

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790720
 研究課題名（和文） 最新の遺伝子解析技術を駆使した尿細管輸送体異常症の網羅的遺伝子異常の解明
 研究課題名（英文） Molecular analysis for inherited tubulopathies.

研究代表者
 野津 寛大 （KANDA I NOZU）
 神戸大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：70362796

研究成果の概要：

Bartter 症候群（BS）、Gitelman 症候群（GS）は常染色体劣性尿細管機能異常症で、低カリウム血症、代謝性アルカローシス、高レニン、高アルドステロン血症などを特徴とする。日本人におけるこれらの疾患を有する患者において、臨床的および遺伝学的検討はこれまで行われてこなかったが、私たちは今回の研究で、現在までに 53 例で遺伝子解析による確定診断を行ってきた。その結果、典型例ではそのほとんどで遺伝子変異を同定することができ、本疾患においては遺伝子診断率が高い疾患であることが分かった。また、解析方法に関する工夫を行い、尿中落下細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR を用いて解析を行うという非侵襲的かつ斬新な方法を導入することで、遺伝子診断率を向上させることに成功し、さらに、これまでこれらの疾患で遺伝子診断率が低かった原因として、従来の直接シーケンス法による解析では広範囲のヘテロ接合体欠失の検出はできず、BS 患者においてはこの変異が多いためであることを明らかにした。そこで、PCR 半定量法を導入することで、それらの変異の検出に成功した。現在まで私たちは 90% 以上の患者において遺伝子変異の検出に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	270,000	2,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：(1)Bartter 症候群 (2)Gitelman 症候群 (3)尿中落下細胞 (4)チャンネル・トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

Bartter 症候群、Gitelman 症候群に関し、そ

の分類、発症機序、頻度、遺伝子異常との相関など一切不明であった。特に日本人においては遺伝子診断を行う施設がなく、臨床診断

もままならない状況であった。

2. 研究の目的

本研究では mRNA や PCR 半定量法を用いた遺伝子解析など分子遺伝学的手法における最新の技術を駆使して、すべての尿細管輸送体異常症の症例で遺伝子の異常を解明し、その分子機構を明らかとすることを旨とする。

3. 研究の方法

尿細管上皮細胞のチャネル・トランスポーター異常症のすべての症例で遺伝子の異常を明らかにする手段として、尿中落下細胞から抽出した mRNA を用いた遺伝子解析方法など、従来行われてこなかった斬新な解析方法や毛細管電気泳動法を用いたゲノム DNA の PCR 半定量という非常に新しい方法を用いることで従来明らかにできなかった広範囲のヘテロ接合体の欠失を発見する。

4. 研究成果

Bartter 症候群 (BS)、Gitelman 症候群 (GS) は常染色体劣性尿細管機能異常症で、低カリウム血症、代謝性アルカローシス、高レニン、高アルドステロン血症などを特徴とする。現在までに I 型から V 型 BS および GS の原因遺伝子が既に明らかにされている。日本人におけるこれらの疾患を有する患者において、臨床的および遺伝学的検討はこれまで行われてこなかったが、私たちは今回の研究で、現在までに 53 例で遺伝子解析による確定診断を行ってきた。内訳は I 型 12 例、II 型 3 例、III 型 18 例、IV 型 1 例、GS 29 例であった。その結果、典型例ではそのほとんどで遺伝子変異を同定することができ、本疾患に

おいては遺伝子診断率が高い疾患であることが分かった。また、解析方法に関する工夫を行い、尿中落下細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR を用いて解析を行うという非侵襲的かつ斬新な方法を導入することで、遺伝子診断率を向上させることに成功し、英文学術誌に投稿を行った (Pediatr Res 2007、Am J Kidney Dis, 2008)。さらに、これまでこれらの疾患で遺伝子診断率が低かった原因として、従来の直接シーケンス法による解析では広範囲のヘテロ接合体欠失の検出はできず、BS 患者においてはこの変異が多いためであることを明らかにした。そこで、PCR 半定量法を導入することで、それらの変異の検出に成功した (Pediatr Res. 2007)。また、日本人においては 2 型 BS の報告例はこれまで 1 例もなかったが、2 型 BS では低カリウム血症を認めない症例もいることを明らかとし、診断がついていない症例の存在の可能性を明らかとした (Pediatr Nephrol 2007)。また、非典型的 late-onset の 1 型 BS 患者の報告 (Pediatr Nephrol 2008) および CLCNKA および CLCNKB 遺伝子の両方に変異を有することによる重症型 4 型 BS 症例に関しても報告した (J. Med. Genet 2009)。現在まで私たちは 90% 以上の患者において遺伝子変異の検出に成功している。更なる症例の蓄積を行い、日本人におけるこれらの疾患の患者の特徴を明らかとしていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1, Nozu K, Krol RP, Nakanishi K, Yoshikawa N, Nozu Y, Ohtsuka Y, Iijima K, Matsuo M. Detection by multiplex ligation-dependent probe amplification of large deletion

mutations in the COL4A5 gene in female patients with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009 Jan 24. [Epub ahead of print] 査読有

2, [Nozu K](#), Inagaki T, Fu XJ, Nozu Y, Kaito H, Kanda K, Sekine T, Igarashi T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K, Matsuo M, Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness. *J Med Genet*, 45:182-6, 2008 査読有

3, Krol RP, [Nozu K](#), Nakanishi K, Iijima K, Takeshima Y, Fu XJ, Nozu Y, Kaito H, Kanda K, Matsuo M, Yoshikawa N. Somatic mosaicism for a mutation of the *COL4A5* gene is a cause of mild phenotype male Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 23(8):2525-30, 2008 査読有

4, Iida K, [Nozu K](#), Takahashi Y, Okimura Y, Kaji H, Matsuo M, Chihara K. Diverse splicing abnormality caused by a homozygous mutation in the thiazide-sensitive sodiumchloride cotransporter gene in a patient with Gitelman's syndrome. *Am J Kidney Dis*, 2008 51:1077-8 査読有

5, [Nozu K](#), Przybyslaw Krol R, Ohtsuka Y, Nakanishi K, Yoshikawa N, Nozu Y, Kaito H, Kanda K, Hashimura Y, Hamasaki Y, Iijima K, Matsuo M. Detection of large deletion mutations in the COL4A5 gene of female Alport syndrome patients. *Pediatr Nephrol*. 2008 23: 2085-90 査読有

6, Kaneko K, Taniguchi N, Tanabe Y, Nakano T, Hasui M, [Nozu K](#). Oxidative imbalance in idiopathic renal hypouricemia. *Pediatr Nephrol*. 2008 Oct 21. [Epub ahead of print] 査読有

7, Yamazaki H, [Nozu K](#), Narita I, Nagata M, Nozu Y, Fu XJ, Matsuo M, Iijima K, Gejyo F. Atypical phenotype of type I Bartter syndrome accompanied by focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2008 Oct 2. [Epub ahead of print] 査読有

8, Kaito H, [Nozu K](#), Fu XJ, Kamioka I, Fujita T, Kanda K, Krol RP, Suminaga R, Ishida A, Iijima K, Matsuo M Detection of a transcript abnormality in mRNA of the SLC12A3 gene extracted from urinary sediment cells of a patient with Gitelman's syndrome. *Pediatric Research* 61, 4: 502-505, 2007 査読有

9, Sekine T, [Nozu K](#), Iyengar R, Fu XJ, Matsuo M, Tanaka R, Iijima K, Matsui M, Harita Y, Inatomi J, Igarashi T OCRL1 mutations in patients with Dent phenotype in Japan. *Pediatr Nephrol*, 22: 975-80, 2007 査読有

10, [Nozu K](#), Fu XJ, Kaito H, Kanda K, Yokoyama N, Krol PR, Nakajima T, Kajiyama M, Iijima K, and Matsuo M A novel mutation in *KCNJ1* in a Bartter syndrome case diagnosed as pseudohypoaldosteronism. *Pediatr Nephrol*, 22: 1219-23, 2007 査読有

11, [Nozu K](#), Fu XJ, Nakanishi K, Yoshikawa

N, Kaito H, Kanda K, Krol RP, Miyashita R, Kamitsuji H, Kanda S, Hayashi Y, Satomura K, Shimizu N, Iijima K, Matsuo M. Molecular Analysis of Patients With Type III Bartter Syndrome: Picking Up Large Heterozygous Deletions With Semiquantitative PCR. *Pediatr Res.* 2007, 62, 364-9. 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

①野津寛大 Bartter症候群とGitelman症候群の病型と臨床症状 第43回日本小児腎臓病学会学術集会
2008.6.13～14 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野津 寛大 (NOZU KANDAI)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70362796

(2) 研究分担者

無し。

(3) 連携研究者

無し。