

博士論文

特発性ネフローゼ症候群におけるポドサイト細胞骨格蛋白
に関する研究

三浦健一郎

目次

I	要旨	3
II	序文	4
III	実験材料および実験法	25
IV	結果	36
V	考察	52
VI	謝辞	61
VII	参考文献	62

I 要旨

巣状分節性糸球体硬化症 (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 nonmuscle myosin heavy chain-IIA (NMMHC-IIA) が糸球体ポドサイトの一次突起に局在することを明らかにした。また特発性ネフローゼ症候群, 特に一次性 FSGS の腎糸球体において NMMHC-IIA の発現が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。

II 序文

ネフローゼ症候群とは

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り、その定義は高度蛋白尿（ $1\text{g}/\text{m}^2/\text{日}$ 以上）と低アルブミン血症（血清アルブミン $3.0\text{g}/\text{dL}$ 未満）である[1]。症状としては乏尿，浮腫，倦怠感，胸腹水，高脂血症を呈し，肺動脈塞栓をはじめとする血栓症や腹膜炎などを合併する場合もある[2]。小児では本邦において年間 1,000 名程度発症するとされるが，小児ネフローゼ症候群の多くは原因不明の特発性ネフローゼ症候群であり，小児特発性ネフローゼ症候群の 80～90%はステロイド治療によって蛋白尿が消失する（寛解する）ステロイド感受性ネフローゼ症候群である（図 1）[3]。その多くは腎組織の光学顕微鏡像にほとんど変化のない微小変化群である。しかし，ステロイド治療によって寛解しても，その 30～40%の症例は 1 年に 4 回以上再発する頻回再発型ネフローゼ症候群や，ステロイドの減量中または中止後 2 週間以内に再発するステロイド依存性ネフローゼ症候群となるため，長期に高用量のステロイドを内服しなければならず，成長障害，肥満，骨粗鬆症による脊椎圧迫骨折，白内障，緑内障などの副作用が重大な問題となる。ステロイドを減量または中止するためにシクロスポリンやシクロフォスファミド，ミゾリビンなどの免疫抑

制薬が用いられるが、これらの薬剤を用いても頻回再発型やステロイド依存性から脱却できない症例が存在する。このような症例に対して、近年 CD20 に対するモノクローナル抗体であるリツキシマブの有効性が次々と報告されている [4,5]。私たちの研究グループは、世界に先がけて難治性ネフローゼ症候群に対するリツキシマブ治療のプラセボ対照二重盲検ランダム化比較試験を医師主導試験として実施し、リツキシマブがネフローゼの寛解維持およびステロイド減量に有効かつ安全であることを示した [6]。この結果をうけて、リツキシマブは 2014 年 8 月に小児期発症の難治性ネフローゼ症候群の治療薬として本邦で保険収載された。ただし、リツキシマブによって B 細胞が枯渇している間は寛解を維持できるものの、B 細胞は平均 5 か月後から回復し、本試験でリツキシマブを投与された患者も 1 年後には 70% 以上が再発するという事実も判明しており、リツキシマブ投与後、B 細胞回復後の寛解維持療法が今後の検討課題になっている。いずれにしても、ネフローゼ症候群の根本的な原因と、なぜネフローゼ症候群に対してステロイドや種々の免疫抑制薬が有効なのかという根本的な疑問については現在も不明な点が多く残されている。

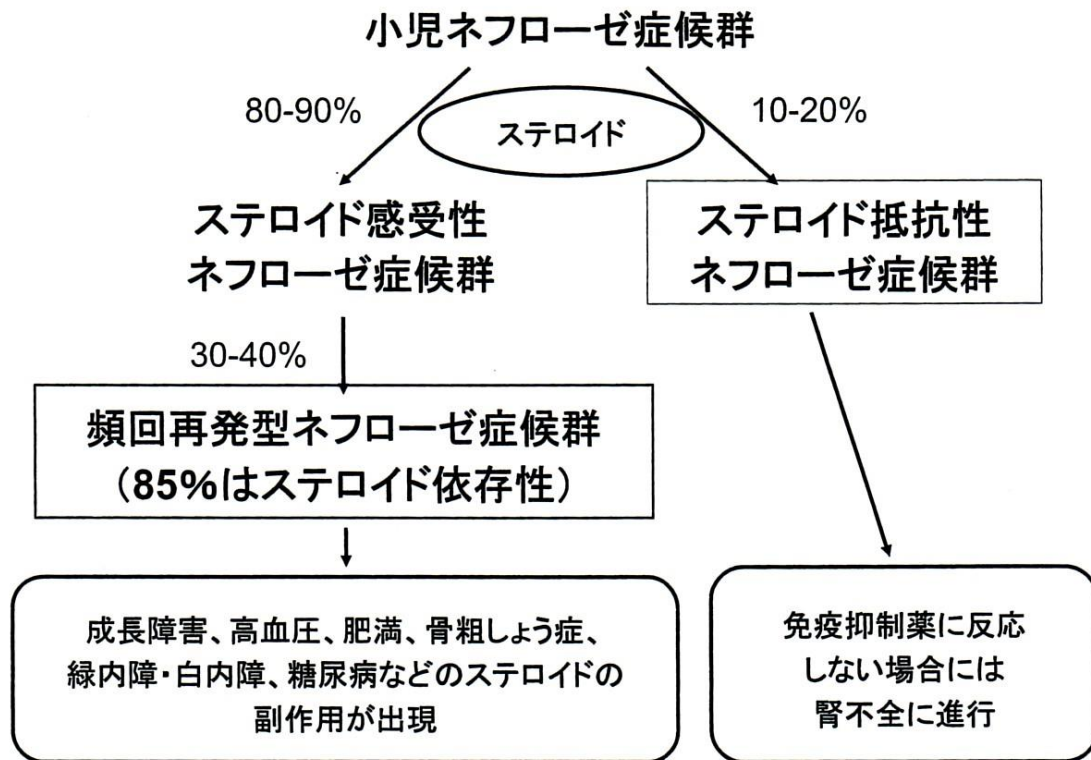


図1 小児ネフローゼ症候群の臨床経過（文献[3]より引用）

頻回再発型ネフローゼ症候群では、寛解維持とステロイドの減量中止を目的に、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群では寛解導入を目的として、何らかの免疫抑制薬が使用されることが多い。

巣状分節性糸球体硬化症とは

巣状分節性糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis; FSGS) は病理学的に腎糸球体に巣状 (一部の糸球体) かつ分節性 (一つの糸球体の一部分) に硬化像を有する腎症の総称である。さまざまな程度の蛋白尿を呈し、しばしばネフローゼ症候群を呈する。小児特発性ネフローゼ症候群のうち、約 10~20% が 4 週間のステロイド治療で蛋白尿が陰性化しない (寛解しない) ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群であるが (図 1)、その多くが FSGS であり、高率に末期腎不全へと進行し、透析や腎移植が必要となる[2]。FSGS は小児の末期腎不全の原因疾患の第 2 位であり、小児原発性糸球体疾患の中では末期腎不全の原因疾患の筆頭である。FSGS には一次性的なもの と二次性的なもの、また遺伝性的なものがある (表 1) [7]。日常診療で比較的好く遭遇するのは一次性的 (特発性) FSGS であり、著明な浮腫と低アルブミン血症がみられることが多い。特発性 FSGS の病理組織学的分類として、コロンビア分類があり、cellular variant, perihilar variant, collapsing variant, tip variant, NOS (not otherwise specified) variant に分けられる (表 2) [8]。tip variant はステロイド感受性のものが比較的多くみられるが、それ以外の variant はほとんどがステロイド抵抗性である。特発性 FSGS は高率に末期腎不全に進行し、腎移植後も 30~40% に FSGS が再発し、移植腎機能廃絶の大きな原因となる[9]。他の原因による末期

腎不全では腎移植後の移植腎の長期生着が十分に期待できるが、特発性 FSGS では早期再発の懸念があるため、腎移植に踏み切ることが難しく、実際に再発によって移植腎機能が廃絶した場合を含め、長期間の透析生活を余儀なくされることになる。このような QOL の低下だけでなく、生命予後に関しても、国内外の小児の透析患者と腎移植患者の統計によれば、明らかに透析患者において生存率が低い[10,11]。以上のことから、特発性ネフローゼ症候群、特に特発性 FSGS における蛋白尿発症機序を解明し、治療に結びつけることは小児腎臓病領域において喫緊の課題である。

表 1 FSGS の原因による分類 (文献[7]より引用)

分類	病因	原因
一次性	血中循環因子	・特発性
二次性	糸球体における過剰濾過	・ネフロンの減少 ○先天異常 (低出生体重児, 腎異形成) ○後天的なネフロンの減少 (逆流性腎症, 糖尿病性腎症など) ・機能的適応反応 (肥満, 鎌状赤血球症, チアノーゼ性先天性心疾患)
	ウイルス感染	・HIV, パルボウイルス B19, サイトメガロウイルス
	薬物	・ヘロイン, パミドロネート, リチウム, 蛋白同化ステロイド
家族性	ポドサイト関連遺伝子異常	・nephrin, podocin, INF2, α -actinin-4, CD2AP, WT1, TRPC6, phospholipase C ϵ 1

表 2 FSGS の病理形態学的分類 (文献[8]より引用改変)

variant	定義	除外基準
NOS	少なくとも 1 個の糸球体で毛細血管の消失を伴う細胞外基質の増加を認める。	perihilar, cellular, tip, collapsing のすべてのバリエントを除外する。
perihilar	少なくとも 1 個の糸球体で血管極の硝子化を認める。硬化を伴うこともある。50%以上の糸球体に血管極部の硝子化あるいは硬化を認める。	cellular, tip, collapsing の各バリエントを除外する。
cellular	少なくとも 1 個の糸球体で毛細血管係蹄を閉塞するような管内増殖を認める。泡沫細胞や核破砕を伴う場合もある。	tip, collapsing の各バリエントを除外する。
tip	少なくとも 1 個の糸球体の尿細管極(近位尿細管起始部に接する外側 25%の係蹄)に硬化病変を認める。尿細管極が明確に同定される必要がある。	collapsing バリエントを除外する。
collapsing	少なくとも 1 個の糸球体に分節性または全節性の虚脱およびポドサイトの肥大・過形成を認める。	なし

NOS, not otherwise specified

ネフローゼ症候群の発症機序—血中循環因子の検討

ネフローゼ症候群，特に特発性 FSGS の発症機序として，古くから血漿中に存在する循環因子が重要と考えられてきた。蛋白尿を発症させる循環因子の存在を支持する事実として，血漿交換が有効な症例が存在することや，FSGS 患者が腎移植を受けた直後に大量の蛋白尿を呈して FSGS が再発すること，FSGS 患者の血漿をラットに投与することにより蛋白尿が発症すること [12-14]，FSGS 患者の血清が単離糸球体モデルにおいてアルブミンの透過性を増加させることなどがあげられる [15]。さらには，末期腎不全に至った FSGS 患者に対する腎移植後，早期に FSGS が再発し，移植腎機能が低下したため，移植後 14 日の時点でこの移植腎を摘出して別の末期腎不全患者（原疾患は糖尿病性腎症）に移植したところ，この移植された腎臓は蛋白尿や腎機能低下を呈することなく正常に機能したという報告があり [16]，FSGS 患者における蛋白尿を惹起させる循環因子の存在を示す根拠となっている。長年の間，存在が示唆されつつも同定に至っていなかった循環因子であるが，2008 年，Wei らはこの循環因子の候補として soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) に着目し，urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) 欠失マウスや培養ポドサイトを用いて，uPAR が $\alpha_v\beta_3$ -integrin のシグナル伝達経路を介して Cdc42 や Rac1 などの Rho GTPase を活性化し，細胞の可動性を亢進させることによ

ってポドサイト障害を引き起こしていることを示した[17]。実際、FSGS 患者血清中の suPAR は微小変化群や膜性腎症、妊娠高血圧症患者のそれよりも有意に高値で、移植後再発した FSGS 症例では血漿交換によって血中 suPAR 濃度が低下した症例が寛解に至ったことが示され[18]、世界的に注目を集めた。しかしその後に行われた追試では、suPAR は疾患によらずに推定糸球体濾過率と負の相関を示し、suPAR が FSGS で特異的に上昇しているわけではないという報告が相次いだ[19-21]。私たちも同様の検討を行い、血清 suPAR は原疾患によらず推定糸球体濾過率と負の相関を示し、移植後再発した FSGS の児のネフローゼ再発時の血清 suPAR は上昇していないことを報告した[22]。したがって現時点では血清 suPAR 濃度の診断マーカーとしての有用性ならびに FSGS を惹起する循環因子としての可能性については否定的な結論となっている。

ネフローゼ症候群の発症機序—糸球体構成要素異常の検討

ネフローゼ症候群の発症機序を考えるうえで重要なもう一つの視点が、蛋白が糸球体の濾過障壁からどのように漏れ出すのかということである。糸球体濾過障壁は内側から外側にかけて血管内皮細胞、基底膜、上皮細胞（ポドサイト）の3つの成分によって構成されている（図2）。血管内皮細胞には比較的径の大きい fenestration があるため、もっとも重要な濾過障壁としては考えにくい。

従来より基底膜が主たる濾過障壁と考えられてきた。基底膜の主要構成分子である 4 型コラーゲンによる基盤構造が比較的密であることと、その 4 型コラーゲンの異常によって引き起こされる Alport 症候群において、血尿とともに蛋白尿が顕著にみられることが、この仮説を支持してきた。また基底膜のもうひとつの構成分子であるヘパラン硫酸が陰性に荷電しており、同じく陰性に荷電しているアルブミンに対して電気的な障壁にもなっていると考えられてきた。しかし、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの核蛋白質である **perlecan** の変異マウスでは糸球体基底膜の異常がみられず[23]、プロテオグリカンである **agrin** のノックアウトマウスでも蛋白尿が生じないことから[24]、基底膜のプロテオグリカンがチャージバリアーとして機能していることを示す積極的なデータは現在のところ乏しい。

次に述べるように 1998 年から遺伝性ネフローゼ症候群の原因遺伝子が明らかになり、蛋白尿、特にネフローゼ症候群の発症機序についてポドサイトの重要性があらたに認識されるようになった。

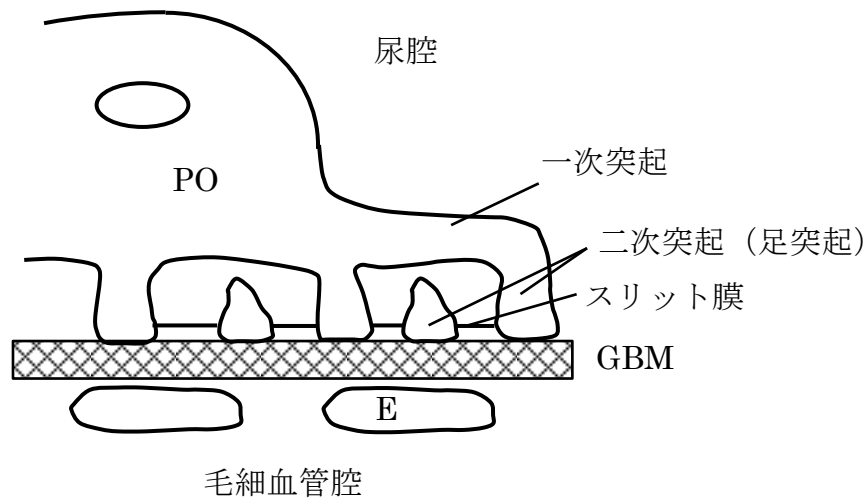


図2 糸球体濾過障壁の3層構造

糸球体係蹄は内側から内皮細胞 (E)、基底膜 (GBM)、ポドサイト (PO) の3層で構成されている。ポドサイトから一次突起が伸び、さらに二次突起 (足突起) が出ている。足突起間を結ぶ構造がスリット膜である。

遺伝性ネフローゼ症候群の原因はポドサイト機能異常である

1998年、Tryggvasonらはポドサイトの細胞間接着装置であるスリット膜の構成分子 *nephrin* の異常によってフィンランド型先天性ネフローゼ症候群が発症することを見いだした[25]。ポドサイトは高度に分化した細胞で、細胞体から無数の一次突起が出ており、さらにそこから二次突起（足突起）が突出している（図2）。隣り合う足突起は隣接するポドサイト同士のものである。この足突起間をつなぐジッパー様構造を形成するスリット膜の構成分子の異常によってネフローゼ症候群が生じることが判明し、ネフローゼ症候群の原因としてポドサイトおよびスリット膜がにわかに注目されるようになった。実際、*nephrin* の発見の後、ポドサイトに特異的に発現する分子である *podocin* [26], α -actinin-4 [27], transient receptor potential channel 6 (TRPC6) [28], phospholipase C epsilon-1 [29]が遺伝性にFSGSを起こす分子として次々と報告され、これらの異常による腎糸球体障害はポドサイトパシー (podocytopathy) と呼ばれるようになった。ポドサイトおよびスリット膜が蛋白尿の濾過障壁として極めて重要であると認識されたことから、それらの分子メカニズムに関する研究が進み、遺伝性FSGSの病態生理が一部明らかになった。これらの結果、欧州の1歳以下のステロイド抵抗性ネフローゼ症候群80例のうち、*NPHS1* (*nephrin* をコードする遺伝子), *NPHS2*(同 *podocin*), *WT1*(同 *WT1*), *LAMB2*(同 *laminin- β 2*)

の変異が原因の 2/3 を占めることが報告された (それぞれ 23%, 37%, 4%, 3%) [30]。これらの乳児期発症のネフローゼ症候群は常染色体劣性遺伝を示すが、年長児ないしは成人発症で比較的緩徐に進行する常染色体優性遺伝の FSGS の原因もまたポドサイトに発現する遺伝子の異常, すなわち *ACTN4* (α actinin-4 をコードする遺伝子), *CD2AP* (同 CD2-associated protein), *TRPC6* (同 TRPC6), *INF-2* (同 inverted formin 2) の異常が報告されている。表 3 にこれまで知られている遺伝性ネフローゼ症候群の原因遺伝子を示す[9]。

表 3 ネフローゼ症候群および FSGS の原因遺伝子（文献[9]より引用改変）

遺伝子	蛋白	機能	症候
<i>NPHS1</i>	nephrin	スリット膜	フィンランド型 先天性 NS, 孤発 型 FSGS/NS
<i>CD2AP</i>	CD2 associated protein	スリット膜	AD または AR の 成人発症 FSGS
<i>NPHS2</i>	podocin	スリット膜	小児期発症 AR の FSGS
<i>ACTN4</i>	α -actinin-4	ポドサイト細胞骨 格	成人発症 AD の FSGS
<i>MYO1E</i>	unconventional myosin 1E	アクチン制御	小児期発症 AR の FSGS
<i>INF2</i>	inverted formin-2	アクチン制御	成人発症 FSGS
<i>ANLN</i>	anillin	アクチン束の形成	AD の FSGS
<i>MYH9</i>	NMMHC-IIA	アクチン制御	Epstein 症候群
<i>PTPRO</i>	receptor-type tyrosine-protein phosphatase O	ポドサイトシグナ ル伝達	小児期発症 AR の FSGS
<i>ARHGDI1</i>	Rho GDP- dissociation inhibitor 1	Rho GTPase シグ ナル伝達, アクチン 制御	小児期発症 NS/ FSGS
<i>TRPC6</i>	transient receptor potential channel 6	Ca チャネル	AD または AR の 成人発症 FSGS
<i>WT1</i>	Wilms tumor protein	ポドサイト発生	AD の孤発型 FSGS, DMS
<i>PLCE1</i>	phospholipase C ϵ 1	ポドサイト分化, シ グナル伝達	小児期発症 AR の FSGS, DMS
<i>LMX1B</i>	LIM homeobox transcription factor 1- β	ポドサイト・基底膜 発生	Nail-patella 症候 群, FSGS
<i>CD151</i>	CD151 antigen	ポドサイトと基底 膜, laminin- integrin 相互作用	小児期発症 FSGS, 難聴, サ ラセミア
<i>LAMB2</i>	laminin β 2 chain	integrin α 3 β 1 との	AR Pierson 症候

<i>ITGB4</i>	integrin β4	相互作用, 基底膜と細胞骨格の結合 細胞と細胞外基質の接着	群, FSGS FSGS
<i>SMARCA1</i>	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1	クロマチンの束化と遺伝子転写	AR Schimke immunoosseous dysplasia, 小児期発症 FSGS
<i>COQ2</i>	polyprenyltransferase	ミトコンドリア機能, coenzyme Q10 欠乏	AR の小児期発症 NS, FSGS
<i>COQ6</i>	ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6	ubiquinone の合成	AR の NS, FSGS, 難聴
<i>PDSS2</i>	decaprenyl diphosphate synthase subunit 2	coenzyme Q10 の合成, ミトコンドリア機能	FSGS, collapsing FSGS
<i>ADCK4</i>	AarF domain-containing protein kinase 4	coenzyme Q10 の調節	FSGS
<i>MTTL1</i>	mitochondrially encoded tRNA leucine 1	ミトコンドリア tRNA	AR の MELAS, FSGS
<i>SCARB2</i>	scavenger receptor class B member 2	ライソゾーム受容体と推定	FSGS, collapsing FSGS
<i>APOL1</i>	apolipoprotein L1	不明	FSGS のリスク, HIV 関連腎症

NS : ネフローゼ症候群, AD : 常染色体優性, AR : 常染色体劣性, DMS : びまん性メサンギウム硬化, MELAS : mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes.

ネフローゼ症候群におけるポドサイト細胞骨格制御の重要性

遺伝性ネフローゼ症候群の原因としてポドサイトの細胞骨格制御に関する遺伝子が多く同定された結果、この細胞における骨格構造の維持がネフローゼ症候群発症に深く関与することが明らかになった。ポドサイトには糸球体濾過圧に耐えて糸球体係蹄を保持する役割があり、このために細胞骨格が重要と考えられている。ポドサイトの一次突起では微小管や中間径フィラメントがその機能を担い、二次突起（足突起）はアクチン束で形態が維持されている。

アクチン束の形成に必要な分子である α -actinin-4 や anillin は成人発症型家族性 FSGS の原因となり [31] , アクチン重合に関係するフォルミンファミリー蛋白である INF2 の異常でも家族性 FSGS が起こる [32]。またアクチンを切断・脱重合しアクチン骨格の流動性を生み出す働きをもつ cofilin のポドサイト特異的欠損マウスでも蛋白尿を発症する [33]。上述の Cdc42, Rac1 はアクチン線維のネットワーク形成に重要であり, Cdc42 欠損マウスは新生児期から蛋白尿および腎不全を呈する [34]。また, これら Rho GTPase を制御する ARHGDI1A の異常はヒト先天性ネフローゼ症候群を引き起こすことが報告されたが [35], その機序として GTP に結合した活性型 Rac1 が増加し, ポドサイトの遊走性が亢進することが指摘されている [36]。ほかにも, アクチン結合蛋白である synaptopodin は腎ではポドサイトの足突起に豊富に発現しており, もう一つの Rho GTPase

である RhoA を安定化させることでアクチン線維の形成に働く [37]。実際、synaptopodin ノックアウトマウスはプロタミン硫酸またはリポポリサッカライドによって惹起されたネフローゼ症候群からの回復が障害され [38]、synaptopodin と CD2AP の両者の同時ヘテロ欠損マウスは蛋白尿と FSGS 様の腎組織像を呈する [39]。このように、ポドサイトの細胞骨格とその制御に関わる分子群の異常は蛋白尿と FSGS の発症に深く関与していると考えられる。

ポドサイト細胞骨格制御をターゲットとした治療の可能性

上記は遺伝性ネフローゼ症候群または動物モデルにおける知見であるが、特発性ネフローゼ症候群患者で有効性が証明されたリツキシマブについても、B 細胞の枯渇という免疫学的な機序だけでなく、ポドサイトの細胞骨格への直接作用による機序が提唱されている。Fornoni らは、リツキシマブが FSGS 患者およびコントロールの腎生検組織においてポドサイトに結合しており、かつポドサイトには CD20 が存在しないことを示した。そしてリツキシマブが結合しているのはポドサイト表面の sphingomyelinase-like phosphodiesterase-3b (SMPDL-3b) であり、リツキシマブは FSGS 患者で低下している SMPDL-3b の発現を回復させ、SMPDL-3b 依存性にアクチン線維の形成を促進することを示した [40]。また、Faul らはネフローゼ症候群の確立した治療薬剤であるシクロ

スポリンが、カルシニューリンによる synaptopodin の脱リン酸化を阻害することによって cathepsin-L による synaptopodin の分解を抑制していることを示した[41]。さらに、synaptopodin を過剰発現させたマウスではリポポリサッカライド投与後の蛋白尿発症が抑制されることから、synaptopodin が蛋白尿の発症防御に重要な分子であること、またシクロスポリンの蛋白尿寛解作用のターゲットが細胞骨格の維持に関わる synaptopodin であることが示唆された[41]。以上のことから、ネフローゼ症候群の発症にアクチン線維をはじめとする細胞骨格蛋白が深く関与しており、蛋白尿の治療標的となりうることが示唆される。

FSGS の原因としての nonmuscle myosin heavy chain-IIA の遺伝子異常

非筋ミオシン II (nonmuscle myosin II) は、アクチンフィラメントを動かしたり、つなぎ止めることで、細胞の形態変化を含む様々な過程（細胞質分裂、細胞遊走、細胞間および細胞-基質間接着等）に関与するモーター蛋白質である。

MYH9 遺伝子がコードする nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) の異常は Epstein 症候群の原因であり、巨大血小板を伴う先天性血小板減少症、進行性腎障害、難聴を特徴とする[42-44]。Epstein 症候群は非常にまれな疾患であり、血小板減少のため一般的には腎生検も施行しにくいいため、腎組織に関する知見は非常に限られている[45,46]。

私たちは *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た[47]。ほとんどの患者は乳幼児期から蛋白尿を呈し、10 代で末期腎不全となっていた。1 人の患者で経時的に腎生検が施行されており、組織所見は FSGS であった。NMMHC-IIA について蛍光抗体法で検討したところ、糸球体ポドサイトにおいて明らかな発現低下がみられた。その後、*Myh9* 変異を有する 3 種類のマウスモデル（それぞれ、R702C, D1424N, E1841K の各変異）が作成され、ヒトにおける表現型と同じ像、すなわち巨大血小板減少症、FSGS、軽度の難聴を呈することが判明した[48]。また、Johnstone らはポドサイト特異的な *Myh9* ノックアウトマウスを作成し、doxorubicin を投与されたときの腎障害が増幅されることを見いだした[49]。

また、これより前に Kopp ら[50]および Kao ら[51]はそれぞれ、ゲノムワイド関連解析の手法を用いて、*MYH9* がアフリカ系アメリカ人における特発性 FSGS と関連していることを報告した。2010 年には、同じくアフリカ系アメリカ人において、*MYH9* と隣接する遺伝子である *APOL1* 遺伝子の非同義変異が FSGS と関連していることが示され[52]、その後、*APOL1* のリスクバリエントが慢性腎臓病の進行に関連しているという報告が相次いだ[53-55]。ただし、こうした結果はアフリカ系アメリカ人を対象としたものばかりであり、ヨーロッパ系アメリカ人を対象とした研究では、*APOL1* ではなく *MYH9* の多型が非糖尿病性

腎症の発症に関連していることが示された[56,57]。したがってこの 2 つの遺伝子ともに、そのバリエーションが FSGS や末期腎不全を引き起こす機序についての研究が続けられている。

これらの知見は *MYH9* の異常が糸球体疾患、特に FSGS を引き起こす可能性を支持しており、*MYH9* についての解析を進めることは十分意義があると考えられる。

本研究の目的

遺伝性ネフローゼ症候群の原因については多くの知見が集積されてきたが、日常診療で遭遇することの多い特発性ネフローゼ症候群あるいは特発性 FSGS の原因遺伝子あるいは蛋白尿発症に関わる分子メカニズムはいまだに不明である。ヒト特発性ネフローゼ症候群の糸球体において、これまでに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。例えば、CD2AP と α -actinin-4 は微小変化型ネフローゼ症候群および FSGS の糸球体において発現に変化はなく [58]、nephrin の発現変化に関しては報告によって異なった結果が提示されている [59-61]。podocin については、ネフローゼ症候群において発現と細胞内局在が変化していること [62,63]、また synaptopodin も podocin 同様 FSGS において発現が低下している例が多いと報告されている [64,65]。しかし、

種々のポドサイト関連蛋白の発現を網羅的に検討し、またそれぞれの検討の相関を調べた報告はない。

NMMHC-IIA は糸球体ポドサイトに発現していることがすでに報告されているが[47,66,67]、ポドサイト内における詳細な局在についてはこれまで検討されておらず、また特発性ネフローゼ症候群や慢性糸球体腎炎における発現も検討されていない。

本研究の目的は、

1. NMMHC-IIA のポドサイトにおける詳細な局在を解析すること
2. 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動物のネフローゼ症候群モデルにおいて、NMMHC-IIA および他のポドサイト関連蛋白の発現変化について検討すること

であり、これによって、遺伝性でないネフローゼ症候群、特に特発性 FSGS において、ポドサイト障害の病態における NMMHC-IIA の役割を明らかにすることをめざす。

III 実験材料および実験法

1. NMMHC-IIA のポドサイトにおける詳細な局在の検討

実験動物

すべての動物実験は順天堂医院の動物実験ガイドラインを遵守し、順天堂医院の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。雄の 6 週齢の Wistar ラットを Charles River Japan 社（神奈川）より購入した。

ラット正常糸球体の蛍光抗体染色

ラット腎を periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)固定液に 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えたもので灌流し、同液で固定した。次に、厚さ 5 μ m の切片を一次抗体とともに室温で 2 時間反応させ、その後 fluorescein isothiocyanate (FITC)または rhodamine (TRITC)で標識された二次抗体 (100 倍希釈) とともに室温で 1 時間反応させた。一次抗体として抗 NMMHC-IIA 抗体, 抗 NMMHC-IIB 抗体, 抗 synaptopodin 抗体, 抗 podocalyxin 抗体, 抗 ZO-1 抗体, 抗 intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 抗体を用いた。抗 NMMHC-IIA 抗体は BT561 抗体 (Biomedical Technologies 社, 米国マサチューセッツ州

Stoughton, 400 倍希釈) を使用した。これはマウス神経芽腫 Neuro-2A 細胞から単離した NMMHC-IIA をウサギに免疫して作成したポリクローナル抗体であり, NMMHC-IIB や IIC とは交叉反応しない[68-70]。抗 NMMHC-IIB 抗体 (G650) は白尾智明博士より供与された[71]。マウスモノクローナル抗 synaptopodin 抗体は Progen 社 (ドイツ, Heidelberg) のものを用いた。マウスモノクローナル抗ラット podocalyxin 抗体 (N3) は Marilyn G. Farquhar 博士 (米国カリフォルニア大学) より供与された[72]。マウスモノクローナル抗 ZO-1 抗体は Zymed Laboratories 社 (米国カリフォルニア州 South San Francisco) のものを用いた。マウスモノクローナル抗 ICAM-2 抗体 (D-12) は一過性に ICAM-2 の cDNA を発現させた COS 細胞を用いて作製された[73]。TRITC 標識抗ウサギ IgG ロバ抗体, FITC 標識抗マウス IgG ロバ抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories 社 (米国ペンシルバニア州 West Grove) のものを使用した。すべての切片は共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 (ドイツ Oberkochen, Carl Zeiss 社) で観察した。

ヒト正常糸球体の蛍光抗体染色

ヒト正常糸球体において NMMHC-IIA, WT1, GLEPP1 を染色した。正常ヒト検体として 51 歳の腎移植ドナー腎の 0h 検体, すなわちドナーから摘出されて

すぐに灌流された時の検体を、文書による同意を得て使用した。凍結切片（厚さ 3 μ m）をアセトンで固定し、PBS で洗浄後、一次抗体（抗 NMMHC-IIA 抗体、抗 WT1 抗体、抗 GLEPP1 抗体）と室温で 1.5 時間反応させた。さらに洗浄後、二次抗体（Alexa-Flour 555 および 488）を 1 時間反応させた。画像の撮影は倒立顕微鏡（モデル IX71, オリンパス社, 東京）を用いて行った。

抗 NMMHC-IIA 抗体としては PRB440P 抗体を Covance Research Products 社（米国カリフォルニア州 Barkeley）から購入して 200 倍希釈で使用した。これは NMMHC-IIA の C 末に存在する 12 個のアミノ酸（GKADGAEAKPAE）を認識するよう作成されたウサギポリクローナル抗体で、ラット、マウス、ヒト等に反応性がある。マウスモノクローナル抗 WT1 抗体は Dako 社（米国カリフォルニア州 Carpinteria）のものを 40 倍希釈で、マウスモノクローナル抗 GLEPP1 抗体は BioGenex 社（米国カリフォルニア州 San Ramon）のものを 10 倍希釈で使用した。

ヒト正常糸球体における免疫電顕

ヒト正常腎組織の超薄切切片を -110°C で Leica Ultracut UCT ミクロトーム（オーストリア, ウィーン）を用いて切り出した。51 歳の腎移植ドナー腎の 0h 検体がこのために用いられた。切片はフォームヴァー支持膜とカーボンでコー

トした 150 メッシュのニッケルグリッドに移し、急速凍結を行った。抗 NMMHC-IIA 抗体 (PRB440P, 300 倍希釈) を 4°C で終夜反応させた後、10 nm の金コロイド (10%胎仔ウシ血清を含む PBS で 100 倍に希釈) と結合した二次抗体と 1 時間反応させた。免疫染色後、切片を 2.5%グルタルアルデヒド / 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で固定した。その後、コントラストをつけるために 2%中性酢酸ウラニル溶液に 30 分間浸した。3%ポリビニルアルコールを含む 0.2%酸性酢酸ウラニル溶液を用いて 30 分間吸収染色を行い、透過型電子顕微鏡 JEM1230 (JEOL 社, 東京) で観察した。コントロールとして、抗 NMMHC-IIA 抗体なしでの電顕像も検討した。金標識ヤギ抗ウサギ抗体は British BioCell 社 (英国 Essex) のものを使用した。

2. ネフローゼモデルラット, ヒトネフローゼ症候群, 慢性糸球体腎炎における NMMHC-IIA および他のポドサイト関連蛋白の発現変化の検討

ネフローゼ症候群の動物モデル

ネフローゼ症候群の動物モデルとして、古くから puromycin aminonucleoside (PAN)腎症ラットが用いられている。このモデルでは、PAN 投与開始から 6 日目ごろに蛋白尿が出現し、組織学的にはポドサイトの足突起癒合がみられ始め

る。蛋白尿は 11 日目にピークとなり，足突起の癒合も顕著となる[74]。薬剤で蛋白尿を誘発しているため，ヒト特発性ネフローゼ症候群と発症機序が異なることは明らかであるものの，大量の蛋白尿を認めること，光顕上は糸球体の変化がほとんどなく電顕で足突起の癒合がみられることがヒト特発性ネフローゼ症候群，特に微小変化群と臨床的・病理形態学的に共通しており，ネフローゼ症候群のモデル動物として有用と考えられている。

PAN 腎症ラット糸球体における NMMHC-IIA および他のポドサイト関連蛋白の蛍光抗体染色

PAN (Sigma 社) 100mg/kg を腹腔内に 1 回投与することにより PAN 腎症ラットを作製した。PAN を投与してから 2, 5, 7, 11 日後にペントバルビタール麻醉下で腎臓を摘出した。蛍光抗体染色の手法は上述の正常ラットと同様で，一次抗体は抗 NMMHC-IIA 抗体 (BT561)，podocalyxin 抗体 (N3)，ZO-1 抗体を使用した。

PAN 腎症ラットにおけるウェスタンブロット解析

正常ラット腎および PAN 腎症ラット腎 (PAN 投与後 2, 5, 7, 11 日目) から単離した糸球体をプロテアーゼインヒビター，1mM オルトバナジウム酸ナトリウム，

1%SDS, 5mM EDTA を含んだリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) で可溶化し, 7.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, ニトロセルロース膜に転写した。PAN 投与後 2, 5, 7 日目のラットは 3 匹, 11 日目のラットは 4 匹を実験に供して解析した。ウェスタンブロットは一次抗体として抗 NMMHC-IIA 抗体 (BT561 抗体) と抗 desmin 抗体 (マウスモノクローナル抗 desmin 抗体 (D33), Dako 社 (米国カリフォルニア州 Carpinteria)) を 2000 倍希釈 4°C で終夜反応させた後, HRP 標識抗マウス IgG ヤギ抗体を反応させ, ECL ウェスタンブロッティング検出システム (英国, Buckinghamshire, GE Healthcare 社) を用いて検出した。統計解析は one-way ANOVA および Tukey の多重比較検定を用いて行った。

ヒトネフローゼ症候群, 慢性糸球体腎炎患者糸球体の酵素抗体法による染色

ヒトの腎組織を用いた実験は東京女子医科大学病院の倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 201)。すべての患者の酵素抗体法にはパラフィン包埋サンプル (厚さ 3 μ m) を使用した。正常コントロールとして, 51 歳および 38 歳の腎移植ドナー腎の 0h 検体を, 文書による同意を得て使用した。NMMHC-IIA 発現の著明な低下を認めた Epstein 症候群患者の腎組織 (既報[47]) を, 文書による同意を得たうえで陰性コントロールとして使用した。それぞれの腎組織はク

エン酸緩衝液 (pH 6.0) とともに 121°C で 15 分間オートクレーブし、抗原の賦活化を行った。蒸留水と PBS で洗浄後、各切片に抗 NMMHC-IIA 抗体 (BT561 抗体, 100 倍希釈) を室温で 2 時間反応させ、再度洗浄後にポリマー試薬 (ENVISION, Dako 社) を 20 分間反応させた。その後ストレプトアビジン標識 HRP と diaminobenzidine で処理し、ヘマトキシリンで対比染色した。すべての染色実験は同時に行った。糸球体における NMMHC-IIA の発現は 2 名の研究者 (H.Y. および S.T.) が半定量的にスコア化した。判定の際には臨床情報や組織診断が分からないようにした。NMMHC-IIA 染色の強度は以下のように評価された。「0」= 全く染色されない, またはごくわずかに染色される, 「1」= 弱くあるいは部分的に染色される, 「2」= 中程度に染色される, 「3」= 強くびまん性に染色される。見本とした染色像を図 3 に示す。統計解析は Wilcoxon rank sum test を用いて行った。

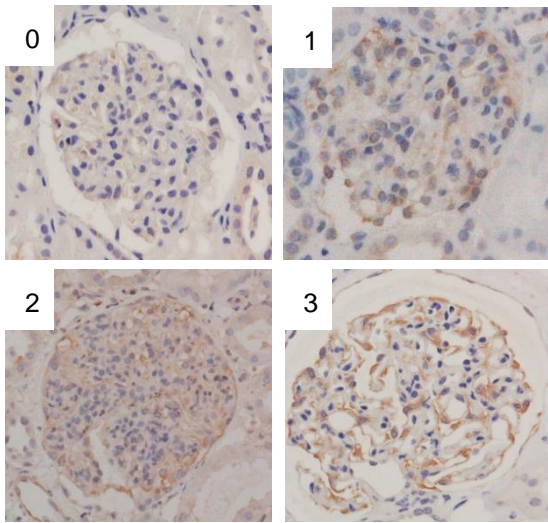


図 3 NMMHC-IIA 染色のスコアの見本
各スコアの代表的な染色図を示す。採点者はこれを参考に採点した。

ヒトネフローゼ症候群，慢性糸球体腎炎患者糸球体の蛍光抗体法による染色

ヒト正常糸球体および各疾患糸球体において NMMHC-IIA, nephrin, Neph1, synaptopodin, podocin, ZO-1, GLEPP1 の染色性変化を検討した。蛍光抗体染色の手法は上述のヒト正常糸球体のものと同じである。細胞核の染色には 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI)を使用した。正常コントロールとして 51 歳の腎移植ドナー腎の 0h 検体を用いた。

抗 NMMHC-IIA 抗体としては PRB440P 抗体（200 倍希釈）を用いた。ウサギポリクローナル抗 nephrin 抗体は nephrin の C 末側の 17 個のアミノ酸から成るペプチドで免疫して作製された[75]。ウサギポリクローナル抗 Neph-1 抗体は Neph-1 の C 末側の 20 個のアミノ酸から成るペプチドで免疫して作製された[76]。ウサギポリクローナル抗 podocin 抗体は podocin の C 末側の 16 個のアミノ酸から成るペプチドで免疫して作製された[77]。

FSGS，微小変化群，高度蛋白尿を呈する慢性糸球体腎炎の患者

2000年から2008年までに東京女子医科大学病院で腎生検された14名の患者の腎組織（ステロイド抵抗性特発性 FSGS，微小変化群および高度蛋白尿を呈する他の糸球体腎炎を含む）について，それぞれの患者から文書による同意を得たのちに解析を行った。解析を通じて，ヘルシンキ宣言を遵守した。腎組織は

酵素抗体染色および蛍光抗体染色に供された。生検時の臨床像と病理所見を表 4 に示す。患者の内訳は、特発性 FSGS が 6 名（4 名がステロイド抵抗性で 2 名がステロイド感受性の tip variant）、微小変化型ネフローゼ症候群 2 名、IgA 腎症 2 名、膜性腎症 2 名、紫斑病性腎炎 1 名、膜性増殖性糸球体腎炎 1 名であった。ほとんどの患者は腎生検時に高度蛋白尿を呈していた。腎機能はすべての患者で正常であった。FSGS の原因については、全員が著明な浮腫と低アルブミン血症を呈していたことと、その後の経過でステロイド抵抗性 FSGS 患者 4 名のうち 3 名が腎移植後に FSGS の再発を認めたことから、二次性ではなく一次性であると考えられた。二次性 FSGS を示唆する所見である低形成腎や肥満を呈する患者はこの研究では除外した。

申請者は、ヒトネフローゼ症候群（FSGS を含む）および慢性糸球体腎炎の酵素抗体染色、蛍光抗体染色を担当した。

表 4 患者の臨床像および病理診断

No.	年齢／性	病理診断	尿蛋白 (g/日)	血清アル ブミン (g/dL)	eGFR (mL/分 /1.73m ²)	治療
1	9/F	FSGS (NOS)	1.0	2.4	98.2	PSL, ACEI
2	5/M	FSGS (NOS)	11.6	2.2	110	PSL
3	4/M	FSGS (NOS)	9.1	2.0	111	PSL, CsA, ACEI
4	3/F	FSGS (collapsing variant)	5.5	2.0	111	PSL
5	18/M	FSGS (tip variant)	0	4.9	136	PSL, CsA
6	8/F	FSGS (tip variant)	0.48	2.6	130	PSL
7	15/M	微小変化群	1.6	2.6	152	PSL, CsA, ARB
8	3/F	微小変化群	2.4	1.7	108	PSL
9	14/F	膜性腎症	1.2	2.8	130	PSL
10	6/F	膜性腎症	3.0	2.0	109	無治療
11	12/M	IgA 腎症	0.18	4.1	131	無治療
12	9/M	IgA 腎症	6.4	1.4	98.9	無治療
13	13/F	紫斑病性腎炎	1.3	3.3	110	無治療
14	15/M	膜性増殖性糸 球体腎炎	10.7	2.3	121	PSL, MZR, ARB

eGFR: 推定糸球体濾過率 (Schwartz の式による)

NOS: not otherwise specified

PSL: プレドニゾロン

ACEI: アンギオテンシン変換酵素阻害薬

CsA: シクロスポリン

ARB: アンギオテンシン受容体拮抗薬

MZR: ミゾリビン

IV 結果

NMMHC-IIA はポドサイトの細胞体および一次突起に局在する

正常ラット糸球体における NMMHC-IIA および他のポドサイト関連分子の蛍光抗体染色を図 4 に示す。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。NMMHC-IIA は内皮細胞に特異的に存在する蛋白である ICAM-2 と異なる局在を示した。またヒトの正常腎でも、GLEPP1 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 (図 5), 正常ラット腎での実験と一致する結果であった。NMMHC-IIA は WT-1 とは一部共局在するのみで、基本的に異なる局在を示した。また NMMHC-IIA は内皮細胞にも弱い発現を認めた。

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 6)。また NMMHC-IIA は内皮細胞にも少量の発現が認められた。

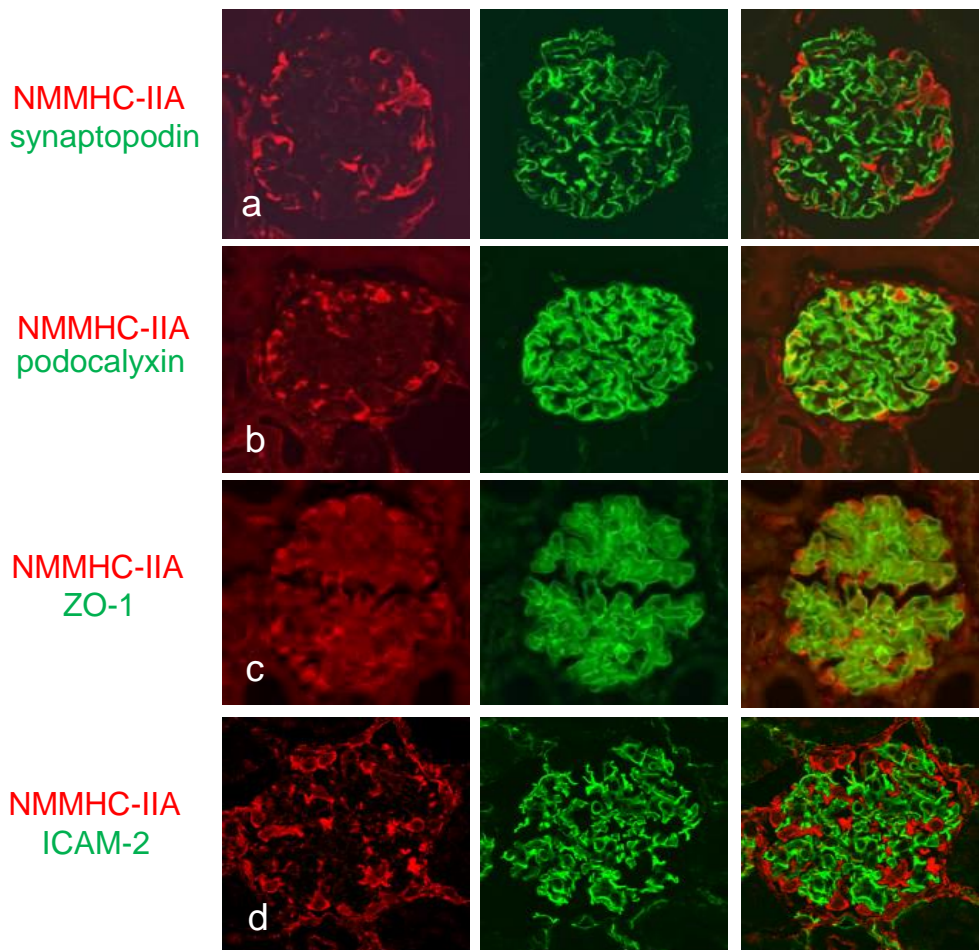


図4 正常ラット糸球体における NMMHC-IIA の染色

ラット糸球体の凍結切片（厚さ $5\mu\text{m}$ ）を用いて NMMHC-IIA（赤）と他のポドサイト関連蛋白（緑）の synaptopodin (a), podocalyxin (b), zonula occludens (ZO)-1 (c)を共染色した。内皮細胞に局在する intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 (緑) についても NMMHC-IIA (赤) と共染色した (d)。右端が merge した像である。NMMHC-IIA はポドサイトに局在しているが、足突起（二次突起）に存在する蛋白である synaptopodin, podocalyxin, ZO-1 とは共局在しない。また、ICAM-2 とも共局在しない。

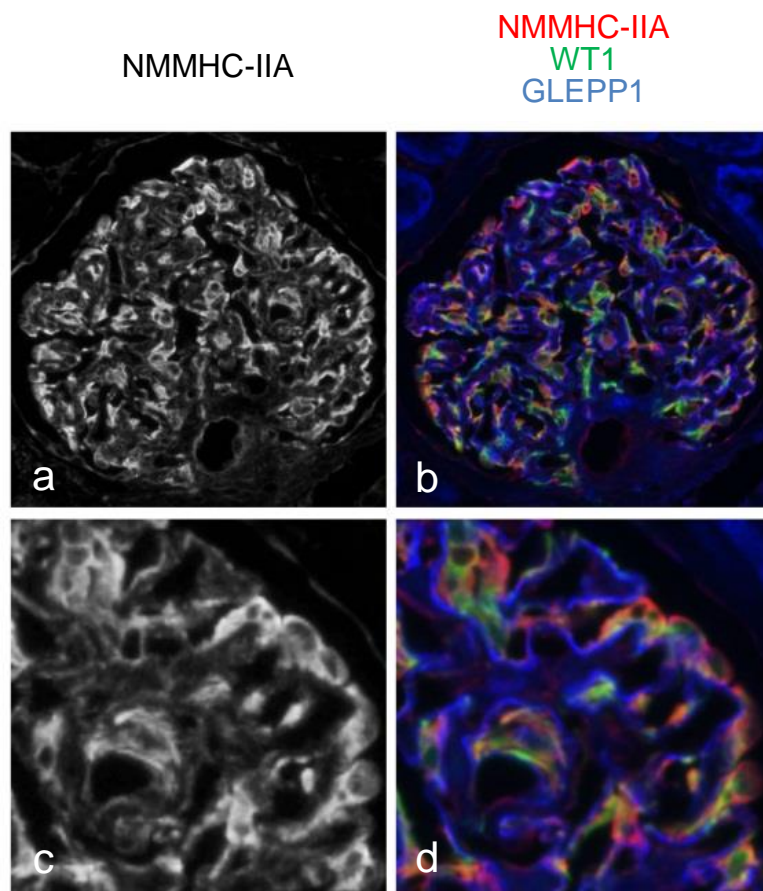


図 5 ヒト正常糸球体における NMMHC-IIA の局在
 ヒト正常糸球体において、蛍光抗体法を用いて NMMHC-IIA, WT1, GLEPP1 を染色した。a と c は NMMHC-IIA の染色を、b と d は NMMHC-IIA, WT1, GLEPP1 の三重染色を示す。NMMHC-IIA は WT1, GLEPP1 とはほぼ異なった局在を示している。

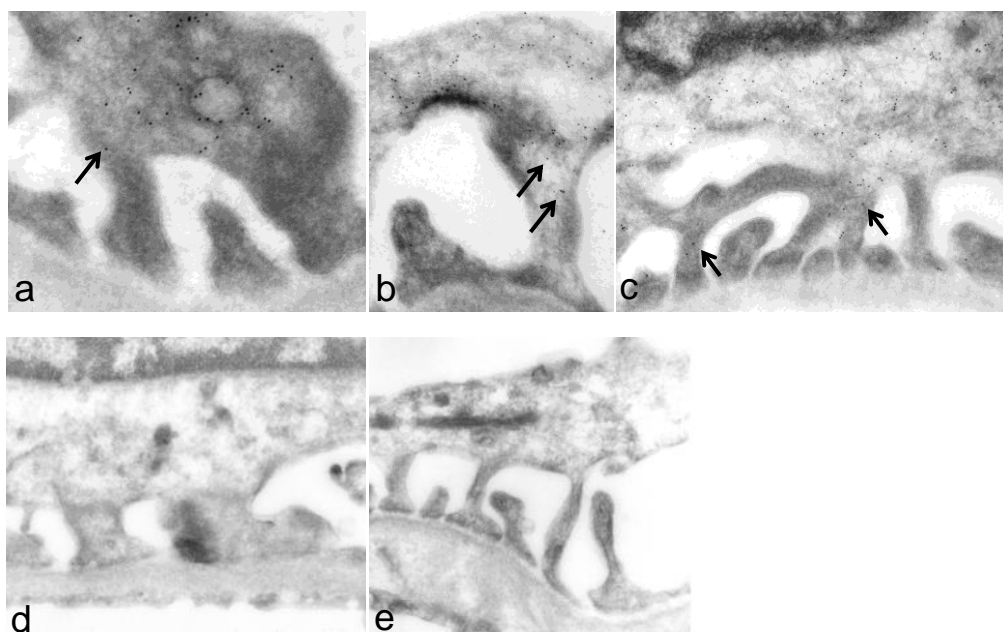


図6 ヒト正常腎における NMMHC-IIA の免疫電顕像

ヒト正常糸球体の超薄切片に抗 NMMHC-IIA 抗体を反応させ, 続いて 10nm の金標識の二次抗体を反応させた (a-c)。NMMHC-IIA は主としてポドサイトの一次突起および, 足突起の足場部分に局在している。矢印は足突起の足場部分に局在する NMMHC-IIA。コントロールでは非特異的なシグナルは検出されていない (d, e)。

NMMHC-IIA はラットの発達途上にある糸球体およびポドサイト障害モデルにおいても発現に変化がみられる

次に、発達段階にあるラット糸球体における NMMHC-IIA の発現を検討した。

図 7 に新生仔ラット糸球体での NMMHC-IIA, NMMHC-IIB の発現を示す。

NMMHC-IIB も NMMHC-II に属する蛋白で、造血幹細胞、腎臓、心臓、脳など全身に発現している。図の上半分は S-shaped stage のもので、下半分は capillary loop stage のものである。S-shaped stage においては、NMMHC-IIA が未熟なポドサイトの尿腔に面した細胞膜側に発現しているのに対して、NMMHC-IIB は主に隣接する細胞との接着部位と基底膜に接した細胞膜側に発現を認めた (図 7A)。一方、capillary stage においては、NMMHC-IIA の局在はポドサイトの細胞質全体にみられるようになり、NMMHC-IIB はポドサイトにおける発現が消失し、メサンギウム細胞での発現を認めた (図 7B)。これらのことから、NMMHC-IIA と NMMHC-IIB は異なった機能をもっていると考えられる。また NMMHC-IIA 抗体と NMMHC-IIB 抗体は交差反応しないことが確かめられた。

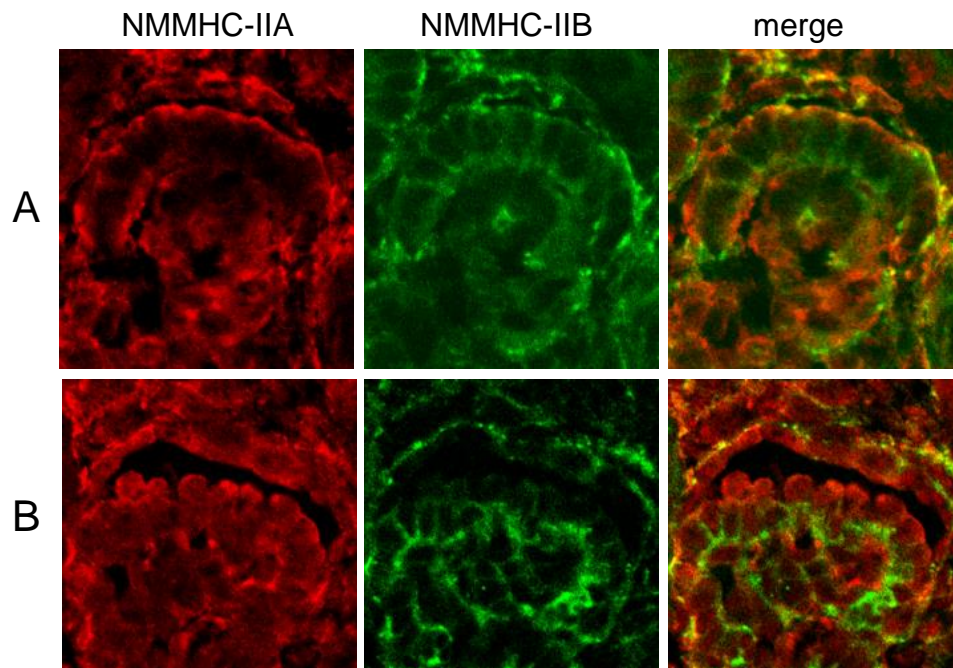


図7 新生仔ラット糸球体における NMMHC-IIA および NMMHC-IIB の局在 S-shaped stage (A)と capillary loop stage (B)において、NMMHC-IIA と NMMHC-IIB を共染色した。右端は merge した像。

次に、後天的なポドサイト障害モデル（PAN 腎症）において NMMHC-IIA の発現が変化するかどうかを検討した。PAN 投与後 11 日目、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（図 8A）。Western blot による解析でも、PAN 投与後 11 日目の NMMHC-IIA の蛋白量はコントロールと比較して著明に低下しており（ $p=0.059$ ）、ポドサイト障害のマーカーである desmin は既報どおり有意に増加していた[78]（図 8B-D）。NMMHC-IIA は 2 本のバンドがあるが、リン酸化を反映している可能性がある。2 本の総量で定量化を行った。個々の Western blot 解析の画像を図 9 に示す。

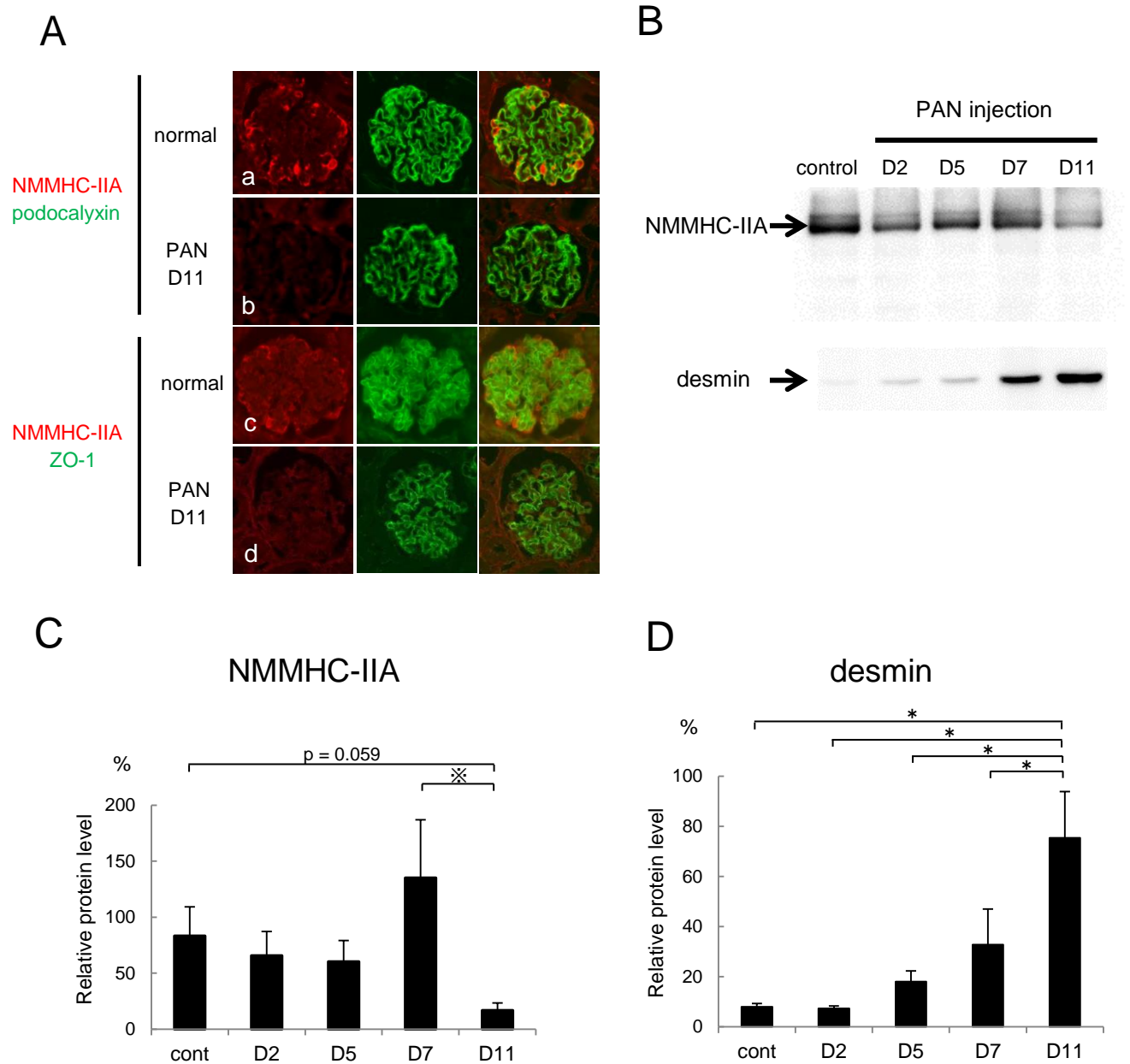


図 8 Puromycin aminonucleoside (PAN)を灌流したラット腎における NMMHC-IIA の発現

(A) PAN を灌流したラット腎における NMMHC-IIA の蛍光抗体染色。5 μ m の薄切切片を用いて NMMHC-IIA (赤) と他のポドサイト関連分子 (緑) である podocalyxin (a, b) または ZO-1 (c, d) を共染色した。右端が merge した像である。a と c が正常ラット糸球体で、b と d が PAN 投与後 11 日目のラット糸球体。PAN 投与後の糸球体では、NMMHC-IIA のシグナルの明らかな低下がみられる

が、podocalyxin と ZO-1 のシグナルには変化はない。

(B) コントロールおよび PAN 灌流糸球体における NMMHC-IIA と desmin のウェスタンブロット解析。NMMHC-IIA の発現は PAN 投与後 11 日目で著明に低下しており、一方 desmin の発現は PAN 投与後徐々に増加している。

(C) 糸球体サンプルを用いた NMMHC-IIA のウェスタンブロット定量解析。NMMHC-IIA 蛋白レベルは、PAN 投与後 11 日目において、コントロールおよび PAN 投与後 7 日目に比較して低下している (それぞれ $p=0.059$, 0.001)。コントロールにおける最大値を 100%の relative protein level とした。

(D) 糸球体サンプルを用いた desmin のウェスタンブロット定量解析。PAN 投与後、desmin 蛋白レベルの有意な増加を認める。PAN 投与後 11 日目における最大値を 100%の relative protein level とした。

統計解析は one-way ANOVA および Tukey の多重比較検定を用いて行った。

D : day

※ $P=0.001$

* $P<0.005$

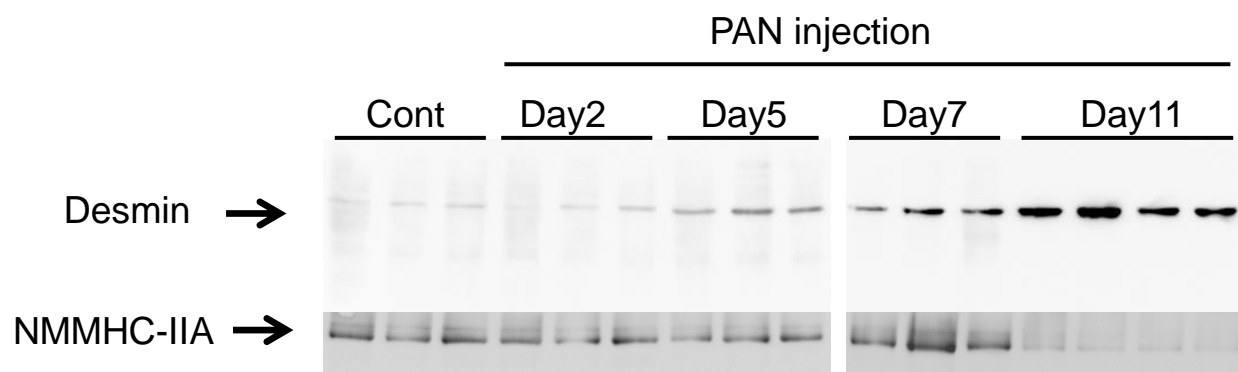


図9 PAN 灌流糸球体における desmin と NMMHC-IIA のウェスタンブロット解析（個々のデータ）

コントロールと PAN 投与後 2 日目，5 日目，7 日目については各 3 匹のラットを，PAN 投与後 11 日目については 4 匹のラットを実験に供した。どのラットにおいても，PAN 投与後 11 日目の NMMHC-IIA の蛋白レベルは著明に低下し，desmin 蛋白レベルは PAN 投与後徐々に増加していた。

NMMHC-IIA の発現は特発性 FSGS において低下している

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。図 10A に、正常糸球体 (a および b) と、Epstein 症候群 (c)、ステロイド抵抗性 FSGS (d-g)、FSGS tip variant (h および i)、微小変化群 (j-l)、膜性腎症 (m および n)、IgA 腎症 (o および p)、紫斑病性腎炎 (q)、膜性増殖性糸球体腎炎 (r) の患者糸球体における NMMHC-IIA の酵素抗体染色像を示す。正常および患者サンプルにはそれぞれ 2~10 個 (中央値 7 個) の糸球体が含まれていた。それぞれのサンプルにおける NMMHC-IIA 染色の程度を示す intensity score を図 10B に示す。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く ($p=0.016$)、ステロイド感受性の tip variant や微小変化群よりも低い傾向にあった (表 5)。

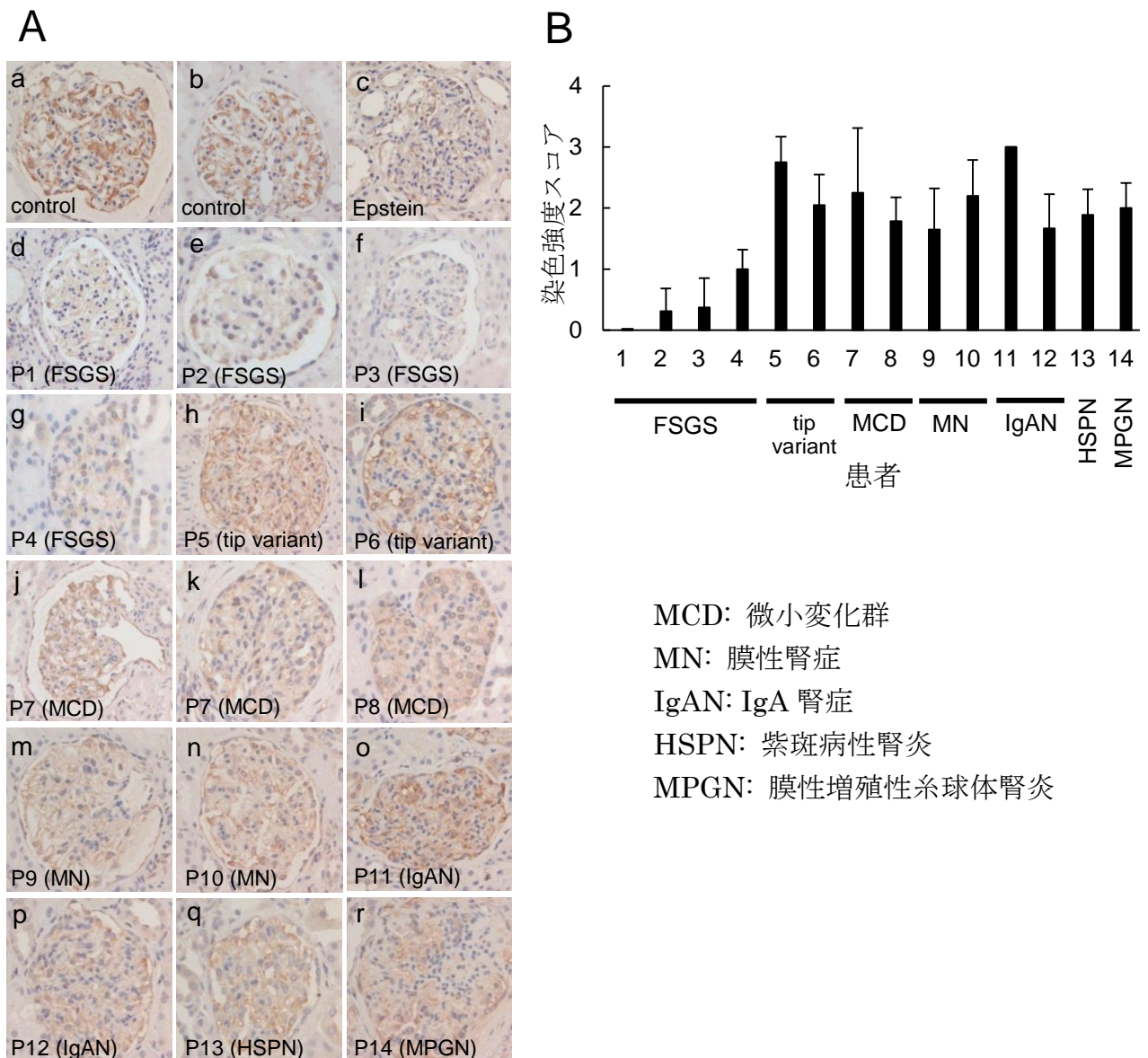


図 10 ヒト糸球体疾患における NMMHC-IIA の酵素抗体染色

(A) Epstein 症候群(c)およびステロイド抵抗性 FSGS (d-g)においては、コントロール (a, b) に比して NMMHC-IIA の染色性は著明に低下していた。一方、FSGS の tip variant (h, i)では NMHC-IIA の染色性は保たれていた。MCD の蛋白尿再発時(j, l)と寛解時(k)でも NMMHC-IIA の染色性は保たれており、MN (m, n), IgAN (o, p), HSPN (q), MPGN (r)でも NMMHC-IIA の染色性に有意な変化はなかった。

(B) 各患者における NMMHC-IIA の酵素抗体染色の染色強度スコア。それぞれ 2~10 個 (中央値 7 個) の糸球体染色スコアの平均および標準偏差を示す。疾患別の染色強度スコアの統計解析については表 5 を参照。

表 5 ステロイド抵抗性 FSGS と他の蛋白尿を呈する糸球体疾患患者における酵素抗体染色における NMMHC-IIA の染色強度スコア

	ステロイド抵抗性 FSGS	tip variant	微小変化群	慢性糸球体腎炎
患者数	4	2	2	6
染色強度スコア (平均±標準偏差)	0.42±0.42	2.05, 2.75	1.79, 2.25	2.07±0.50
P 値*	—	—	—	0.016

慢性糸球体腎炎は膜性腎症, IgA 腎症, 紫斑病性腎炎, 膜性増殖性糸球体腎炎を含む。

*ステロイド抵抗性 FSGS との比較。統計解析は Wilcoxon rank sum test で行った。

ヒト糸球体疾患において NMMHC-IIA の変化は他のポドサイト関連分子とは異なる

次に, nephrin, Neph1, synaptopodin, podocin, ZO-1, GLEPP1 の発現を特発性 FSGS (患者 No.2), 微小変化群 (患者 No.7 の再発時), 膜性腎症 (患者 No.10) のサンプルを用いて蛍光抗体法で検討した。図 11 に示すように, これらの蛋白の発現に有意な変化はみられなかった。これに対して, NMMHC-IIA の発現は特発性 FSGS において著明に低下し, 微小変化群においても中等度の低下が認められた。NMMHC-IIA の発現は膜性腎症においては著変なかった。

また, 図 12 に示すように, NMMHC-IIA と nephrin, NMMHC-IIA と synaptopodin の二重染色を行ったところ, FSGS と微小変化群のポドサイトにおいて NMMHC-IIA の発現が著明に低下した一方, nephrin と synaptopodin の発現はよく保たれていた。膜性腎症においては, NMMHC-IIA の発現に著変はなかった。

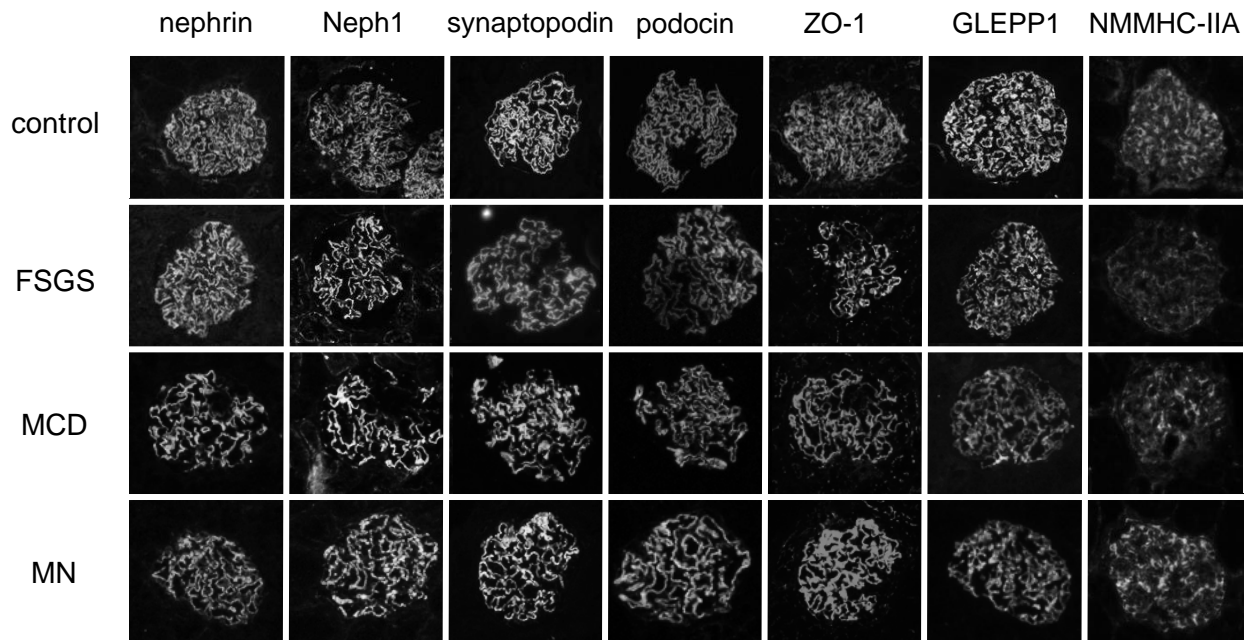


図 11 ヒト糸球体疾患におけるポドサイト関連蛋白の蛍光抗体染色
 コントロール，特発性 FSGS（患者 2），MCD（患者 7 の再発時），MN（患者 10）の糸球体から厚さ 4 μ m の切片を切り出し，足突起蛋白（nephrin, Neph1, synaptopodin, podocin, ZO-1, GLEPP1）および NMMHC-IIA の染色を行った。足突起蛋白の発現はどの患者においても有意な変化はみられなかったが，NMMHC-IIA の発現は特発性 FSGS において著明に低下しており，MCD においても中等度の低下がみられた。

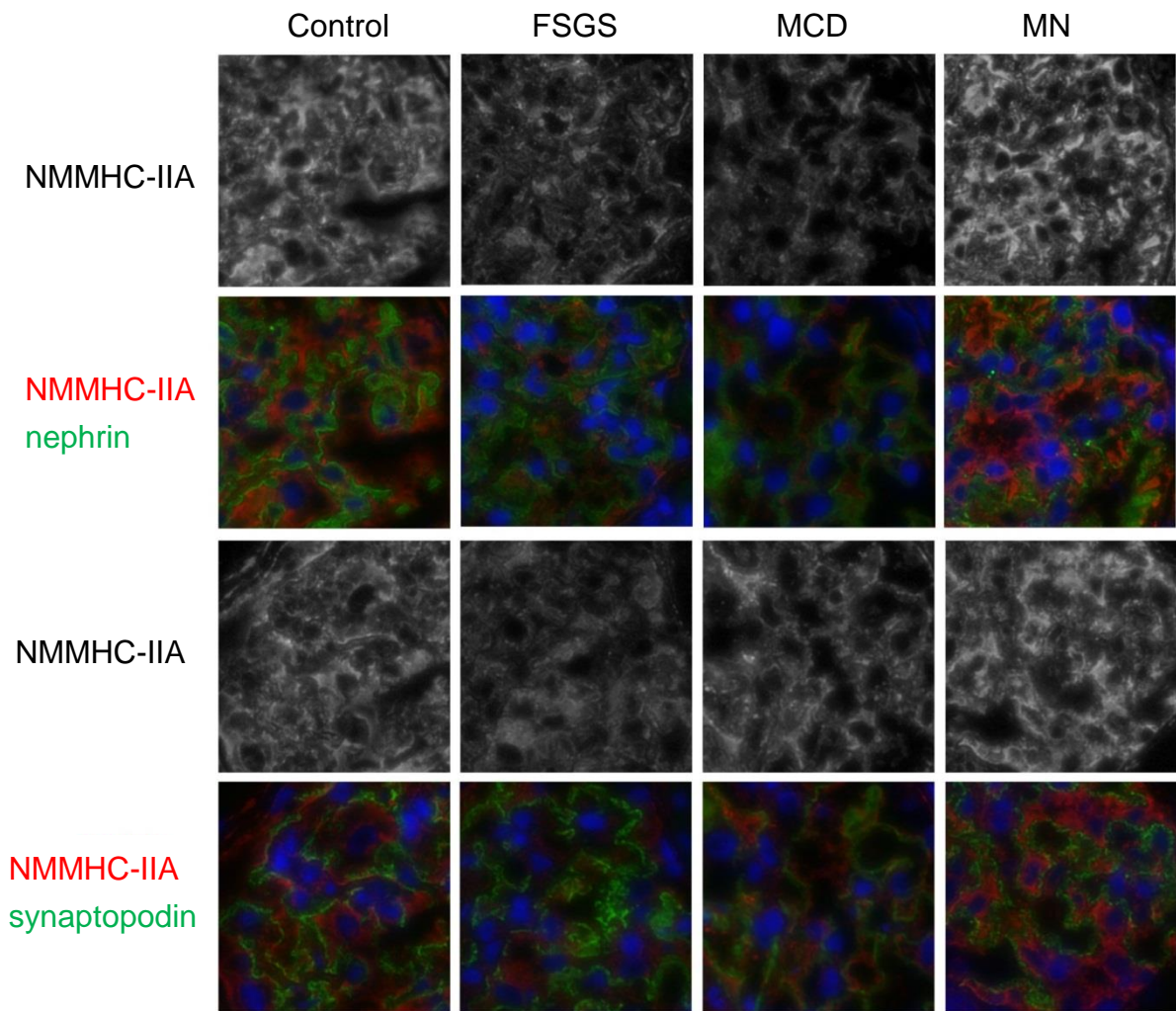


図 12 ヒト糸球体疾患における NMMHC-IIA と他のポドサイト関連蛋白の二重染色

コントロール、特発性 FSGS（患者 2）、MCD（患者 7 の再発時）、MN（患者 10）の腎の薄切切片（厚さ 4 μ m）を用いて、NMMHC-IIA（赤）と足突起蛋白（nephrin と synaptopodin, 緑）の各抗体で染色した。細胞核は DAPI（青）で染色した。

NMMHC-IIA の発現部位は nephrin や synaptopodin とは異なっていた。NMMHC-IIA の発現は FSGS と MCD において著明に低下していたが、nephrin と synaptopodin の発現はどの疾患においても保たれていた。

V 考察

近年の分子学的研究の進歩によって、FSGS の病因がポドサイトにあることが有力になってきた。ただし、ポドサイト関連分子の変異と遺伝性 FSGS の関連性ははっきりしているものの、特発性 FSGS とと思われる患者のほとんどにおいてポドサイト関連分子をコードする遺伝子に異常は認められず、それらの分子が必ずしも特発性 FSGS の発症においても重要な役割を果たしていることを意味しない。しかし最近、アフリカ系アメリカ人において、*MYH9* と *APOL1* の遺伝子多型が特発性 FSGS や進行性腎疾患の発症のしやすさと関連していることが示された[50-55]。また *MYH9* 遺伝子変異は Epstein 症候群として FSGS の原因となる[47,79]。そこで私は NMMHC-IIA が特発性ネフローゼ症候群発症とどのような関わりがあるかについて検討した。

これまで NMMHC-IIA のポドサイト内における詳細な局在の検討がなされていなかったため、まず本研究では NMMHC-IIA のポドサイトにおける局在を調べた。その結果、NMMHC-IIA の糸球体における発現部位が主としてポドサイトの一次突起であり、一部足突起の足場部分、すなわち足突起が突出する根元の部分にも発現していることを明らかにした (図 6)。ポドサイトの一次突起は微小管から成る構造である。nonmuscle myosin II は細胞の収縮や形態維持、細胞

の運動，遊走においてさまざまな機能を有するが[80]，NMMHC-IIA は微小管の動態を制御することで *actomyosin* と微小管のバランスを維持することが知られている[80]。最近 Hays らはプロテオミクスと免疫沈降の手法により NMMHC-IIA と結合する蛋白を網羅的に解析し，NMMHC-IIA がアクチンのみならずさまざまな細胞骨格制御因子と相互作用していることを報告した[81]。また，マウスの胎生期の線維芽細胞を用いた研究では，NMMHC-IIA の収縮性を阻害すると，細胞が拡大する動きを制御する機構が障害され，細胞の形態が保持できなくなり，細胞骨格の維持機構が破綻して細胞質の断片化が生じることが報告された[82]。以上のことから，NMMHC-IIA がポドサイトの一次突起において細胞骨格を制御するマスターレギュレーターである可能性が示唆された。次に本研究では，一次性 FSGS 患者における NMMHC-IIA の発現を解析した。FSGS を含む特発性ネフローゼ症候群患者の糸球体において，*nephrin*，*Neph1*，*podocin*，*synaptopodin*，*ZO-1*，*GLEPP1* といったポドサイト関連分子の発現に有意な変化はみられなかったが，NMMHC-IIA については，*MYH9* 変異を有する Epstein 症候群の症例と同様に，FSGS においてその発現が著明に低下していた。興味深いことに，NMMHC-IIA の発現変化は蛋白尿の量には関係しなかった（表 4，図 10）。このことは NMMHC-IIA の発現変化がネフローゼ症候群の結果生じる事象ではなく，病態の発症に関係することを示唆している。ポ

ドサイトにおける NMMHC-IIA の発現低下はラットネフローゼモデルでも確かめられた。PAN 腎症ラットにおいて、蛍光抗体法による観察で podocalyxin や ZO-1 のシグナルには変化がみられなかったにもかかわらず、NMMHC-IIA のシグナル低下が認められた。PAN 腎症ラットでは Western blot 解析でも NMMHC-IIA の著明な発現低下が確認されたことから、蛋白発現レベルの低下が見られることが明らかとなった。PAN 腎症はその病理学的変化が可逆性であるために一般には微小変化型ネフローゼ症候群のモデルと考えられているが、FSGS の特徴であるポドサイトの剥離やアポトーシスの像も呈する [83]。NMMHC-IIA の発現低下がポドサイトの減少によるものである可能性については、ヒト FSGS においてもラットの PAN 腎症においても、他のポドサイト関連蛋白の発現は保たれていたことから、ポドサイト数に大きな変化はなかったと考えられる。これらのことから、FSGS の発症に NMMHC-IIA が病態生理学的な役割を担っていることが示唆された。

では NMMHC-IIA の発現はどのように調節されているのだろうか？ Babayeva らによれば、特発性 FSGS による末期腎不全に対する腎移植後にネフローゼが再発し、血漿交換で蛋白尿が改善した患者の血清を培養ポドサイトに反応させると、ポドサイトの突起が消失して形状が丸くなり、アクチンストレスファイバーが著明に減少した。同時に、リン酸化されたミオシン軽鎖の急速な減少が

観察され、アクチン線維と共局在していた NMMHC-IIA が細胞質全体に拡散し、アクチン線維との局在が分離した[84]。すなわち、特発性 FSGS 血清中の循環因子がポドサイトに直接作用し、NMMHC-IIA の局在および細胞骨格の変化をもたらすことが示唆された。また、二次性 FSGS の原因として HIV 腎症がよく知られているが、最近ヒトおよびマウスの HIV 腎症においても、NMMHC-IIA の発現が有意に低下すると報告された[85]。さらに、HIV-1 を組み込んだヒトおよびマウスの培養ポドサイトにおいても NMMHC-IIA の発現が低下する[85]。そのほか、Rac1 の活性化が NMMHC-IIA のリン酸化を制御し、NMMHC-IIA と focal adhesion の相互作用を促進して細胞遊走に関わるという報告や[86]、アクチンと高い親和性で結合する phalloidin が F-actin と結合することによって、NMMHC-IIA と F-actin の複合体の解離が促進され、アクチンフィラメントの動きが抑制されるなど、細胞骨格関連蛋白同士の相互作用が NMMHC-IIA の発現や局在を制御することが知られている[87]。以上のことから、ポドサイトにおける様々な刺激が NMMHC-IIA の発現を制御する可能性が示唆される。今後ネフローゼ症候群における NMMHC-IIA の発現調節メカニズムを明らかにすることがこの疾患の発症機序を考える上での重要な検討課題である。

ヒトおよび動物モデルの腎組織における NMMHC-IIA の発現異常はポドサイト細胞骨格の制御あるいは腎症の発症にどのように影響しているのだろうか。

Myh9 のヘテロ欠損マウスは何ら腎症状を呈さないが[70], *Myh9* のホモのノックアウトマウスは胎生致死である[88]。zebrafish では *Myh9* をノックアウトすることにより, 腎においては糸球体毛細血管の拡張と減少, 内皮細胞の fenestration の消失, 基底膜の部分的な肥厚, ポドサイト足突起の形成不良が認められることから, NMMHC-IIA が腎の発生・発達に必要であることが示唆される[89]。一方, ポドサイト特異的な *Myh9* ノックアウトマウスは無刺激では腎症状を呈さず, doxorubicin を負荷するとコントロールに比して腎障害が増幅される[49]。これに対して, *Myh9* 遺伝子の R702C 変異ノックインマウスは巨大血小板減少症, FSGS, 難聴という, ヒト Epstein 症候群と全く同一の症候を呈する[48,90]。ヒトの *MYH9* 異常症において, 血小板や巨核芽球ではコントロールに比較して NMMHC-IIA 蛋白発現量は約 50%になるが, 顆粒球においてはコントロールの約 30%と, 蛋白発現量の低下幅が血小板や巨核芽球に比べて有意に大きく, また通常は顆粒球細胞質に均一に存在する NMMHC-IIA が, 変異細胞においては正常な NMMHC-IIA も変異 NMMHC-IIA とともに大部分が異常集積部位に凝集する[91]。これらのことから, ポドサイトにおいては NMMHC-IIA が存在しないことのみならず, 異常な NMMHC-IIA の存在が dominant negative に細胞骨格の制御異常に関与し, 腎症を引き起こしている可能性が示唆される。一方で培養ポドサイトにおいて NMMHC-IIA をノックダウ

ンすることにより，アクチン細胞骨格の減少とポドサイトの形態異常が認められたとする報告があり[81]，ポドサイト特異的な *Myh9* ノックアウトマウスの表現型とあわせ，FSGS において NMMHC-IIA の発現が低下することがポドサイトに対する傷害を増強する作用を有する可能性を示唆している。異常な NMMHC-IIA が dominant negative に腎症を引き起こしているのか，ハプロ不全の機序によって引き起こしているのかは断言できないが，いずれにしても NMMHC-IIA がポドサイトの特有の足突起構造の維持に重要な役割を果たしていることが示唆される。

図 13 にポドサイトにおける NMMHC-IIA の局在と他の因子との関係についての模式図を示す。血中循環因子を含む免疫学的異常によってポドサイトの形態異常が起こる過程で，NMMHC-IIA は他の細胞骨格蛋白と相互作用しつつ局在を変え，アクチン線維と分離し，発現が低下し，このことがまた細胞骨格の減少およびポドサイトの形態異常を引き起こすと考えられる。

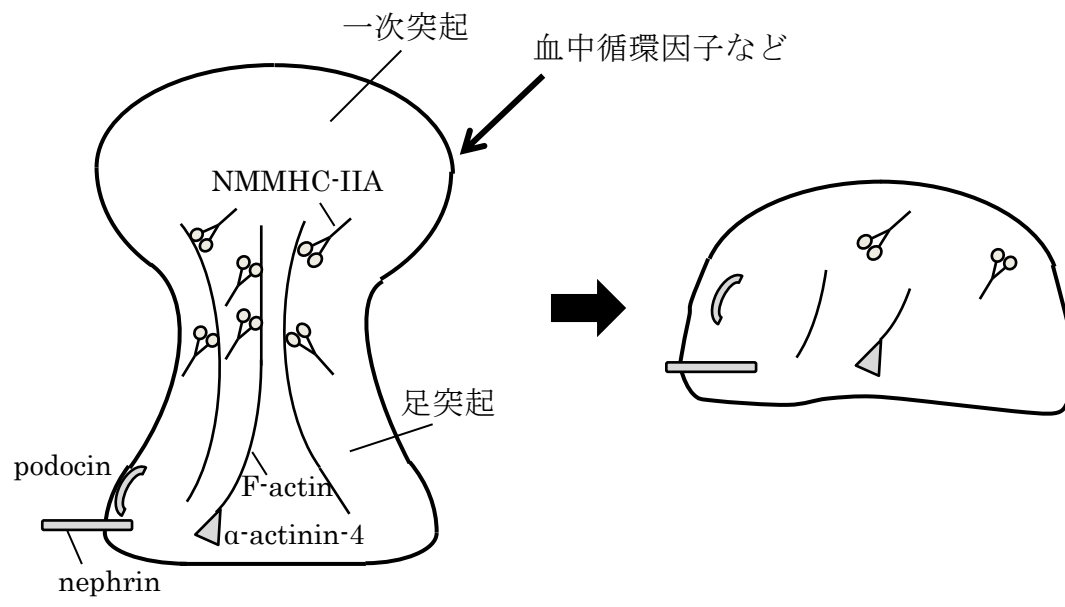


図 13 ポドサイト形態異常を起こすメカニズムについての模式図
 血中循環因子などの刺激によってポドサイトの形態異常が起こる。
 NMMHC-IIA は発現が低下し、アクチンと分離し、細胞骨格も減少する。他の
 ポドサイト関連蛋白は局在が変化するものもあるが、発現としては保たれる。

本研究では、NMMHC-IIA の発現の程度によって FSGS と微小変化群を明確に区別することはできなかった。すなわち、酵素抗体染色においては微小変化群における NMMHC-IIA の発現は保たれており、FSGS と明らかに異なる所見を呈していたが（図 10）、蛍光抗体による観察では微小変化群においても NMMHC-IIA 発現の中等度以上の低下を認め、FSGS における所見に近かった（図 11, 12）。微小変化群と FSGS が本質的に別の疾患であるのか、同じ疾患のスペクトラムにすぎないのかという点は古くから議論的であり、現在も不明である[92]。一方で、NMMHC-IIA の発現に明確な差が認められなかった原因として、微小変化群の症例数が少なかったことや、微小変化群の症例（患者 7）が最終的にはステロイド感受性であったものの、腎生検を施行した時点では治療抵抗性であったことが一部関与している可能性が挙げられる。すなわち、初期の腎生検で微小変化群と診断されステロイド感受性であった症例で、のちにステロイド抵抗性となり腎生検で FSGS と診断される症例も存在する。実際、患者 7 は微小変化群であるが治療にやや抵抗性であり、病態として FSGS と共通した部分を有している可能性がある。本来は典型的なステロイド感受性の微小変化群の症例でかつ症例数を増やして検討すべきであるが、そのような例においては蛋白尿がステロイド治療によって短期間で消失するため、高度蛋白尿を呈する時期に腎生検を行うことはほとんどない。したがって、典型的な微小

変化群における蛋白尿を呈する時期の検討は非常に困難である。微小変化群と FSGS における NMMHC-IIA の発現の相違を検出する可能性として、尿中あるいは尿中落下細胞における NMMHC-IIA の濃度を検討する価値はあるかもしれない。

結論として、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 の発現は特発性ネフローゼ症候群、特に FSGS において低下しており、他の高度蛋白尿を呈する糸球体疾患では低下していなかった。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。

VI 謝辞

本研究を進めるにあたり，ご指導を賜りました国立成育医療研究センター五十嵐隆総長，東邦大学医療センター大橋病院小児科 関根孝司教授，順天堂大学医学部解剖学・生体構造科学講座前任准教授 栗原秀剛先生に深く感謝いたします。患者さんへの説明・検体採取にご協力いただいた北海道大学医学部小児科 佐々木聡先生，東京女子医科大学腎臓小児科 服部元史教授，近本裕子先生，実験および論文投稿に際して有益なご教示をいただいた名古屋医療センター高度診断研究部分子診断研究室室長 國島伸治先生，東京大学医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児医学講座 張田豊先生に，深く感謝いたします。また，実験にあたり技術的な指導をしてくださった，東京女子医科大学腎臓病総合医療センターの堀田茂さん，東邦大学医療センター大橋病院小児科の澤田洋子さんに，深く御礼申し上げます。

VII 参考文献

1. Cadnapaphornchai M, Tkachenko O, Shchekochikhin D, Schrier RW. The nephrotic syndrome: pathogenesis and treatment of edema formation and secondary complications. *Pediatr Nephrol* 29: 1159-1167, 2014.
2. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 362: 629-639, 2003.
3. 飯島一誠. 小児難治性ネフローゼ症候群に対するリツキシマブ療法. *日本小児科学会雑誌* 112: 965-972, 2008.
4. Bagga A, Sinha A, Moudgil A. Rituximab in patients with the steroid-resistant nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 356: 2751-2752, 2007.
5. Nakayama M, Kamei K, Nozu K, Matsuoka K, Nakagawa A, Sako M, Iijima K. Rituximab for refractory focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 23: 481-485, 2008.
6. Iijima K, Sako M, Nozu K, Mori R, Tuchida N, Kamei K, Miura K, Aya K, Nakanishi K, Ohtomo Y, Takahashi S, Tanaka R, Kaito H, Nakamura H, Ishikura K, Ito S, Ohashi Y. Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome steroid-dependent nephrotic

- syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 384(9950): 1273-1281, 2014.
7. Jefferson JA, Shankland SJ. The pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Adv Chronic Kidney Dis* 21: 434-441, 2014.
 8. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* 43: 368-382, 2004
 9. Fogo AB. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Rev Nephrol* 11: 76-87, 2015.
 10. 宍戸清一郎. PD と小児腎移植. 今日の移植 22: 451-459, 2009.
 11. McDonald SP, Craig JC; Australian and New Zealand Paediatric Nephrology Association. Long-term survival of children with end-stage renal disease. *N Engl J Med* 26: 2654-2662, 2004.
 12. Zimmerman SW. Increased urinary protein excretion in the rat produced by serum from a patient with recurrent focal glomerular sclerosis after renal transplantation. *Clin Nephrol* 22: 32-38, 1984.

13. Sharma M, Sharma R, Reddy SR, McCarthy ET, Savin VJ. Proteinuria after injection of human focal glomerulosclerosis factor. *Transplantation* 73: 366-372, 2002.
14. Avila-Casado Mdel C, Perez-Torres I, Auron A, Soto V, Fortoul TI, Herrera-Acosta J. Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 66: 133-143, 2004.
15. Savin VJ, Sharma R, Lovell HB, Welling DJ. Measurement of albumin reflection coefficient with isolated rat glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 3: 1260-1269, 1992.
16. Gallon L, Leventhal J, Skaro A, Kanwar Y, Alvarado A. Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation. *N Engl J Med* 366: 1648-1649, 2012.
17. Wei C, Moller CC, Altintas MM, Li J, Schwartz K, Zacchigna S, Xie L, Henger A, Schmid H, Rastaldi MP, Cowan P, Kretzler M, Parrilla R, Bendayan M, Gupta V, Nikolic B, Kalluri R, Carmeliet P, Mundel P, Reiser J. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med* 14: 55-63, 2008.

18. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, Maignel D, Karumanchi SA, Yap HK, Saleem M, Zhang O, Nikolic B, Chaudhuri A, Daftarian P, Salido E, Torres A, Salifu M, Sarwal MM, Schaefer F, Morath C, Schwenger V, Zeier M, Gupta V, Roth D, Rastaldi MP, Burke G, Ruiz P, Reiser J. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 17: 952-960, 2011.
19. Wada T, Nangaku M, Maruyama S, Imai E, Shoji K, Kato S, Endo T, Muso E, Kamata K, Yokoyama H, Fujimoto K, Obata Y, Nishino T, Kato H, Uchida S, Sasatomi Y, Saito T, Matsuo S. A multicenter cross-sectional study of circulating soluble urokinase receptor in Japanese patients with glomerular disease. *Kidney Int* 85: 641-648, 2014.
20. Meijers B, Maas RJ, Sprangers B, Claes K, Poesen R, Bammens B, Naesens M, Deegens JK, Dietrich R, Storr M, Wetzels JF, Evenepoel P, Kuypers D. The soluble urokinase receptor is not a clinical marker for focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 85: 636-640, 2014.
21. Sinha A, Bajpai J, Saini S, Bhatia D, Gupta A, Puraswani M, Dinda AK, Agarwal SK, Sopory S, Pandey RM, Hari P, Bagga A. Serum-soluble urokinase receptor levels do not distinguish focal segmental

- glomerulosclerosis from other causes of nephrotic syndrome in children. *Kidney Int* 85: 649-658, 2014.
22. Harita Y, Ishizuka K, Tanego A, Sugawara N, Chikamoto H, Akioka Y, Tsurumi H, Miura K, Gotoh Y, Tsujita M, Yamamoto T, Horike K, Takeda A, Oka A, Igarashi T, Hattori M. Decreased glomerular filtration as the primary factor of elevated circulating suPAR levels in focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 29: 1553-1560, 2014.
23. Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23: 354-358, 1999.
24. Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Rops AL, van der Vlag J, Berden JH, Moeller MJ, Holzman LB, Burgess RW, Miner JH. Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. *Am J Pathol* 171: 139-152, 2007.
25. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a

- novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1: 575-582, 1998.
26. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 24: 349-354, 2000. Erratum in: *Nat Genet* 25: 125, 2000.
27. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodriguez-Perez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24: 251-256, 2000.
28. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308: 1801-1804, 2005.
29. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nummer G, Garg P, Verma R, Chaib H, Hoskins BE, Ashraf S, Becker C, Hennies HC,

Goyal M, Wharram BL, Schachter AD, Mudumana S, Drummond I, Kerjaschki D, Waldherr R, Dietrich A, Ozaltin F, Bakkaloglu A, Cleper R, Basel-Vanagaite L, Pohl M, Griebel M, Tsygin AN, Soylu A, Muller D, Sorli CS, Bunney TD, Katan M, Liu J, Attanasio M, O'toole JF, Hasselbacher K, Mucha B, Otto EA, Airik R, Kispert A, Kelley GG, Smrcka AV, Gudermann T, Holzman LB, Nurnberg P, Hildebrandt F. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 38: 1397-1405, 2006.

30. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, Hangan D, Ozaltin F, Zenker M, Hildebrandt F; Arbeitsgemeinschaft fur Paediatrische Nephrologie Study Group. Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics* 119: e907-914, 2007.

31. Gbadegesin RA, Hall G, Adeyemo A, Hanke N, Tossidou I, Burchette J, Wu G, Homstad A, Sparks MA, Gomez J, Jiang R, Alonso A, Lavin P, Conlon P, Korstanje R, Stander MC, Shamsan G, Barua M, Spurney R, Singhal PC, Kopp JB, Haller H, Howell D, Pollak MR, Shaw AS, Schiffer

- M, Winn MP. Mutations in the gene that encodes the F-actin binding protein anillin cause FSGS. *J Am Soc Nephrol* 25: 1991-2002, 2014.
32. Brown EJ, Schlondorff JS, Becker DJ, Tsukaguchi H, Tonna SJ, Uscinski AL, Higgs HN, Henderson JM, Pollak MR. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 42: 72-76, 2010.
33. Garg P, Verma R, Cook L, Soofi A, Venkatareddy M, George B, Mizuno K, Gurniak C, Witke W, Holzman LB. Actin-depolymerizing factor cofilin-1 is necessary in maintaining mature podocyte architecture. *J Biol Chem* 285: 22676-22688, 2010.
34. Scott RP, Hawley SP, Ruston J, Du J, Brakebusch C, Jones N, Pawson T. Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23: 1149-1154, 2012.
35. Gupta IR, Baldwin C, Auguste D, Ha KC, El Andalousi J, Fahiminiya S, Bitzan M, Bernard C, Akbari MR, Narod SA, Rosenblatt DS, Majewski J, Takano T. ARHGDI1: a novel gene implicated in nephrotic syndrome. *J Med Genet* 50: 330-338, 2013.

36. Gee HY, Saisawat P, Ashraf S, Hurd TW, Vega-Warner V, Fang H, Beck BB, Gribouval O, Zhou W, Diaz KA, Natarajan S, Wiggins RC, Lovric S, Chernin G, Schoeb DS, Ovunc B, Frishberg Y, Soliman NA, Fathy HM, Goebel H, Hoefele J, Weber LT, Innis JW, Faul C, Han Z, Washburn J, Antignac C, Levy S, Otto EA, Hildebrandt F. ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest* 123: 3243-3253, 2013.
37. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signaling. *Nat Cell Biol* 8: 485-491, 2006.
38. Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, Reiser J, Mundel P. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 115: 1188-1198, 2005.
39. Huber TB, Kwok C, Wu H, Asanuma K, Godel M, Hartleben B, Blumer KJ, Miner JH, Mundel P, Shaw AS. Bigenic mouse models of focal segmental glomerulosclerosis involving pairwise interaction of CD2AP, Fyn, and synaptopodin. *J Clin Invest* 116: 1337-1345, 2006.

40. Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher-Gomez S, Aguillon-Prada R, Jauregui AN, Li J, Mattiazzi A, Clancio G, Chen L, Zilleruelo G, Abitbol C, Chandar J, Seeherunvong W, Ricordi C, Ikehata M, Pia Rastaldi M, Reiser J, Burke GW III. Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Sci Transl Med* 3: 85ra46, 2011.
41. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 14: 931-938, 2008.
42. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J, Denison JC, Gregory MC, White JG, Barker DF, Greinacher A, Epstein CJ, Glucksman MJ, Martignetti JA. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet* 69: 1033-1045, 2001.
43. Seri M, Pecci A, Di Bari F, Cusano R, Savino M, Panza E, Nigro A, Noris P, Gangarossa S, Rocca B, Gresele P, Bizzaro N, Malatesta P, Koivisto PA,

Longo I, Musso R, Pecoraro C, Iolascon A, Magrini U, Rodriguez Soriano J, Renieri A, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Balduini CL, Savoia A.

MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)* 82: 203-215, 2003.

44. Kunishima S, Matsushita T, Kojima T, Amemiya N, Choi YM, Hosaka N, Inoue M, Jung Y, Mamiya S, Matsumoto K, Miyajima Y, Zhang G, Ruan C, Saito K, Song KS, Yoon HJ, Kamiya T, Saito H. Identification of six novel MYH9 mutations and genotype-phenotype relationships in autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions. *J Hum Genet* 46: 722-729, 2001.

45. Kopp JB. Glomerular pathology in autosomal dominant MYH9 spectrum disorders: what are the clues telling us about disease mechanism? *Kidney Int* 78: 130-133, 2010.

46. Naito I, Nomura S, Inoue S, Kagawa M, Kawai S, Gunshin Y, Joh K, Tsukidate C, Sado Y, Osawa G. Normal distribution of collagen IV in renal basement membranes in Epstein's syndrome. *J Clin Pathol* 50:

919-922, 1997.

47. 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.
48. Zhang Y, Conti MA, Malide D, Dong F, Wang A, Shmist YA, Liu C, Zerfas P, Daniels MP, Chan CC, Kozin E, Kachar B, Kelley MJ, Kopp JB, Adelstein RS. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood* 119: 238-250, 2012.
49. Johnstone DB, Zhang J, George B, Leon C, Gachet C, Wong H, Parekh R, Holzman LB. Podocyte-specific deletion of Myh9 encoding nonmuscle myosin heavy chain 2A predisposes mice to glomerulopathy. *Mol Cell Biol* 31: 2162-2170, 2011.
50. Kopp JB, Smith MW, Nelson GW, Johnson RC, Freedman BI, Bowden DW, Oleksyk T, McKenzie LM, Kajiyama H, Ahuja TS, Berns JS, Briggs W, Cho ME, Dart RA, Kimmel PL, Korbet SM, Michel DM, Mokrzycki MH,

Schelling JR, Simon E, Trachtman H, Vlahov D, Winkler CA. MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 40: 1175-1184, 2008.

51. Kao WH, Klag MJ, Meoni LA, Reich D, Berthier-Schaad Y, Li M, Coresh J, Patterson N, Tandon A, Powe NR, Fink NE, Sadler JH, Weir MR, Abboud HE, Adler SG, Divers J, Iyengar SK, Freedman BI, Kimmel PL, Knowler WC, Kohn OF, Kramp K, Leehey DJ, Nicholas SB, Pahl MV, Shelling JR, Sedor JR, Thornley-Brown D, Winkler CA, Smith MW, Parekh RS; Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group. MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. *Nat Genet* 40: 1185-1192, 2008.

52. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, Bowden DW, Langefeld CD, Oleksyk TK, Uscinski Knob AL, Bernhardt AJ, Hicks PJ, Nelson GW, Vanhollebeke B, Winkler CA, Kopp JB, Pays E, Pollak MR. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science* 329: 841-845, 2010.

53. Friedman DJ, Kozlitina J, Genovese G, Jog P, Pollak MR. Population-based risk assessment of APOL1 on renal disease. *J Am Soc Nephrol* 22:

2098-2105, 2011.

54. Kanji Z, Powe CE, Wenger JB, Huang C, Ankers E, Sullivan DA, Collerone G, Powe NR, Tonelli M, Bhan I, Bernhardt AJ, Dibartolo S, Friedman D, Genovese G, Pollak MR, Thadhani R. Genetic variation in APOL1 associates with younger age at hemodialysis initiation. *J Am Soc Nephrol* 22: 2091-2097, 2011.
55. Reeves-Daniel AM, DePalma JA, Bleyer AJ, Rocco MV, Murea M, Adams PL, Langefeld CD, Bowden DW, Hicks PJ, Stratta RJ, Lin JJ, Kiger DF, Gautreaux MD, Divers J, Freedman BI. The APOL1 gene and allograft survival after kidney transplantation. *Am J Transplant* 11: 1025-1030, 2011.
56. O'Seaghdha CM, Parekh RS, Hwang SJ, Li M, Kottgen A, Coresh J, Yang Q, Fox CS, Kao WH. The MYH9/APOL1 region and chronic kidney disease in European-Americans. *Hum Mol Genet* 20: 2450-2456, 2011.
57. Cooke JN, Bostrom MA, Hicks PJ, Ng MC, Hellwege JN, Comeau ME, Divers J, Langefeld CD, Freedman BI, Bowden DW. Polymorphisms in MYH9 are associated with diabetic nephropathy in European Americans. *Nephrol Dial Transplant* 27: 1505-1511, 2012.

58. Wagrowska-Danilewicz M, Stasikowska O, Danilewicz M. Immunorexpression of podocyte-associated preteins in acquired human glomerulopathies with nephrotic syndrome. *Pol J Pathol* 57: 17-21, 2006.
59. Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, Holmberg C, Heikinheimo M, Tryggvason K, Jalanko H. Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 12: 289-296, 2001.
60. Hingorani SR, Finn LS, Kowalewska J, McDonald RA, Eddy AA. Expression of nephrin in acquired forms of nephrotic syndrome in childhood. *Pediatr Nephrol* 19: 300-305, 2004.
61. Wernerson A, Duner F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Hultenby K, Soderberg M. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 18: 70-76, 2003.
62. Guan N, Ding J, Zhang J, Yang J. Expression of nephrin, podocin, alpha-actinin, and WT1 in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 18: 1122-1127, 2003.
63. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, Bruijn JA. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human

- kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 14: 2063-2071, 2003.
64. Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, Alon US. Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 59: 118-125, 2001.
65. Horinouchi I, Nakazato H, Kawano T, Iyama K, Furuse A, Arizono K, Machida J, Sakamoto T, Endo F, Hattori S. In situ evaluation of podocin in normal and glomerular diseases. *Kidney Int* 64: 2092-2099, 2003.
66. Arrondel C, Vodovar N, Knebelmann B, Grunfeld JP, Gubler MC, Antignac C, Heidet L. Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes. *J Am Soc Nephro.* 13: 65-74, 2002.
67. Ghiggeri GM, Caridi G, Magrini U, Sessa A, Savoia A, Seri M, Pecci A, Romagnoli R, Gangarossa S, Noris P, Sartore S, Necchi V, Ravazzolo R, Balduini CL. Genetics, clinical and pathological features of glomerulonephritis associated with mutations of nonmuscle myosin IIA (Fechtner syndrome). *Am J Kidney Dis* 41: 95-104, 2003.
68. Miller M, Bower E, Levitt P, Li D, Chantler PD. Myosin II distribution in neurons is consistent with a role in growth cone motility but not synaptic

- vesicle mobilization. *Neuron* 8: 25-44, 1992.
69. Kunishima S, Kojima T, Matsushita T, Tanaka T, Tsurusawa M, Furukawa Y, Nakamura Y, Okamura T, Amemiya N, Nakayama T, Kamiya T, Saito H. Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). *Blood* 97: 1147-1149, 2001.
70. Matsushita T, Hayashi H, Kunishima S, Hayashi M, Ikejiri M, Takeshita K, Yuzawa Y, Adachi T, Hirashima K, Sone M, Yamamoto K, Takagi A, Katsumi A, Kawai K, Nezu T, Takahashi M, Nakashima T, Naoe T, Kojima T, Saito H. Targeted disruption of mouse ortholog of the human MYH9 responsible for macrothrombocytopenia with different organ involvement: hematological, nephrological, and otological studies of heterozygous KO mice. *Biochem Biophys Res Com* 325: 1163-1171, 2004.
71. Cheng XT, Hayashi K, Shirao T. Non-muscle myosin IIB-like immunoreactivity is present at the drebrin-binding cytoskeleton in neurons. *Neurosci Res* 36: 167-173, 2000.
72. Kurihara H, Sunagawa N, Kobayashi T, Kimura K, Takasu N, Shike T. Monoclonal antibody P-31 recognizes a novel intermediate filament-

- associated protein (p250) in rat podocytes. *Am J Physiol* 274: F986-F997, 1998.
73. Notoya M, Shinosaki T, Kobayashi T, Sakai T, Kurihara H.
Intussusceptive capillary growth is required for glomerular repair in rat Thy-1.1 nephritis. *Kidney Int* 63: 1365-1373, 2003.
74. Vernier RL, Papermaster BW, Good RA. Aminonucleoside nephrosis. I. Electron microscopic study of the renal lesion in rats. *J Exp Med* 109: 115-126, 1959.
75. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Ohsawa I, Ohta S, Hattori S. Phosphorylation of nephrin triggers Ca²⁺ signaling by recruitment and activation of phospholipase C-gamma 1. *J Biol Chem* 284: 8951-8962, 2009.
76. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Tezuka T, Sekine T, Igarashi T, Hattori S. Nephrin, a component of the kidney slit diaphragm, is tyrosine-phosphorylated by the Src family tyrosine kinase and modulates intracellular signaling by binding to Grb2. *J Biol Chem* 283: 9177-9186, 2008.
77. 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.
78. Zou J, Yaoita E, Watanabe Y, Yoshida Y, Nameta M, Li H, Qu Z, Yamamoto T. Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury. *Virchows Arch* 448: 485-492, 2006.
79. Sun XH, Wang ZY, Yang HY, Cao LJ, Su J, Yu ZQ, Bai X, Ruan CG. Clinical, pathological, and genetic analysis of ten patients with MYH9-related disease. *Acta Haematol* 129: 106-113, 2013.
80. Even-Ram S, Yamada KM. Of mice and men: Relevance of cellular and molecular characterizations of myosin IIA to MYH9-related human disease. *Cell Adh Migr* 1: 152-155, 2007.
81. Hays T, Ma'ayan A, Clark NR, Tan CM, Teixeira A, Teixeira A, Choi JW, Burdis N, Jung SY, Bajaj AO, O'Malley BW, He JC, Hyink DP, Klotman PE. Proteomics analysis of the non-muscle myosin heavy chain IIa-enriched actin-myosin complex reveals multiple functions within the podocyte. *PLoS One* 9: e100660, 2014.

82. Cai Y, Rossier O, Gauthier NC, Biais N, Fardin MA, Zhang X, Miller LW, Ladoux B, Cornish VW, Sheetz MP. Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility. *J Cell Sci* 123: 413-423, 2010.
83. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, Krofft RD, Logar CM, Marshall CB, Ohse T, Shankland SJ. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F213-229, 2009.
84. Babayeva S, Miller M, Zilber Y, El Kares R, Bernard C, Bitzan M, Goodyer P, Torban E. Plasma from a case of recurrent idiopathic FSGS perturbs non-muscle myosin IIA (MYH9 protein) in human podocytes. *Pediatr Nephrol* 26: 1071-1081, 2011.
85. Hays T, D'Agati VD, Garellek JA, Warren T, Trubin ME, Hyink DP, He JC, Klotman PE. Glomerular MYH9 expression is reduced by HIV-1. *AIDS* 26: 797-803, 2012.
86. Pasapera AM, Plotnikov SV, Fischer RS, Case LB, Egelhoff TT, Waterman CM. Rac1-dependent phosphorylation and focal adhesion recruitment of myosin IIA regulates migration and mechanosensing. *Curr Biol* 25: 175-186, 2015.

87. Diensthuber RP, Müller M, Heissler SM, Taft MH, Chizhov I, Manstein DJ. Phalloidin perturbs the interaction of human non-muscle myosin isoforms 2A and 2C1 with F-actin. *FEBS Lett* 585: 767-771, 2011.
88. Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM, Adelstein RS. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem* 279: 41263-41266, 2004.
89. Müller T, Rumpel E, Hradetzky S, Bollig F, Wegner H, Blumenthal A, Greinacher A, Endlich K, Endlich N. Non-muscle myosin IIA is required for the development of the zebrafish glomerulus. *Kidney Int* 80: 1055-1063, 2011.
90. Suzuki N, Kunishima S, Ikejiri M, Maruyama S, Sone M, Takagi A, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T, Matsushita T. Establishment of mouse model of MYH9 disorders: heterozygous R702C mutation provokes macrothrombocytopenia with leukocyte inclusion bodies, renal glomerulosclerosis and hearing disability. *PLoS One* 8: e71187, 2013.
91. Pecci A, Canobbio I, Balduini A, Cisterna B, Stefanini L, Marseglia C, Noris P, Savoia A, Balduini CL, Torti M. Pathogenetic mechanisms of

haematological abnormalities of patients with MYH9 mutations. *Hum Mol Genet* 14: 3169-3178, 2005.

92. Cho MH, Hong EH, Lee TH, Ko CW. Pathophysiology of minimal change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* 12 Suppl 3: S11-14, 2007.