

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390212

研究課題名(和文)ネフローゼ症候群における蛋白尿発症機構への遺伝学的アプローチと機能的解明

研究課題名(英文)Elucidation to Pathogenetic Mechanism of Nephrotic Proteinuria through Genetic and Functional Analysis

研究代表者

野入 英世(NOIRI, Eisei)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00301820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、研究者は日本人ネ症のGWAS解析を行い、GPC5とSULF2を初めて同定し、マウスのネフローゼ症候群(ネ症)モデルを樹立して機能的な証明を行った。PLA2R1とHLA-DQ1は膜性腎症で疾患感受性遺伝子として欧米より報告されている。

本検討では、SULF2遺伝子欠損マウスのネ症でSULF2は保護的に働くことを見いだした。次に、膜性腎症でPLA2R1を網羅的解析し、日本人特有なSNPを初めて発見した。HLAの感受性領域と同SNPの交互作用は、リスクを17倍以上にすることが初めてわかった。本検討では、日本人固有なネ症の発症様式を見いだすと共に、ネ症に共通な経路を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Japan has 30,000 cases of intractable nephrotic syndrome (NS), which has a phenotype that is independent of pathological diagnosis. Recently, we found GPC5 and SULF2 from GWAS analysis of a Japanese NS cohort. Also, PLA2R1 and HLA-DQ1 are causal factors of primary NS. In this study, we generated BDF1 SULF2 deleted mice and subjected them to FGF2 and puromycin-induced mice NS. Results show that SULF2 plays a crucial protective role for proteinuria. GPC5 was also a susceptible gene in diabetic proteinuria. Genome-wide analysis of PLA2R1 found the new causal SNP in a Japanese cohort. HLA typing revealed the susceptible locus on NS. The interaction between PLA2R1 and HLA gene locus was found to have higher susceptibility to membranous nephropathy with odds ratio higher than 17. We are working now with the second cohort for validation. This project might prove the unique characteristics of Japanese NS cohort and elucidate the NS pathophysiology from the aspect of a common pathway on NS.

研究分野：腎臓病学

キーワード：ネフローゼ症候群 膜性腎症 糖尿病性腎症 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

研究チームは、ネフローゼ（ネ症）に共通な疾患感受性遺伝子をゲノムワイド関連解析法により世界に先駆けて検討し、複数の遺伝子が糸球体上皮細胞膜のヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）制御に関わることを、fibroblast growth factor (FGF)に関連した経路において示した (*Nat Genet* 43:459, 2011). この検討で発見し未解析の SULF2 についてゲノム解析精度を高めつつ機能的検討を行うと共に、GPC5 についても二次性ネ症において検討を行う。また、近年膜性腎症で疾患感受性遺伝子として関心が高まっている PLA₂R について、日本人ゲノムにおいて精査すると共に、同症は HLA 拘束性が高いことが分かっていること、病態が欧米と我が国で異なることから、HLA の網羅的解析を実施することで、我が国の膜性腎症における遺伝的背景が明確となる。ネフローゼに関する近年の代表的テーマをもとに検討を深める。

2. 研究の目的

難治性ネ症は本邦では頻度の高い疾患であり（推定患者数約 3 万）、種々の病態生理により最終共通経路である大量の蛋白尿を呈するに至る。従って、ネ症には大量蛋白尿制御と疾患発症制御の 2 方向からのアプローチが必要である。研究チームは、前者の観点からネ症患者を対象にゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、FGF 作用を修飾する 2 遺伝子（グリピカン [GPC], スルファターゼ [SULF]) を疾患感受性遺伝子として同定した。さらに、糸球体上皮細胞特異的に GPC5 遺伝子発現を減弱させると、マウスネ症モデルにおいて蛋白尿を大幅に低減できることが判明し、膜型機能性ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) の一つである GPC5 の重要性を世界で初めて証明した (*Nat Genet* 43:459, 2011). 更に、SULF 及び疾患感受性遺伝子 Gene X (オッズ比 3 以上, genomewide significance) を得ておりさらに研究を進める必要がある。疾患発症の観点からは、近年 PLA₂R と HLA-DQ1 がネ症の一角を占める膜性腎症発症に強く関与することが欧米より報告されたことを踏まえ、本研究では研究チームの保有するゲノム検体を用いて次世代遺伝子解析装置により遺伝子多様性を検討し、本邦でのネ症疾患感受性遺伝子、重症化や組織学的変容を惹起する多様性を検証する。本研究によりネ症の発症様式への理解を深め、最適な蛋白尿制御法、疾患制御に結びつく診断指標の発見を最終目標とする。

3. 研究の方法

GWAS, imputation 及び haplotype 解析, Ion Proton[™] System による Target region sequencing, BDF1 の SULF2 遺伝子欠損マウス及び AKITA マウスで糸球体上皮細胞の GPC5 をノックダウンしたマウス作出、マウスネ症モデル (puromycin + FGF2) 及びその効果判

定のためのマウスアルブミン尿測定, GCP5, FGFR1~4 に対する免染, RealTime PCR 等により解析を行った。

[参照: *Nat Genet* 43:459, 2011, *Am J Pathol* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.025>]

4. 研究成果

1. 疾患感受性遺伝子内候補領域の絞込み

これまでの解析では、Tag SNP の rs11086243 のみにより判断されていたが、その位置は SULF2 遺伝子と PREX1 遺伝子の間で、SULF2 遺伝子の約 400kb 上流に位置し、SULF2 の causal SNP と呼びにくい状況でもあった。そこで SULF2 に近い領域を詳細に解析し、特に imputation analysis で p<0.05 を満たした SNP とそれらの LD ブロック内で 24 SNP で解析した (表 1 : SNP は伏字表記)。

表 1 24SNP による imputation analysis

CHR	SNP	Position	P value	MAF
20	rs6066508	45919496	0.00105	0.456
20	rs4289248	45971615	0.00194	0.262
20	rs4810720	45913931	0.00211	0.419
20	rs12480162	45908442	0.00299	0.377
20	rs6063186	46019143	0.00301	0.459
20	SNP A		0.00348	0.222

更に、genotyping を行ったところ、新たな SNP A が統計学的に有意であることが分かった (表 2 : SNP は伏字表記)。

表 2 Imputation analysis で得られた 6SNP の genotyping の結果

SNP A	Allele Model				Dominant Model			
	A	A	OR	Pvalue	AA+Aa	Aa	OR	Pvalue
Case	317	71	1.42	0.031	136	58	1.536	0.029
Control	437	139			174	114		
rs6063186	A	A	OR	Pvalue	AA+Aa	Aa	OR	Pvalue
Case	190	190	1.106	N.S.	139	51	1.016	N.S.
Control	293	265			205	74		
rs12480162	A	A	OR	Pvalue	AA+Aa	Aa	OR	Pvalue
Case	261	141	1.206	N.S.	177	24	1.115	N.S.
Control	395	177			255	31		
rs6066508	A	A	OR	Pvalue	AA+Aa	Aa	OR	Pvalue
Case	218	176	1.145	N.S.	137	60	0.84	N.S.
Control	332	234			186	97		
rs4289248	A	A	OR	Pvalue	AA+Aa	Aa	OR	Pvalue
Case	273	125	1.009	N.S.	105	94	1.045	N.S.
Control	368	170			139	130		
	A	A	OR	Pvalue	AA+Aa	Aa	OR	Pvalue
Case	187	213	1.201	N.S.	158	42	1.209	N.S.
Control	239	327			232	51		

全ての genotype data を用いて行った haplotype 解析では、次の組合せがネフローゼ発症群と最も強く統計学的に関連していた (表 3 : SNP は伏字表記)。

表3. ハプロタイプ解析 (rs11086243-SNPA)

Haplotype	Frequency in Case (%)	Frequency in Control (%)	χ^2	Permutation P value
X1-X3	54.4	45.5	7.651	0.0088

次世代型遺伝子解析装置のターゲットリージョンシーケンス法を用いて、X1-X3を含む1,000kbのregion wide sequencingを実施するために、第20番染色体上の疾患感受性遺伝子SULF2の候補領域絞り込み及びネ症重症化に関わる多様性新規配列を上述の遺伝子群で同定を試みた。Ion Proton™ Systemを用いてCase 14, Control 14サンプルずつで複数サンプルでのPI chipランを行っている。カバー率は93.24%である。繰り返し配列やマイクロサテライト部分があるため、2つのallele間を100%決定することは、報告書作成時期にはまだ出来ていない。

2. SULF 及び Gene X の遺伝子トラップマウスを作製開始

SULF2 遺伝子欠損マウスを、C57/B6 バックグラウンドで導入し、FGF2 と puromycin を用いたマウスにおけるネフローゼモデル惹起を試みたが、バックグラウンドの影響でアルブミン尿としての検出が可能となるレベルであったため、これまでの実験系に合わせたBDF1を取得するべくC57/B6をDBAバックグラウンド化した。実際には7世代DBAとバッククロスし、DBA化を行った上で、C57/B6とクロスしてBDF1のSULF2遺伝子欠損マウスを取得した。これにより、FGF2とpuromycinを用いた検討で0.3~0.7PCRの尿蛋白を認め、SULF2遺伝子欠損による効果が確認された。尚、Gene XについてはBDF1作出に、当初の予想をはるかに上回る時間と費用を要した。そのため、今回の検討内容に含めることは出来なかった。

3. 二次性ネフローゼ症候群における検討

GPC5は、ネフローゼ症候群の増悪に関連するcommon pathwayにのっている遺伝子である。糖尿病性腎症は、2型の場合に発症から15年程度で腎機能が廃絶して血液透析へと至ると、教科書的に書かれている。その過程では、一旦糸球体濾過量の過剰な時期を経て、正常化して、その後に腎機能が低下し出すと一機に進むというイメージをもたれている。そして、タンパク尿は、当初は軽微な微量アルブミン尿として覚知され、その後に明確なアルブミン尿を示す時期となり、更にタンパク尿として顕在化して腎機能廃絶に向かう。しかし、このような病態の進度には個体差がかなりあることも、臨床家のよく知るところである。糖尿病性腎症でネフローゼの基準を満たす症例では、急速に腎機能が低下して血液透析治療へと向かうことが知られており、そのようなコホートでGPC5は疾患感受性遺伝子となり、OR 1.45を示すことが研究チームでは分かっていた。

そこで、GPC5をヒト2型糖尿病の腎組織で調べると、図1(A)のようにGPC5の免染で陽性所見をみとめた。ここで緑色のGPC5は、糸球体上皮細胞特有に発現する赤色のネフリンと共染色している場所と、単独で発現している場所があることより、2型糖尿病由来の腎症では、傍メサンギウム領域でのGPC5の染色も認められることが分かった。

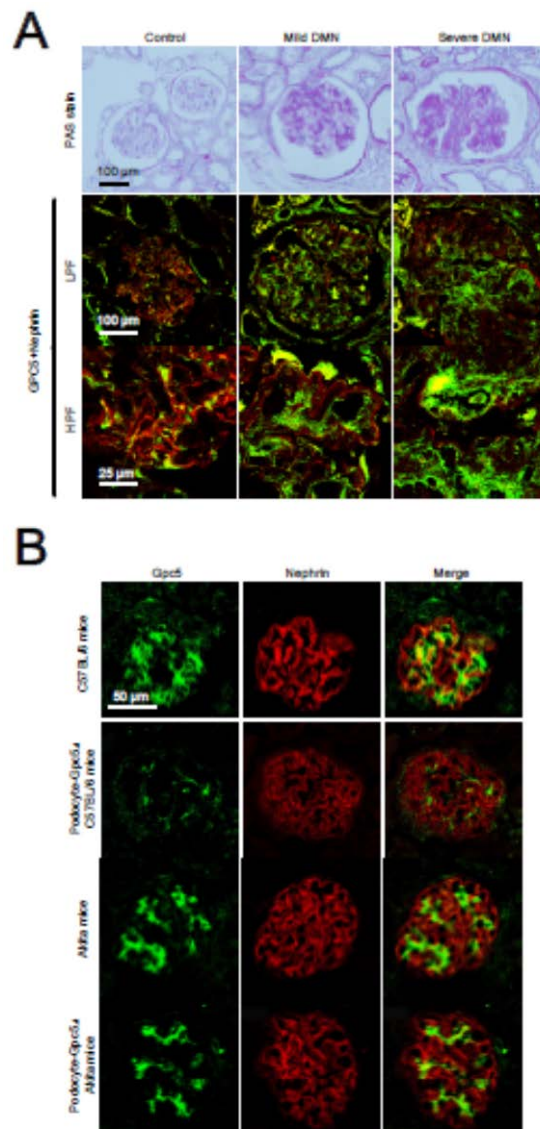


図1 GPC5とネフリンの免染

この点を明確にするために、研究チームでは糖尿病発症マウスとしてよく知られているAkitaマウスをGPC5 knockdownマウス(Podocyte-GPC5 Δ)と交配し、ヘテロ同士の掛け合わせをスクリーニングして、AKITAマウスで糸球体上皮細胞のGPC5をノックダウンしたマウス(Podocyte-GPC5 Δ Akita)を作出した。それらのマウスでのGPC5とネフリンの局在を同様に調べると、Podocyte-GPC5 Δ では糸球体上皮細胞での発現は明確に落としているが、糖尿病性腎症を生じるAkitaバックグラウンドのPodocyte-GPC5 Δ AkitaではGPC5の陽性所見が散見され(図1B)、傍メサンギウム領域に

合致する所見であることが直接的に証明された。更に研究チームでは、糖尿病性腎症において FGF 受容体 (FGFR) の発現が、特に FGFR3, FGFR4 において、糖毒性の増加に伴い発現が上昇することを、初めて見いだした。そのため、既報告のマウスネフローゼモデルでは、FGF と puromycin を用いてネフローゼを惹起していたが、同様な誘導が糖尿病性腎症では可能である可能性が示唆された (図 2)。

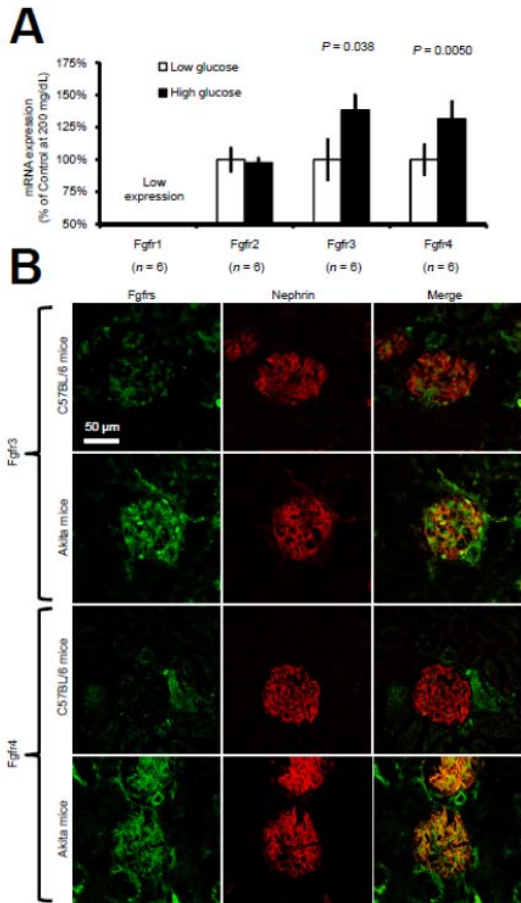


図 2 FGF 受容体とネフリンの染色

尚、ここでは puromycin を用いていない。C57/B6 には、種々の手法でのタンパク尿誘導が不十分な歴史的背景がある。ここでも、FGF2 の刺激によるタンパク尿誘導はないことがわかる。一方、Akita では誘導がかかっており、GPC5 をノックダウンしておくことで、その制御が可能となり、正常化することが示された (図 3)。

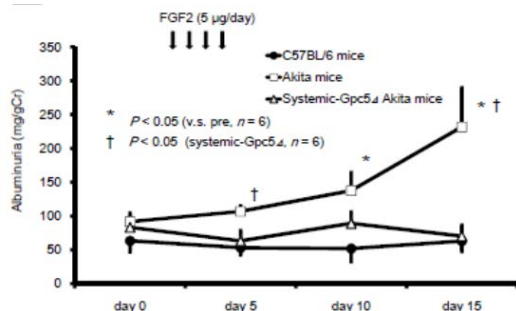


図 3 Gpc5-K0 による糖尿病性腎症の制御

このように、糖尿病性腎症でタンパク尿がネフローゼレベルに誘導されて、一機に増悪する場合には、GPC5 を介した原発性ネフローゼ症候群と同じメカニズムが働いていると考えられる。

4. 日本人膜性腎症の疾患感受性遺伝子検討

Phospholipase A2 receptor 1 (PLA₂R1) は特異性膜性腎症症例の 75% に認められる血清タンパクとして同定され、健常人や二次性膜性腎症では検出されない。膜性腎症の疾患感受性遺伝子として、人種を越えて保存されている可能性が高い。その一方で、膜性腎症は発症・増悪・腎機能廃絶の表現型は、人種によって異なることが知られているため、遺伝学的検討の必要性が高いと思われる分野である。本遺伝子は統計学的に非常に高い疾患感受性を示しているため、SNP 解析としては、ある意味お気楽に genome wide significance 相当を示すいくつかの SNP を遺伝子上に掴むことができる。しかし、その部位(どこに peak があるのかなど)は必ずしも定まっていない。そして、これまでの major な報告においても fine mapping に積極的に取り組んだ情報が乏しく、日本人においては全く行われたことはなかった。一方、日本における膜性腎症のゲノムの集積は多くない。研究チームで保有している確診症例 53 と健常人 420 において当該遺伝子の 12 タグ SNP 及び既報告 3SNP について genotyping を行って更に多変量解析を行った。表 4 (次頁) に示したように太線より上が genome wide significance を有意に越える SNP で、特に薄緑色で示した SNP は本解析で新たに発見したものである(但し、SNP は伏字表記)。更に、同一 LD 内の有意な SNP によるハプロ解析は表 5 (次頁) のようになる。H1, H2 では膜性腎症側に頻度が高く、risk haplotype と考えられ、一方で H3 は健常者での頻度が高く、protective haplotype と見做すことができる。

表 4. 膜性腎症における PLA₂R1 遺伝子多型

SNP	Position	Allele	IMN n=53	健常人 n=420	OR (95%CI)	p-value
A	intronic	A	52	199	3.07	3.33×10 ⁻⁸
		C	(49.1%)	(23.9%)	(2.03 – 4.64)	
		54	635	(76.1%)		
B	5' UTR	T	16	356	0.25	1.31×10 ⁻⁷
		C	(15.7%)	(42.8%)	(0.14 – 0.43)	
		86	476	(84.3%)	(57.2%)	
C	intronic	C	75	378	3.12	2.53×10 ⁻⁷
		T	(72.1%)	(45.3%)	(1.99 – 4.89)	
		29	456	(27.9%)	(54.7%)	
D	missense	C	19	367	0.28	3.01×10 ⁻⁷
		G	(17.9%)	(43.9%)	(0.17 – 0.47)	
		87	469	(82.1%)	(56.1%)	
E	intronic	T	30	126	2.25	4.72×10 ⁻⁴
		C	(28.8%)	(15.3%)	(1.42 – 3.58)	
		74	700	(71.2%)	(84.7%)	
F	intronic	G	66	390	0.47	7.83×10 ⁻⁴
		A	(67.3%)	(49.4%)	(0.3 – 0.74)	
		32	400	(32.7%)	(50.6%)	
G	3' UTR	C	18	261	0.45	2.17×10 ⁻³
		A	(17.0%)	(31.4%)	(0.26 – 0.76)	
		88	569	(83.0%)	(68.6%)	

表 5. 上記 PLA₂R1 のハプロ解析

SNP	Haplotype					Case freq. (n=53)	Cont. freq. (n=420)	P-value	OR (95%CI)
	E	A	F	C	B				
H1	T	A	A	C	C	0.283	0.148	4.07×10 ⁻⁴	2.28 (1.18–4.39)
H2	C	A	G	C	C	0.164	0.067	4.21×10 ⁻⁴	2.86 (1.27–6.46)
H3	C	C	G	T	T	0.169	0.423	5.15×10 ⁻⁷	0.28 (0.13–0.59)
H4	C	C	A	C	C	0.229	0.211	0.66	1.10 (0.56–2.19)
H5	C	C	A	T	C	0.110	0.111	0.97	1.01 (0.41–2.50)

次に HLA 領域との関連を検討したのが表 6 である。ここでは、Top 5 を記述した (但し、SNP は伏字表記)。

表 6. HLA allele と膜性腎症の関連

HLA allele	膜性腎症 (n=106)	健常人 (n=840)	P-value	OR (95%CI)
DR_A	21 (19.8%)	62 (7.4%)	2.02×10 ⁻⁵	3.10 (1.80–5.34)
DQ_B	19 (17.9%)	61 (7.3%)	2.01×10 ⁻⁴	2.79 (1.59–4.89)
Cw_C	5 (4.7%)	7 (0.8%)	5.79×10 ⁻³	5.89 (1.84–18.91)
B*_D	1 (0.9%)	53 (6.3%)	9.73×10 ⁻³	0.14 (0.02–1.03)
DR_E	3 (2.8%)	2 (0.2%)	1.09×10 ⁻²	12.20 (2.02–73.9)

そこで次に、HLA と PLA₂R1 の代表的な risk allele 同士の交互作用を検討して、オッズ比の高い順にその組合せを表 7 に示した。ここで、HLA と PLA₂R1 の両者が陽性の場合には、オッズ比は 17.4 倍にまで上りうるが示されている (但し、SNP は伏字表記)。

表 7. HLA と PLA₂R1 の risk allele の交互作用の代表例

HLA-DR_A -DQ_B	PLA ₂ R1 SNP A	膜性腎症 (n=53)	健常人 (n=420)	P-value	OR (95%CI)
+	+	4 (7.5%)	3 (0.7%)	9.70×10 ⁻⁴	17.44 (3.7–82.08)
+	–	12 (22.6%)	58 (13.8%)	6.37×10 ⁻³	2.71 (1.29–5.66)
–	+	9 (17.0%)	18 (4.3%)	1.62×10 ⁻⁴	6.54 (2.67–15.99)
–	–	26 (49.1%)	340 (81.0%)		1

確認検討を行うために、BioBank Japan より原発性膜性腎症症例 130 症例の分譲依頼手続きを行い、慎重な評価討議を経て平成 26 年 3 月に入手した。現在、上記についての validation を進めている。

まとめ

研究期間内に提案したほぼ全てにおいて、プロセスを示すことができたと思われる。特に、現在論文作製中ではあるが、SULF 遺伝子欠損マウスを BDF1 を作出することで、明確な結果を得ることが出来た。この研究過程で、SULF は Wnt/ β catenin のシグナル伝達に関与して腎症増悪を来すことがわかり、その downstream では BNP6 とその更に下流のタンパク群が重要な役割を果たすことがわかりつつあり、今後の研究課題である。また二次性ネフローゼの代表格で、成人病でも重要な糖尿病性腎症において、ネフローゼを呈して増悪する場合には、GPC5 が重要な役割を果たしていることが示された。これは Am J Pathol に in press の状況である (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.025> 参照)。そして、膜性腎症のゲノム解析では、近年注目を集めている PLA₂R1 と、HLA の関与が示され、特に日本人独自の両遺伝子の交互作用がありそうであることが示されつつあり、腎臓病学のみならず人類遺伝学的にも極めて興味深いと思われる。

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 3件)

1. Okamoto K, Honda K, Doi K, Ishizu T, Katagiri D, Wada T, Tomita K, Ohtake T, Kaneko T, Kobayashi S, Nangaku M, Tokunaga K, Noiri E: Glypican-5 increases susceptibility to nephrotic damage in diabetic kidney. **Am J Pathol** (in press)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.025>
2. Doi K., Ishizu T, Tsukamoto-Sumida M, Hiruma T, Yamashita T, Ogasawara E, Hamasaki Y, Yahagi N, Nangaku M, Noiri E: The high-mobility group B1-toll-like receptor 4 pathway contributes to the acute lung injury induced by bilateral nephrectomy. **Kidney Int** 86:316, 2014
3. Katagiri D, Hamasaki Y, Doi K, Okamoto K, Negishi K, Nangaku M, Noiri E: Protection of glucagon-like peptide-1 in cisplatin-induced renal injury elucidates gut-kidney connectio. **J Am Soc Nephrol** 24:2034, 2013

[学会発表] (計 1件)

米国腎臓学会Kidney Week 2014, Cell Biology: Glomerular II
Nov. 15th. Sat. 10AM-
Sulfatase 2, Identified By Genome Association Analysis, Contributes to Protection against Nephrotic Syndrome
Kenjiro Honda, MD, PhD, Koji Okamoto, MD, PhD, Kent Doi, MD, PhD, FASN, Masaomi Nangaku, MD, PhD, Katsushi Tokunaga, Eisei Noiri, MD, PhD, FASN.
Nephrology and Endocrinology, The University of Tokyo, Tokyo, Tokyo, Japan; Kidney section, NIDDK/NIH, Bethesda, MD, United States; Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Tokyo, Japan.

[図書] (計 1件)

Noiri E & Minami K: Part I-5 Nitric oxide and endothelial dysfunction. In Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Eds; Armstrong D, Tsukahara H, and Kaneko K, **Humana Press**, New York, 2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

[その他]

特記なし.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野入 英世 (NOIRI, Eisei)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 00301820

(2) 研究分担者

徳永 勝士 (TOKUNAGA, Katsushi)
東京大学・医学部・教授
研究者番号: 40163977

岡本 好司 (OKAMOTO, Koji)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80572247

土井 研人 (DOI, Kent)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80505892

濱崎 敬文 (HAMASAKI, Yoshifumi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20617774

根岸 康介 (NEGISHI, Kosuke)
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
研究者番号: 40572219

(3) 連携研究者 なし