

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 三浦健一郎

【序文】

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。

FSGS を含むネフローゼ症候群の原因は長年の間不明であったが、1998 年、糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 間のスリット膜蛋白である *nephrin* が先天性ネフローゼ症候群の責任分子であることが判明した。以後、ポドサイト関連蛋白が遺伝性ネフローゼ症候群の原因として次々と報告され、ネフローゼの病態にポドサイト障害が大きく関与していることが示された。しかし、日常臨床でよく遭遇する特発性ネフローゼ症候群においては、これらのポドサイト関連遺伝子に異常がなく、いまだにその原因は不明である。

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。*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。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。

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、NMMHC-IIA 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。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、ポドサイト内における詳細な局在については不明であり、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 (puromycin aminonucleoside (PAN)腎症ラット) 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。

【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、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 (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慢性糸球体腎炎を含む) における NMMHC-IIA の発現を酵素抗体染色で検討した。2 名の研究者 (H.Y.および S.T.) が染色強度を半定量的にスコア化し、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。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。

【結果】

ヒトの正常腎において、NMMHC-IIA のシグナルは 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 2)。

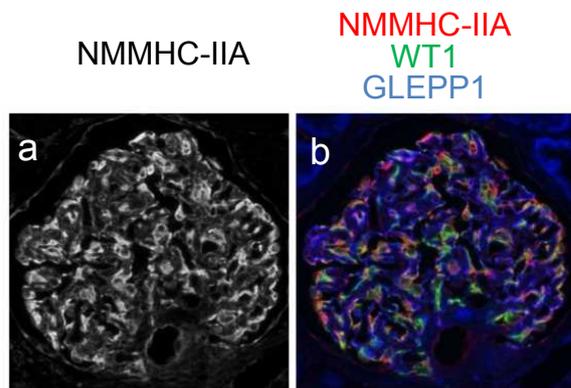


図 1 糸球体における NMMHC-IIA の局在
ヒト正常糸球体において、NMMHC-IIA はポドサイト細胞体に染色され、WT1, GLEPP1 とはほぼ異なった局在を示している。

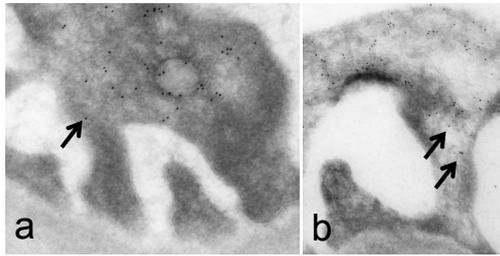


図2 ヒト正常腎における NMMHC-IIA の免疫電顕像

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)。

次に、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 の染色強度スコア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を用いて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 ステロイド抵抗性 FSGS と他の蛋白尿を呈する糸球体疾患の免疫組織染色における糸球体 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。tip variant は特発性 FSGS の中でもステロイド感受性であった群。

*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。

また、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。

【考察】

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 2)。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、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。したがって、NMMHC-IIA がポドサイトの一次突起において細胞骨格を制御している可能性が示唆される。

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。PAN 腎症ラットにおいても、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。ヒト特発性 FSGS および PAN 腎症ラットにおいて著明に NMMHC-IIA の発現が低下していることから、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。

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。まず、*Myh9* のヘテロ欠損マウスは何ら腎症状を呈さない。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ないものの 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。また *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。顆粒球においては、NMMHC-IIA は正常では細胞質に均一に存在するが、*MYH9* 変異を入れた細胞においては正常な NMMHC-IIA が変異 NMMHC-IIA とともに大部分が異常集積部位に凝集する。一方、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いう報告もある。これらのことから、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。

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 の発現低下は特発性ネフローゼ症候群、特に FSGS において顕著であった。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。