

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591569

研究課題名(和文)ネフローゼ症候群発症の分子基盤の解明

研究課題名(英文)Research on molecular mechanism of 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：巣状糸球体硬化症(FSGS)を含む特発性ネフローゼ症候群の発症機序は未だ不明である。本研究では、細胞骨格蛋白であるnonmuscle myosin heavy chain-IIA(NMMHC-IIA)が糸球体ポドサイトの一次突起に局在し、特発性ネフローゼ症候群、特に一次性FSGSの糸球体においてNMMHC-IIAの発現が特異的に低下していることを見いだした。FSGSや他の慢性糸球体腎炎において他のポドサイト関連蛋白の明らかな発現変化はみられなかった。これらの結果はNMMHC-IIAがポドサイトの細胞骨格の維持に重要であり、特発性ネフローゼ症候群の発症と強く関連していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：It remains to be elucidated how idiopathic nephrotic syndrome including focal segmental glomerulosclerosis(FSGS) develops, while glomerular podocyte cytoskeletal proteins have recently emerged as candidate molecules associated with development of proteinuria. Mutations in the MYH9 gene, which encodes nonmuscle myosin heavy chain-IIA(NMMHC-IIA), cause Epstein syndrome and secondary FSGS in the kidney. Firstly, we showed that NMMHC-IIA was localized at primary processes of the podocyte. Secondly, podocyte expression of NMMHC-IIA decreased specifically in Epstein syndrome and idiopathic nephrotic syndrome including primary FSGS. Thirdly, expression of other podocyte-associated proteins did not significantly changed in both FSGS and other chronic glomerulonephritis. These results suggest that NMMHC-IIA is strongly associated with development of idiopathic nephrotic syndrome, playing a pivotal role in maintenance of podocyte cytoskeleton.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児腎・泌尿器学

### 1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群は腎糸球体から大量の蛋白が尿中に漏出する疾患である。小児ネフローゼ症候群の 10~20%はステロイドによって寛解しないステロイド抵抗性ネフローゼ症候群であり、高率に末期腎不全に至るが、その多くは腎組織所見が巣状分節性糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis; FSGS) を呈する。近年、糸球体ポドサイトに存在する蛋白 (nephrin, podocin,  $\alpha$ -actinin 4, WT1 など) の異常が遺伝性ネフローゼ症候群の原因であることが判明したが、遺伝性でない、日常診療でよく遭遇する特発性ネフローゼ症候群や特発性 FSGS の大部分においてはこれらの蛋白をコードする遺伝子に異常がなく、その原因はいまだに不明である。

2008 年、ゲノムワイド関連解析の手法を用いて、nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) をコードする *MYH9* 遺伝子が特発性 FSGS と関連していることが示された [1, 2]。 *MYH9* は巨大血小板をともなう先天性血小板減少症、難聴、進行性腎障害を特徴とする Epstein 症候群の原因遺伝子である。私たちは以前に *MYH9* 遺伝子の R702 変異を有する 9 人の Epstein 症候群患者において臨床像と組織学的特徴を解析し、腎生検を施行した 1 名の組織所見が FSGS であることを報告した [3]。また、糸球体ポドサイトにおける NMMHC-IIA の発現が著明に低下していた。その後、 *Myh9* 変異を有するマウスモデルにおいても巨大血小板減少症、難聴がみられ、腎組織所見が FSGS であることが報告された [4]。

これまでヒト特発性ネフローゼ症候群の糸球体において、いくつかのポドサイト関連蛋白の発現に関する検討が行われているが、 *MYH9* の発現は検討されておらず、また種々のポドサイト関連蛋白の発現を網羅的に検討し、それぞれの相関を調べた報告はない。また、NMMHC-IIA のポドサイト内における詳細な局在についても不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、NMMHC-IIA のポドサイトにおける詳細な局在を解析するとともに、ヒト FSGS を含む特発性ネフローゼ症候群、慢性糸球体腎炎およびポドサイト障害モデル (ラットの puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症) における NMMHC-IIA の発現を検討する。同時に、種々のポドサイト関連蛋白の発現についても検討する。これによって、特発性 FSGS を含むネフローゼ症候群の病態すなわちポドサイト障害における NMMHC-IIA の役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒト正常糸球体での NMMHC-IIA の局在を蛍光抗体法および免疫電顕を用いて解析

した。また、14 名の患者の腎組織 (ステロイド抵抗性特発性 FSGS、微小変化群 (ステロイド感受性ネフローゼ) および高度蛋白尿を呈する他の糸球体腎炎を含む) における NMMHC-IIA の発現を免疫組織染色で検討した。臨床情報や組織診断を知らない 2 名の研究者が染色強度を半定量的にスコア化した。統計解析は Wilcoxon rank sum test を用いて行った。さらに、一部の検体を用いて NMMHC-IIA と他のポドサイト関連蛋白 (nephrin, Neph1, synaptopodin, podocin, ZO-1, GEPP1) の発現を蛍光抗体染色を用いて同時に解析した。

また、PAN 腎症ラット (PAN 投与後 11 日) を用いて、蛍光抗体法で NMMHC-IIA および podocalyxin, ZO-1 の発現を検討した。

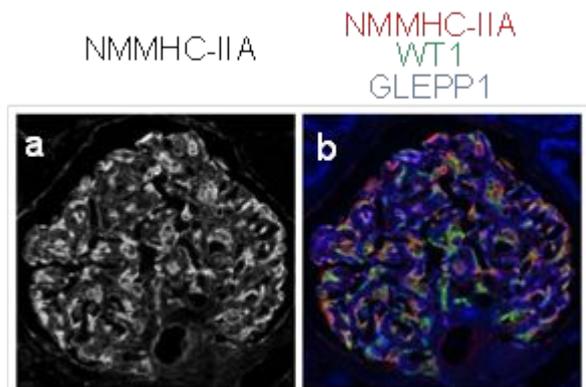
### 4. 研究成果

#### (1) NMMHC-IIA の詳細な局在の検討

ヒトの正常腎において、NMMHC-IIA のシグナルは GEPP1 によって示される係蹄壁の外側、すなわちポドサイトの細胞体に局在することが示された (図 1)。また正常ラット糸球体においても NMMHC-IIA のシグナルは糸球体係蹄の外側に認められ、かつ足突起に局在した蛋白である synaptopodin, podocalyxin, ZO-1 とは異なる局在を示した。

次に、免疫電顕の手法を用いてポドサイトにおける NMMHC-IIA の精確な局在部位を解析した。その結果、NMMHC-IIA はヒト正常腎において、主としてポドサイトの一次突起と、足突起を出す足場部分に局在することがわかった。

図 1 糸球体における NMMHC-IIA の局在



#### (2) ヒト糸球体疾患における NMMHC-IIA を含むポドサイト関連蛋白の発現の検討

ヒトの FSGS および他の蛋白尿を呈する糸球体疾患において NMMHC-IIA 発現を検討した。その結果、ステロイド抵抗性 FSGS における NMMHC-IIA の発現は著明に低下し、他の慢性糸球体腎炎においてはその発現が保たれており、ステロイド抵抗性 FSGS の intensity score は他の慢性糸球体腎炎より有意に低かった (表 1,  $P=0.016$ )。一方、nephrin,

Neph1, synaptopodin, podocin, ZO-1, GLEPP1 の発現を特発性 FSGS, 微小変化群, 膜性腎症の患者サンプルで蛍光抗体法で検討したところ, これらの蛋白の発現に有意な変化はみられなかった。

表 1 ヒト糸球体疾患における NMMHC-IIA の糸球体免疫組織染色の染色強度スコア

	染色強度スコア (平均 ± 標準偏差)	P 値
ステロイド抵抗性 FSGS	0.42 ± 0.42	
FSGS tip variant	2.40 ± 0.49	0.13
微小変化群	2.02 ± 0.33	0.13
慢性糸球体腎炎	2.07 ± 0.50	0.016

ステロイド抵抗性 FSGS との比較

#### (3) PAN 腎症ラットの糸球体における NMMHC-IIA 発現の検討

後天的なポドサイト障害モデル (PAN 腎症) においても, 大量の蛋白尿が認められた時点で, NMMHC-IIA のシグナルの著明な低下が認められ, 同時に検討した podocalyxin や ZO-1 の発現には変化がなかった

#### (4) 考察

本研究では NMMHC-IIA が主としてポドサイトの一次突起に局在していること, またヒト特発性 FSGS 患者のポドサイトにおいて NMMHC-IIA の発現が低下することを明らかにした。NMMHC-IIA の発現低下は特発性ネフローゼ症候群, 特に FSGS に特異的であり, 他の高度蛋白尿を呈する糸球体疾患ではみられなかった。これらの結果により, 細胞骨格蛋白である NMMHC-IIA が遺伝的な Epstein 症候群における腎症のみならず, 特発性 FSGS の発症にも重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### < 引用文献 >

Kopp JB, Smith MW, Nelson GW, et al. MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2008;40:1175-1184.

Kao WH, Klag MJ, Meoni LA, et al. Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group: MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. *Nat Genet.* 2008;40:1185-1192.

Sekine T, Konno M, Sasaki S, et al. Patients with Epstein-Fechtner syndromes owing to MYH9 R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease. *Kidney Int.* 2010;78:207-214.

Zhang Y, Conti MA, Malide D, et al. Mouse models of MYH9-related disease:

mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood* 2012; 119: 238-250.

#### 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)

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* 29: 376-384, 2014 (査読有)

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* 28: 2993-3003, 2013 (査読有)

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* 28: 2123-2130, 2013 (査読有)

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)

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.* 279: 3010-3021, 2012 (査読有)

#### [ 学会発表 ] (計 7 件)

三浦健一郎, 張田豊, 鶴見晴子, 吉田賢弘, 貴田岡節子, 関根孝司: 軽症 Lowe 症候群が疑われた 2 家系における遺伝子解析 第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会, 秋田, 2014 年 6 月 7 日

三浦健一郎, 五十嵐隆, 森貞直哉, 飯島一誠: 原発性尿細管性アシドーシスの全国疫学調査. 第 57 回日本腎臓学会学術集会, 横浜, 2014 年 7 月 6 日

Miura K, Sekine T, Harita Y, Tsurumi H, Takahashi K, Takita J, Harita Y, Tajima A, Ishihara M, Hisano M, Hisano M, Nakakura H, Ashida A, Igarashi T. Intermediate phenotypes of Dent-2 disease and Lowe syndrome in patients with *OCRL* mutations. American Society of Nephrology, Kidney Week 2014, Philadelphia, USA, November 13, 2014

張田豊, 石塚喜世伸, 三浦健一郎, 鶴見晴子, 種五淳史, 菅原典子, 秋岡祐子, 服部元史, 五十嵐隆. 小児ネフローゼ症候群患者における血中可溶性ウロキナーゼ受容体 (suPAR) 濃度の検討. 第 56 回日本腎臓学会, 東京, 2013 年 5 月 11 日

Miura K, Sekine T, Takahashi K, Takita J, Harita 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. International Pediatric Nephrology Association 2013, Shanghai, China, September 1, 2013

三浦健一郎, 張田豊, 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の臨床像と遺伝子変異の解析. 第 55 回日本腎臓学会, 横浜, 2012 年 6 月 2 日

Miura K, Sekine T, Takahashi K, Takita J, Harita Y, Ishihara M, Hisano M, Igarashi T. Detection of novel interstitial large deletions in the *ATP6V0A4* gene and mutations in the *ATP6V1B1* gene in patients with distal renal tubular acidosis. American Society of Nephrology Kidney Week 2012, San Diego, CA, November 2, 2012

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等 : なし

## 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

関根 孝司 (SEKINE, Takashi)  
東邦大学・医学部・教授  
研究者番号 : 50255402

五十嵐 隆 (IGARASHI, Takashi)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・総長  
研究者番号 : 70151256

### (3) 連携研究者