

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03612

研究課題名(和文) 同胞発症家系を用いたステロイド感受性ネフローゼ症候群の遺伝的背景の解明

研究課題名(英文) Genomic analysis of steroid-sensitive nephrotic syndrome using sibling cases

研究代表者

呉 繁夫 (KURE, Shigeo)

東北大学・医学系研究科・客員教授

研究者番号：10205221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド感受性ネフローゼ症候群の同胞発症家系を用いた研究により、Rhoファミリー低分子量G蛋白質の活性調節経の本症発症への関与を報告した(Nat Commun, 2018;17:9:1960)。同様な戦略により新たな病的経路を検索し、罹患同胞は複合ヘテロ接合体、両親は保因者となるIL1RAP遺伝子変異を同定した。変異IL1RAP遺伝子を発現させるとIL1結合能低下を認めた(Int Immunol. 2020;12:32:283-292)。更に、Il1rapノックアウト・マウスを解析したが、尿蛋白質排出において野生型と有意差を認めなかったため、マウス遺伝学的背景を変えた検証が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネフローゼ症候群には、ステロイド治療が効くステロイド感受性と効かない病型がある。小児では、ステロイド感受性の症例が多数を占めるが、遺伝的背景はステロイド感受性に比べて解明されていない。本研究では、同胞発症のステロイド感受性症例に着目し、その遺伝的背景を明らかにするゲノム解析を行った。この同様な戦略により、申請者らはこれまで6つの病因となる遺伝子を明らかにしてきた。今回、同様の手法によりIL1RAPという遺伝子に候補遺伝子変異を見出し、その性質を培養細胞内および遺伝子改変マウスを用いて検証したところ、相棒レベルでは機能低下を認めたが、マウスレベルでは認めなかった。現在更なる検証を進めている。

研究成果の概要(英文)：To clarify gene for steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) we performed the whole exome-sequencing of SSNS family with affected sibs, and identified first gene ISTN1, and identified additional 23 mutations in the ISTN1-related genes. To explore a novel SSNS gene we screened additional 7 families with affected sibs and found a compound-heterozygous mutations in IL1RAP gene. Since IL1RAP is a critical subunit of the functional interleukin-1 receptor (IL-1R), we tested the its functional effect. When stimulated with IL-1, peripheral blood cells from the patients produced markedly lower levels of cytokines compared with cells from healthy family members. Moreover, IL-1R with a variant IL1RAP subunit had impaired binding ability and low reactivity to IL-1. To confirm the causality of the mutations in a mouse model we analyzed urine protein levels in the Il1rap knockout mouse. However, the protein level was not different from wild-type mouse, suggesting necessity of further analysis.

研究分野：小児科学、ゲノム医療

キーワード：ネフローゼ症候群 ステロイド感受性 ゲノム解析 同胞発症家系

1. 研究開始当初の背景

多因子病の遺伝的背景を解明する方法として Wide Association Study (GWAS) が実施されてきた。しかしながら、効果の強い遺伝子を同定することが出来ない多因子病も多く、「失われた遺伝率」と呼ばれている。また、一般に GWAS で同定された感受性遺伝子の多くはその効果が小さく、機能解析や動物モデルにおける再現が困難で、発症メカニズムの解明になかなか迫ることができない、という側面がある。現時点では、「ネフローゼ症候群はいかに発症するか?」、古くかネフローゼ症候群の治療に古くから用いられてきたステロイドが「どのようにして効くのか?」、といった基本的な問題に答えることができない。

ネフローゼ症候群のステロイド治療が長期間に及ぶ場合、小児では成長障害などのステロイドの副作用が深刻な問題となる。このような副作用の無い治療法を開発するには、ステロイドの作用分子を明らかにし、その分子に作用する薬剤(分子標的薬)の開発が必要である。また、以前より繰返し問われてきた「先行感染がどのように SSNS の発症に関係しているか?」の問題も未解決である。GWAS による SSNS 感受性遺伝子解析の結果、HLA 遺伝子が SSNS の発症に関連してことが示されている。また、リツキシマブが新しい治療選択肢となっていることも、SSNS と免疫系の関連を示唆するが、その病的経路の解明には至っていない。従って、SSNS の遺伝学的背景の解明には、これまでの手法とは異なる、新たな遺伝的背景の解析戦略が必要と考える。

これまでの GWAS による SSNS のゲノム解析では限界があるため、新たな戦略で SSNS の遺伝的背景の解明を計画した。着目したのは、当科外来でフォローしていたステロイド依存性ネフローゼ症候群の同胞(姉弟)発症家系であった(図1)。両親は非罹患、同胞(姉弟)は罹患、であるため、常染色体劣性遺伝を想起させる。「多因子病と考えられている SSNS でなぜ同胞発症したのか?」という問いに対し、次の様な仮説を立てた。「この家系には SSNS 発症に劣性に働く効果の強い遺伝子を持つため、あたかも常染色体劣性遺伝のように見えるのではではないか?」

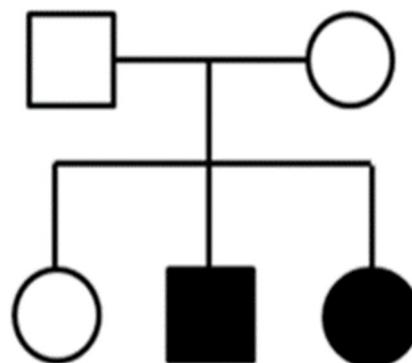


図1 病因遺伝子同定の発端となったSSNS同胞発症家系

この仮説に基づき、全エクソーム解析により常染色体劣性遺伝に当てはまる遺伝子変異を検索したところ、合致する変異遺伝子は単一で ITSN2 という新規病因遺伝子であった。ITSN2 遺伝子は、腎足細胞の糸状仮足形成に参与するため、正常型と変異型の ITSN2 cDNA を培養細胞で発現させると、変異遺伝子の糸状仮足形成能の低下を認めた。更に、マウス *Itsn2* をノックアウトしたところ、炎症惹起時の尿蛋白排泄増加を認め、病因性を確認した。

ITSN2 遺伝子変異を持つ別の症例を検索する目的で、患者 DNA を多数収集しているポストン小児病院と共同研究を開始した。ITSN2 遺伝子と機能的に関連がある遺伝子群を 1000 症例において変異スクリーニングし、6つの新規病因遺伝子 (MAG2, TNS2, DLC1, CDK20, ITSN2, ITSN2) を同定した。遺伝子変異を認めた家系は、いずれも頻回再発型のステロイド依存性ネフローゼ症候群であり、常染色体劣性の遺伝形式をとっていた。

これらの遺伝子は、いずれも同一のシグナル伝達経路 (Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性調節経路) 上の分子をコードし(図2)、SSNS の病的経路が明らかになった (Ashraf S, Kudo H, Kure S, et al. Mutations in six nephrosis genes delineate a pathogenic pathway amenable to treatment. *Nat Commun*, 2018;9:1960)。このシグナル伝達経路は、腎足細胞におけるアクチン重合を調節す

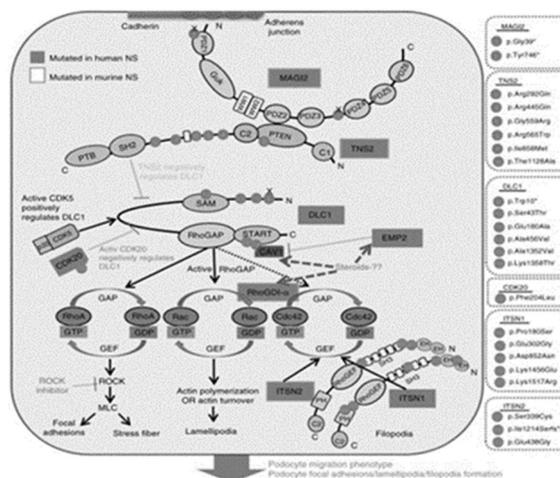


図2 同胞発症症例のゲノム解析から明らかになった病因6遺伝子を含む病的パスウェイ

ることにより足突起の運動を制御するため、この経路の機能不全により蛋白尿を来すと推察された。また、経路内にはステロイドが作用する CAV1 分子も存在するため「ステロイドは何故効くか？」の問題解決へ示唆を与えた。図 2 に SSNS の 17 家系で変異を認めた 6 遺伝子（全 23 変異）と各遺伝子の機能的関連を示す（上述論文の Fig.2 より引用）。

2. 研究の目的

これまでの申請者らの研究により、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性調節経の調節障害が SSNS の発症に関連していることが判明した。しかしながら、SSNS は多因子病であり、この経路の調節障害のみでは、説明できない点も多く存在する。特に先行感染や HLA 分子が関わると考えられる免疫系の関与が説明できない。また、先行研究から免疫系に対するステロイドの関与も示唆されているため、ステロイド作用機序も更に複雑と推察されるため、SSNS の発症に関与する、第 2、第 3 の病的経路が存在すると考えている。

本研究では、新たな同胞発症 SSNS 家系をできるだけ多く収集し、これまで実施してきた手法により第 2、第 3 の病的経路を同定し、SSNS 発症機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

基本的には、これまでの研究で第 1 の病的経路（Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の活性調節）の解明の際に利用した手法をそのまま実施する。実際には、ゲノム解析、候補遺伝子絞込、培養細胞を用いた機能解析、遺伝子改変動物を用いた機能解析、関連遺伝子の変異スクリーニングの順に進める（図 3）。

以上の手法により、第 2、第 3 の病的経路を同定し、SSNS 発症機序の解明を目指す。基本的には、これまでの研究の経験から、病的経路の解明の際に、最も時間がかかると予想されるのは、マウスモデルの作成とその表現型（尿中蛋白排出の増加）の証明であった。

その問題を克服するために、今回の研究計画では、ゼブラフィッシュ・モデルの解析系を導入し、CRISPR/CAS9 による遺伝子改変によるノックダウンやノックインによる遺伝子改変動物の作成を行う。マウスモデル作成に比べ、実験期間の大幅な短縮が期待できるので、研究を加速するものと考えられる。

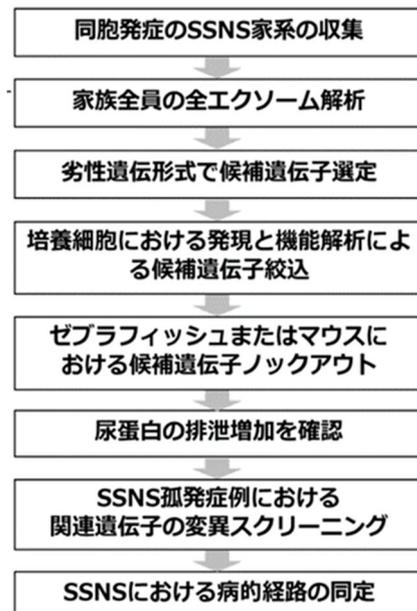


図 3 研究の流れ

4. 研究成果

本研究では、まず初めに同胞発症者が存在する含む SSNS 家系を新たに 7 家系を収集した（図 4）。全て日本人症例であった。この研究の発端となった同胞発症家系を左上に示す。残りの 7 家系に対し、全エクソーム解析を実施し、常染色体潜性遺伝または、X 連鎖性遺伝に合致する家系を抽出した。

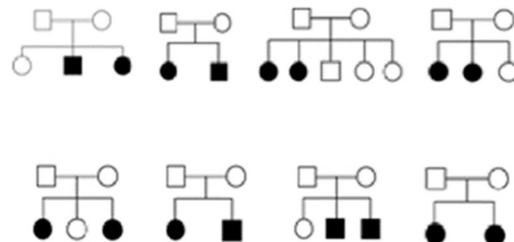


図 4 同胞発症者を含むステロイド感受性ネフローゼ症候群の 8 家系

その結果、1 家系（図 4 中、上段右の家系）に常染色体潜性遺伝に合致する新たな病因遺伝子変異候補を見出した（図 5）。遺伝子変異は、インターロイキン 1 受容体アクセサリ-蛋白質をコードする IL1RAP 遺伝子であった。この家系の同胞患者は共に複合ヘテロ接合体（I175T/R22H）両親は一方の遺伝子の保因者であった。この変異遺伝子を持つ IL1 受容体を培養細胞に発現させ、その性質を検索したところ、IL1 受容体への IL1 リガンド結合能が低下していること、IL1 受容体を介したサイトカイン分泌能が有

意に低下していることを見出した (Niizuma S, Kure S, et. al., *Int Immunol.* 2020;32:283-292)

個体レベルの検証を行うべく、*Il1rap* 遺伝子ノックアウト・マウスの解析を行った。*Il1rap* 遺伝子ノックアウト・マウスの尿蛋白質排出量を野生型マウスと比較した。しかしながら、*IL1RAP* ノックアウト・マウスの尿蛋白質排出量は、野生型マウスと有意差を認めなかった。次に炎症惹起時の尿蛋白質排出量を検討した。LPSにより炎症を惹起したが、尿中蛋白濃度にも変化がなかった。ネフローゼ症候群の病因遺伝子となっている確証を得ることは出来なかった。以上の実験は B6 系統マウスで実施したが、今後はマウスの遺伝学的背景を変化させて表現型を解析するなど検索が必要と考えている。

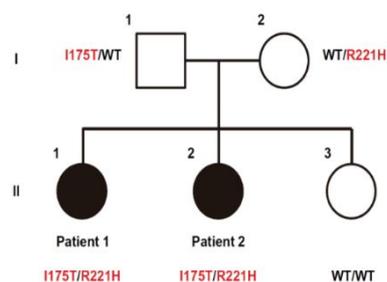


図5 *IL1RAP* 遺伝子に常染色体潜性遺伝性変異を認めた SSNS 家系

< 引用文献 >

1. Ashraf S, Kudo H, Rao J, Kikuchi A, Widmeier E, Lawson JA, Tan W, Hermle T, Warejko JK, Shril S, Airik M, Jobst-Schwan T, Lovric S, Braun DA, Gee HY, Schapiro D, Majmundar AJ, Sadowski CE, Pabst WL, Daga A, van der Ven AT, Schmidt JM, Low BC, Gupta AB, Tripathi BK, Wong J, Campbell K, Metcalfe K, Schanze D, Niihori T, Kaito H, Nozu K, Tsukaguchi H, Tanaka R, Hamahira K, Kobayashi Y, Takizawa T, Funayama R, Nakayama K, Aoki Y, Kumagai N, Iijima K, Fehrenbach H, Kari JA, El Desoky S, Jalalah S, Bogdanovic R, Stajic N, Zappel H, Rakhmetova A, Wassmer SR, Jungraithmayr T, Strehlau J, Kumar AS, Bagga A, Soliman NA, Mane SM, Kaufman L, Lowy DR, Jairajpuri MA, Lifton RP, Pei Y, Zenker M, *Kure S, *Hildebrandt F. (*corresponding author) Mutations in six nephrosis genes delineate a pathogenic pathway amenable to treatment. *Nat Commun.* 2018;9:1960.
2. Niitsuma S, Kudo H, Kikuchi A, Hayashi T, Kumakura S, Kobayashi S, Okuyama Y, Kumagai N, Niihori T, Aoki Y, So T, Funayama R, Nakayama K, Shirota M, Shuji Kondo S, Kagami S, Tsukaguchi H, Iijima K, Kure S, *Ishii N. (*corresponding author) Biallelic variants/mutations of *IL1RAP* in patients with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Int Immunol*, 2019;32:283-293.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Niitsuma Sou, Kudo Hiroki, Kikuchi Atsuo, Hayashi Takaya, Kumakura Satoshi, Kobayashi Shuhei, Okuyama Yuko, Kumagai Naonori, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko, So Takanori, Funayama Ryo, Nakayama Keiko, Shiota Matsuyuki, Kondo Shuji, Kagami Shoji, Tsukaguchi Hiroyasu, Iijima Kazumoto, Kure Shigeo, Ishii Naoto	4. 巻 32
2. 論文標題 Biallelic variants/mutations of IL1RAP in patients with steroid-sensitive nephrotic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 283 ~ 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 呉 繁夫
2. 発表標題 同胞発症家系を用いたステロイド感受性ネフローゼ症候群の遺伝的背景の解析
3. 学会等名 日本腎臓学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	菊池 敦生 (Kikuchi Atsuo) (30447156)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------