

令和元年6月11日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16262

研究課題名(和文) TRPC6遺伝子異常によるネフローゼ症候群の発症機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of nephrotic syndrome caused by TRPC6 gene mutation and new drug development

研究代表者

中西 啓太(Nakanishi, Keita)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：00793712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群に対して、次世代シーケンサーによる解析を行い、日本における遺伝性ネフローゼ症候群の割合や、原因遺伝子の内訳を明らかにすることができた。

TRPC6変異に対する解析については、ヒト由来細胞に作成したcTRPC6配列を遺伝子導入し、Ca influxを行った。Larixyl Acetateを用いた、細胞内のCa濃度上昇が抑制されることを確認した。今後変異を含んだcTRPC6をヒト由来細胞に遺伝子導入し、変異導入によりCa濃度の変動に変化が見られるかどうか確認していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群に対する次世代シーケンサーを用いた解析結果から、日本における遺伝性ネフローゼ症候群の割合を明らかにすることができた。遺伝性ネフローゼ症候群の中には特別な治療によって腎予後を改善できる遺伝子も含まれており、診断する意義が高いと考えられた。

TRPC6に対する機能解析については、正常のTRPC6遺伝子導入を行ったヒト由来細胞でCa influxを行った結果、Larixyl Acetateによって細胞内Ca濃度上昇が抑制された。Larixyl AcetateがTRPC6遺伝子異常例に対する新薬となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed Japanese patients diagnosed with steroid resistant nephrotic syndrome by next generation sequencer and detected some kinds of gene defects which were reported as the causative genes of nephrotic syndrome.

For analysis of TRPC6 mutations, Ca influx was performed by transfected the cTRPC6 into human-derived cells. It was confirmed that the increase of intracellular Ca concentration was suppressed with Larixyl Acetate. In the future, we plan to transfect cTRPC6 containing mutations into human-derived cells, and to confirm whether changes in Ca concentration are observed by the introduction of mutations.

研究分野：小児科

キーワード：遺伝性ネフローゼ症候群 TRPC6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児特発性ネフローゼ症候群 (INS) は、高度蛋白尿、低アルブミン血症、全身性浮腫を呈する腎疾患で、我が国において小児 10 万人に対して毎年 5 人が発症する最も頻度の高い小児腎疾患である。INS の約 10% がステロイド抵抗性 (SRNS) を呈し、その場合、ステロイドパルス療法や各種免疫抑制薬の併用を行うが、それでも寛解導入に至らない場合は、10 年間で約 40% が末期腎不全へと進行する予後不良の病態を呈する (Cattran et al, 1988)。末期腎不全となった場合は透析療法 (血液透析、腹膜透析) や腎移植 (生体腎移植、献腎移植) などの腎代替療法が必要となる。小児末期腎不全患者における SRNS 患者の比率は約 15% を占めることが知られており、発症機序の解明および治療法の開発が急務である。

近年、分子生物学的研究の進歩に伴い SRNS におけるその原因遺伝子が次々と同定されている。SRNS に対して次世代シーケンサー (NGS) 等による遺伝子解析が行われ、約 30% で原因遺伝子が同定されたと海外からの報告がある (Sadowski et al. J Am Soc Nephrol, 2015)。遺伝性 SRNS は、各種治療抵抗性で高率に腎不全へと進行する一方で、腎移植後にネフローゼ症候群の再発率が低く、移植後の腎予後は比較的良好であることが知られている。そのため、海外では既に SRNS に対する NGS 解析と結果に基づく治療への反映の体制が確立してきている。一方本邦における小児 SRNS は、腎生検組織像に基づいて治療方針が決定されることが多く、遺伝子診断体制が未整備のままである。そのため、病初期における NGS による診断後早期の検査体制の整備が望まれている。

私たちのこれまでの研究で、日本人 SRNS 患者における NGS を用いた網羅的遺伝子解析を行った結果、遺伝性 SRNS の 20% の患者に TRPC6 遺伝子の変異を同定した。このように日本人 SRNS 患者の多数が TRPC6 遺伝子異常で発症する可能性を明らかにしているが、そのほとんどが日本人固有の新規変異であった。従って検出した変異の病原性は不明である。NGS 解析により同定した遺伝子異常に伴うネフローゼ症候群の発症機序を解明することは、SRNS に対する新たな治療戦略が開発されるきっかけとなると考えられる。以上より、今回、日本人 SRNS の患者において同定された TRPC6 遺伝子異常に関して機能解析を行い、その病原性の確認のみならず、病態発症機序の解明およびさらに治療法の開発を行うことを目的として研究を行うこととした。

2. 研究の目的

- 1) SRNS の患児に対して NGS を利用することにより、原因遺伝子の同定を行う
- 2) 同定された TRPC6 遺伝子異常について機能解析を行うことで、SRNS 発症機序の解明を行う
- 3) TRPC6 阻害薬の投与による治療の可能性につき評価を行う

3. 研究の方法

- 1) SRNS の患児に対して NGS を利用することにより、原因遺伝子の同定を行う

TRPC6 を含む SRNS の原因遺伝子としてこれまで報告のある 45 遺伝子について、targeted sequence 用疾患パネルを作成する。全国の小児期発症 SRNS 症例について作成した疾患パネルを用いて網羅的に NGS を使用し遺伝子検査を行う。

- 2) 同定された TRPC6 遺伝子異常について機能解析を行うことで、SRNS 発症機序の解明を行う

TRPC6 遺伝子変異機能解析の方法としては、2011 年に Gigante らが報告している方法に基づいて行った(Gigante et al., Clin J Am Soc Nephrol, 2011)。具体的には、Wild type の TRPC6 遺伝子の cDNA を作成し、その全長をベクターに導入しクローニングを行った。それを型にして mutagenesis を行い、患者遺伝情報に従って変異挿入を行う。これらの cDNA を Wild type とともに安定株作成用のベクターへ導入後、ヒト胚性腎細胞由来の Human Embryonic Kidney cells(HEK293 細胞)に導入し Ca²⁺チャネルの強制発現を行う。その後、細胞膜表面への Ca²⁺チャネルの発現の確認および細胞内の Ca²⁺濃度を測定する。細胞内の Ca²⁺濃度については、カルバコールによる刺激下に、Ca²⁺ influx を行い測定した。

3) TRPC6 阻害剤の投与による治療の可能性につき評価を行う

作製した cDNA 導入後の HEK293 細胞に、TRPC6 阻害剤として過去に報告されている薬剤である Larixyl Acetate を投与する。その後 Ca²⁺ influx を行う。

次に、実際の症例から、患者由来の尿中落下細胞を分離培養する。具体的には患者の尿を採取し、尿を遠沈後 plate 上で培養を行う。その後数日かけて増殖してきた尿中落下細胞を使用する。尿中落下細胞を培養後、遺伝子導入した HEK293 細胞と同様に、細胞内の Ca²⁺濃度を測定する。コントロール検体としては、TRPC6 以外の遺伝子変異が同定された SRNS 症例、ネフローゼ以外の疾患、特に腎疾患の既往歴のない症例などを想定している。さらに、Larixyl Acetate を加えて、Ca²⁺ influx を行い、Ca²⁺の細胞内取り込みが阻害されるかどうか確認する。

4. 研究成果

1) SRNS の患児に対して NGS を利用することにより、原因遺伝子の同定

2018 年 5 月までで日本全国、33 都道府県、77 施設から 174 家系の検体が集まり、遺伝子解析を行った。その内、原因遺伝子を同定したのが 53 家系 (30%) であった。最も多かったのが WT1 変異で 13 家系であった。続いて TRPC6、LAMB2、NPHS1 変異がそれぞれ 6 家系ずつであった (表 1)。TRPC6 変異を同定した 6 家系の内、5 家系が新規変異であった。

また、原因遺伝子の中でミトコンドリアの機能に係る遺伝子である COQ6 や ADCK4 などの遺伝子異常を同定することができた。これらの患児については、補酵素である CoQ10 補充を開始することで、治療効果が見られることがこれまで報告されている。実際に、COQ6 の変異を認めた症例に対して CoQ10 投与を始めたところ、蛋白尿 (UPCR) が陰性化した (図 2)。今回同定した COQ6 変異は、

遺伝子	家系数
WT1	13
LAMB2, NPHS1, TRPC6	6
INF2	5
NUP107, ADCK4	3
LMX1B, ACTN4	2
COL4A5, COQ6, FAT1, PAX2, PLCE1, SMARCAL1, TTC21B	1

一方は既報の 1 塩基変異であったが、他方は Exon1 から Exon2 にかけての巨大欠失であった。今回我々は COQ6 の

表 1 遺伝子解析結果

巨大欠失を同定するために、NGS による解析 data を用いて SureCall というソフトを使用し、ペア解析を行った。さらに、custom array CGH 法を用いて同部位の Copy number variation を再確認することができた。これらの Copy number variation 解析の手法は有用と考えられ、同方法を用いること

で疾患パネルを用いた NGS 解析によってより多くの原因遺伝子を同定することができると考えられた。

2) 同定された TRPC6 遺伝子異常について機能解析を行うことで、SRNS 発症機序の解明を行う

Wild type の TRPC6 遺伝子の cDNA を作成し、安定株ベクターに導入後、

HEK293 細胞に導入した。ベクター導入後、細胞の免疫染色を施行し、TRPC6 が細胞表面に強制発現されていることを確認した。さらに、Ca²⁺ influx を行ったところ、カルバコールによる刺激によって細胞内に Ca²⁺濃度が上

昇することを確認することができた。今後は、患者の遺伝情報に従い mutagenesis を用いて変異を挿入し、変異が挿入された cTRPC6 を導入された vector を HEK293 細胞内に取り込み、Ca²⁺ influx を行う予定である。コントロールとしては、Wild type の TRPC6 を強制発現させた HEK 293 細胞もしくは、何も導入していない HEK293 細胞を使用する予定である。Positive control としては、これまで過去に gain of function として報告のある c. 2683C>T (p.Arg895Cys) の変異を導入した cTRPC6 を組み込んだ vector を導入した HEK293 細胞を使用する予定である。

3) TRPC6 阻害薬の投与による治療の可能性につき評価を行う

作製した Wild type の TRPC6 遺伝子の cDNA 導入後の HEK293 細胞に TRPC6 阻害薬として報告されている Larixyl Acetate を投与し、Ca²⁺ influx を行った。その結果、Larixyl Acetate を投与した細胞では、Ca²⁺チャネル刺激に対する細胞内 Ca²⁺濃度上昇が実際に抑制されることを確認できた(図 3)。今後は、患者遺伝情報に従い mutagenesis を用いて cTRPC6 に変異を挿入し、それを組み込んだ vector を導入した HEK293 細胞について Ca²⁺濃度の変化を調べる予定である。その後、尿中落下細胞を用いて同様に Ca²⁺ influx を行う予定である。これまでネフローゼ症候群を含め、尿細管障害の児からなどから尿中落下細胞を分離培養することが可能であったことから、今回も同様の

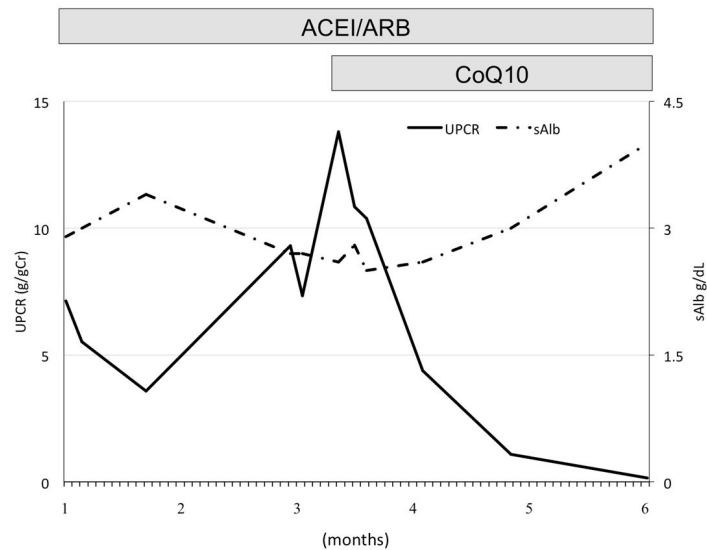


図 2 COQ6 変異例に対する CoQ10 の効果について

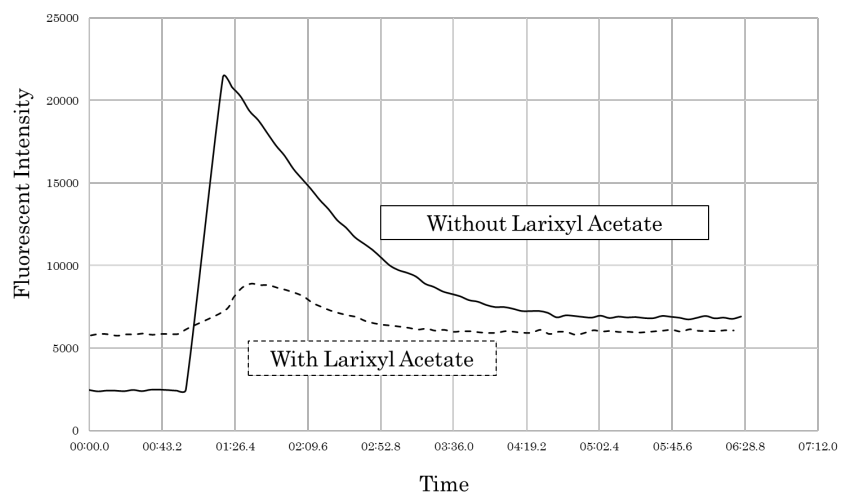


図 3 Larixyl Acetate の効果

手法を用いて培養を行っていく予定である。尿中落下細胞の培養ができた時点で、患者由来の尿中落下細胞とコントロールの尿中落下細胞を使用し、Ca²⁺ influx を行い、細胞内の Ca²⁺ の濃度に違いが生じるかどうかを調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Keita Nakanishi, Kandai Nozu, Ryugo Hiramoto, Shogo Minamikawa, Tomohiko Yamamura, Junya Fujimura, Tomoko Horinouchi, Takeshi Ninchoji, Hiroshi Kaito, Naoya Morisada, Shingo Ishimori, Koichi Nakanbishi, Ichiro Morioka, Hiroyuki Awano, Masafumi Matsuo, Kazumoto Iijima, Eur J Med Genet. A comparison of splicing assays to detect an intronic variant of the OCRL gene in Lowe syndrome, 査読あり, 2017 Dec;60(12):631-634. doi: 10.1016/j.ejmg.2017.08.001.

Keita Nakanishi, Takayuki Okamoto, Kandai Nozu, Shigeo Hara, Yasuyuki Sato, Asako Hayashi, Toshiyuki Takahashi, China Nagano, Nana Sakakibara, Tomoko Horinouchi, Junya Fujimura¹, Shogo Minamikawa, Tomohiko Yamamura, Rini Rossanti, Hiroaki Nagase, Hiroshi Kaito, Tadashi Ariga, Kazumoto Iijima, Clinical and Experimental Nephrology, Pair analysis and custom array CGH can detect a small copy number variation in *COQ6* gene, 査読あり, 2019 May;23(5):669-675. doi: 10.1007/s10157-018-1682-z.

[学会発表] (計 2 件)

2018年6月 日本腎臓学会学術集会

2018年11月 アメリカ腎臓学会学術集会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]なし

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者なし

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。