

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間： 2007 ～ 2009

課題番号：19390281

研究課題名（和文） プロテオーム解析によるネフローゼ症候群の病因・病態の解明

研究課題名（英文） Proteomic analysis of the pathogenesis of proteinuria
and nephrotic syndrome.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

小児期発症の腎疾患の代表的存在であるネフローゼ症候群は、糸球体血管係蹄に存在する蛋白濾過障壁の破綻により発症する。近年、podocyte（糸球体上皮細胞）およびpodocyteを連結するslit膜が蛋白尿濾過障壁の実体であることが明らかになってきた。特に腎特異的発現分子であるnephrinがslit膜の機能と構造維持に中心的役割を担う。本研究において私共はnephrinやNeph1などのスリット膜複合体の構造をプロテオミクスの手段を用いて網羅的に解析した。その結果、スリット膜複合体がリン酸化を介したダイナミックな構造であること、この構造が細胞内シグナル伝達系を司るプラットフォームとして働きそのシグナル伝達が蛋白尿とネフローゼ症候群の発症と深く関連することが明らかになった。また、ネフローゼ症候群や巣状糸球体硬化症を起こす遺伝子変異について解析を行い、Epstein-Fechtner症候群においてMYH9遺伝子のR702変異が糸球体硬化のフェノタイプと最も相関する変異であることを見いだした。これらの結果は糸球体上皮細胞の機能分子がネフローゼ症候群を惹起するメカニズムを明らかにするものである。

研究成果の概要（英文）：

A specialized intercellular junction between podocytes, known as the slit diaphragm, forms the essential structural framework for glomerular filtration in the kidney. In this study, we performed proteomic analysis to characterize the structure and function of slit diaphragm as a signaling complex. We found that post-translational modification orchestrates a wide spectrum of protein-protein interactions and intracellular signaling networks at slit diaphragm. These results unraveled the role of dynamics of slit diaphragm signal complex in modulating the glomerular filtration barrier function. We also performed genetic studies on Epstein and Fechtner syndromes which often develops progressive nephrotic syndrome, and found that R702 mutations display a strict genotype-phenotype correlation, and lead to the rapid deterioration of podocyte structure. Our results highlight the critical role of functional podocyte molecules in the development of Nephrotic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H19年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
H20年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
H21年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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：ネフローゼ症候群、蛋白尿、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

1990年代後半より蛋白濾過障壁の分子・細胞レベルでの理解は飛躍的に進み、Nephrinなどの膜タンパク質による糸球体上皮細胞の細胞間接着構造が濾過バリアーとして機能していることが明らかとなってきた。しかし小児期発症ネフローゼ症候群の大半を占める微小変化型ネフローゼおよび、巣状糸球体硬化症の原因は依然として不明であった。

2. 研究の目的

Nephrin や Neph1 などのスリット膜構成分子の結合タンパク質およびそのシグナル伝達分子としての機能をプロテオミクス解析を用いて網羅的に解析し、その構造/機能が蛋白尿やネフローゼ症候群の発症といかに関わるかについて検討する。

一方、糸球体上皮細胞に発現する MYH9 の遺伝子変異について解析を行い、その変異でおこる Epstein-Fechtner 症候群におけるネフローゼ症候群/巣状糸球体硬化症の発症機序を明らかにする。

3. 研究の方法

Nephrin や Neph1 の細胞内および細胞外に結合する蛋白質を網羅的に質量分析計を用い解析した。またこれらの分子はチロシンリン酸化の修飾を受けるが、この修飾の下流についても網羅的な解析を行った。

MYH9 遺伝子変異について genotype-phenotype 相関について解析を行い、また個々の変異体の機能解析を行った。

4. 研究成果

Neph1 の細胞内領域のチロシンリン酸化残基を同定し、そのチロシンリン酸化依存的な結合蛋白質 (Csk, Grb2) を同定した。また

Neph1-Grb2 の結合が細胞内シグナル伝達を修飾することを見だし、その変化が in vivo の蛋白尿発症と関連することを報告した (Harita Y, et al. J. Biol. Chem. 283:9177-86, 2008)。

また、Nephrin についてはチロシンリン酸化に伴い多くのシグナル分子 (PI3Kp85, Crk family proteins, PLC-gamma) と結合すること、PLC-gamma との結合を介して Nephrin が細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすことを見いだした。また Nephrin のリン酸化と PLC-gamma の活性化 (リン酸化) が in vivo の蛋白尿発症モデルにおいて惹起されていることを見だし、糸球体上皮細胞における Nephrin シグナルとその下流のカルシウム濃度の変化が蛋白尿の発症と深く関連することが明らかになった (Harita Y, et al. J. Biol. Chem. 284: 8951-62, 2009)。Nephrin とカルシウム濃度については Nephrin とカルシウムチャンネルとの相互作用をみだし、その制御機構について解析を行っている。

その他、Nephrin の細胞外領域に結合する蛋白質も新規に同定しており、スリット膜複合体の構造について研究をすすめている。

一方、MYH9 遺伝子の R702 変異が糸球体硬化のフェノタイプと最も相関する変異であることを見だし、MYH9 が糸球体上皮細胞の形態形成に重要な役割を果たしていること、その変異が遺伝性ネフローゼ症候群の一端を担っていることを明らかにした (Sekine T et al. Kidney International, in press.)。

これらの結果は糸球体上皮細胞の機能分子がネフローゼ症候群を惹起するメカニズムを明らかにするものである。

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 20 件)

1. Sekine T, Konno M, Sasaki S, et al. Patients with Epstein-Fechtner syndromes owing to MYH9 R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease. *Kidney International*, 査読有, in press.
2. Miura K, Sekine T, Iida A, et al. Salt-losing nephrogenic diabetes insipidus caused by fetal exposure to angiotensin receptor blocker. *Pediatric Nephrology*, 査読有, 24: 1235-8, 2009
3. Zhang Y, Yoshida Y, Nameta M, Xu B, Taguchi I, Ikeda T, Fujinaka H, Mohamed SM, Tsukaguchi H, Harita Y, Yaoita E, Yamamoto T. Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 査読有, in press.
4. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S. Phosphorylation of Nephtrin Triggers Ca^{2+} Signaling by Recruitment and Activation of Phospholipase C- γ 1. *J Biol Chem*, 査読有, 284: 8951-62, 2009
5. 張田豊:「特集-プロテオミクスが解き明かす情報伝達ネットワーク:腎糸球体上皮細胞におけるチロシンキナーゼシグナリング」 実験医学 羊土社, 査読無, Vol. 27, 2582-2587, 2009
6. 張田豊:「腎における細胞内シグナル伝達と病態生理:細胞機能のスイッチとしての蛋白質リン酸化・脱リン酸化」腎と透析 東京医学社、査読無、 Vol. 67, 300-305, 2009
7. 張田豊:「遺伝性ネフローゼ症候群の原因解析からみる濾過バリアとしての podocyte」 小児内科、査読無、Vol. 41, No. 2, 252-256, 2009
8. 張田豊:「糸球体上皮細胞の新たな情報伝達分子と新機能」Annual Review 腎臓 2009, 中外医学社, 査読無, p1-7, 2009
9. 五十嵐隆:「爪膝蓋骨症候群」、専門医のための腎臓病学、医学書院、査読無、p367-370、2009
10. 五十嵐隆:「Dent 病」、専門医のための腎臓病学、医学書院、査読無、p549-553、2009
11. 五十嵐隆:「Gitelman 症候群」、専門医のための腎臓病学、医学書院、査読無、p553-555、2009
12. 五十嵐隆:「Fanconi 症候群」、エキスパートのための腎臓内科学、中外医学社、査読無、p325-328、2009
13. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Hattori S. Neph1, a component of the kidney slit diaphragm, is tyrosine phosphorylated by Fyn and modulates intracellular signaling by binding to Grb2. *J. Biol. Chem.* 査読有 . 283:9177-86, 2008
14. Saito H, Takahashi S, Nagata M, Tsuchiya T, Mugishima H, Yan K, Kondo Y, Matsuyama T, Sekine T, Igarashi T. Reevaluation of glomerular charge selective protein-sieving function. *Pediatr Nephrol*, 査読有, 24: 609-612, 2008
15. Suzuki M, Vaisbich MH, Yamada H, Horita S, Li Y, Sekine T, Moriyama N, Igarashi T, Endo Y, Cardoso TP, de Sa LC, Koch VH, Seki G, Fujita T. Functional analysis of a novel missense NBC1 mutation and of other mutations causing proximal renal tubular acidosis, 査読有, *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 455: 583-593, 2008
16. 張田豊 「腎尿路疾患の ABC と新たな展開-ネフローゼ症候群の病態」小児科診療 診断と治療社、査読無, Vol. 72, No. 2, 2008
17. 張田豊 「総説:糸球体上皮細胞、その構造と機能-蛋白尿の発症原因の解明に向けて-」, 査読有, 日本小児科学会雑誌 Vol. 112, No. 8, p1219-1226, 2008
18. Sekine T, Nozu K, Iyengar R, Fu XJ, Matsuo M, Tanaka R, Iijima K, Matsui E, Harita Y, Inatomi J, Igarashi T. *OCRL1* mutations in patients with Dent disease phenotype in Japan. *Pediatr. Nephrol.* 査読無. 22: 975-980, 2007
19. 張田豊 「蛋白尿発症機序解明に向けた研究の流れと今後の展望-糸球体上皮細胞におけるシグナル伝達系の役割-」, 査読有, 小児腎臓病学会雑誌 Vol. 20, No. 2, p76-81, 2007
20. 張田豊 「これだけは知っておきたい分子腎臓病学-PLC」腎と透析 東京医学社, 査読無, Vol 63, No. 4, p542-545, 2007

[学会発表] (計 12 件)

1. Harita Y: SIRP α Co-Localizes with Nephtrin at Podocyte Slit Diaphragm, and Modulates Nephtrin Tyrosine

- Phosphorylation. ASN (American Society of Nephrology) Renal Week 2009, San Diego, CA, 2009, 10.31.
2. Kanda S, Harita Y, et al: Phosphorylation-dependent surface expression of TRPC6 by PLC γ is negatively regulated by Nephrin. ASN (American Society of Nephrology) Renal Week 2009, San Diego, CA, 2009, 10.30.
 3. Igarashi T: Molecular pathogenesis of primary renal tubular acidosis. The 44th European Society of Pediatric nephrology, Birmingham, 2009, 9,5.
 4. 張田 豊: 糸球体スリット膜におけるリン酸化シグナリング. 第24回新潟腎シンポジウム, 新潟, 2009, 7月25日
 5. 張田 豊: Nephrinのチロシンリン酸化はPLC γ -1を介し細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる. 第52回日本腎臓学会学術総会 基礎と臨床の融合, 横浜, 2009, 6.26.
 6. 張田 豊: 先天性遺伝性ネフローゼ症候群の原因解析から見えてきた蛋白尿の発症機序. 第112回日本小児科学学会学術集会, 奈良, 2009, 4月17日
 7. Kanda S, Harita Y, Sekine T, Igarashi T, Hattori S: TRPC6 as a possible link between Nephrin and PLC γ -the role of phosphorylation of TRPC6. Renal Week 2008 2008年11月6日 フィラデルフィア
 8. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S: Clustering-induced phosphorylation of Nephrin triggers Ca²⁺ entry by recruitment and activation of PLC γ . Renal Week 2008-2008年11月6日 フィラデルフィア
 9. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S: Recruitment and activation of PLC- γ by phosphorylation of nephrin: a new insight into a link between slit diaphragm and calcium signaling. 7th International Podocyte Meeting, 2008年6月4日 トロント
 10. 張田豊: ネフローゼ症候群の病態解明への挑戦と治療の標準化-ネフローゼ症候群発症に関連する分子群と蛋白尿発生メカニズム- 日本小児科学会(シンポジウム)、2008年4月25日 東京
 11. Harita Y, Kurihara H, Kanda S, Sekine T, Igarashi T, Hattori S: "PLC-gamma as a novel phospho-nephrin binding protein" Renal Week 2007, 2007年10

月3日サンフランシスコ

12. 張田豊: 糸球体上皮細胞スリット膜におけるシグナル伝達解析 第91回東京腎生理集団会 2007年4月7日、東京

[図書] (計2件)

1. Igarashi T: Fanconi syndrome, pp1039-1068, Pediatric Nephrology, 6th edition, vol 1, Edited by Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 2009
2. 五十嵐 隆: 小児腎疾患の臨床、改訂第3版、全291頁、診断と治療社、東京、2008

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0件)
- 取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

関根 孝司 (SEKINE TAKASHI)
 東邦大学・医学部附属病院大橋病院・教授
 研究者番号: 50255402

(3) 連携研究者

張田 豊 (HARITA YUTAKA)
 横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・特任助教
 研究者番号: 10451866