

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10057

研究課題名(和文) 本邦における巣状分節性糸球体硬化症の疫学と病態解明

研究課題名(英文) Epidemiology and pathological elucidation of focal segmental glomerulosclerosis in Japan

研究代表者

橋本 多恵子 (Hashimoto, Taeko)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30507629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：現在まで巣状分節性糸球体硬化症/ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群(FSGS/SRNS)には多数の原因遺伝子があるが日本人でのデータが非常に少ないことから日本人FSGS/SRNS患者にエクソーム解析を施行しFSGS/SRNSによる腎移植患者の半数に遺伝子変異が確認され、原因遺伝子としてNUP107が半数と最多であることを報告した。また、新規のNUP93 遺伝子変異の日本人FSGS症例を初めて報告し、その病原性の機能解析し報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患を起こしている原因遺伝子により治療方針や予後が大きく異なるため、その遺伝子診断が非常に重要である。また日本人は欧米人と違う遺伝的背景をもっており、将来的にクリニカルシーケンス体制を整えるために日本人データを蓄積していくことは必須であり、また今後もさらに継続する必要性がある。また、特に日本人特有の病原性不明なバリエーションについて、積極的に機能解析を追加することで意義不明な変異の病原性が明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：To date, there are many causative genes in focal segmental glomerulosclerosis / steroid-resistant nephrotic syndrome (FSGS / SRNS), however, there are very few data of Japanese people. Exome analysis was performed on Japanese FSGS / SRNS patients, and gene mutations confirmed in half of FSGS / SRNS renal transplant patients and reported that NUP107 gene was the most frequent causative gene. We also reported a Japanese FSGS case with a novel NUP93 gene mutation, and analyzed its pathogenic function.

研究分野：遺伝性腎疾患

キーワード：遺伝性腎疾患 エクソーム解析 ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 巣状分節性糸球体硬化症 クリニカルシーケンス 日本人遺伝的背景

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。

1. 研究開始当初の背景

ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 (SRNS) は、組織学的に巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) を呈し、小児期末期腎不全の主因であり、多くの遺伝子異常が報告されている。しかし、欧州で頻度が高いとされる遺伝子変異が我が国で少なく、欧米とは異なる疾患遺伝子の存在が疑われる。また、その欧米との異なる遺伝的背景から、日本人の、迅速かつ正確な遺伝子診断を遂行するためには、「日本人の遺伝的背景を明らかにし」「信頼性の高い日本人のデータベース」を作成する必要性が極めて高い。さらに、近年のゲノム解析技術の進歩により疾患関連遺伝子変異は多数検出される一方で、バリエーションの病原性が不十分なまま報告されるなどが相次ぎ、近年大きな問題となっている。遺伝子解析を進める一方で、特に日本人特有な遺伝子変異については機能解析を積極的に加えることにより、日本人の FSGS の遺伝的背景をより明らかにすることが迅速かつ正確な日本人の遺伝子診断への近道となる。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、「日本人特有の SRNS/FSGS 原因遺伝子・病因遺伝子変異に対する機能解析」による、日本人の遺伝子変異による FSGS (genetic FSGS) の遺伝的背景の解明であるが、それと同時に、臨床応用可能なクリニカルシーケンス体制の確立も目的とする。そのためには、日本人 genetic FSGS 原因遺伝子は欧米と大きく異なるため、病原性が明らかでないバリエーションに対しては積極的に機能解析をさらに加えて病原性の確認作業を進め、遺伝子診断材料として還元していくことが必須である。

3. 研究の方法

(1) 日本における FSGS 患者の臨床データ、gDNA の収集

SRNS 疾患遺伝子には多様性と民族特異性があり、日本における SRNS/FSGS の日本人の遺伝的背景は欧米と異なる可能性がある。日本人の遺伝子背景を明らかにするために、症例の収集が必要である。現在までに、我々は 33 症例の小児期発症 SRNS/FSGS 患者の臨床データと gDNA を収集しており、すでに 24 症例についてはすでに次世代シーケンサーでのエクソーム解析を終了している。

SRNS/FSGS 症例は自検例のみでは少数になるため、東京女子医科大学腎臓小児科 服部元史教授の協力を得て検体供与いただいているが、さらに症例数を増やす。

(2) 既知の SRNS/FSGS 遺伝子変異のなかでも新規の変異に関しては、発症因子としての可能性を検討するため、家系解析を行い、原因遺伝子の可能性と追及する。

また新しい病因遺伝子は日々報告が増加しているため、以前確認した症例についても、新規に病因遺伝子と判明したものについては、病因変異の有無について、再検討を行う。

(3) 病因遺伝子変異の可能性が高いもので新規のものに関しては、家系解析を追加し、またその分子の発現の有無や、臨床経過やデータでの齟齬の有無を確認していく。また、さらに培養細胞やトランスジェニックマウス等を使用した機能解析を行う。

4. 研究成果

我々は 2012 年から日本人小児 SRNS/FSGS 患者にエクソーム解析を施行し、当時の既報 SRNS/FSGS 原因遺伝子として報告されているものが、日本人小児 SRNS/FSGS 患者内に確認されるかどうかについてエクソーム解析を行い、日本人の特徴を初めて報告した (J Hum Genet. 2016)。

そのなかで、

LAMB2 遺伝子変異症例の機能解析と報告；

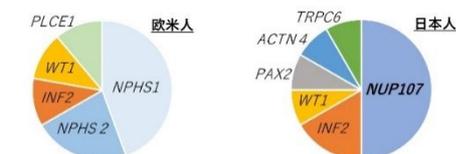
Pierson 症候群は、眼症状および神経精神症状を合併する先天性ネフローゼ症候群を特徴とし、その多くは truncation 変異 であるが、腎外症状が軽微な症例や孤発性腎症として発症する missense 変異症例も散見される。幼児期にネフローゼ症候群を発症し、腎外症状を認めないにもかかわらず、LAMB2 遺伝子変異 (p .[R469Q];[G699R]) を同定した。Pierson 症候群で見られる眼異常や筋症状、精神運動発達遅滞 などの腎外症状の出現はなく、大学卒業後現在公務員 として働いている。なお患児の腎生検標本における、LAMB2 の発現について免疫染色で確認したが、その染色性はなく、その発現低下が示唆された。LAMB2 遺伝子の P . R469Q は既報になく各種アルゴリズムにより機能喪失が予測される。一方で、p . G699R は機能喪失予測が比較的軽微で東アジアのアレル頻度が 1.2% と高く、データベース 上ホモ接合体の個人も存在する。アレル頻度が高くかつ機能喪失が軽微な変異であってもステロイド抵抗性フローゼの発症に關与する可能性があることを報告した (第 52 回日本小児腎臓病学会学術集会：東京：2017 年)

(i)新規 NUP107 遺伝子変異症例の報告：

2 歳時に血尿・蛋白尿 (lg/日程度) を指摘され、8 歳時の腎生検で FSGS と診断され、11 歳時に腹膜透析を導入し 15 歳時に献腎移植を受けた孤発例で新規 NUP107 遺伝子の変異 (c [2030G > A];[2492A > C]) を同定した。病因遺伝子産物の発現確認のために腎生検組織に免疫染色を施行したところ、NUP107 の著明な染色性の上昇を認めた。 (第 53 回日本小児腎臓病学会学術集会：福島：2018 年)

(ii)NUP107 変異の頻度情報収集：

その後、2016 年の段階で解析対象にしていなかった、新規原因遺伝子である NUP107 について再解析した結果、FSGS/SRNS による腎移植患者の半数に遺伝子変異が確認され、原因遺伝子として NUP107 が半数と最多(日本小児腎臓病学会学術集会：大阪：2019 年)であることを報告した。



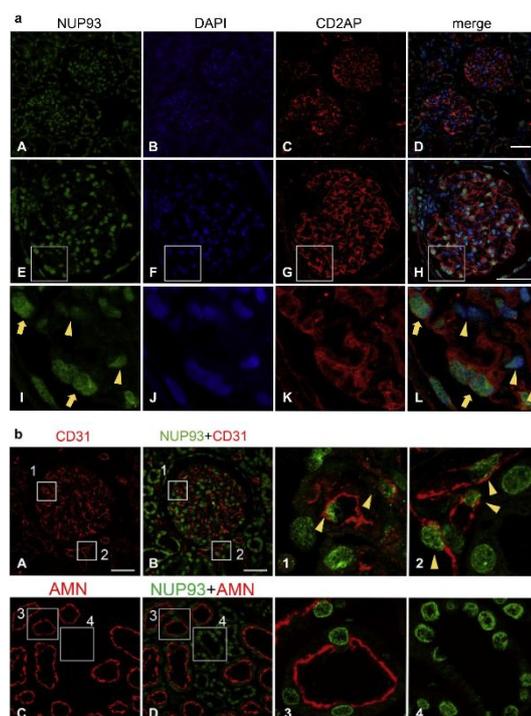
J Am Soc Nephrol 2019 2019年 日本小児腎臓病学会 (改編)
図1：腎移植に至った小児FSGS/SRNS患者の原因遺伝子の違い

新規 NUP93 遺伝子変異症例：日本人 FSGS 症例の初めて報告と機能解析

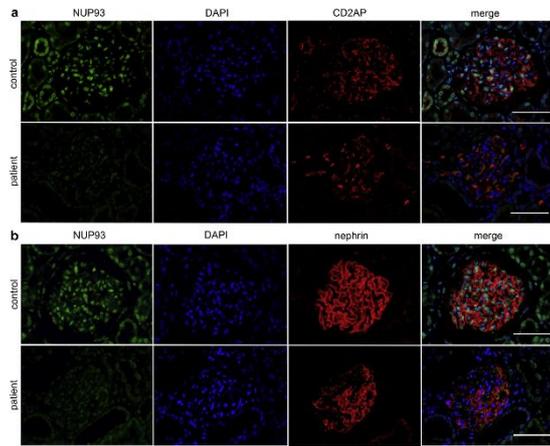
4 歳時に 血尿・蛋白尿 (2g/日) を指摘され、その後腎生検 FSGS と病理診断された。6 歳時には腹膜透析導入し 15 歳で生体腎移植を受けている。エクソーム解析により日本人 FSGS 患者では初めて NUP93 遺伝子の新規の変異 (c .[1573C > T];[1886 A > G]) を同定し、機能解析を試みた (Kidney Int Rep. 2019)。

まず初めに、ヒト腎組織における NUP93 の局在を確認したところ、FSGS の原因として広く知られているポドサイトの核のみならず、メサンギウム細胞や内皮細胞の核にも広く発現していた。(右図 a)

さらに尿細管間質における NUP93 の発現について確認したところ、近位尿細管や遠位尿細管上皮細胞の細胞核にも NUP93 が発現していることを明らかにした (右図 b)。



さらに、上記患者腎組織において NUP93 の発現の変化について確認したところ、その染色性は著明に低下していた。その染色性の低下は、ポドサイトの核のみならず、糸球体細胞全般と尿細管細胞の核でも同時にみられ、その変異に伴う変化と考えられた (右図 a.b)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Hashimoto Taeko, Harita Yutaka, Takizawa Keiichi, Urae Seiya, Ishizuka Kiyonobu, Miura Kenichiro, Horita Shigeru, Ogino Daisuke, Tamiya Gen, Ishida Hideki, Mitsui Tetsuo, Hayasaka Kiyoshi, Hattori Motoshi | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 In Vivo Expression of NUP93 and Its Alteration by NUP93 Mutations Causing Focal Segmental Glomerulosclerosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Kidney International Reports | 6. 最初と最後の頁 1312 ~ 1322 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2019.05.1157 | 査読の有無 無 |
| 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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Hashimoto T, Harita Y, Miura K, Ishizuka K, Akioka Y, Hisano M, Horie H, Matsumura C, Tamiya G, Ogino D, Mitsui T, Hayasaka K, Hattori M |
| 2. 発表標題 Clinicopathological characterization of steroid-resistant nephrotic syndrome caused by NUP107 mutations |
| 3. 学会等名 第16回日韓中小児腎セミナー 韓国、釜山（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 橋本多恵子、張田豊、三浦健一郎、石塚喜世伸、秋岡祐子、久野正貴、堀江弘、北村博司、 荻野大助、田宮元、山口裕、三井哲夫、早坂清、服部元史 |
| 2. 発表標題 Nucleoporin遺伝子変異を有するステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の臨床経過と分子病理像の解析 |
| 3. 学会等名 第53回日本小児腎臓病学会 学術集会 福島 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 橋本多恵子、張田豊、三浦健一郎、秋岡祐子、久野正貴、堀江弘、 荻野大助、田宮元、山口裕、三井哲夫、早坂清、服部元史 |
| 2. 発表標題 孤発性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群として発症したLAMB2変異例 |
| 3. 学会等名 第52回小児腎臓病学会 学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 橋本多恵子 |
| 2. 発表標題 ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群・巣状分節性糸球体硬化症におけるエクソーム解析 |
| 3. 学会等名 第119回日本小児科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 橋本多恵子 |
| 2. 発表標題 ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群・巣状分節性糸球体硬化症におけるエクソーム解析 |
| 3. 学会等名 第51回日本小児腎臓病学会学術集会 |
| 4. 発表年 2016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 | 沼倉 周彦 (Numakura Chikahiko) (00400549) | 山形大学・医学部・講師 (11501) | |
| 研究 分担者 | 早坂 清 (Hayasaka Kiyoshi) (20142961) | 山形大学・医学部・名誉教授 (11501) | |