

平成 22 年 3 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究 C

研究期間： 2007 年 ～ 2008 年

課題番号： 19590953

研究課題名（和文）アジア人に重要な新しいネフローゼ遺伝子座からの疾患遺伝子探査

研究課題名（英文）Analysis of Candidate Genes within a New Disease Locus in Asian Patients with Steroid Resistance Nephrotic Syndrome

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症候群 SRNS は、巣状分節糸球体硬化の組織像を特徴とし、小児腎不全の主因である。SRNS の疾患遺伝子には民族差があり、わが国の多くの症例の原因は不明である。申請研究では、小児期発症・劣性遺伝 SRNS17 家系(日本 12、韓国 5)を収集し、連鎖解析マッピングにより染色体の 1 か所に新しい疾患遺伝子座位を同定した(多点ロット値 5.8)。候補領域の疾患遺伝子は~50 個程度であるが、ゲノムデータベースや糸球体発現解析によって絞り込み、変異の有無を確認中である。

研究成果の概要（英文）：Steroid resistance nephrotic syndrome, characterized by renal histology of focal segmental glomerulosclerosis, is a leading cause of childhood end-stage renal failure. There are a significant ethnic difference in genetic factors underlying autosomal recessive, familial SRNS. Linkage mapping with 17 Asian SRNS families demonstrated a new disease locus with a multi-point LOD score of 5.8 ($\alpha = 0.7$, manuscript in preparation). The candidate interval spans about 3.5Mb, which contains ~ 50 genes. We are currently doing mutational analysis of candidate genes, particularly focusing on those which are specifically enriched in glomeruli

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：腎臓内科学

科研費の分科・細目：一般基盤 C

キーワード：ポドサイト、腎不全、ネフローゼ症候群

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、巣状分節糸球体硬化の組織像を特徴とする難治性腎疾患である。小児腎不全の主因であるが、病因の多くは不明で、病態の解明が待たれている。欧米の家族性 SRNS 症例の主

疾患遺伝子である *NPHS1*, *NPHS2* の変異は、わが国の症例には極めてまれで、疾患遺伝子には明らかな民族差がある。

生後早期に発症する SRNS 症例では 一般に まずステロイド治療が行われるが、反応は不良で進行性に腎機能低下を来し末期腎不

全に至ることが多い。根治的治療は腎移植以外に無く、母子ともに抱える身体的、精神的負担は大きい。効果的な治療法を実現するためには、病因をあきらかにし、責任分子を標的とした新しい治療戦略を考案する必要がある。

2. 研究の目的

近年のヒトゲノム完読の恩恵に浴して、単一遺伝疾患の疾患遺伝子の解明は飛躍的に進歩を遂げている。SRNS は一般に多因子疾患であるが、小児早期に発症する家族例は単一遺伝子変異による可能性が高い（単一遺伝疾患）。このような症例は、疾患遺伝子と疾患表現型の1対1の対応を追跡観察できるため連鎖解析を用いた疾患遺伝子マッピングに適している。

実際に欧米の小児劣性遺伝 SRNS 症例では、連鎖解析により、新しい疾患遺伝子が次々と発見されている。しかし、アジアの症例では疾患遺伝子解析が遅れていた。そこで申請研究は日韓共同で小児発症・劣性遺伝の家族性 SRNS 症例の疾患遺伝子座位を決定し、糸球体硬化症遺伝子を明らかにすることを目的とする。そして分子病態に基づいた新しい診断や治療開発の基盤構築に役立てる。

3. 研究の方法

本学遺伝子研究倫理委員会承認のプロトコルを用いて検体採集と情報管理を行った。神戸大学・飯島一誠博士、国立ソウル小児病院 Hae Il Cheong 博士らと共同でアジア家族性 SRNS17 家系(日本 12、韓国 5)を収集した (Kitamura A., *Nephrol Dial Transplant*.2006)。診断基準は、① 発症は生後3ヶ月~15歳、② 劣性遺伝（両親は検尿異常を認めない）、③ 15歳までに末期腎不全に至る、④ 病理組織は FSGS/微少変化群、⑤ 移植後再発なし、を満たす症例を対象にした。二次性 SNRS (感染、膠原病、薬剤性等)の症例は除外した。

末梢白血球からゲノム DNA を抽出し、マイクロサテライトマーカー (Linkage mapping set、20cM 間隔) を用いて遺伝型を決定した。蛍光 PCR 産物の鎖長の多型を、ABI 自動シーケンサで解析した。遺伝型を劣性遺伝、浸透率 100%、変異率 0.0001 のパラメトリックモデルで連鎖解析を行い、Genehunter、Merlin プログラムを用いて単点、多点連鎖スコアを計算した (Tsukaguchi H., *J Am Soc Nephrol* 2000)。一次スクリーニングでのアレル頻度は等頻度 (n=10) に設定してスクリーニングを行った。ロット値 2.0 以上を示す領域を陽性とし、2

次解析の対象とした。陽性領域については、健常日本人のアレル頻度を用いてロット値の再検討を行った。Marshfield や deCODE の Human genome map を基に、アレル多型の多いマーカーを高密度に配置し、染色体組み換え部位を目安として候補領域を狭小化した。

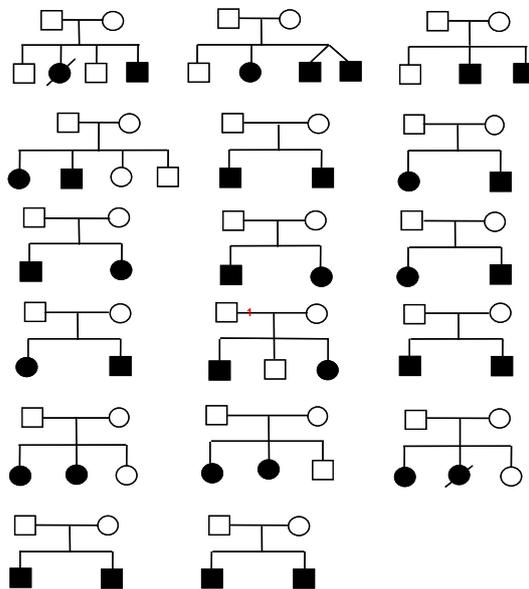


図 SRNS 17 家系

両親に検尿異常はなく、劣性遺伝が考えられる。また腎移植後のネフローゼ再発がないため、病因は腎臓内に存在すると推測される。

4. 研究成果

アジア家族性 SRNS17 家系(患者 31 人、健常 45 人) のゲノムワイド連鎖解析スクリーニングを行い、新規疾患遺伝子座位を確定した(多点ロット値 5.8、 $\alpha = 0.7$ 、論文作成中)。Merlin プログラムで作成したハプロタイプを目視で再構築し、疾患との連鎖を検討した。17 家系中 13 家系が同一の遺伝子座位に連鎖しており、患者は候補領域において複合ヘテロ接合体であった。Autozygosity を示す部分は、確認できなかった。患者疾患ハプロタイプで共通に見られる候補領域は 3.5cM 程度あり、約 50 種類以上の候補遺伝子が存在していた。

DeCODE map を参考にして、候補領域に 70 個のマイクロサテライトマーカーを配置 (平均 0.5cM 間隔) して高密度タイピングを行った。一次スクリーニング(20cM 間隔)で疾患遺伝子座位に連鎖していた患児のハプロタイプは、高密度マッピングでも矛盾なく連鎖することがわかった。しかし連鎖不平衡を示唆する共通部分は検出できなかった。このことは、フィンランド型先天性ネフローゼ症候群

の責任変異 *NPHS1* 変異(ネフリン)の ~90%が、同一祖先に由来する同祖性アレル (Fin-major, -minor) であることと対照的な結果であった。欧米の成人型 SRNS の原因遺伝子 *NPHS2* (ポドシン)変異の中にも、同祖性を示す頻度の高い疾患アレル R229Q が確認されている事実 (Tsukaguchi H., *J Clin Invest.* 2002) とも、異なる結果であった。日本人では仮に創始者効果があったとしても、かなり古い世代に起こっていると考えられる。

近年の少子化傾向を反映して、家族性集積を示す SRNS は減少しつつある。そこで候補領域の狭小化のための方策として、孤発性 SRNS 症例に着目した。家系内で罹患者が患児一人であっても両親、健常同胞の協力が得られる場合は連鎖解析による、疾患マッピングが可能である。そこで、9 症例 (患児 9 人、健常 25 人) のサンプルを収集して、マイクロサテライトマーカーのタイピングを行い、候補領域の確認と狭小化を実施した (論文作成中)。9 家系中、4 家系が家族性 SRNS 症例で得られた遺伝子座位に連鎖する可能性が示唆され、新しい疾患遺伝子座位の存在はほぼ間違いないと考えた。

しかし候補領域にはまだ ~50 個の遺伝子があり、すべてをシーケンスして変異を調べるのは、多大な労力と時間を要す。そこで疾患遺伝子を絞り込むために、最も疑わしいものから順に解析して、効率化を図ることが重要と考えた。そこでマウス糸球体から全 RNA を抽出し、マウス発現チップ (Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 array; GlomChip, Takemoto M., *EMBO* 2006; GNF SymAtlas) とのハイブリダイゼーションを行い、特異的発現を示す遺伝子のリストを作成した。現在糸球体に特異性の高い遺伝子から順に、候補遺伝子のシーケンス解析を行っている。

総括 : アジア人の家族性 SRNS には、欧米と異なる新しい疾患遺伝子座位が存在し、遺伝学背景には人種差があることが明確になった。疾患遺伝子を同定は、遺伝診断、分子標的治療など、次世代の新しい治療開発に資するものと期待される。

本研究は、神戸大学・飯島一誠博士、国立ソウル小児病院 Hae Il Cheong 博士、徳島大学・土井俊夫博士、香美祥二博士、北村明子博士、らとの共同研究で行われた。

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 11 件)

1. Zhang Y, Yoshida Y, Nameta M, Xu B, Taguchi I, Ikeda T, Fujinaka H, Mohamed SM, Tsukaguchi H, Harita Y, Yaoita E, Yamamoto T. Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Jan 12. [Epub ahead of print]
2. Brown EJ, Schlöndorff JS, Becker DJ, Tsukaguchi H, Uscinski AL, Higgs HN, Henderson JM, Pollak MR. Mutations in the formin gene *INF2* cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2010 ;42(1):72-76.
3. Qin XS, Tsukaguchi H, Shono A, Yamamoto A, Kurihara H, Doi T. Phosphorylation of nephrin triggers its internalization by raft-mediated endocytosis. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(12):2534-2545.
4. Shono A, Tsukaguchi H, Kitamura A, Hiramoto R, Qin XS, Doi T, Iijima K. Predisposition to relapsing nephrotic syndrome by a nephrin mutation that interferes with assembly of functioning microdomains. *Hum Mol Genet.* 2009 ;18(16):2943-2956.
5. Suzuki H, Suzuki Y, Narita I, Aizawa M, Kihara M, Yamanaka T, Kanou T, Tsukaguchi H, Novak J, Horikoshi S, Tomino Y. Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2008 ;19(12):2384-2395.
6. Kitamura A, Tsukaguchi H, Maruyama K, Shono A, Iijima K, Kagami S, Doi T. Steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2008 ;74(9):1209-1215.
7. Hattori M, Akioka Y, Chikamoto H, Kobayashi N, Tsuchiya K, Shimizu M, Kagami S, Tsukaguchi H. Increase of integrin-linked kinase activity in cultured podocytes upon stimulation with plasma from patients with recurrent FSGS. *Am J Transplant.* 2008 ; 8(7) 1550-1556.
8. Furue T, Hattori M, Tsukaguchi H, Kitamura A, Oomori T, Ogino D, Nakakura H, Ashida A, Miura K, Hisano M, Takahashi K, Chikamoto H, Akioka Y, Sakano T. Clinical features and mutational survey of

NPHS2 (podocin) in Japanese children with focal segmental glomerulosclerosis who underwent renal transplantation. *Pediatr Transplant.* 2008; 12(3):341-346.

9. Shono A, Tsukaguchi H, Yaoita E, Nameta M, Kurihara H, Qin XS, Yamamoto T, Doi T. Podocin participates in the assembly of tight junctions between foot processes in nephrotic podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2007 ;18(9):2525-2533.

(邦文)

1. **塚口裕康**【ネフローゼ症候群:診断と治療の進歩】ネフローゼ症候群と遺伝子異常 日本内科学会誌 98:1076-1083, 2009
2. **塚口裕康**【病因と病態に関わる最近の知見】ネフローゼ症候群責任遺伝子の探索 腎と透析特集 ネフローゼ症候群:最新の知見 腎と透析 64: 887-901, 2008.
3. **塚口裕康**,北村明子『遺伝性巣状糸球体硬化症の関連分子の解明』日本腎臓学会誌,49:88-97, 2007

すべて査読あり

〔学会発表〕(計1件)

ネフローゼ症候群研究の新たな展開
ネフローゼ症候群遺伝子研究の最近の知見
ポドサイト遺伝子の重要性
第52回日本腎臓学会総会シンポジウム
S1-1-1, 2009年6月3日 横浜(パシフィコ横浜)

〔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
〔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 該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚口裕康 (TSUKAGUCHI HIROYASU)

関西医大・医学部・助教

研究者番号: 60335792

(2) 研究分担者

土井 俊夫(DOI TOSHIO)

徳島大学・大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部
教授

研究者番号: 60183498

(3) 連携研究者

該当なし。