

原発性巣状糸球体硬化症 (FSGS) における  
蛋白尿惹起液性因子の遺伝子解析  
－ cDNAアレイシステムを用いた検討－

(課題番号 14570775)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金  
〔基盤研究C2〕 研究成果報告書

平成16年3月



服部元史

(東京女子医科大学医学部助教授)





原発性巣状糸球体硬化症 (FSGS) における  
蛋白尿惹起液性因子の遺伝子解析  
－ cDNAアレイシステムを用いた検討－

(課題番号 14570775)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金  
〔基盤研究C2〕 研究成果報告書

平成16年3月

服部 元史  
(東京女子医科大学医学部助教授)

はしがき

原発性巣状糸球体硬化症(FSGS)の蛋白尿発症機序は不明であるが、一部の患者の血漿中には糸球体濾過障壁の蛋白透過性を亢進させる何らかの液性因子(蛋白尿惹起液性因子:CFs)が存在する可能性が示されている。一方、蛋白尿発症におけるポドサイトの重要性と濾過障壁の分子レベルでの理解が進んでおり、CFsによる直接的なポドサイト障害が key-step である可能性が想定される。そこで、腎移植後再発を認めた原発性 FSGS 患者血漿特異的に発現が変化するポドサイト関連分子群の同定を目的として研究を行った。原発性 FSGS 患者血漿とマウス培養ポドサイト細胞との direct-interaction について、まず cDNA アレイシステムを用いてスクリーニングし、さらにその結果をもとに real-time PCR 法にて検討した。その結果、腎移植後再発を認めた原発性 FSGS 患者血漿特異的に integrin-linked kinase (ILK) mRNA 発現の亢進が認められたことより、FSGS 再発患者血漿中にはポドサイトの糸球体基底膜への接着に影響を及ぼす因子が含まれ、その機序に ILK が関与している可能性が示唆された。

平成16年3月

研究組織

研究代表者：服部元史（東京女子医科大学医学部助教授）

研究分担者：伊藤克己（東京女子医科大学医学部教授）

：土谷 健（東京女子医科大学医学部講師）

：秋岡祐子（東京女子医科大学医学部助手）

：近本裕子（東京女子医科大学医学部助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成14年度	2,500	0	2,500
平成15年度	900	0	900
平成 年度			
平成 年度			
平成 年度			
総 計	3,400		3,400

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Hattori M et al.: Analysis by cDNA array of altered gene expression in mouse cultured podocytes in response to plasma from focal segmental glomerulosclerosis patients. J Am Soc Nephrol 13:123A, 2002
2. 服部元史 他：マウス培養ポドサイトに対する原発性 FSGS 患者血漿の影響—cDNA アレイシステムを用いた検討— Ther Res 23:1355-1357, 2002
3. Hattori M et al.: Induction of integrin-linked kinase (ILK) in mouse cultured podocytes after stimulation with plasma from recurrent focal segmental glomerulosclerosis patients. J Am Soc Nephrol 14:375A, 2003
4. 服部元史 他：マクロファージと腎障害 腎と透析 54:269-273, 2003
5. 服部元史 他：先天性・乳児ネフローゼ症候群 小児科診療 66:613-619, 2003
6. 服部元史 他：原発性 FSGS の組織学的 variant: Cellular lesion と Collapsing glomerulopathy 腎と透析 55:781-785, 2003
7. 服部元史 他：腎疾患に対するアフェレシス療法 小児科 44:2065-2072, 2003
8. Hattori M et al.: A combined low-density lipoprotein apheresis and prednisone therapy for steroid-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis in children. Am J Kidney Dis 46:1121-1130, 2003

### (2) 口頭発表

1. 服部元史、秋岡祐子、岩本典子、小林直人、土谷 健、伊藤克己：cDNA アレイシステムを用いた原発性 FSGS 患者血漿による培養マウスポドサイトの細胞機能変化の検討 第 45 回日本腎臓学会学術総会、5 月 23～25 日、大阪、2002
2. 服部元史、秋岡祐子、近本裕子、岩本典子、土谷 健、小林直人、伊藤

克己：原発性 FSGS 患者血漿による培養足細胞の機能変化 第 37 回日本小児腎臓病学会学術集会シンポジウム：蛋白尿とポドサイト、7 月 4～6 日、神戸、2002

3. Hattori M, Akioka Y, Chikamoto H, Iwamoto N, Tsuchiya K, Kobayashi N, Mundel P, Ito K: Effects of plasma from recurrent-focal segmental glomerulosclerosis patients on gene expression of mouse cultured podocytes analyzed by cDNA array. 4<sup>th</sup> International Symposium on Podocyte Biology, September 19-20, Niigata, 2002
4. Hattori M, Akioka Y, Iwamoto N, Chikamoto H, Tsuchiya K, Kobayashi N, Ito K: Analysis by cDNA array of altered gene expression in mouse cultured podocytes in response to plasma from focal segmental glomerulosclerosis patients. ASN 35<sup>th</sup> Annual meeting & scientific exposition, November 1-3, Philadelphia, 2002
5. Hattori M, Akioka Y, Chikamoto H, Tsuchiya K, Kobayashi N, Mundel P, Ito K: Effects of plasma from recurrent focal segmental glomerulosclerosis patients on gene expression of mouse cultured podocytes analyzed by cDNA array. The 9<sup>th</sup> Asian Pacific Congress of Nephrology, February 16-20, Pattaya, 2003
6. 服部元史、伊藤克己：腎移植後 FSGS 再発に対するアフェレシス治療 第 19 回日本医工学治療学会学術大会シンポジウム：臓器移植におけるアフェレシス治療、5 月 17～18、札幌、2003
7. 服部元史、秋岡祐子、近本裕子、土谷 健、小林直人、伊藤克己：ポドサイトの糸球体基底膜接着に対する原発性 FSGS 患者血漿の影響 第 46 回日本腎臓学会学術総会、5 月 22～24 日、東京、2003
8. 服部元史：FSGS の病因・病態と治療に関する最近の知見 第 17 回九州小児ネフロロジー研究会、7 月 26 日、大宰府、2003
9. Hattori M, Akioka Y, Chikamoto H, Tsuchiya K, Gao S, Kobayashi N, Kagami S, Mundel P, Ito K: Induction of integrin linked kinase (ILK) in mouse cultured podocytes after stimulation with plasma from recurrent-focal segmental glomerulosclerosis patients. ASN 36<sup>th</sup>

Annual meeting & scientific exposition, November 12-17, San Diego,  
2003

(3) 出版物

1. 服部元史：巣状系球体硬化症 小児科学第2版 （白木和夫、前川喜平  
監修）、p1257-1261、医学書院、2002

## 原発性巣状糸球体硬化症(FSGS)における蛋白尿惹起液性因子の分離・同定

### I: 研究の背景

原発性巣状糸球体硬化症(focal segmental glomerulosclerosis: FSGS)は極めて予後不良な腎疾患である。症例の約 40%はステロイドや各種免疫抑制薬に反応することなく高度蛋白尿、全身性浮腫、著明な高脂血症が持続し、そして短期間のうちに末期腎不全へ進行する。実際、小児慢性腎不全患者の原因のうち、一番頻度が高い後天性腎疾患は原発性 FSGS である。さらに、腎移植後の再発も高頻度(約 30～40%)にみられ、再発例の約半数は透析再導入を余儀なくされる。1957 年に Rich らにより初めて本疾患概念が報告されたが、現在もなお、その病因や病態の詳細は不明である(文献 1 参照)。

しかしながら、原発性 FSGS では腎移植直後に再発が認められ、そして再発(蛋白尿)に対して血漿交換療法が有効なことから(文献 2, 3 参照)、蛋白尿の発症機序として、糸球体濾過障壁の蛋白透過性を亢進させる何らかの液性因子(蛋白尿惹起液性因子: circulating factors; CFs)が関与している可能性が示唆されている(文献 2 参照)。

一方、原発性 FSGS の大半は散発例であるが、最近、家族性に発症する症例が集積され、2000 年には家族性 FSGS の責任遺伝子(*NPHS2* と *ACTN4*; コードする蛋白分子はそれぞれ podocin と  $\alpha$ -actinin-4)が同定された。これらの蛋白分子はいずれも糸球体上皮細胞(ポドサイト)に発現し、ポドサイトの細胞骨格を構成する。1998 年にフィンランド型先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子(*NPHS1*)の遺伝子産物として同定された nephrin もポドサイト足突起間のスリット膜の構成蛋白であることが明らかにされており、蛋白尿発症におけるポドサイトの重要性和濾過障壁の分子レベルでの理解が進んでいる(文献 4 参照)。実際、ポドサイトの腫大・変性・増生像が原発性 FSGS の早期病変として認められることから(文献 5～7 参照)、前述の CFs による直接的なポドサイト障害が蛋白尿発症機序の key-step であると想定される。

## II: 研究の目的・意義

本研究では、マウス培養ポドサイト細胞(mouse cultured podocytes; MCP)を用いて、腎移植後再発を認めた原発性 FSGS 患者血漿特異的に発現が変化するポドサイト関連分子群をマーカーとする *bioassay* システムを確立することが第一段階の目標である。そして、この *bioassay* システムを用いて、原発性 FSGS 患者血漿中に存在する CFs を分離・同定することが最終的な目標である。

本研究の意義は、1) 上記の *bioassay* システムが確立されれば、現在もなおその性状が全く不明である CFs の分離・同定に向けて、極めて有力なツールになる、そして 2) CFs が同定されて産生部位や産生細胞が特定されれば、特異的治療法の開発に繋がるものと期待され、患児、家族、そして社会全体が受ける恩恵は計り知れない。

## III: これまでの研究経過

研究代表者らは以前から原発性 FSGS に注目し、その病因や病態（腎障害進行機序）の解明に向けて研究を進めてきた。

まず、本疾患に合併した高脂血症は腎障害進行因子として重大な病的意義を有していること（特にマクロファージと接着分子の点から検討）、また合併した高脂血症に対して積極的に治療する必要性(LDL 吸着療法など)を報告してきた（文献 8, 9 参照）。

次に、原発性 FSGS では腎移植直後に再発が認められ、そして再発(蛋白尿)に対して血漿交換療法が有効なことから、原発性 FSGS における蛋白尿発症機序として、CFs が関与している可能性を報告してきた(文献 2, 3 参照)。

また、ポドサイトの腫大・変性・増生像(細胞形質変換を含む)を特徴とした cellular lesion が原発性 FSGS の早期病変として認められることから、CFs による直接的なポドサイト障害が原発性 FSGS における蛋白尿発症機序の key-step である可能性を報告してきた(文献 5～7 参照)。

そして本研究では、原発性 FSGS 患者血漿と MCP との direct-interaction に関して、まず cDNA アレイシステムを用いた大規模



mRNA 発現変化を検討し、次にそこで得られた結果をもとに、いくつかの遺伝子については RT-PCR や real-time PCR 法を用いて検討した。その結果、腎移植後に再発を認めた原発性 FSGS 患者血漿を MCP に添加すると、integrin-linked kinase (ILK) の mRNA 発現が亢進することが確認された。現在、蛋白レベルでの変化 (ILK 活性や細胞形態像の変化) についても検討しているが、これらの結果は、腎移植後再発を認めた原発性 FSGS 患者血漿中にはポドサイトと糸球体基底膜との接着を阻害する何らかの液性因子が存在する可能性を強く示唆している。

#### IV: 今後の研究計画

腎移植後再発を認めた原発性 FSGS 患者血漿特異的に発現が変化する遺伝子群を同定する目的で、1) 腎移植後再発 FSGS 患者血漿、2) 腎移植後再発しなかった FSGS 患者血漿、3) 微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) 患者血漿、4) ネフローゼ状態にある紫斑病性腎炎 (HSPN) 患者血漿、5) 健康人血漿、さらに 6) 細胞毒性のコントロールとしてピューロマイシン・アミノヌクレオシド、それぞれの MCP に及ぼす影響について、cDNA アレイシステムを用いてスクリーニングしてきた。そこで得られた結果については、種々のポドサイト関連分子群とも併せて、引き続き RT-PCR や real-time PCR 法を用いて検討を加える。なお、実験には保存してある治療用アフレスシスでの廃棄血漿を使用する (文献 3, 10 参照)。

同時に、現在までの解析結果によれば、腎移植後再発 FSGS 患者血漿を MCP に添加すると、ポドサイトの糸球体基底膜との接着に重要な役割を果たしている ILK 発現の亢進が認められたことから、とくに ILK に的を絞って、ILK 活性の変化や ILK 関連分子群の変化についてさらに検討を進める。

上記のプロセスにて、原発性 FSGS 再発患者血漿特異的に発現が変化するポドサイト関連分子群をマーカーとする *bioassay* システムをまず確立する。

そしてこの *bioassay* システムが確立されれば、このシステムを用いて原発性 FSGS 患者血漿中に存在する CFs の分離・同定を試みる。まず全血漿

を種々のカラムを用いて分子量で大別し、各分画を *bioassay* システムを用いてスクリーニングする。そしてその結果をもとに、二次元電気泳動＋質量分析法(MS)による患者血漿のプロテオミクス解析をおこなう。プロテオミクス解析は、島津社製 MALDI-TOF/MS システムによるペプチドマスフィンガープリント法（マスマップ法）を用いておこなうが、場合によっては、液体クロマトグラフィー＋MS システムも試みる。

#### 参考論文

1. 巣状糸球体硬化症. 服部元史. 小児科学 第2版 (白木和夫、前川喜平監修)、p1257-1261、医学書院、2002
2. 難治性ネフローゼ症候群に対する血液浄化療法. 服部元史、伊藤克己. Annual Review 腎臓 2001 (伊藤克己、他編)、p168-172、中外医学社、2001
3. Effect of pre- and post-operative plasmapheresis on posttransplant recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in children. Ohta T, Kawaguchi H, Hattori M, Komatsu Y, Akioka Y, Nagata M, Shiraga H, Ito K, Takahashi K, Ishikawa N, Tanabe K, Yamaguchi Y, Ota K. Transplantation 71(5):628-633, 2001
4. 遺伝子異常が明らかにされた巣状糸球体硬化症. 服部元史、伊藤克己. Annual Review 腎臓 2002 (伊藤克己、他編)、p59-63、中外医学社、2002
5. 原発性 FSGS と cellular lesion: 病理像の特徴とその臨床病理学的意義. 服部元史、鈴木俊明、伊藤克己. 日本小児腎臓病学会誌 14(1):17-21, 2001
6. Phenotypic characteristics and cyclin-dependent kinase inhibitors repression in hyperplastic epithelial pathology in idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. Nagata M, Horita S, Shu Y, Shibata S, Hattori M, Ito K, Watanabe T. Laboratory Investigation 80(6):869-880, 2000
7. Mesangial phenotypic changes associated with cellular lesions in primary focal segmental glomerulosclerosis. Hattori M, Horita S,

Yoshioka T, Yamaguchi Y, Kawaguchi H, Ito K. American Journal of Kidney Diseases 30(5):632-638, 1997

8. A combined low-density lipoprotein apheresis and prednisone therapy for steroid-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis in children. Hattori M, Chikamoto H, Akioka Y, Nakakura H, Ogino D, Matsunaga A, Fukazawa A, Miyakawa S, Khono M, Kawaguchi H, Ito K. American Journal of Kidney Diseases 42(6):1121-1130, 2003
9. Mechanisms of glomerular macrophage infiltration in lipid-induced renal injury. Hattori M, Nikolic-Paterson DJ, Miyazaki K, Isbel NM, Lan HY, Atkins RC, Kawaguchi H, Ito K. Kidney International 55(Suppl.71):S47-S50, 1999
10. Plasmapheresis as the sole therapy for rapidly progressive Henoch-Schoenlein purpura nephritis in children. Hattori M, Ito K, Konomoto T, Kawaguchi H, Yoshioka T, Khono M. American Journal of Kidney Diseases 33(3):427-433, 1999