

201128199A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

Epstein症候群の全国疫学調査ならびに
診断・予防・治療の開発研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関根 孝司

平成24(2012)年4月

目 次

I. 総括研究報告

Epstein 症候群の全国疫学調査：方法およびその結果 関根孝司 -----	3
--	---

II. 分担研究報告

1) 免疫蛍光染色による顆粒球の非筋ミオシン重鎖 IIA 局在 解析および MYH9 遺伝子配列解析 國島伸治 -----	11
2) Epstein 症候群動物モデル：MYH9 R702C マウスの 表現型解析 松下正 -----	15
3) HeLa 細胞および COS-7 細胞への変異 NMMHC-IIA 分子の 導入とその解析 川口裕之 -----	19
4) NMMHC-IIA の糸球体内局在の解析 三浦健一郎 -----	21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	25
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	29
-----------------------	----

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

Epstein症候群の全国疫学調査ならびに診断・予防・治療に関する研究

研究代表者：関根 孝司（東邦大学医学部 小児科 教授）

研究要旨

Epstein症候群の病態・重症度を明らかにし、本疾患の診断・診療を確立する目的で、本邦におけるEpstein症候群について初めての大規模疫学調査（1次調査、2次調査）を行った。さらに診断法の確立、遺伝子型・臨床表現型の連関、分子病態の解明についても研究をおこなった。今年度の調査研究および基礎研究をもとに、Epstein症候群の「標準的診断」の確立、匿名化データベースの作成、さらに本疾患の治療体制の整備を目指す基盤整備を行った。

研究分担者

國島伸治（国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター室長）

松下正（名古屋大学輸血部教授）

川口裕之（防衛医科大学小児科 准教授）

三浦健一郎（東京大学医学部小児科 助教）

研究協力者

百名 伸之（琉球大学骨髄移植センター小児科
血液内科部門 診療教授）

酒井 道生（産業医科大学小児科 助教）

高橋 義行（名古屋大学小児科 准教授）

松原 康策（西神戸医療センター小児科
医長）

金兼 弘和（富山大学付属病院小児科 講師）

小林 良二（札幌北楡病院小児科小児科
部長）

佐々木 聡（北海道大学小児科 講師）

笹原 洋二（東北大学小児科 講師）

A. 研究目的

Epstein症候群は以下の3兆候を呈する遺伝性難治性疾患である。

- 1) 先天性巨大血小板性血小板減少症
- 2) 進行性腎機能障害（末期腎不全に至る）
- 3) 感音性難聴

従来、巨大血小板性血小板減少症を呈する疾患としてMay-Hegglin異常、Sebastian症候群、Fechtner症候群、および本疾患（**Epstein症候群**）が知られてきた。2000年に分担研究者である國島らにより、4つの疾患が単一遺伝子（ミオシン重鎖IIA遺伝子：以下MYH9）異常により発症することが判明し、「MYH9異常症」という新規疾患概念が提唱されるに至った。MYH9異常症の最大の予後決定因子は「進行性腎障害・難聴」であり、Epstein症およびFechtner症がこれに相当し、思春期前～中年期に末期腎不全に至る。またこれら2疾患を明確に区別することは難しく、以下これら2疾患をまとめてEpstein症候群と呼ぶ。

MYH9異常症（さらにその中に含まれるEpstein症

候群)は希少疾患であり、さらに医師の疾患認知度が低く、正確に診断を受けていない症例が多数存在すると考えられる。このような背景のもと、本研究は、以下の2つの課題を研究目的に設定した。

1. Epstein症候群 (MYH9異常症)の本邦における初めての疫学調査(担当:関根)

本症候群に関しては、本邦はもとより世界的にもその疫学調査はされておらず、その頻度などは全く不明である。思春期前に末期腎不全を発症する可能性のある本症について、正確な疫学的情報を得る事は本疾患の診療にあたり極めて重要である。

2. 先天性巨大血小板減少症における診断法の確立と新規MYH9遺伝子解析(担当:國島)

本疾患は小児期に出血傾向により偶然発見されることが多いが、大半の症例は特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura) と誤診され、本疾患に対しては全く無効でありかつ有害事象の多い治療 (例: γ グロブリン大量投与、ステロイド薬大量投与) などを受けている。こうした事例を回避し適切な診療がなされるためには、

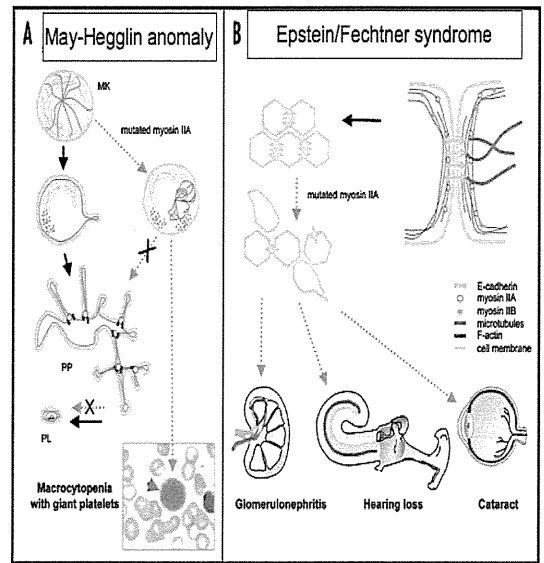
- 1) 本疾患の正確な診断法の確立 (血液塗抹標本の免疫染色、遺伝子解析)
- 2) これまで治療法のないとされてきたEpstein症候群の治療法の開発が必要である。

3. Epstein症候群の腎症発症の分子病態の研究(担当:松下、三浦、川口)

本症候群病態が巣状糸球体硬化症 (FSGS) であることは、研究代表者らが國島との共同研究によりすでに明らかにしてあるが (Sekine T. et al, *K*

idney Inter 2010)、その分子病態については未解明のままである。本症候群の分子病態について、myosinIIAの変異動物モデル、*in vitro*で分子生物学的解析、免疫染色などを用いて病態メカニズムの解明を試みた。

【MYH9異常症の臨床分類の概念図】



Cell Adhesion & Migration 1:3, 152-155; 2007 with modification

B. 研究方法

2. Epstein症候群 (MYH9異常症)の本邦における初めての疫学調査

Epstein 症候群患者に遭遇し、診断する可能性の高い医師は、1) 血液専門医 (小児、成人)、2) 腎臓専門医 (小児、成人)、3) 透析専門医である。これらの関連学会会員、医師、関係者に1次調査、2次調査をおこなった。方法は以下のようなものである。

1. 5つの関連学会に「Epstein症候群の患者の疫学調査」の送付の許諾を得たのち、「本目的のためだけに使用する」ことを明確な条件とし、各学会の会員、評議員の連絡先を学会から教示いただいた。

2. その情報をもとに、以下の内容の一時調査用紙を約7,000の医療機関、医師に送付した。

- A. 本研究の趣旨(厚生労働省難知性希少疾患事業であることの説明含む)
- B. Epstein症候群の病態の説明
- C. 患者の有無の返信依頼

3. 一次調査で「患者あり」の連絡をいただいた医療機関および医師に、

- A. 患者背景(年齢、性別、暫定的診断名、治療など)
- B. 腎機能(検尿異常、腎機能異常)に関する詳しい情報
- C. 難聴の進行度

などについての詳細な二次調査用紙を送付し回答を得た。

【一次調査：平成23年4月～11月】

1) 平成23年8月下旬～9月上旬に一斉送付(送付先一覧)

①小児腎臓学会	79通
②日本腎臓学会	592通
③日本血液学会	744通
④小児血液学会	1,364通
⑤日本透析学会	4,004通
⑥大学病院小児科	117通
⑦小児科病院	28通

2) 一次調査送付数合計と回収率

一次調査合計発送数	<u>6,928通</u>
一次調査回収率	<u>2,182通</u>

【二次調査】

1) 平成23年10月上旬送付に送付

2次調査の最終的な回答総数(重複症例を除く)

42通(症例)

2. 先天性巨大血小板減少症における診断法の確立と新規MYH9遺伝子解析

分担研究者の國島の報告参照。

3. Epstein症候群の腎症発症の分子病態の研究

分担研究者の松下、川口、三浦のそれぞれを参照。

<倫理面への配慮>

Epstein症候群を含むMYH9異常症が疑われる患者の遺伝子解析、末梢血解析などについては、すでに國島が名古屋医療センターにて倫理委員会の承認を受けており、遺伝子解析を開始している。特にEpstein症候群の発症が予測される遺伝子変異については、進行性腎機能障害、また、難聴の進行の可能性が強く、患者の心理的側面に配慮した診療をおこなっていただけるように主治医に連絡をとっている。過去2年は、希望する患者さんについては、研究代表者の関根が病態や治療の可能性について詳しく説明している。

動物を用いる研究に関しては、それぞれの施設の動物取り扱いに対する規約を遵守し、その扱いに関しても適切におこなわれるよう、十分に配慮した。

C. 研究結果

【二次調査の解析結果】

1) 最終診断名

42症例の2次調査回答のあった症例の臨床経過を精査し、以下の2項目を基準に最終診断を行った。

- A. 巨大血小板性血小板減少症に、腎炎あるいは難聴の明確な記載があるもの
- B. すでに遺伝子解析されているものでは腎炎、難聴の発症前でもR702変異、S96変異のあるもの

1. Epstein症候群	38例
2. May-Hegglin異常症	2例
3. その他	2例
合計	42例

2) 初診時診断名

1. Epstein症候群	6例
2. Alport症候群疑い・慢性ITP	1例
3. ITP（うち慢性ITPと診断）	19例(5例)
4. May-Hegglin異常症	5例
5. その他（原因不明の血小板減少）	11例
合計	42例

3) 腎症の発見時期

（初めて蛋白尿を指摘された時期）

最年年齢	2.6歳
最高年齢	41歳
平均年齢	16.1歳

4) 末期腎不全に至った年齢

最年年齢	15歳
最高年齢	56歳
平均年齢	25.3歳

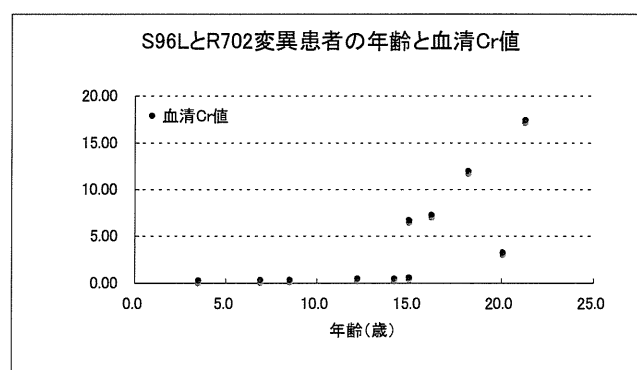
5) 病理診断(13例で施行)

今回の調査でEpstein症候群と確定診断されているもので腎生検を受けているものの病理診断名

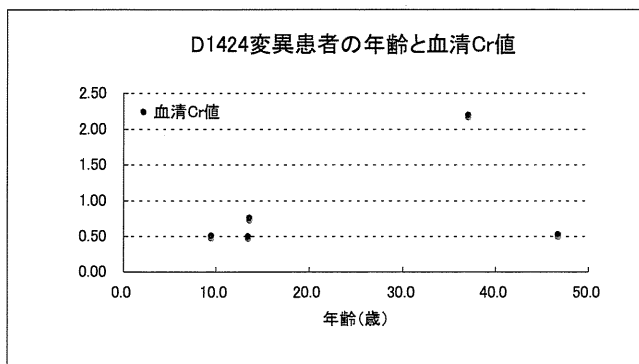
1. FSGS	3例
2. 先天性腎硬化症	1例
3. 増殖性腎炎	3例
4. Alport症候群疑い	1例
5. 膜性増殖性腎炎	1例
6. 非ループス腎炎	2例
7. 微小変化型	1例
8. 病理所見不明	1例
合計	13例

6) 遺伝子型毎の重症度分類

6-(1) S96およびR702変異患者の年齢と血清Cr値



6-(2) D1424変異患者の年齢と血清Cr値

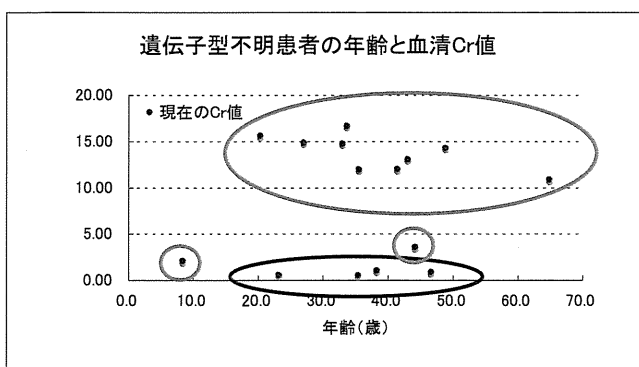


る症例は5例のみであった。すなわち、MYH9異常症の大半はITPと誤診され、不要な検査や治療がなされている。

一方で、MYH9異常症の予後を決定する腎症発症には、かなり進行してから気づく例もすくなくない。

このようにEpstein症候群については、まず、正しい診断をし、かつ、腎症の発症に注意することが最も重要であることが今回の疫学調査からも明らかとなった。

6-(3) 遺伝子型不明患者の年齢と血清Cr値



すでにMYH9異常症において、遺伝型と臨床症状が良く相関することが報告されているが、今回の疫学調査はその予測を裏付けられた。従来から予後不良とされてきたR702、S96のアミノ酸残基の変異は思春期以後に急速な進展をとることが図6-(1)から明らかである。一方、図6-(2)のようにD1424変異は、中年期以降に腎不全がゆっくりと進展する可能性がある。さらに遺伝子型が不明の例では{6-(3)}、赤線で囲まれたように思春期以降に腎不全にいたるものと、中年期以降も腎機能を保もたれるもの(青線で囲まれる)に分類される。8歳と44歳の患者(赤線で囲まれている)の2人は明らかな保存期腎不全である。このように遺伝子型と腎機能は厳密な相関があり、先天性巨大血小板減少性血小板減少々の患者の腎予後を遺伝子解析および末梢血液標本のmyoIIA分子の染色パターンにより、厳密の予測することが可能であることがわかる。

D. 考察

大規模(約7,000人、施設)に対してのEpstein症候群の調査研究を行った結果、本邦のEpstein症候群患者の概数、臨床症状、治療などが把握できた。今回得られたEpstein症候群患者について、遺伝子解析を進め、さらに、國島らがすでに得ている国内の患者情報と合致させることにより、本邦のEpstein症候群の実態を全容を明らかにすることができると考えている。

今回の2次調査症例の中で、最終的に38症例をEpstein症候群と確定診断した。一方で、初診時の診断名でEpstein症候群と正しく診断されているのは6症例にすぎず、これらも事前に國島らの遺伝子解析により予測されたものも含まれている。大半の症例は特発性血小板減少性紫斑病(ITP)と診断されており、巨大血小板性血小板減少症(May-Hegglin異常症)と正しく診断されてい

今後、責任分子(myosin IIA)の病態発症(FSGS)との関連を明らかにし、その治療法を確立するとともに、国内のEpstein症候群の治療拠点となるよう、ホームページなどを通じて、啓発をおこなっていく。

E. 結論

平成23年度の1年間に大規模な疫学調査研究をお

こなうことにより、Epsiten症候群の1次調査、	なし
2次調査を完了し、本邦でのEpstein症候群の実	
態について詳しい情報を得ることができた。今後、	2. 実用新案登録
患者の遺伝子解析、病態解明、治療法研究をおこ	なし
ない、Epstein症候群の「標準的診断・治療法」	
の確立をおこなう。さらに「特発性FSGS」病態解	4. その他
明に向けての研究を継続す。	なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. ○Sekine T : MYH9, the gene responsible for hereditary progressing nephritis, also cause idiopathic FSGS ? The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, Fukuoka, Japan, June, 2, 2011

2. ○関根孝司 : ゲノムワイド連鎖解析・単一遺伝子異常症・古典的生理学の統合による腎臓病の病態理解 : MYH9(非筋性ミオシン重鎖ⅡA)と巣状糸球体硬化症九州
ネフロロジー研究会(特別講演)、2010年7月2日、福岡

3. ○関根孝司 : MYH9(非筋性ミオシン重鎖ⅡA)と巣状糸球体硬化症 近畿小児腎臓研究会(特別講演)、2011年11月09日

4. ○関根孝司 : MYH9(非筋性ミオシン重鎖ⅡA)と巣状糸球体硬化症、秋田腎疾患研究会、2011年11月09日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（分担） 研究報告書

免疫蛍光染色による顆粒球の非筋ミオシン重鎖IIA局在解析、MYH9遺伝子配列解析

研究分担者：國島伸治（国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター・室長）

研究要旨

先天性血小板減少症を疑う症例において、免疫蛍光染色による顆粒球の非筋ミオシン重鎖IIA局在解析、MYH9遺伝子配列解析を行なった。11症例のMYH9異常症を確定診断した。腎炎未発症のEpstein症候群1症例は長期的経過観察が必要であり、アンギオテンシン受容体阻害薬投与が考慮されている。

A. 研究の目的

Epstein症候群は、進行性腎炎・感音性難聴・巨大血小板性血小板減少症を呈する常染色体優性遺伝性疾患である。本疾患はAlport症候群の類縁疾患と考えられていたが、非筋ミオシン重鎖IIAをコードするMYH9遺伝子異常が原因であり、MYH9異常症の一病型であることが判明している。本研究の目的は、1) 腎炎および難聴を発症する前の確定診断と腎炎および難聴発症の予防、2) 腎炎および難聴を呈する症例に対しての適切な治療法の確立、である。

B. 研究方法

主任研究者、研究分担者および研究協力者の施設を中心として、先天性血小板減少症を疑う症例について末梢血を採取し塗抹標本を作成した。我々の開発した免疫蛍光染色による顆粒球の非筋ミオシン重鎖IIA局在解析を施行し、異常局在を認めた場合は局在様式に対応するMYH9遺伝子領域の配列解析を行なった。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析に関わる本研究を行うに当たっては、文部科学省、厚生労働省及び経済

産業省により告示された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の定めるところに従い、当院ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会にて審議、承認されている。

C. 研究結果

平成23年度には、11症例のMYH9異常症を同定した。9症例ではMYH9異常症に特徴的な顆粒球細胞質封入体を認めため、診断は容易であった。2症例では封入体を認めなかったが、非筋ミオシン重鎖IIA局在解析によって局在異常が明らかとなり、その後の遺伝子解析によってMYH9 R702C変異を同定した。

D. 考察

MYH9異常症の顆粒球細胞質には非筋ミオシン重鎖IIAの異常凝集／集積があり、メイギムザ染色などにより青色の封入体として染色される。Epstein症候群ではミオシン凝集は微小であり、光顕的封入体は観察されないことが多い。Epstein症候群は、進行性腎炎・感音性難聴・巨大血小板性血小板減少症の三徴により診断されるため、従来では腎炎と難聴を発症してはじめて確定診断さ

れた。巨大血小板性血小板減少症において非筋ミオシン重鎖IIAの局在異常を同定することにより、腎炎および難聴発症前の確定診断が可能になり、腎炎および難聴予防と、腎炎発症例では腎不全に至る時期を遅らせることが可能になってきた。

R702C変異を有する2症例の内、1症例は慢性腎不全に進行していたが、他の1症例は小児で腎機能は正常であった。本症例については長期的経過観察が必要であり、腎炎発症予防と進展阻止のためにアンギオテンシン受容体阻害薬投与が考慮されている。

E. 結論

腎炎未発症のEpstein症候群1症例を含め、11症例のMYH9異常症を確定診断した。

F. 健康危険情報 総括報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Hao J, Kunishima S, Guo X, Hu R, Gao W: A large family with *MYH9* disorder caused by E1841K mutation, suffering from serious kidney and hearing impairment and cataracts. *Ann Hematol* in press
- 2 Uyeda T, Echizenya T, Eto S, Otani K, Sato T, Takahashi T, Ito E, Yonesaka S, Kunishima S: A patient with Adams-Oliver Syndrome and familial *MYH9* mutation *Pediatr Int* in press
- 3 Takeyama M, Uchida Y, Arai I, Kamamoto T, Nishikubo T, Kanehiro H, Sado T, Kunishima S, Takahashi Y: Neonatal case of transient abnormal myelopoiesis in Down's syndrome treated by Inchinkoto. *Pediatr Int* 53: 1093-6, 2011.
- 4 Tsuburaya R, Uematsu M, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Kunishima S, Kato M, Haginoya K,

Tschiya S: Unusual ribbon-like periventricular heterotopia with congenital cataracts in a Japanese girl. *Am J Med Genet* 158A: 674-7, 2012.

5 Shiota M, Kunishima S, Hamabata T, Nakata M, Hata D: Early diagnosis improves the quality of life in *MYH9* disorder. *Pediatr Blood Cancer* 58: 314-5, 2012.

6 Flatland B, Kunishima S: Successful immunostaining demonstrates abnormal intracytoplasmic *MYH9* protein (NMMHC-IIA) in neutrophils of a dog with May-Hegglin Anomaly. *Vet Clin Pathol* 40:409-10, 2011.

7 Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H: Heterozygous *ITGA2B* R995W mutation inducing constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 117:5479-84, 2011.

2. 学会発表

- 1 中国人MYH9異常症の2家系
Hao Jihong(郝冀洪) 山村喜美 國島伸治
第12回日本検査血液学会学術集会 平成
23年7月17-18日 倉敷
- 2 May-Hegglin異常単球における封入体
國島伸治 Hao Jihong(郝冀洪) 山村喜美
第12回日本検査血液学会学術集会 平成
23年7月17-18日 倉敷
- 3 Fechtner症候群が疑われる兄弟例の報告
笠原秀範 荃田昌敬 田中 杏 柿田直人
迫田寛人 國島伸治 森島淳之 阪口勝彦
第41回日本腎臓学会西部学術大会 平成23年
9月30日-10月1日 徳島
- 4 Nobuaki Suzuki I, Shinji Kunishima, Kyosuke
Takeshita, Makoto Ikejiri, Shoichi Maruyama,

Michihiko Sone, Akira Takagi, Masahito Ikawa,
Masaru Okabe, Tetsuhito Kojima, Hidehiko Saito,
Tomoki Naoe, Tadashi Matsushita. R702C

mutation of the *MYH9* gene causes great changes
in blood cell and other organs in mice model

第73回日本血液学会総会 平成23年10月
14-16日 名古屋

5 長期フォローしているMYH9異常症の1例

吉田 晃 高藤 哲 明石良子 額田貴之 井庭憲
人 深尾大輔 井上美保子 濱畑敬悟 百井 亨 山
地秀平 國島伸治

第161回日本小児科学会和歌山地方会 平成23年
10月22日 和歌山

6 当科で経験したMYH9異常症の2例

星野顕宏 大坪慶輔 野村恵子 金兼弘和 宮
脇利男 國島伸治 第303回日本小児科学会北陸
地方会 平成23年12月11日 富山

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨

MYH9異常症のうちAlport症状を合併する頻度の高い変異（R702C）を導入したノックインマウスを作製した。R702C+/-マウスは巨大血小板性血小板減少症、進行性の腎障害、感音性難聴など、多くの症状をヒト疾患と共有しており、このモデルマウスは重篤な腎炎を有するEpstein症候群の診断・治療につながると考えられた。

A. 研究の目的

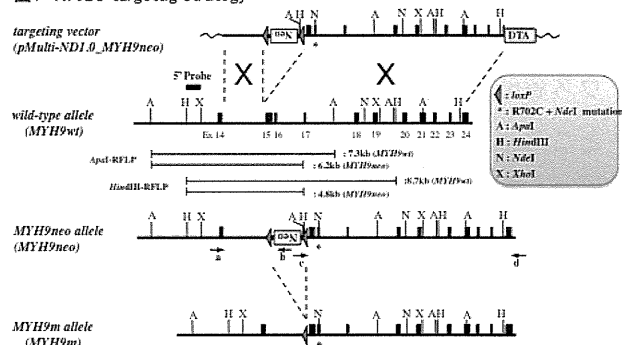
稀な遺伝性巨大血小板性血小板減少症にMay-Hegglin異常症(MHA)がある。MHAは巨大血小板、血小板減少、顆粒球封入体の三主徴を特徴とする常染色体優性遺伝疾患で、ときに軽度な出血傾向を示すことがある。近年、顆粒球封入体の電顕所見の異なるSebastian症候群、血液学的三主徴と感音難聴、糸球体腎炎、白内障のいわゆるAlport症状を伴うFechtnerh症候群に加えて、Alport症候群の亜種として巨大血小板性血小板減少を示すが顆粒球封入体を伴わないEpstein症候群(1)がある。この疾患グループの原因遺伝子はMYH9 (myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle) であり、この遺伝子産物であるIIA型非骨格筋型ミオシン重鎖(NMMHC-IIA)の異常によって引き起こされることから、MYH9異常症と呼ぶことが提唱されている(2)。本研究ではMYH9異常症のうちAlport症状を合併する頻度の高い702番目のアミノ酸ArgがCysに変わる変異(R702C)を導入したノックインマウスを作製し、分子モーターであるミオシンの異常が、なぜ巨大血小板減少症以外に、腎、内耳など限定された器官の異常となって病態発現するのか、解明する。

B. 研究方法

1 マウスMYH9遺伝子クローニング

ノックイン・ターゲティングベクターの構築は、loxP配列に挟まれたネオマイシン (Neo) 耐性遺伝子 (ポジティブ選択用) とジフテリア毒素A (DTA) 遺伝子 (ネガティブ選択用) 領域をもつpMulti ND-1.0を基盤とし、Neo耐性遺伝子の両側に必要なMYH9遺伝子領域をpMulti ND-1.0に組み込んだ。

図1 R702C targetting strategy



2 ノックインマウスの作成

常法に従ってC57BL/6J胚盤胞にベクターを注入し、仮親から生まれたキメラマウスをC57/BL6マウスと交配することによって得られたヘテロマウスとCAG-Creマウス (Cre-recombinaseを発現するトランスジェニックマウス) とさらに交配させて、loxP配列で挟まれたNeoR遺伝子を除去した。ヘテロ接合体マウスはC57BL/6系統マウスと最低5世代交配させ均質化したものを解析に用いた

C. 研究結果

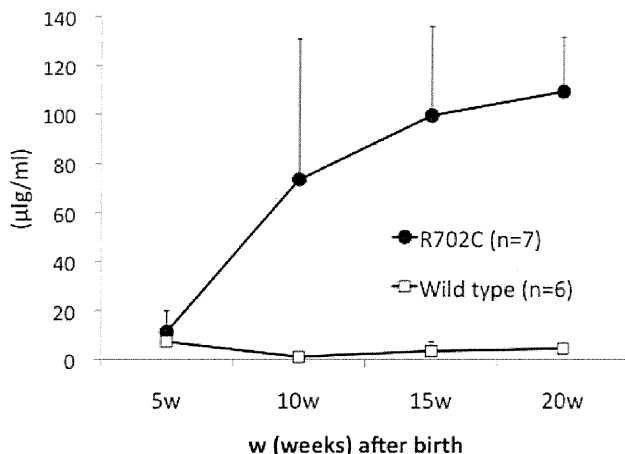
1 血液学的所見

我々がこれまで作成したMYH9 +/-マウスにおいては、ヒトMYH9Dに見られるような血小板、好中球異常は全く観察されず、大腿骨骨髓塗抹標本における骨髓巨核球の形態も正常であった。R702C +/-マウスでは $53 \times 10^9/L$ (正常C57/BLマウス: $1071. \pm 321.7 \times 10^9/L$) と著明な血小板減少を示し、May-Giemsa染色にて検討したところはっきりした巨大血小板症が見られた。一方顆粒球内封入体についてはMay-Giemsa染色ではまったく見られなかったが、抗NMMHC-1A抗体による免疫染色を行ったところ、NMMHC-1Aの異常分布(3)が見られ、この所見はR702C異常をもつMYH9異常症患者における所見(4)と一致した。骨髓巨核球数は軽度増加していたが、May-Giemsa染色による骨髓巨核球の形態は正常であった。さらに我々はR702C +/-マウス胎仔肝臓細胞より初期培養を行い、thrombopoietin存在下で巨核球培養を行ったところ、明らかにproplatelet-formationが低下していた。

2 腎機能

マウスの腎機能低下を推測するため、5-20週齢のマウス各6匹のspot尿サンプル中の蛋白量を測定したところ、マウスは明らかに週齢に応じたタンパク尿を呈した(図2)。さらに各月齢の成体マウスの腎組

図2 R702C +/-マウスにおける年齢依存性尿タンパク増加



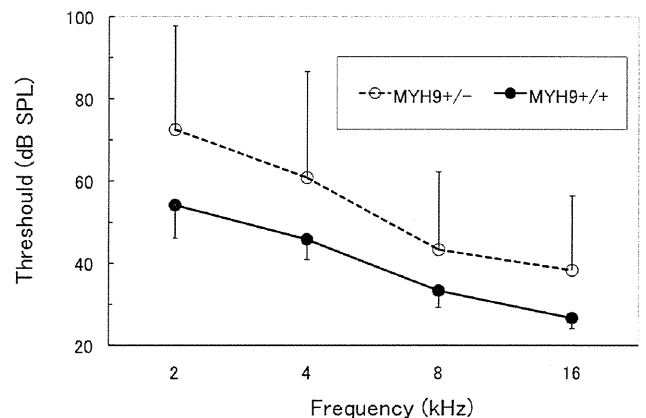
織を採取し、HE染色、PAS染色により糸球体病変を検討したところ、巣状糸球体硬化症 (Focal and se

gmental glomerular sclerosis, FSGS) 像を呈した。この所見は透過型電子顕微鏡により、特徴的なpodocyteの突起の消失像を得ることにより確認された。R702Cを有するヒト患者においてもFSGS像を呈することが研究代表者の関根らにより報告されており(5)、ヒト患者とよく一致した。

3 内耳機能

Epstein症候群では感音性難聴を合併する。これまで我々はMYH9 +/-マウスの聴力を検討したが、6固体中3個体に著しい聴力低下を認めている(図3)(6)。今回も同様の方法を用い、Auditory brain stem response (ABRs: 聴性脳幹反応)を測定した。90 mg/kgのケ

図3 MYH9 +/-マウスの調整脳幹反応 (ABR) 所見



無響室において、2, 4, 8, and 16 kHz各周波の低音を10 Hzの頻度で左耳から10 cmの距離から聞かせた。惹起された脳波計を記録、脳波が反応する音圧の閾値をSPL (sound pressure level)にて表し、マウスが105 dB SPL以上の音にも反応を示さなかった場合は105 dB SPLと定義した。MYH9 +/-、+/-マウス各6匹について検討し、得られたSPLの平均値と標準偏差をグラフに表した。

タミンを腹腔内投与にて麻酔後、頭部皮下3カ所に電極を挿入、無響室において、外部からの音を全く遮断した条件で、各周波の低音を10 Hzの頻度で聞かせ、惹起された脳波計を記録、脳波が反応する音圧の閾値を5dB刻みで音量を下げながら決定する。閾値はSPL (sound pressure level)にて表した。MYH9 +/-マウスと同様、R702C +/-マウスでは軽度の聴力異常を認めた。

D. 考察

MYH9 R702C変異を有する患者は他のMYH9異常症と比べて、もっとも低い血小板数を来することが知られている(3)。事実巨核球のproplatelet formationは低下しており、Pecciらのヒト症例での観察とも一致した(7)。血小板は巨核球から放出されるときには適

当な小ささで放出される必要があり、NMMHC-IIAの機能不全は未成熟な血小板放出につながるのかもしれない。

またR702C変異を有する患者では好中球封入体はMay-Giemsa染色では検出できないの、NMMHC-IIA免疫染色では特徴的な染色パターンが検出されるというこれまでの検討結果(3, 8)と一致している。

E. 結論

R702C+/-マウスは巨大血小板性血小板減少症、好中球封入体、そして何よりも進行性のFSGS、軽度ながら感音性難聴など、多くの症状をヒト疾患と共有しており(9-11)、これらの臓器はNMMHC-IIAが特異的に発現していることから、このマウスはMYH9異常症のP-henocopyともいえる。これらのことから、このモデルマウスは重篤な腎炎を有するEpstein症候群の診断・治療につながると考えられる。

F. 健康危険情報

総括報告書参照

G. 論文発表

Suzuki N, Kunishima S, Takeshita K, Ikejiri M, Maruyama S, Sone M, Takagi A, Hirashima K, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T and Matsushita T R702C mutation of the MYH9 gene provokes impaired platelet formation, renal focal segmental glomerulosclerosis, and hearing disability in mice model in submission.

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Suzuki N, Kunishima S, Takeshita K, Ikejiri M, Maruyama S, Sone M, Takagi A, Hirashima K, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T and Matsushita T R702C mutation of the MYH9 gene provokes impaired platelet formation, renal focal segmental glomerulosclerosis, and hearing disability in mice model in submission. Abstrac

t 482, oral presentation at the 2010 Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, Florida, December 6, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

4. その他

なし

文献

1. Epstein, C. J., Sahud, M. A., Piel, C. F., et al. (1972) *Am J Med* **52**, 299-310
2. Kunishima, S., Kojima, T., Matsushita, T., et al. (2001) *Blood* **97**, 1147-1149
3. Kunishima, S., Yoshinari, M., Nishio, H., et al. (2007) *Eur J Haematol* **78**, 220-226
4. Kunishima, S., Matsushita, T., Kojima, T., et al. (2003) *Lab Invest* **83**, 115-122
5. Sekine, T., Konno, M., Sasaki, S., et al. (2010) *Kidney Int* **78**, 207-214
6. Matsushita, T., Hayashi, H., Kunishima, S., et al. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 1163-1171
7. Pecci, A., Malara, A., Badalucco, S., et al. (2009) *Thromb Haemost* **102**, 90-96
8. Kunishima, S., Hamaguchi, M., and Saito, H. (2008) *Blood* **111**, 3015-3023
9. Seri, M., Pecci, A., Di Bari, F., et al. (2003) *Medicine (Baltimore)* **82**, 203-215
10. Heath, K. E., Campos-Barros, A., Toren, A., et al. (2001) *Am J Hum Genet* **69**, 1033-1045
11. Kunishima, S., Matsushita, T., Kojima, T., et al. (2001) *J Hum Genet* **46**, 722-729

HeLa細胞およびCOS-7細胞への変異NMMHC-IIA分子の導入とその解析

研究分担者：川口 裕之（防衛医科大学 小児科 准教授）

研究要旨

Epstein症候群で見られる腎炎の分子病態をあきらかにするため、MYH9遺伝子発現ベクターを構築し、導入線維芽細胞内での機能的NMMHC-IIA分子の発現を確認した。本実験系はEpstein症候群での腎機能障害発症メカニズムの解析に有用である。

A. 研究の目的

Epstein症候群は、進行性腎炎・感音性難聴・巨大血小板性血小板減少症を呈する。本疾患は非筋ミオシン重鎖IIA (NMMHC-IIA) をコードするMYH9遺伝子異常によるMYH9異常症の一病型である。血液異常の病因としてはNMMHC-IIA蛋白の異常凝集があきらかにされている。本研究の目的は、腎糸球体足細胞での異常NMMHC-IIAの挙動を解析し、腎炎の分子病態をあきらかにすることである。

B. 研究方法

MYH9遺伝子発現ベクターの構築

Epstein症候群の原因となる代表的MYH9遺伝子R702C変異を有する動物細胞発現ベクターを作製した。正常人白血球由来cDNAを用い、PCRにてMYH9遺伝子の構造領域を増幅した。サブクローニング後、塩基配列を確認し、動物細胞発現ベクターであるpcDNA3.1に組み入れた。野生型作製後に、部位特異的変異導入法によってR702C変異を有する発現ベクターを作製した。

遺伝子強制発現実験

COS-7細胞あるいはHeLa細胞に野生型およびR702C変異を有するMYH9ベクターを遺伝子導入し、

カバーガラス上に進展後、抗NMMHC-IIA抗体を用いた蛍光免疫染色を施行した。

（倫理面への配慮）

本研究は該当しない。

C. 研究結果

HeLa細胞ではNMMHC-IIAのみが発現し、COS-7細胞ではNMMHC-IIIBのみが発現する。COS-7細胞への遺伝子導入実験ではNMMHC-IIAは線維状構造として存在した。また、HeLa細胞においても同様な局在を呈したことより、導入されたNMMHC-IIAは内因性分子とミオシンフィラメントを形成しうることが示唆された。

D. 考察

本年度に作製したMYH9遺伝子発現ベクターは導入された線維芽細胞内においてNMMHC-IIAを産生し、オリゴマーを形成しミオシンフィラメントとなり、内因性NMMHC-IIAともヘテロマーを形成しミオシンフィラメントを形成することが判明した。内因性NMMHC-IIAを発現する細胞への導入実験ではヘテロ接合性変異で発症するヒトのMYH

9異常症に近い病態を解析しうると考えられる。

来年度以降には、本年度に作製した野生型およびR702C変異を有するMYH9ベクターをプライマリーあるいは細胞株の腎足細胞に遺伝子導入し、Epstein症候群で見られる腎炎の分子病態をあきらかにする予定である。

E. 結論

MYH9遺伝子発現ベクターは導入された線維芽細胞内においてNMMHC-IIAを産生し、ミオシンフィラメント形成した。

F. 健康危険情報

総括報告書参照

G. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

4. その他

なし

NMMHC-IIAの糸球体内局在の解析

研究分担者：三浦 健一郎（東京大学 小児科 助教）

研究要旨

MYH9のコードするNMMHC-IIA分子の変異により、糸球体障害が発生することがその詳細なメカニズムは不明なままである。本研究ではげっ歯類の腎臓標本を用いて、免疫蛍光染色および免疫電顕法を用いてNMMHC-IIA分子の糸球体内局在を詳細に解析した。NMMHC-IIAは糸球体上皮細胞に強く発現し、さらに上皮細胞内では足突起（foot process）ではなく、細胞体および一次突起に発現することが明らかになった、

A. 研究の目的

MYH9異常症Epstein症候群/Fechtner症候群の中でMay-Hegglin異常症およびSebastian症候群と決定的に異なるのは、進行性腎機能障害を呈する点にある。特定の変異（R702およびS96など）では思春期頃より急速に腎機能障害が進展し、20歳前後で末期腎不全に至る症例も存在する。

本疾患の病理組織像が巣状糸球体硬化症（FSGS）であることは、本研究代表者の関根および國島らがすでに明らかにしたが（Sekine T. et al. *Kidney Inter* 2010）、FSGS発症の詳細なメカニズムは全く不明である。本研究の目的は、NMMHC-IIAの糸球体内での発現を詳細に検討し、Epstein症候群によるFSGS発症メカニズムの解明に端緒をつけることにある。

B. 研究方法

1) 免疫抗体法による解析

6週齢のラットの腎切片を用いて、抗NMMHC-IIA抗体、nestin, synaptopodin, podocalyxin, zonula occludens (ZO-1)抗体とともに染色し、NMMHC-IIAの糸球体内発現部位を詳細に解析した。

2) 免疫電顕によるNMMHC-IIAの局在解析

ラット腎組織切片を免疫電顕法によりNMMHC-IIAの局在を同定した。

（倫理面への配慮）

動物を用いる研究に関しては、動物取り扱いに対する規約を遵守し、その扱いに関しても適切におこなわれるよう、十分に配慮した。

C. 研究結果

1) 免疫抗体法による解析結果

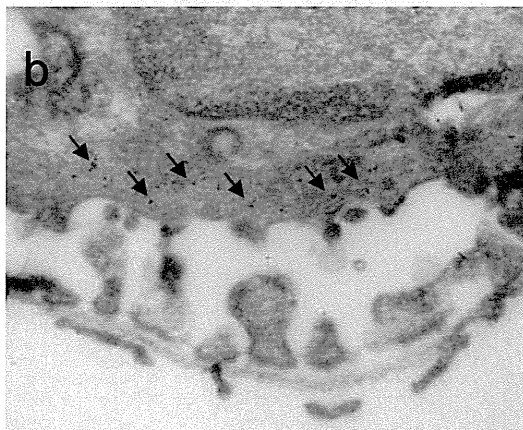
抗NMMHC-IIAによるラット腎組織切片の染色では、NMMHC-IIAは糸球体上皮細胞（podocyte）に強く発現することが明らかになった。糸球体以外では、糸球体外では、尿細管管腔側の一部、糸球体外血管内皮細胞に一部染色が認められた。

抗NMMHC-IIAと他のpodocyte発現蛋白（nestin, synaptopodin, podocalyxin, zonula occludens (ZO-1)）では、NMMHC-IIAはnestinとのみ一部の共発現が認められたが、synaptopodin, podocalyxin, zonula occludens (ZO-1)との共発現は認めなかった。これらの結果はNMMHC-IIAがpodocyteの二次突

起（足突起：foot process）ではなく、podocyteの細胞体および一次突起に発現することを示す。

2)免疫電顕によるNMMHC-IIAの発現の解析

抗NMMHC-IIAによるラット腎の免疫電顕の結果は、NMMHC-IIAがpodocyteの細胞体（下図a）および一次突起（とくに足突起の基部：下図b）に局在し、足突起に存在しないことが明らかになった。この結果は上記の蛍光抗体法による結果に合致する。



D. 考察

すでに述べたようにEpstein症候群の病理組織像はFSGSである。近年の分子生物学的な解析により、遺伝性のFSGSの責任遺伝子のほぼ総てがpodocyteの足突起に存在することが報告されてきた。

一方、Epstein症候群もその腎病理組織像の本体はFSGSである。NMMHC-IIAがpodocyteに存在することはFSGS発症に矛盾しない。一方、二次突起

および細胞体に主に存在するNMMHC-IIAの変異によりFSGSを発症し、その腎障害の程度がNMMHC-IIAの変異の種類により異なることは極めて重要である。恐らくNMMHC-IIAは足突起の基部に存在することで、足突起の構造の維持に関与していると予測される。

今後、本結果を元にさらにEpstein症候群における腎病態発症メカニズムの解析を進め、その本体を明らかにし、治療薬の選択、あるいは開発に結びつけたい。

E. 結論

今回の研究によりNMMHC-IIA分子がpodocyteの細胞体および一次突起に存在することが明らかになった。今後、この局在がEpstein症候群の腎病理発症にどのように寄与するのかをさらに解析する。

F.健康危険情報

総括報告書参照

G. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

4. その他