

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591586

研究課題名(和文) 難治性ネフローゼ症候群の分子病因・病態の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of the pathophysiology basis of nephrotic syndrome

研究代表者

関根 孝司 (SEKINE, Takashi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：50255402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：難治性ネフローゼ症候群(巣状糸球体硬化症：以下FSGS)の分子病態を解明のため、podocyteの細胞骨格 myosin IIA分子につき詳細に解析した。myosin IIA分子がpodocyteのprimary process & cell bodyに局在していることをし、蛋白尿を呈するヒト病態中でFSGS患者特異的に腎でのmyosin IIAの発現が低下していることが明らかにした。ラットネフローゼモデルでは蛋白尿発症時期に一致して、myosin IIA分子の発現低下が観察された。これらの事実はmyosin IIA分子がヒト特発性ネフローゼ症候群発症で中心的役割を果たしている事を示唆する。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathophysiology of nephrotic syndrome, especially FSGS, we investigated myosin IIA. First, we determined the precise localization of myosin IIA; myosin IIA is located at the primary process and cell body of podocyte. In human kidney diseases manifesting heavy proteinuria, only in the kidney specimen from the patients with FSGS, the level of expression of myosin IIA was decreased, while in those from other kidney disease patients were not changed. In rat PAN nephrosis model, the expression level of myosin IIA was decreased at day 11 when heavy proteinuria was observed. Taken together, myosin IIA plays a very important role in the development of human idiopathic nephrotic syndrome, especially FSGS.

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：巣状糸球体硬化症 myosin IIA ポドサイト 蛋白尿 細胞骨格タンパク

1. 研究開始当初の背景

(1)特発性ネフローゼ症候群は小児慢性腎疾患の代表の一つであり、再発やステロイド依存などにより罹患患児の QOL を著しく低下させる。特に巣状糸球体硬化症(以下:FSGS)はステロイド抵抗性の症例が多く、末期腎不全に至る頻度も高い。

(2)過去 10 年間の分子生物学的研究によりメンデル遺伝に従う遺伝性ネフローゼ症候群についてはその分子基盤がかなり明らかになってきた。一方、特発性ネフローゼ症候群については依然としてその病因・病態が不明であり、分子病態は明らかにされていない。

(3)私達は *MYH9* (myosin IIA をコード) 異常により発症する Epstein 症候群について、以前から注目し研究を続けてきた。*MYH9* は大規模連鎖解析により、FSGS 等の難治性ネフローゼの連鎖が初めて報告された唯一の遺伝子である。

2. 研究の目的

(1)上記の背景から、特発性ネフローゼ症候群(特に FSGS)の分子病態に myosin IIA が深く関与しているとの仮定のもと、まずヒト腎疾患患者において myosin IIA の発現解析を行うことを計画した。

(2)(1)の実験により、ヒト特発性 FSGS において特異的に myosin IIA 分子の発現低下を認めたため、さらに、実験動物、培養細胞を用いて myosin IIA 分子の podocyte 内局在・機能および病態への関与について詳細に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の方法を用いておこなった。

(1)ヒトにおけるネフローゼ症候群(微小変化型、FSGS、その他の慢性腎炎における多量蛋白尿)における、免疫組織学染色を用いた myosin IIA 蛋白の発現の解析。

(2)免疫組織染色、免疫電顕法を用いた myosin IIA 分子の podocyte 内の局在の解析。

(3)ネフローゼモデル(ラット PAN 腎症)における myosin IIA の発現変化の解析

(4) *in vitro* で podocyte 培養細胞を用いた myosin IIA の機能解析

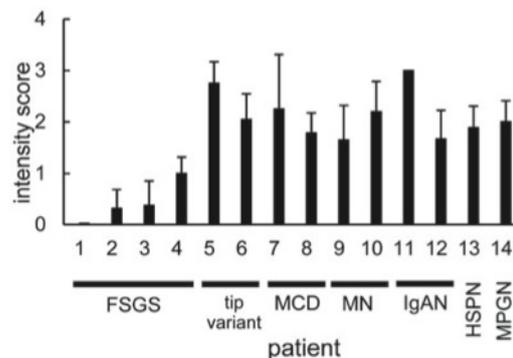
4. 研究成果

(1)ヒトにおけるネフローゼ症候群における myosin IIA の発現解析
ヒトにおいて重度の蛋白尿を呈する、微小変化型ネフローゼ、FSGS、種々の慢性腎炎で、myosin IIA の発現を免疫組織染

色にて観察した(全ての疾患で蛋白尿は同程度)。その結果 FSGS にて有意に、また微小変化型でも明らかに myosin IIA の発現は減少していた。この発現低下は他の podocyte 特異的蛋白(nephrin、podocin など)には認められず、myosin IIA 分子特異的な

現象であった(図1)。

図1. ヒト FSGS (1~4) では他の腎炎などと比較し、有意に myosin IIA 分子の低下を認める。

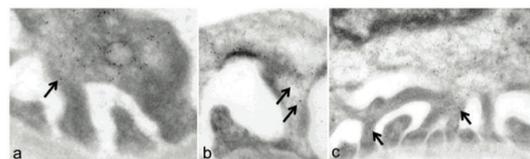


(2)ラットおよびヒトの myosin IIA 分子の局在の解析

ラットおよびヒトで myosin IIA の免疫染色を行ったところ podocyte に局在することが明らかになった。一方、2重染色により podocyte の foot process 局在蛋白との2重染色では共局在パターンは得られなかった。このため、免疫電顕によりさらに詳細な局在解析を行ったところ、podocyte の cell body および primary process (とくに foot process の基部)に局在していることが判明した(図2)。

図2. 免疫電顕法による myosin IIA 分子の podocyte における局在(ヒト)

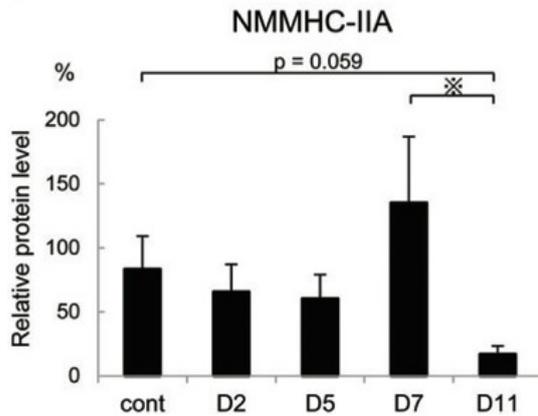
Gold particke が podocyte の foot process ではなく cell body および primary process に局在していることが分かる。



(3)ネフローゼ動物モデル(PAN 腎症)における myosin IIA 分子の発現解析

ネフローゼモデルである PAN 腎症を用いた実験において、コントロールマウスおよび PAN 投与ラットにおいて、経時的に sieving 法を用いて糸球体を単離し、myosin IIA 蛋白のサザン法により定量的に解析をおこなった。その結果、PAN 投与後 11 日目には、有意に myosin IIA の発現が低下していることが明らかになった(図3)。

図 3. PAN 腎症における myosin IIA(NMMHC-IIA)の control, day2, day5, day7, day11 における発現の経時的変化。Day11 で control と比べ有意な低下を認める。



- 4) podocyte 培養細胞を用いた myosin IIA の機能解析。

現在解析途中であるが、培養 podocyte への myosin IIA siRNA 投与、および、myosin 活性阻害薬の投与により、podocyte の細胞形態（足突起の形成）が阻害されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

- ①. [Kunishima S](#), [Kitamura K](#), [Matsumo T](#), [Sekine T](#), [Saito H](#), Somatic mosaicism in MYH9 disorders: the need to carefully evaluate apparently healthy parents. *British Journal of Haematology*, 2014 (査読あり) 165、883–892. doi: 10.1111/bjh.12797
- ②. [Tsurumi H](#), [Harita Y](#), [Kurihara H](#), [Kosako H](#), [Hayashi K](#), [Matsunaga A](#), [Kajiho Y](#), [Kanda S](#), [Miura K](#), [Sekine T](#), [Oka A](#), [Ishizuka K](#), [Horita S](#), [Hattori M](#), [Hattori S](#), [Igarashi T](#). Epithelial protein lost in neoplasm modulates platelet-derived growth factor-mediated adhesion and motility of mesangial cells. *Kidney Int.* (査読あり)、2014、doi:10.1038/ki.2014.85. [Epub ahead of print]
- ③. [Sekine T](#), [Komoda F](#), [Miura K](#), [Takita J](#), [Shimadzu M](#), [Matsuyama T](#), [Ashida A](#), [Igarashi T](#). Japanese Dent disease has a wider clinical spectrum than Dent disease in Europe/USA: genetic and clinical studies of 86 unrelated patients with low-molecular-weight proteinuria. *Nephrol Dial Transplant.* (査読あり) 2014、29(2)、376-84. doi: 10.1093/ndt/gft394.
- ④. [Miura K](#), [Kurihara H](#), [Horita S](#), [Chikamoto H](#), [Hattori M](#), [Harita Y](#), [Tsurumi H](#), [Kajiho Y](#), [Sawada Y](#), [Sasaki S](#), [Igarashi T](#),

[Kunishima S](#), [Sekine T](#). Podocyte expression of nonmuscle myosin heavy chain-IIA decreases in idiopathic nephrotic syndrome, especially in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* (査読あり) 2013、28(12):2993-3003. doi: 10.1093/ndt/gft350.

- ⑤. [Miura K](#), [Sekine T](#), [Takahashi K](#), [Takita J](#), [Harita Y](#), [Ohki K](#), [Park MJ](#), [Hayashi Y](#), [Tajima A](#), [Ishihara M](#), [Hisano M](#), [Murai M](#), [Igarashi T](#). Mutational analyses of the ATP6V1B1 and ATP6V0A4 genes in patients with primary distal renal tubular acidosis. *Nephrol Dial Transplant.* (査読あり) 2013 28(8)、2123-30. doi: 10.1093/ndt/gft216.
- ⑥. [関根孝司](#) : ネフローゼ症候群の関連分子と podocyte 細胞骨格-Epstein 症候群から学ぶ. *日本小児科学会雑誌* 117:959-969、2013
- ⑦. [Kajiho Y](#), [Harita Y](#), [Kurihara H](#), [Horita S](#), [Matsunaga A](#), [Tsurumi H](#), [Kanda S](#), [Sugawara N](#), [Miura K](#), [Sekine T](#), [Hattori S](#), [Hattori M](#), [Igarashi T](#). SIRPα interacts with nephrin at the podocyte slit diaphragm. *FEBS J.* (査読あり) 2012、279(17)、3010-21. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08682.x.
- ⑧. [Vaisbich MH](#), [Henriques Ldos S](#), [Igarashi T](#), [Sekine T](#), [Seki G](#), [Koch VH](#). The long-term use of enalapril and hydrochlorothiazide in two novel mutations patients with Dent's disease type I. *J Bras Nefrol.* 2012 (査読あり) 34(1)、78-81.
- ⑨. [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 highlight protean agonism of V2R antagonists. *J Biol Chem.* (査読あり) 2012、287(3):2099-106. doi: 10.1074/jbc.M111.268797.

〔学会発表〕（計 2 件）

- ①. [Ohwada Y](#), [Suzumura H](#), [Sugita K](#), [Kanou K](#), [Arisaka O](#), [Tomita S](#), [Ueda U](#), [Sekine T](#), [Kunishima S](#) : Identical twins of Epstein/Fechtner syndrome with MYH9 R702C mutations, The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, Japan June 4, 2011
- ②. [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

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○ 取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

関根 孝司 (SEKINE, Takashi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：50255402

(2)研究分担者

①. 國島 真治 (KUNISHIMA, Shinji)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療
センター臨床研究センター)臨床研究セ
ンター, 室長

研究者番号：60373495

②. 栗原 秀剛 (KURIHARA, Hidetake)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80311976

③. 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