

令和元年6月17日現在

機関番号：34417  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2016～2018  
 課題番号：16K10066  
 研究課題名(和文) 小児ステロイド抵抗性ネフローゼの疾患遺伝子パネル構築と免疫因子検査体制の整備  
  
 研究課題名(英文) Establishment of the targeted NGS panel and the associated immune factors-test system for SRNS  
  
 研究代表者  
 庄野 朱美 (SHONO, Akemi)  
  
 関西医科大学・医学部・研究員  
  
 研究者番号：10535066  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：全国の協力医療機関から先天性・乳児NS、およびSRNS症例の臨床検体を収集の上、臨床データベースの構築を行い、既知SRNS・FSGS責任遺伝子(43-49遺伝子)のエクソンおよびエクソン-イントロン境界領域を対象とした疾患パネルの作製と、次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスを実施した。2018年度までに219症例を解析し、67症例で責任遺伝子を同定した。2017年度以降は、寛解導入を一度でも認めた症例は解析から除外したため、同定率は30%以上で推移している(2016年度26%)。欧州・米国で確認されるNPHS2遺伝子の変異症例は認めず、人種差を反映する結果となった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

欧州・米国・韓国においては、すでいくつかSRNS/FSGS疾患パネルを用いた遺伝子解析と腎生検による病理学的組織所見や予後、長期フォローアップデータを統計学的にまとめた報告が出てきており、それを基にした治療方針の決定などが成されてきている。しかし、本邦では解析症例数の少なさと包括的データベースの構築が追いついておらず、患者背景や疾患発症機序に基づく検査診断体制の整備が立ち後れているのが現状である。本研究により、遺伝情報と免疫応答による複合的病態理解が進めば、副作用の少ない疾患特異的治療の開発につながり、患者QOLの向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：This research design was approved by the Institutional Review Board of Kobe University School of Medicine, and the participants-derived samples and data from all affiliated institutes in Japan were collected by obtaining their written informed consents. Genetic analysis using the targeted next generation sequencing panel (43-49 genes for SRNS/FSGS) was conducted on the affected individuals with congenital and infantile nephrotic syndrome, and steroid resistant nephrotic syndrome. The candidate mutations and their genetic segregation were confirmed by the Sanger sequencing. The causative genes were identified in an approximately 30% of the recruited familial or sporadic cases (67 out of 219 cases) to date. NPHS2 mutations were not identified in this study so far, resulting in reflection of the racial differences in the incidence compared to the Europe and the United states as reported.

研究分野：遺伝性腎疾患

キーワード：遺伝性腎疾患 ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 次世代シーケンサー 疾患パネル解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群 (NS) は、腎糸球体濾過障壁構造の破綻により、高度蛋白尿、低アルブミン血症および全身性浮腫を主徴とするで、小児 NS 有病率は 12-16/100,000 人である。小児特発性 NS (INS) の約 90% はステロイド治療で寛解し予後良好であるが、約 10% はステロイド抵抗性 (SRNS) で、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) の病理像を示し、免疫抑制療法で反応不良の場合、約 40% が末期腎不全へと進行する。治療抵抗性に多様性を持つ小児 SRNS は、副作用の多いステロイドと免疫抑制薬による治療低減を図ることが重要であるが、現在発症機序に基づく検査とそれに則した治療法の確立が立ち後れている。

### 2. 研究の目的

小児 SRNS は約 30% が糸球体上皮細胞の遺伝子変異が主因とされ、また、INS の発症には、糸球体透過性亢進因子、サイトカイン、自己抗体など多くの病態と相関性を示す液性因子が報告されてきている。このように小児 SRNS 発症には、遺伝学的機序と免疫学的機序の二つの機序が関与していることから、本研究は、全国レベルで小児特発性 SRNS の遺伝子解析と発症に関与する液性因子の解析、およびその作用機序の解明を行い、発症機序に基づく、検査体制の整備を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 倫理委員会による研究計画承認後、全国医療機関から先天性・乳児 NS、および SRNS 症例の臨床検体を収集し、臨床データベースの構築を行った。(2) 既知 SRNS・FSGS 責任遺伝子 (43-49 遺伝子) のエクソンおよびエクソン-イントロン境界領域を対象とした疾患パネルの作製と、次世代シーケンサー (NGS) を用いたターゲットリシーケンスを実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝学的解析

2018 年度までに収集した SRNS 219 症例を解析し、67 症例で原因遺伝子を同定した (図)。2017 年度以降は、寛解導入を一度でも認めた症例を解析から除外したため、現時点で同定率は欧州・米国からの報告同様に 30% 以上で推移している (2016 年度 26%)。原因遺伝子を同定した 67 症例中に NPHS2 遺伝子の変異症例はなく、SRNS 責任遺伝子は人種差が存在することを裏打ちする結果となった。また、近年日本人と韓国人の家系で発見された NUP107 遺伝子 (Miyake et al. Am J Hum Genet. 2015) は 67 家系中 3 家系 (4.4%) で同定されているが、

原因遺伝子	家系
WT1	17
NPHS1, INF2	8
LAMB2, TRPC6	6
ADCK4	4
NUP107	3
LMX1B, ACTN4, PAX2, COL4A5	2
COQ6, FAT1, PLCE1, SMARCAL1, TT21B, MYH9, CUBN	1

(図) パネル解析結果 (219家系中67家系; 31%)

これまでの解析で同定された変異に多様性が乏しいため、創始者効果との関連が想定される。本研究の収集症例数には含まれていないが、本邦医療機関を受診したロシア人 1 家系で NUP93 遺伝子を原因遺伝子として同定し報告した (Rossanti and Shono et al., J Hum Genet. 2019)。これは、NPHS2 遺伝子同様、NUP 関連遺伝子にも人種差が存在することを示唆している。

本研究で同定した原因遺伝子の中でも、COQ6 遺伝子や ADCK4 遺伝子の変異は、ミトコンドリアのエネルギー産生に必須な補酵素 CoQ10 の合成異常を引き起こすため、早期の診断と治療介入 (CoQ10 経口補充療法) が可能な場合、治療や腎予後および患者 QOL に大きく影響する例であり、疾患パネル解析の有用性を鑑みることができる。実際に、COQ6 遺伝子変異と ADCK4 遺伝子変異を同定した各 1 症例について、CoQ10 補充療法により尿蛋白が減少したとの報告を受けている。

また、NGS による疾患パネル解析のみでは片側アレル変異しか同定できず、カスタム CGH アレイ解析により微細欠失を検出して、原因遺伝子の同定に至った例も存在する。さらに、スプライシングに関与するイントロン部位の変異等については、エクソンをターゲットとしているパネル解析では検出が難しく、RNA を解析して初めてスプライシング異常を同定できる症例も経験している。したがって、遺伝型-表現型相関が得られない場合は、パネル解析だけではなく、その他の解析手法と組み合わせることで遺伝子異常等を検証することが重要である。

本邦では、統計学的解析を行うための症例数を収集するには時間を要すると予想されるが、今後さらに症例を収集し、原因遺伝子やその変異、腎生検病理組織や予後フォローアップなどのデータを蓄積することで、治療につながる統計学的な相関解析を実施していきたい。

#### (2) 免疫学的解析

我々のグループでは近年、微小変化型 NS の診断マーカー候補である尿中 CD80 について遺伝性疾患を含めた他の腎疾患とその特異性について比較解析を行ったが、微小変化型 NS に対する顕著な有用性は確認できなかった (Minamikawa et al., Sci Rep. 2018)。小児 SRNS 発症に関与する免疫学的機序については、今後さらに、新規液性因子の探索や腎病態との関連を詳細に検討していく必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 13件)

- Rossanti R, Shono A, Miura K, Hattori M, Yamamura T, Nakanishi K, Minamikawa S, Fujimura J, Horinouchi T, Nagano C, Sakakibara N, Kaito H, Nagase H, Morisada N, Asanuma K, Matsuo M, Nozu K, Iijima K. Molecular assay for an intronic variant in NUP93 that causes steroid resistant nephrotic syndrome. *J Hum Genet*. 2019. doi: 10.1038/s10038-019-0606-4. (査読有)
- Sakakibara N, Morisada N, Nozu K, Nagatani K, Ohta T, Shimizu J, Wada T, Shima Y, Yamamura T, Minamikawa S, Fujimura J, Horinouchi T, Nagano C, Shono A, Ye MJ, Nozu Y, Nakanishi K, Iijima K. Clinical spectrum of male patients with OFD1 mutations. *J Hum Genet*. 2019 ;64(1):3-9. doi: 10.1038/s10038-018-0532-x. (査読有)
- Jia X, Horinouchi T, Hitomi Y, Shono A, Khor SS, Omae Y, Kojima K, Kawai Y, Nagasaki M, Kaku Y, Okamoto T, Ohwada Y, Ohta K, Okuda Y, Fujimaru R, Hatae K, Kumagai N, Sawanobori E, Nakazato H, Ohtsuka Y, Nakanishi K, Shima Y, Tanaka R, Ashida A, Kamei K, Ishikura K, Nozu K, Tokunaga K, Iijima K; Research Consortium on Genetics of Childhood Idiopathic Nephrotic Syndrome in Japan. Strong Association of the HLA-DR/DQ Locus with Childhood Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome in the Japanese Population. *J Am Soc Nephrol*. 2018 ;29(8):2189-2199. doi: 10.1681/ASN.2017080859. (査読有)
- Watanabe S, Aizawa T, Tsukaguchi H, Tsugawa K, Tsuruga K, Shono A, Nozu K, Iijima K, Joh K, Tanaka H. Long-term clinicopathologic observation in a case of steroid-resistant nephrotic syndrome caused by a novel Crumbs homolog 2 mutation. *Nephrology (Carlton)*. 2018 ;23(7):697-702. doi: 10.1111/nep.13244. (査読有)
- Yamamura T, Nozu K, Fu XJ, Nozu Y, Ye MJ, Shono A, Yamanouchi S, Minamikawa S, Morisada N, Nakanishi K, Shima Y, Yoshikawa N, Ninchoji T, Morioka I, Kaito H, Iijima K. Natural History and Genotype-Phenotype Correlation in Female X-Linked Alport Syndrome. *Kidney Int Rep*. 2017 ;2(5):850-855. doi: 10.1016/j.ekir.2017.04.011. (査読有)
- Uemura S, Nishimura N, Hasegawa D, Shono A, Sakaguchi K, Matsumoto H, Nakamachi Y, Saegusa J, Yokoi T, Tahara T, Tamura A, Yamamoto N, Saito A, Kozaki A, Kishimoto K, Ishida T, Nino N, Takafuji S, Mori T, Iijima K, Kosaka Y. ETV6-ABL1 fusion combined with monosomy 7 in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2018 ;107(5):604-609. doi: 10.1007/s12185-017-2371-5. (査読有)
- Iwatani S, Shono A, Yoshida M, Yamana K, Thwin KKM, Kuroda J, Kurokawa D, Koda T, Nishida K, Ikuta T, Fujioka K, Mizobuchi M, Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Iijima K, Nishimura N. Involvement of WNT Signaling in the Regulation of Gestational Age-Dependent Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation. *Stem Cells Int*. 2017;2017:8749751. doi: 10.1155/2017/8749751. (査読有)
- Yokota K, Nozu K, Minamikawa S, Yamamura T, Nakanishi K, Kaneda H, Hamada R, Nozu Y, Shono A, Ninchoji T, Morisada N, Ishimori S, Fujimura J, Horinouchi T, Kaito H, Nakanishi K, Morioka I, Taniguchi-Ikeda M, Iijima K. Female X-linked Alport syndrome with somatic mosaicism. *Clin Exp Nephrol*. 2017 ;21(5):877-883. doi: 10.1007/s10157-016-1352-y. (査読有)
- Nozu K, Nozu Y, Nakanishi K, Konomoto T, Horinouchi T, Shono A, Morisada N, Minamikawa S, Yamamura T, Fujimura J, Nakanishi K, Ninchoji T, Kaito H, Morioka I, Taniguchi-Ikeda M, Vorechovsky I, Iijima K. Cryptic exon activation in SLC12A3 in Gitelman syndrome. *J Hum Genet*. 2017 ;62(2):335-337. doi: 10.1038/jhg.2016.129. (査読有)
- Kamiyoshi N, Nozu K, Fu XJ, Morisada N, Nozu Y, Ye MJ, Imafuku A, Miura K, Yamamura T, Minamikawa S, Shono A, Ninchoji T, Morioka I, Nakanishi K, Yoshikawa N, Kaito H, Iijima K. Genetic, Clinical, and Pathologic Backgrounds of Patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 ;11(8):1441-9. doi: 10.2215/CJN.01000116. (査読有)
- Ohtsubo H, Okada T, Nozu K, Takaoka Y, Shono A, Asanuma K, Zhang L, Nakanishi K, Taniguchi-Ikeda M, Kaito H, Iijima K, Nakamura S. Identification of mutations in FN1 leading to glomerulopathy with fibronectin deposits. *Pediatr Nephrol*. 2016 ;31(9):1459-67. doi: 10.1007/s00467-016-3368-7. (査読有)
- Fu XJ, Nozu K, Eguchi A, Nozu Y, Morisada N, Shono A, Taniguchi-Ikeda M, Shima Y, Nakanishi K, Vorechovsky I, Iijima K. X-linked Alport syndrome associated with a synonymous p.Gly292Gly mutation alters the splicing donor site of the type IV collagen alpha chain 5 gene. *Clin Exp Nephrol*. 2016 ;20(5):699-702. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26581810>. (査読有)
- 森貞直哉, 庄野朱美, 野津寛大, 叶明娟, 神田祥一郎, 井藤奈央子, 亀井宏一, 伊藤秀一,

山本勝輔, 里村憲一, 田中亮二郎, 西尾久英, 飯島一誠. 次世代シーケンサーを用いた先天性腎尿路奇形(CAKUT)の原因遺伝子解析. 発達腎研究会誌. 2016 ;24(1):13-15. (査読有)

〔学会発表〕(計 4件)

庄野朱美, 野津寛大, 小泉誠, 大西朗之, 高石巨澄, 山村智彦, 南川将吾, 飯島一誠. エクソンスキッピング療法によるアルポート症候群特異的治療法の開発.(優秀演題奨励賞(基礎・遺伝子関連部門))第52回日本小児腎臓病学会学術集会. 2017年.

森貞直哉, 庄野朱美, 野津寛大, 忍頂寺毅史, 叶明娟, 井藤奈央子, 神田祥一郎, 亀井宏一, 石倉健司, 伊藤秀一, 山本勝輔, 塚口裕康, 里村憲一, 田中亮二郎, 飯島一誠. NGSターゲット遺伝子シーケンスパネルによるCAKUTおよびNPHの包括的原因遺伝子解析. 第52回日本小児腎臓病学会学術集会. 2017年.

山村智彦, 野津寛大, 久富隆太郎, 上田博章, 藤丸李可, 藤村順也, 城之内智子, 中西啓太, 南川将吾, 庄野朱美, 忍頂寺毅史, 貝藤裕史, 中西浩一, 飯島一誠. minigeneを用いた遺伝性腎疾患におけるpathogenic splicing variantの同定. 第52回日本小児腎臓病学会学術集会. 2017年.

庄野朱美. 遺伝子から見たネフローゼ遺伝子異常から見た特発性ネフローゼ症候群発症機序-ステロイド感受性ネフローゼも含めて-. (招待講演) 第51回日本症に腎臓病学会学術集会. 2016年.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: アルポート症候群治療薬

発明者: 飯島、野津、庄野、小泉、大西、高石、足立

権利者: 同上

種類: 特許

番号: FT-225PCT

出願年: 2017年

国内外の別: 国内外

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野 <http://www.med.kobe-u.ac.jp/pediat/>

## 6. 研究組織

該当なし

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。