Japanese congenital nephrotic syndrome patients 国際腎臓病学会 IPNA 2010. 8. 29-9. 2 ニューヨーク

⑥宮井貴之 綾邦彦ら 日本人先天性ネフローゼ症候群(先天ネ症)患者が持つ NPHS1 遺伝子変異の機能解析 日本小児腎臓病学会 2010. 7. 2-3 大阪

⑦宮井貴之 綾邦彦ら 治療に反応し寛解に至ったび慢性糸球体硬化(DMS)例 日本腎臓学会 2010. 6. 16-18 神戸

⑧綾邦彦ら 日本人先天性ネフローゼ患者遺伝子異常の創始者効果 日本小児科学会 2010. 4. 23-25 盛岡

⑨綾邦彦 先天性ネフローゼ症候群の発症機序 山陰腎疾患研究会 2010. 03. 20 米子

⑩綾邦彦ら 日本人先天性ネフローゼ患者遺伝子異常の創始者効果についての検討 日本小児腎臓病学会 2009. 06. 26-27 東京

⑪綾邦彦ら NPHS1 遺伝子異常 nt2515(delC)の創始者効果についての検討 日本腎臓学会 2009. 06. 3-5 横浜

[図書] (計 3 件)

①綾邦彦 診断と治療社 小児腎臓病学 先天性ネフローゼ症候群を分担執筆 2012 460

②綾邦彦 南江堂 腎疾患・透析 最新の治療 2011-2013 紫斑病性腎炎 小児を分担執筆 2011 454

③綾邦彦 中山書店 小児科臨床ピクシス 小児のネフローゼと腎炎 先天性ネフロー

ゼ症候群を分担執筆 2011 222

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：腎障害の新規マーカー

発明者：綾邦彦 大内田守

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：2010-216786

出願年月日：2010.9.28

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綾 邦彦 (AYA KUNIHICO)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：20379762

(2) 研究分担者

大内田 守 (OUCHIDA MAMORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80213635

(3) 連携研究者