

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09245

研究課題名(和文) ヒトネフローゼ発症に関わるBMPファミリー下流経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of Downstream Pathway of BMP family affecting to Nephrotic Syndrome

研究代表者

野入 英世 (NOIRI, Eisei)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00301820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年rs16946160がネフローゼ重症化に関わることを報告した。これは糖尿病性腎症重症化にも関与していた。GPC5に加えてヘパラン硫酸(HS)制御酵素SULF2上流の標識SNPされ、ハプロタイプをSULF-PREX1間で同定した。BDF1によりSULF2欠損に伴うタンパク尿重症化のメカニズムを検討し、中でもWnt/catenin経路のBMP6を介して糸球体上皮細胞障害を増強する知見が得られつつある。また、LD構造の不十分なSULF/PREX1領域のtarget re-sequencingをIon Protonで実施し、common variantを見いだしてLD構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：We have recently reported causative nephrotic proteinuric association of rs16946160 in severe phenotype. It was further proven in diabetic kidney disease in massive proteinuric phenotype. Likewise, the SULF2 was further suggested as the haplotype between SULF-PREX1 as susceptible to nephrotic proteinuria. But this region was defective to tag SNP information and LD structure for fine analysis. The current study conducted re-sequencing of this region using Ion Proton and determined LD structure. Then we concluded that there is no higher disease susceptible variant superior to this haplotype. We used mice nephrotic model previously established in BDF1 strain and found that deletion of SULF2 could induce glomerular epithelial injury to nephrotic proteinuria of which downstream was involved in BMP6 through Wnt/beta catenin pathway. This study also meticulously investigated PLA2R1 and HLA in membranous nephropathy, a representative phenotype of adult nephrotic syndrome.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：ヘパラン硫酸プロテオグリカン スルファターゼ ネフローゼ症候群 グリピカン Wnt

1. 研究開始当初の背景

研究チームでは、近年全ゲノム解析により rs16946160 の一塩基多型 (SNP) が成人ネフローゼ症候群発症に関わることを報告した (Nat Genet 2011, doi:10.1038/ng.792). 即ち、糸球体上皮細胞の GPC5 の発現レベルに関与し、蛋白尿発症強度を制御していることを世界で初めて示した。このことにより、これまで腎臓病領域では研究対象は構造的なヘパラン硫酸が主体であったが、この発見により全く関心の向いてなかった機能的なヘパラン硫酸制御への国内外の専門家の関心が一機に膨らんでいる。

2. 研究の目的

本研究成果の中で、ヘパラン硫酸のグリコサミノグリカンを制御する酵素として知られているサルファターゼ (SULF) の機能不全が、蛋白尿発症強度を変える可能性が標識 SNP の rs11086243 により示唆された。そこで、本研究提案に先立つ科研費基盤研究 (B)において、この領域に関わる詳細な解析を行い、発症に関わるハプロタイプを同定した。それに引き続く機能解析を行い、SULF 低発現が蛋白尿増強のリスクであることを遺伝子欠損マウスを交えた検討を行い、現在論文投稿中である。この研究過程で、SULF 低発現による蛋白尿誘導過程では、BMP ファミリーが関与することが見いだされた。中でも、これまでの国内外の研究では注目を集めてこなかった Wnt/catenin 経路の中心的な役割を果たしている BMP6 を介して糸球体上皮細胞障害を増強する知見が得られつつある。本経路は、ヒトのネフローゼ増悪の機序を読み解く上で鍵となる経路である可能性が高い。また本研究では *SULF* のネフローゼ発症に関わる遺伝子領域にハプロタイプより強い疾患感受性遺伝子が存在する可能性については調べられておらず詳細に調べる必要がある。

3. 研究の方法

i) マウスネフローゼモデル
Puromycin-FGF2 nephropathy モデルには 8-12 週齢の BDF1 マウス (Japan SLC) を用い、day 0 に puromycin aminonucleoside (PAN; Sigma-Aldrich) を皮下注 (300 mg/kg BW) し、FGF2 を day0, 1 または day0, 1, 2, 3 に静注 (5 µg per animal) した。

ii) *SULF2*^{-/-}マウス (BDF1)
SULF2 遺伝子の exon 3 の 3' 末に galactosidase を含めた配列を in-frame insertion したものを ES 細胞に導入し DBA 系統の *SULF2* knock down マウスを作製した。既に作出済みの C57/B6 系統の *SULF*^{-/-}との交配で F1 世代を得て BDF1 *SULF2*^{-/-}を取得した。これは上記のマウスネフローゼモデルは BDF1 により確立され、C57/B6 では頑強性が高かったため、再現性の高い検討

を行うために非常に手の込んだアプローチをとっている。

iii) Western 解析
凍結したマウス腎臓のブロックおよび培養細胞を 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, and 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin を含む RIPA buffer により氷上で溶解した。MicroSmash でホモジナイズし、細胞溶解液を SDS page へとすすめ、PVDF 膜へ転写後 Can Get Signal (Toyobo) を用いるプロトコルから ECL Plus による化学発光を LAS-4000 で検出し定量評価した。

iv) 組織免疫学的検討及び Western 解析に用いた一次抗体
SulfFP2/sulf-2 (KM109, TransGenic Inc), Nephrin (Acris Antibodies GmbH), CD31 (BD Pharmingen), Active catenin (Millipore), catenin (Santa Cruz Biotechnology), TO-PRO-3 iodide (Invitrogen), BMP6 (Abcam), phospho-Smad1/5 (Cell Signaling), tubulin (Santa Cruz Biotechnology)

v) Region Wide Genome Sequencing
SULF2 上流は LD 構造が不十分で、疾患感受性遺伝子が Top SNP かどうかを見極めるには Region wide に小型の全ゲノム sequencing を行う必要があった。Custom DNA パネルである AmpliSeq Custom Panel を作製し、Case-control それぞれ 14 症例ずつで *SULF2*/*PREX1* 領域を target resequencing を行った。

4. 研究成果

i) Wnt / catenin pathway 解析
機能性 HS の GPC5 がタンパク尿増悪 (ネフローゼ) に関わる病態として糖尿病性腎症の増悪時にも関与することが分かった (Am J Pathol 2015)。機能性 HS の調節タンパクである *SULF2* 下流には、Wnt / catenin pathway が知られている。ラット糸球体上皮細胞を用いて Wnt / catenin pathway を評価したところ、*SULF2* を siRNA により knock down させると、protein level で約 40% の発現低下が見られた。active catenin の上昇を伴い PAN により増強した。アドリアマイシンによるモデルでもほぼ同様な傾向を確認している。

ii) BMP の関与
SULF2 による HSPG の硫酸化パターンの調節は特に BMP signal を制御することが知られている。そこで我々が既に作出済みの *SULF2*^{-/-} で調査したところ、BMP ファミリーの中で BMP6 の発現がこの遺伝子変異動

物で増加していることがわかり、局在としては nephrin と一致していた。我々がプロトコル化したマウスネフローゼモデルでは BMP6 の発現が増加していた。糸球体上皮細胞とメサンギウム細胞において SULF2 をノックダウンしたときの BMP6 を評価したところ、ノックダウンした場合と Mock 群では、糸球体上皮細胞とメサンギウム細胞での発現が逆転現象が生じる可能性があることが分かった。即ちノックダウンにより BMP6 の発現は増加する傾向が認められる。一方、Smad pathway に対する影響は、糸球体上皮細胞細胞では強くないようであった。

iii) Region Wide Genome Sequencing
SULF2/PREX1 領域を target resequencing し、一検体あたり 1,000 以上を症例毎にファイルする作業を経て common variant より LD 構造を決定した。機能的な rare variant の絞り込みも行った。結論としては、1000 genome を reference として、研究チームがこれまでに実施済みの Fine mapping data を利用した imputation を実施した。しかし、発見した p 値を上回る Haplotype を上回る疾患感受性遺伝子は、この領域には存在しない可能性が極めて高いことが分かった。またこの検討に際して、膜性腎症の PLA2R1 と HLA に関しての解析を実施する機会を得た。膜性腎症 183 人、健常成人 811 人での日本人での解析で、PLA2R1 では 5 つの SNP が有意に関連しそのうち 2 つは欧米等の既報告と同じで、intron の 2 SNP (rs2715928, rs16844715) は新たな発見であった (OR = 2.30, 2.51; P = 3.15E-10, 5.66E-13)。HLA 解析では、*DRB1*15:01* と *DQB1*06:02* の膜性腎症への関与が強く (P = 1.14E-11, 1.25E-11) 交互作用は *HLA-DRB1*15:01 - HLA-DQB1*06:02* と intronic SNP の rs2715928 の間で最強であった (OR = 17.53, P = 4.26E-26)。更に *HLA-DRB1*15:01 - HLA-DQB1*06:02* と missense SNP rs35771982 でも強い交互作用 (OR = 15.91, P = 2.76E-29) を認めた。これは 5' UTR の SNP である rs3749119 や intron SNP の rs16844715 と膜性腎症で強い Linkage disequilibrium を示すことが分かった (OR = 15.91, P = 2.30E-26)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Okamoto K, Honda K, Doi K, Ishizu T, Katagiri D, Wada T, Tomita K, Ohtake T, Kaneko T, Kobayashi S, Nangaku M, Tokunaga K, Noiri E. Glypican-5 increases susceptibility to nephrotic damage in Diabetic Kidney. *Am J Pathol* 185: 1889, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.025>
2. Thiri M, Honda K, Kashiwase K, Mabuchi A, Suzuki H, Watanabe K, Nakayama M,

- Watanabe T, Doi K, Tokunaga K, Noiri E. High-density association mapping and interaction analysis of PLA2R1 and HLA regions with idiopathic membranous nephropathy in Japanese. *Sci Rep* 6:38189, 2017, DOI: 10.1038/srep38189
3. 平石敦子: 野入英世 ゲノムワイド解析と腎臓疾患。腎と透析 82:334, 2017, ISSN: 00385-2156

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Thiri M, Honda K, Kashiwase K, Mabuchi A, Suzuki H, Watanabe K, Nakayama M, Watanabe T, Doi K, Tokunaga K, Noiri E. Genomic Analysis of Japanese People. 膜性腎症シンポジウム 第 47 回日本腎臓学会, 2017 [横浜]
2. Goldstein SL, Murray PT, Noiri E. Using Kidney Biomarkers for AKI: Differential Diagnosis, Interventions, and Prognosis. Workshop and CME for US eligible, AKI & CRRT 2017 [San Diego]
3. Noiri E, McCullough P. Heart Failure and Kidney Diseases: The KDIGO Controversies Conference. Panel Discussion, CME for US eligible, AKI & CRRT 2018 [San Diego]

〔図書〕(計 1 件)

- Noiri E & Jha TK eds *Kala-Azar in South Asia* 2nd. Edition. Springer Verlag 2017

〔産業財産権〕

出願状況及び取得状況 (各 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (各 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

〔その他〕 特記なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野入 英世 (NOIRI, Eisei)
東京大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号: 00301820

(2) 研究分担者: 該当なし

(3)連携研究者：該当なし

(4)研究協力者

徳永 勝士 (TOKUNAGA, Katsushi)