

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860800

研究課題名(和文)小児特発性ネフローゼ症候群におけるマイクロRNA発現の検討及び治療法の開発

研究課題名(英文)The role of microRNA for pediatric idiopathic nephrotic syndrome

研究代表者

松野下 夏樹(Matsunoshita, Natsuki)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70622885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000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(SRNS)の責任遺伝子として45遺伝子がすでに報告されている。海外からの報告ではSRNS患者の約30%において、何らかの遺伝子異常を有し、その場合、各種免疫抑制療法に抵抗性で腎不全へと至る一方、腎移植後のSRNSの再発を認めないことを特徴とすることが報告されている。私たちは次世代シーケンサーを用いた既知の45遺伝子の網羅的診断体制を確立した。その結果これまで63家系の新規SRNS患者の解析を施行し、28%に遺伝子異常を同定し、全例で各種治療抵抗性であることを見いだした。今後、さらに日本人SRND患者の病態を明らかとしていく。

研究成果の概要(英文)：It has already been identified that 45 genes are responsible for steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS). Among SRNS cases, 30% of them are caused by mutations in some genes. In addition, those cases are resistant to various immunosuppressive therapies and develop to end-stage renal disease but doesn't show SRNS relapse after kidney transplantation. We have established the comprehensive gene testing system using next generation sequencer and conducted gene tests for 63 families. Among them, we identified gene mutations in 28% of them. Moreover, those cases never responded to immunosuppressive therapies. We will identify molecular mechanisms for the onset of SRNS and character of clinical courses of each gene mutations in Japan.

研究分野：小児腎臓病

キーワード：ネフローゼ症候群 podocyte 網羅的診断体制

1. 研究開始当初の背景

小児特発性ネフローゼ症候群(小児 INS)は小児期における代表的な難治性腎疾患である。小児 INS 患者においては循環血漿中に存在する未知の蛋白尿惹起因子によって podocyte 障害が発生し、蛋白尿漏出防止機構が破綻することで疾患を発症すると推測されているが、未だ病態の全容は解明されていない。中でもその重症型であるステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 (SRNS) においては、海外からの報告では約 30% において単一遺伝子の異常により発症するとされているが、日本人における網羅的解析結果は存在しない。一方で、マイクロ RNA(miRNA)と小児 INS の関連については、一部の miRNA が podocyte 関連遺伝子を標的とするため、その過剰発現により podocyte 障害を起こすことが報告されている。しかし未だに系統的に発現解析を行った研究はなく、miRNA と INS の関連は不明である。

2. 研究の目的

本研究では小児 INS における podocyte での miRNA の発現プロファイルを明らかとし、未だ明らかでない miRNA 発現を介した小児 INS の病態を解明する。さらにその結果をもとに、未だ存在しない miRNA を用いた疾患バイオマーカー、miRNA を標的とした特異的 治療法の開発を目指す。

さらに、海外より、ステロイド抵抗性ネフローゼ (SRNS) 患者の 30% は podocyte 関連遺伝子の異常により発症することが報告されている。日本人における遺伝子異常によるネフローゼの発症頻度は不明であり、遺伝学的バックグラウンドにつき、解析を行い、その病態を明らかとす

る。

3. 研究の方法

1. 小児 INS 患者の血清、尿および腎組織における miRNA の発現プロファイルを明らかにする。
2. 小児 INS 患者血清を添加して細胞障害を誘導した培養 podocyte における miRNA の発現プロファイルを明らかにする。
3. 細胞障害を誘導した培養 podocyte における podocyte 関連因子のメッセンジャー RNA(mRNA) および蛋白の発現解析を行い、podocyte の障害部位およびその程度を病理学的、分子生物学的に明らかにする。
4. 遺伝子診断用疾患パネルを作成し、次世代シーケンサーを用いた網羅的診断体制を確立する。

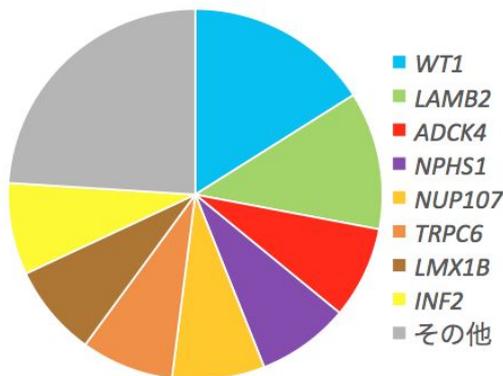
4. 研究成果

小児 INS の発症機序にはすでに以下の 2 つが明らかとされている。1) リンパ球より産生され、血液中を循環する何らかの因子により podocyte が障害され、蛋白尿漏出防止機構が破綻することで発症する機序。2) podocyte 関連蛋白を産生する遺伝子異常により発症する機序。これら 2 つの機序による病態解明に関する研究を行った。

- 1) 患者血清を培養 podocyte に添加する研究を行った。その結果、患者血清とともに培養した場合、小児 INS 発症に大きく関与するとされている nephrin、podocin 等のスリット膜関連蛋白が細胞膜表面に発現せず、そのほとんどが核周囲にとどまる現象を発見した。マイクロ RNA の発現に

関する解析を進めているが、実験系により検出される miRNA の発現量に相違があり、有意なデータを得ることができなかった。

- 2) これまで海外から SRNS 患者の約 30% において、遺伝子異常を認めることが報告され、その場合、各種免疫抑制療法に抵抗性で末期腎不全へと進行する一方で、移植後 SRNS 再発は認めないことが報告されてきた。私たちは既知の 45 遺伝子に関する網羅的解析体制を確立し、これまで 84 家系において解析を行ったところ、25 家系 (30%) で変異を同定し、その変異検出率は海外と同等であった。また検出した遺伝子の内訳は以下の通りで、日本人における遺伝子異常を有する割合およびその原因遺伝子の内訳を初めて明らかにした。



また、それらの患者では各種治療抵抗性であることが示された。また、遺伝子異常を有する場合、各種治療抵抗性で高率に腎不全へと進行する一方、腎移植後にはネフローゼ症候群の再発を認めない点も明らかとした。それらの点から、SRNS 例においては早期に遺伝子診断を行い、遺伝子への有無を検索することにより、その後の治療方針の決定において有用な情報を得られることが明らかとなり、現在、10-20 検体/月のペース

で検体を受領し遺伝子診断を行う体制の確立を行った。今後、更なる日本人 SRNS 患者の遺伝学および臨床的背景を明らかとする予定である。

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 4 件)

Matsunoshita N, Nozu K, Shono A, Nozu Y, Fu XJ, Morisada N, Kamiyoshi N, Ohtsubo H, Ninchoji T, Minamikawa S, Yamamura T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Shima Y, Kaito H, Iijima K. Differential diagnosis of Bartter syndrome, Gitelman syndrome, and pseudo-Bartter/Gitelman syndrome based on clinical characteristics. Genet Med 2016;18(2):180-8.

Kamiyoshi N, Nozu K, Urahama Y, Matsunoshita N, Yamamura T, Minamikawa S, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Kaito H, Iijima K. Pathogenesis of hypokalemia in autosomal dominant hypocalcemia type 1. Clin Exp Nephrol 2016;20(2):253-7.

Fu XJ, Nozu K, Kaito H, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Yoshikawa N, Ohtsubo H, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Yamamura C, Takagi N, Maekawa K, Taniguchi-Ikeda M, Iijima K. Somatic mosaicism and variant frequency detected by next-generation sequencing in X-linked Alport syndrome. Eur J Hum Genet 2016;24(3):387-91.

【遺伝性腎疾患】 Bartter 症候群

/Gitelman 症候群 松野下 夏樹, 野津寛大, 飯島 一誠 日本腎臓学会誌 57, 4, 743-750, 2015

〔学会発表〕(計 0 件)

第 261 回日本小児科学会兵庫県地方会
西宮 2014.2.15

再発直後に肺炎球菌による敗血症を合併したネフローゼ症候群の一例

神吉直宙, 松野下夏樹, 大坪裕美, 忍頂寺毅史, 貝藤裕史, 野津寛大, 飯島一誠

第 117 回日本小児科学会学術集会 名古屋
2014.4.11-13

シクロスポリン投与下に再発をきたしたステロイド感受性ネフローゼ症候群の長期予後

忍頂寺毅史, 貝藤裕史, 神吉直宙, 松野下夏樹, 大坪裕美, 野津寛大, 中西浩一, 吉川徳茂, 飯島一誠

第 262 回日本小児科学会兵庫県地方会
神戸 2014.5.24

学校検尿で発見され、緩徐な経過を辿った特発性ネフローゼ症候群の 1 例

南川将吾, 神吉直宙, 松野下夏樹, 大坪裕美, 忍頂寺毅史, 貝藤裕史, 野津寛大, 飯島一誠

第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会
秋田 2014.6.5-7

フィブロネクチン腎症 (FN) における FN1 遺伝子変異の同定およびその機能解析に関する研究

大坪裕美, 岡田太郎, 梶本武利, 野津寛大, 神吉直宙, 松野下夏樹, 忍頂寺毅史, 貝藤裕史, 中村俊一, 飯島一誠

第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会

秋田 2014.6.5-7

遺伝性塩類喪失性尿細管機能異常症とその偽性症例の臨床的差異に関する検討

松野下夏樹, 野津寛大, 神吉直宙, 大坪裕美, 忍頂寺毅史, 貝藤裕史, 飯島一誠

第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会
秋田 2014.6.5-7

初診時高血圧を呈さず特発性ネフローゼ症候群との鑑別を要した腎血管性高血圧の 1 例

神吉直宙, 忍頂寺毅史, 松野下夏樹, 大坪裕美, 貝藤裕史, 野津寛大, 飯島一誠

第 57 回日本腎臓学会学術総会 横浜
2014.7.4-6

フィブロネクチン腎症における FN1 遺伝子変異の同定およびその機能解析に関する研究

大坪裕美, 野津寛大, 神吉直宙, 松野下夏樹, 忍頂寺毅史, 貝藤裕史, 飯島一誠

第 57 回日本腎臓学会学術総会 横浜
2014.7.4-6

遺伝性塩類喪失性尿細管機能異常症とその偽性症例の臨床的差異に関する検討

松野下夏樹, 野津寛大, 神吉直宙, 大坪裕美, 忍頂寺毅史, 貝藤裕史, 飯島一誠

第 21 回日本小児高血圧研究会 東京
2014.8.30

初診時高血圧を呈さず特発性ネフローゼ症候群との鑑別を要した腎血管性高血圧の 1 例

忍頂寺毅史, 南川将吾, 神吉直宙, 松野下夏樹, 大坪裕美, 貝藤裕史, 野津寛大, 飯島一誠

第 36 回日本小児腎不全学会学術集会
松江 2014.10.30-31

ステロイド及びシクロスポリンで完全寛解に至った巣状分節性糸球体硬化症 collapsing variant の1例
南川将吾, 忍頂寺毅史, 神吉直宙, 松野下夏樹, 大坪裕美, 貝藤裕史, 原 重雄, 野津寛大, 飯島一誠

American Society of Nephrology Kidney Week 2014 Philadelphia 2014.11.11-16

Autosomal Dominant Alport Syndrome: Molecular Analysis of the COL4A3/COL4A4 Genes and Clinical Outcome.

Kamiyoshi N, Nozu k, Matsunoshita N, Ohtsubo H, Ninchoji T, Kaito H, Nakanishi N, Yoshikawa N, Iijima K

XII Asian Congress of Pediatric Nephrology New Delhi 2014.12.4-6
Differential diagnosis of Bartter/Gitelman syndrome and pseudo-disorder based on clinical characteristics.

Matsunoshita N, Nozu K, Kamiyoshi N, Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K
〔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 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野下 夏樹 (Matsunoshita Natsuki)
神戸大学大学院医学研究科内科系講座
小児科学分野 医学研究員
研究者番号 : 26860800

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()