

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591396

研究課題名（和文）日本人先天性・乳児ネフローゼ症候群における新しい責任遺伝子同定と発症機序の解明

研究課題名（英文）Mutation analysis in Japanese patients with congenital and infantile nephrotic syndrome

研究代表者

吉川 徳茂（ YOSHIKAWA NORISHIGE ）

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10158412

研究成果の概要（和文）：先天性ネフローゼ症候群患者 18 例と乳児ネフローゼ症候群患者 78 例の DNA を検索した。先天性ネフローゼ症候群患者 18 例のうち、16 例(88.9%)に原因と考えられる遺伝子変異を認めた（*NPHS1* 変異 12 例、*WT1* 変異 3 例、*LAMB2* 変異 1 例）。*NPHS2* 変異は認めなかった。*WT1* 変異のある CNS は 1 か月以内に末期腎不全に移行し、*LAMB2* 変異のある症例には小瞳孔を認めた。乳児ネフローゼ症候群患者 78 例のうち、10 例(12.8%)に原因と考えられる遺伝子変異を認めた（*WT1* 変異 10 例）。遺伝子変異によりおこるネフローゼ症候群はステロイド抵抗性で、ステロイド治療は副作用により患児の生命予後を危うくする。

研究成果の概要（英文）：Mutations in each of the *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *LAMB2*, and *PLEC1* genes have been implicated in nephrotic syndrome manifesting in the first year of life. The relative frequency of causative mutations in these genes in Japanese children with nephrotic syndrome manifesting in the first year of life is unknown. Therefore, we analyzed all 5 of the genes in 96 patients from 96 families with nephrotic syndrome manifesting in the first year of life. We detected disease-causing mutations in 88.9% (16 of 18) patients with congenital onset (0-3 months) and 12.8% (10 of 78) patients with infantile onset (4-12 months) of nephrotic syndrome were explained by mutations. Infants with causative mutations in any of the 5 genes do not respond to steroid treatment; therefore, unnecessary treatment attempts can be avoided.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：ネフリン・ポドシン・WT1・ラミニンβ2・PLEC1・先天性ネフローゼ症候群・乳児ネフローゼ症候群

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群では、糸球体係蹄壁の蛋白透過性の亢進、つまり糸球体係蹄壁の蛋白透過を防ぐバリア機能の低下により、尿中に蛋白が漏出し、蛋白尿、低蛋白血症がおこる。これまで、糸球体係蹄壁の蛋白透過を防ぐメインバリアは、糸球体基底膜と考えられてきた。しかし近年、糸球体上皮細胞間スリット膜もバリアとして重要な働きをしていることを示唆する多くの報告がされている。

1998年、糸球体係蹄壁バリア構成成分の遺伝子変異がネフローゼ症候群の重要な原因であることが報告された。これまでに小児ネフローゼ症候群ではpositional cloningによりNPHS1遺伝子(*Mol Cell* 1:575, 1998), NPHS2遺伝子(*Nat Genet* 24:349, 2000), WT1遺伝子, LAMB2遺伝子(*Hum Mol Genet* 13:2625, 2004)の変異が報告されている。さらに2006年末PLEC1遺伝子の変異が小児ネフローゼ症候群の原因遺伝子として報告された(*Nat Genet* 38:1397-1405, 2006)。

小児ネフローゼ症候群の多くはステロイド治療に反応するステロイド感受性ネフローゼ症候群である。生後3ヶ月までに発症する先天性ネフローゼ症候群と4ヶ月から1歳までに発症する乳児ネフローゼ症候群の多くはネフローゼ症候群関連遺伝子の変異により起こると考えられる。遺伝子変異によりおこるネフローゼ症候群はステロイド抵抗性で、ステロイド治療は副作用により患児の生命予後を危うくする。一方遺伝子変異のない場合は、ステロイド感受性の可能性がある。先天性・乳児ネフローゼ症候群の治療をはじめるとは、まずネフローゼ症候群責任遺伝子の検索が必要である。したがって日本人患者を対象とした系統的検索が急務である。

2. 研究の目的

私達は、これまでに、日本人先天性ネフローゼ症候群におけるNPHS1、NPHS2、WT1遺伝子変異の役割を明らかにしてきた (Sako, Yoshikawa et al. *Kidney Int* 67:1248-1255, 2005)。本研究では、①その後発見された、LAMB2、PLEC1遺伝子変異の日本人先天性ネフローゼ症候群における役割を明らかにする。また、②これら5遺伝子変異の乳児ネフローゼ

症候群における役割も明らかにする。

3. 研究の方法

対象患者：発症時3か月未満の先天性ネフローゼ症候群と発症時1歳未満の乳児ネフローゼ症候群患者を対象とした。

全エクソン検索による遺伝子変異の解析：ゲノムDNAを使用し、(1) nephrin 遺伝子 (*NPHS1*)、(2) podocin 遺伝子 (*NPHS2*)、(3) laminin- β 2 (*LAMB2*) 遺伝子、(4) WT1 (*WT1*) 遺伝子 (5) PLEC1 (*PLEC1*) 遺伝子の全エクソンをプライマーを用いてサーマルサイクラーによるPCR法により増幅し、シーケンサー (ABI PRISM310 Genetic Analyzer 現有) により塩基配列を確認し、変異を検出した。

4. 研究成果

先天性ネフローゼ症候群患者 18例と乳児ネフローゼ症候群患者 78例のDNAを検索した。

結果

先天性ネフローゼ症候群患者 18例のうち、16例(88.9%)に原因と考えられる遺伝子変異を認めた (*NPHS1* 変異 12例、*WT1* 変異 3例、*LAMB2* 変異 1例)。 *NPHS2* 変異は認めなかった。 *WT1* 変異のある CNS は1か月以内に末期腎不全に移行し、 *LAMB2* 変異のある症例には小瞳孔を認めた。乳児ネフローゼ症候群患者 78例のうち、10例(12.8%)に原因と考えられる遺伝子変異を認めた (*WT1* 変異 10例)。

考察

日本人先天性ネフローゼ症候群患者では、欧州と比較して *NPHS1* 変異の頻度は高く、一方、 *NPHS2* 変異の頻度は低い。 *NPHS1* 遺伝子変異において、c.2515delC の変異を12例中6例認め、創始者効果によると考えられる。巨大胎盤は CNS 全般の非特異的徴候と考えられているが、 *NPHS1* 変異を有する症例は全例巨大胎盤を示し、 *WT1* 変異を有する症例は全例巨大胎盤を示さなかった。

結論

日本人先天性ネフローゼ症候群と乳児ネフローゼ症候群の原因遺伝子が明らかになった。

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 12 件)

1. Kanda K, Nozu K, Kaito H, Iijima K, Nakanishi K, Yoshikawa N, Ninchoji T, Hashimura Y, Matsuo M, Moritz ML. The relationship between arginine vasopressin levels and hyponatremia following a percutaneous renal biopsy in children receiving hypotonic or isotonic intravenous fluids. *Pediatr Nephrol* 26:99-104, 2011
2. Kamei K, Nakanishi K, Ito S, Saito M, Sako M, Ishikura K, Hataya H, Honda M, Iijima K, Yoshikawa N, for the Japanese pediatric IgA nephropathy treatment study group. Long-term results of a randomized controlled trial in childhood IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 6:1301-1307, 2011
3. Shima Y, Nozu K, Nozu Y, Togawa H, Kaito H, Matsuo M, Iijima K, Nakanishi K, Yoshikawa N. Recurrent EIARF and PRES with Severe Renal Hypouricemia by Compound Heterozygous *SLC2A9* Mutation *Pediatrics*, 2011, 127:e1621-1625
4. Nozu K, Iijima K, Kanda K, Nakanishi K, Yoshikawa N, Satomura K, Kaito H, Hashimura Y, Ninchoji T, Komatsu H, Kamei K, Miyashita R, Kugo M, Ohashi H, Yamazaki H, Mabe H, Otsubo A, Igarashi T, Matsuo M. The Pharmacological Characteristics of Molecular-Based Inherited Salt-Losing Tubulopathies. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95:E511-518
5. Ishikura K, Yoshikawa N, Hattori S, Sasaki S, Iijima K, Nakanishi K, Matsuyama T, Yata N, Ando T, Honda M, for Japanese study group of renal disease in children. Treatment with microemulsified cyclosporine in children with frequently relapsing nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 25:3956-3962, 2010
6. Shima Y, Nakanishi K, Togawa H, Obana M, Sako M, Miyawaki M, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N. Membranous nephropathy associated with thyroid-peroxidase antigen. *Pediatr Nephrol* 24:605-608, 2009
7. Togawa H, Nakanishi K, Shima Y, Obana M, Sako M, Nozu K, Tanaka R, Iijima K, Yoshikawa N. Increased chymase-positive mast cells in children with crescentic glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol* 24:1071-1075, 2009
8. Nozu K, Iijima K, Kawai K, Nozu Y, Nishida A, Takeshima Y, Fu X J, Hashimura Y, Kaito H, Nakanishi K, Yoshikawa N, Matsuo M. In vivo and in vitro splicing assay of SLC12A1 in an antenatal salt-losing tubulopathy patient with an intronic mutation. *Hum Genet* 126:533-538, 2009
9. Hamasaki Y, Yoshikawa N, Hattori S, Sasaki S, Iijima K, Nakanishi K, Matsuyama T, Ishikura K, Yata N, Kaneko T, Honda M, Japanese study group of renal disease in children. Cyclosporine and steroid therapy in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 24:2177-2185, 2009
10. 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* 24:1773-1774, 2009
11. Hashimura Y, Nozu K, Kanegane H, Miyawaki T, Hayakawa A, Yoshikawa N, Nakanishi K, Takemoto M, Iijima K, Matsuo M. Minimal change nephrotic syndrome associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Pediatr Nephrol* 24:1181-1186, 2009,
12. Nozu K, Iijima K, Nozu Y, Ikegami E, Imai T, Fu XJ, Kaito H, Nakanishi K, Yoshikawa N, Matsuo M. A deep intronic mutation in the SLC12A3 gene leads to gitelman syndrome. *Pediatr Res.*

〔学会発表〕(計 1 件)

Symposium

Yoshikawa N. Summary and future directions, The nephcure foundation symposium: Focus on focal. 15th International Pediatric Nephrology Association, New York, USA, 2010.

〔図書〕(計 4 件)

1. 中西浩一, 吉川徳茂: Alport 症候群と家族性良性血尿の異同, 50 の典型例で学ぶ小児の腎泌尿器疾患 編集 金子一成, pp46-49, 診断と治療社, 東京, 2011
2. 中西浩一, 吉川徳茂: Drash 症候群, 50 の典型例で学ぶ小児の腎泌尿器疾患 編集 金子一成, pp110-114, 診断と治療社, 東京, 2011
3. 吉川徳茂: 小児頻回再発型・ステロイド依存症ネフローゼ症候群に対する治療戦略は?, EBM 小児疾患の治療 2011-2012 監修 五十嵐隆, pp459-464, 中外医学社, 東京, 2011
4. 中西浩一, 吉川徳茂: ネフローゼ症候群. 小児科疾患アルゴリズム 市川光太郎編, 2009, pp68-69, 中山書店, 東京

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.wakayama-med.ac.jp/med/shonika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 徳茂 (YOSHIKAWA NORISHIGE)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10158412

(2) 研究分担者

中西 浩一 (NAKANISHI KOUICHI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50336880
飯島 一誠 (IIJIMA KAZUMOTO)
神戸大学・医学部・教授
研究者番号: 00240854

(3) 連携研究者
なし