

## 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 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22406027

研究課題名（和文）難治性腎疾患克服を目指す小児腎系球体硬化症のアジア国際共同調査

研究課題名（英文） International collaborative research on the etiology for intractable kidney disease children in East Asia

## 研究代表者

塚口 裕康 (TSUKAGUCHI HIROYASU)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号 60335792

研究成果の概要(和文):ステロイド抵抗性ネフローゼ(SRNS)は、小児腎不全の主因疾患である。アジア人には欧米と異なる SRNS 遺伝子の存在が疑われているが、その実体は不明である。そこで本研究ではアジア諸国(韓国、中国、台湾)で協力して家族性 SRNS 症例を収集し、疾患遺伝子を探索した。新生児~幼児期(3ヶ月-5歳)に発症する家族例 16、孤発例 10 で全ゲノム連鎖解析を行ったところ、疾患遺伝子座は数個検出され、原因遺伝子は複数存在する可能性が示唆された。優性遺伝 SRNS(発症年齢 10-20 歳)の 4 家系には、*INF2* 変異を同定した。疾患遺伝子が確定しない症例については、全エクソーム解析を行い、原因遺伝子を探索中である。

研究成果の概要(英文): Steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) is a major cause of end-stage renal disease in children. More than 10 SRNS disease genes have been reported to date. However, there is a considerable ethnic difference in the prevalence of the genes. In particular, the molecular basis of early childhood onset SRNS in Asian is still largely unknown. The aim of this study was to identify the disease genes highly specific to Asians through international collaboration. The linkage mapping 16 Asian SRNS families of recessive inheritance revealed several candidate loci with HLOD scores >3.0, suggesting that multiple genes rather than a single major gene may be involved. In 4 autosomal-dominant types of SRNS families, we found *INF2* mutations, which are reported to account for 10-20% of dominant SRNS in Caucasians and African Americans. Whole exome analysis is now being on progress to clarify the genes in other families in which genes are yet to be determined,

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：腎不全・疾患遺伝子・ネフローゼ・ポドサイト・シークエンス

## 1. 研究開始当初の背景

小児期腎不全の原因疾患は、欧米の報告では先天性腎尿路奇形が約半数を占め、さらに残

り約 1 割が糸球体疾患(臨床疾患名:ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: SRNS, 病理診断:巣状糸球体硬化症 FSGS)である(NAPRTCS, 2007, ItalKid 2003)。これに対し本邦の調査では、先天性腎尿路奇形が 45%、FSGS が 35%で、欧米と異なり糸球体疾患が多いのが特徴である(小児腎臓病学会 1998-2005)。

また欧州の調査では、1 歳以下の SRNS の大部分が *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *LAMB2* の 4 つの変異のいずれかで起こることが報告されている(APNS, 2007)。これに対し本邦 (Kitamura A, 2006) や韓国の調査 (Cheong, 2011) では、*NPHS2* がアジアでは欧州に比してきわめてまれであることが示されている。以上のことからアジア人の SRNS の遺伝学背景は欧州と違いがあり、診断治療の向上のためには、独自の cohorts を構築し病因を調べる必要がある。

## 2. 研究の目的

家族性 SRNS の家系構造は一般的に小さく、また疾患遺伝子は複数存在する (Genetic heterogeneity) がある。

したがって現状を打開して原因遺伝子を明らかにするには、国内の症例数 (30 例程度) では不足であり、海外共同研究による症例収集が必要である。

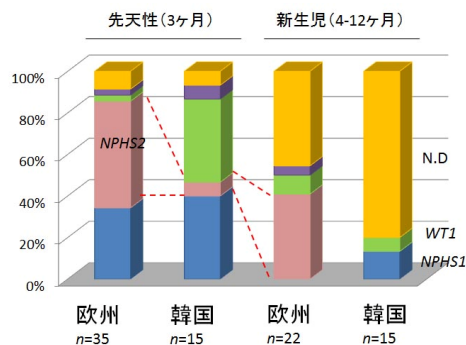


図 1 先天性と新生児 SRNS の原因遺伝子の欧州とアジアの比較 欧州では先天性 SRNS の約半数が *NPHS2* 変異によるものであるが、アジアではわずか数例の報告しかない。新生児期に発症する SRNS の大部分は、原因不明である。

そこで本研究では民族特異性が高いと推測される疾患遺伝子を明らかにすることを目的とし、アジアの研究拠点が相互連携して家族性 SRNS 症例を収集し、その疾患遺伝子を

探索した。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝学的解析

**連鎖解析:** マイクロサテライトマーカー (ABI linkage mapping set) を 20cM 間隔で配置してタイピングを行った。また Human SNP 6.0 マイクロアレイ (Affymetrix) で決定した遺伝子型を、Merlin プログラムを用いて、尤度 HLOD 値を計算した。連鎖が疑われる部分については、ハプロタイプ解析を行った。

**エクソーム解析:** SureSelect Kit (50Mb, Agilent) で全エクソームライブラリーを作成し、次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いて、paired-end 75bp, depth x30-50, total 5-6 Gb の条件で変異を検索した。リードのマッピング状況については、IGV ブラウザで目視にて確認した。

### Sanger シーケンシング:

PCR 直接サイクルシーケンシング法により塩基配列を決定した。アレル頻度は公共データベース (dbSNP137, 1000 Genomes) を参考にした。

(2) 候補遺伝子の意義付け: 候補遺伝子のヒト腎での局在を、免疫組織染色法で検討した。発現実験を行い、変異体の細胞生物学、生化学的特性を検討した。

**倫理的な配慮** 3 省合同の「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従った計画書を作成して本学倫理委員会の審査承認を受け (ヒ-0805 号)、カウンセリングを提供する体制を整えた。

## 4. 研究成果

### (1) 劣性遺伝家系の遺伝子解析

症例収集のために、3 カ国の海外共同研究者 Prof. Hae Il Cheong (Seoul National University Children's Hospital, Seoul), Hong Xu (Children's Hospital of Fudan University, Shanghai), Tzu-Hao Wang (Chang Gung Memorial Hospital, Taiwan) らと症例収集に関する打ち合わせを行った (学会発表 2)。

共同で収集した劣性遺伝 SRNS 症例 (図 2, 家族例 16、孤発例 10 例, Kitamura A 2006) で、全ゲノムのマイクロサテライトマーカーと SNP をタイピングし連鎖解析マッピングを行った。

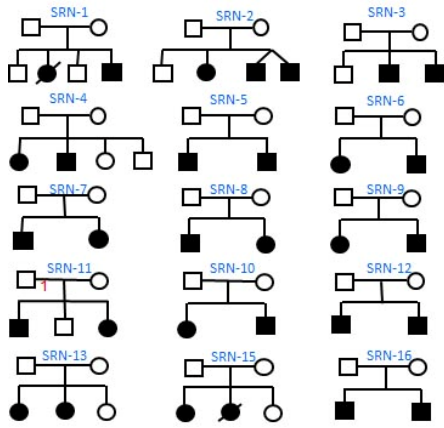


図2 *INF2* 変異による優性遺伝 SRNS の4家系

両親には異常はなく、劣性遺伝が疑われる。患児は3ヶ月-5歳に発症し、腎生検でFSGSの組織像が確認されている。多くは10歳までに末期腎不全になっているが、腎移植後の再発は認めていない。

疾患遺伝子座は数個検出されたが、いずれもHLOD 1.3-1.7, □□□□□□□□□□□□□□□□で、single major gene モデルよりも、oligo or polygenes モデルによく合致する結果となり、遺伝的な異質性が確認された。

候補領域のハプロタイプ解析では、患児はヘテロ接合体あり、共通のハプロタイプは見いだせなかった。欧州における同様の臨床像を呈するSRNSコホートの解析では、20-40%に*NPHS2*変異が検出されている。しかし本邦の症例では*NPHS2* locus 1q25には連鎖スコアのピークがなく、*NPHS2* 変異はアジアではまれであることがわかった。

### (2) 優性遺伝 SRNS の遺伝子解析

優性遺伝 SRNS (発症年齢10-20歳)の4家系には、inverted formin-2 (*INF2*) のヘテロ接合体ミスセンス変異を同定した (図3, 論文作成中、雑誌3), 学会5)。

原因変異はDID領域をコードする exon 2-4 に集中していた。*INF2* 変異は欧米の優性遺伝FSGS家系の10-20%に検出され、優性SRNS遺伝子としては最も頻度が高い。本邦でも優性遺伝で20歳までに腎不全に進展する症例に限定すれば *INF2* 変異が1割程度に検出される可能性があり症例を増やして検討中である。また *INF2* 変異は、SRNS と末梢神経変性症を合併するまれな症例の原因となることがわかっており、調査中である

(OMIM 614455 Charcot-Marie-Tooth Disease, dominant intermediate E; CMTDIE, 文献1)。

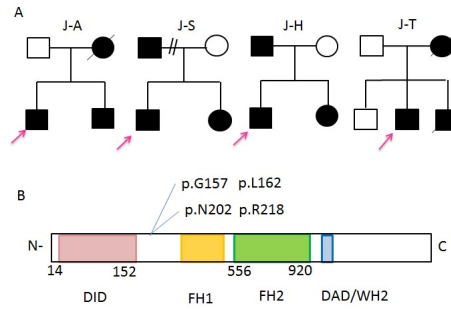


図3 *INF2* 変異による優性SRNS

A., 家系図 親子2世代に発症しており優性遺伝が考えられる。B., *INF2* のドメイン構造と変異部位 ミスセンス変異がN端側のDIDドメインに集中している。1個を除き、新規変異である。

### (3) 新規SRNS候補遺伝子群

現在、既知の3大疾患遺伝子

(*NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*) の変異を検出できなかった症例について、エクソーム解析を実施して原因を探索している。エクソーム解析では、一人当たり300-400個の一塩基置換が検出されるため、良性多型と病的変異との鑑別に難渋するケースに多く遭遇した。

たとえば *COL4A3*, 4, 5, *COQ2*, 6 などの既知SRNS 遺伝子群のミスセンス多型、あるいはミトコンドリア遺伝子のホモプラスミー点変異が、単独あるいは組み合わせで検出される症例が数例あった。これらの症例ではどれが病因変異かを特定するために、対照となる家系内健常人の検体を追加収集し segregation を確認するなど、慎重な検討を行っている。

全エクソーム解析の導入により変異探索を大幅に効率化できたが、キャプチャーにくいゲノム反復領域にある変異は、見逃されている可能性がある。また現行の次世代シーケンサー技術は100bpのショートリードであるため、短いIndelは検出できない。そのため細胞遺伝学マイクロアレイや、場合によっては全ゲノムシーケンセス、Sanger シーケンセスを併用し、さらなる探索を継続している。

### 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)

- (1) Toyota K, Ogino D, Hayashi M, Taki M, Saito K, Abe A, Hashimoto T, Umetsu K, Tsukaguchi H, Hayasaka K. *INF2* mutations

in Charcot-Marie-Tooth disease complicated with focal segmental glomerulosclerosis. *J Peripher Nerv Syst.* 18(1):97-98, 2013.  
doi: 10.1111/jns5.12014.

- (2) 山本準也, 中沢大悟, **塚口裕康**, 豊山貴之, 佐藤亜樹子, 中垣祐, 石川康暢 柴崎跡也, 西尾妙織, 渥美達也 フォルミン *INF2* 変異が同定された腎移植希望の家族性糸球体硬化症 (FSGS) の 1 例 日内会誌 102:1220-1222, 2013
- (3) Kimata T, Tsuji S, Yoshimura K, **Tsukaguchi H**, Kaneko K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-related glomerulonephritis in a child. *Pediatr Nephrol.* 27(11):2149-2152, 2012
- (4) **塚口裕康** ゲノムからみた慢性腎臓病の発症分子機序解明へのアプローチ 細胞 44(5):20-26, 2012 査読無

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Goto S, Hosomichi I, **Tsukaguchi H**, Inoue I, Narita I Exome sequencing identifies a novel EEA1 variant in Japanese familial IgA nephropathy (Abstr). ASN Renal Week San Diego, USA 査読有 Nov 1 to 4, 2012
- (2) **塚口裕康**, 金子一成, 木全貴久, 佐藤秀典 発達遅滞と無眼球症を主徴としたモザイク型 16 番染色体長腕トリソミーの一例 第 57 回日本人類遺伝学会、京王プラザホテル 10 月 24-26 日, 2012 年
- (3) **塚口裕康** 第 47 回日本小児腎臓病学会 招待教育講演 「ネフローゼの原因遺伝子探索」都市センターホテル 6 月 29-30 日, 2012 年
- (4) 上田啓子, **塚口裕康**, 日高義彦, 中沢大悟, 西尾沙織, 鈴木信夫, 岩田恭宣, 飯田博行, 岩坂壽二 家族性優性遺伝巣状糸球体硬化症におけるフォルミン *INF2*

変異の意義 第 55 回 日本腎臓学会学術総会 6 月 1-3 日 2012 年

- (5) 後藤眞, 成田一衛, **塚口裕康**, 井ノ上逸朗, 成田一衛 次世代シーケンサーを用いた腎臓病研究 第 55 回 日本腎臓学会学術総会 会長主導企画シンポジウム パシフィコ横浜, 6 月 1-3 日 2012 年
- (6) **Hiroyasu Tsukaguchi** 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research. "Molecular Genetics of Proteinuric Disorders", Seoul, Korea, May 16-18, 2012
- (7) **塚口裕康** 第 115 回 日本小児科学会 シンポジウム招待講演 「遺伝性・症候群ネフローゼ症候群の遺伝子解析」福岡国際会議場 4 月 20-22 日, 2012 年

[図書] (計 1 件)

- (1) **塚口裕康** Galloway-Mowat 症候群 (脳・腎糸球体異形成) 別冊 日本臨床 腎臓症候群(上): page 411-419, 2012

[その他]  
ホームページ等

腎尿路器系の稀少難治性疾患群に関する調査研究班  
[http://www.cis-trans.org/kobe\\_ku/research.html](http://www.cis-trans.org/kobe_ku/research.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
塚口 裕康 (TSUKAGUCHI HIROYASU)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号 60335792

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし