

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591238
 研究課題名（和文）エピジェネティクスによる微小変化型ネフローゼ症候群の
 病因解明へのアプローチ
 研究課題名（英文）An Epigenetical Approach for Pathogenesis of Minimal Change
 Nephrotic Syndrome in Children
 研究代表者
 森川 昭廣（MORIKAWA AKIHIRO）
 群馬大学・名誉教授
 研究者番号：40125878

研究成果の概要：小児期によく見られる微小変化型ネフローゼ症候群の原因はいまだ解明されていない。この病気の原因を解明するために、エピジェネティクスという、いわば遺伝子の利用の仕方を調節する機構に着目して研究を進めた。すべての遺伝子を対象に、エピジェネティクスの機構の一つである遺伝子DNAのメチル化の状態に、蛋白尿がある状態とない状態に差があるかどうかを調べたところ、Tリンパ球の遺伝子で差のある遺伝子を見出した。病気の状態によってDNAメチル化に変化が起こる可能性が示唆され意義深いものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：微小変化型ネフローゼ症候群、病因、エピジェネティクス、DNAメチル化
ヘルパーT細胞、マイクロアレイ、単球、小児

1. 研究開始当初の背景

微小変化型ネフローゼ症候群（以下MCNS）は大量の蛋白尿、それに伴う低蛋白血症、浮腫、高コレステロール血症を呈する疾患である。通常ステロイド療法によく反応し寛解に入るも、ワクチン接種、感冒、虫刺症などを誘因に、あるいは特に誘因なく再発する。頻回再発型やステロイド依存性の症例では治療に難渋し、ステロイド療法による重篤な副作用を認め、特に成長期にある小児MCNS患者においては低身長や、長引く治療による患者の社会生活に及ぼす影響などは深刻である。病因の解明ならびに病因に基づいた根本的な治療法の開発が待たれる疾患の一つである。

その臨床的特徴からMCNSの病因はT細胞の機能異常であるという仮説が提唱されて以来（Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. Lancet. 1974 Sep 7;2(7880):556-60.）様々な検討がなされてきたが、詳細は解明されて

いない。その名の示すごとく、腎臓の病理学的所見は糸球体に異常なく、蛍光抗体法でも免疫グロブリン、補体などの沈着を認めない。電子顕微鏡で認められる足突起の融合が唯一の病理学的変化であるが、通常大量の蛋白尿を呈する病態には付随してみられ、MCNSに特異的な所見ではない。ShalhoubはMCNSの蛋白尿の原因は活性化T細胞から産生された液性因子による糸球体基底膜透過性亢進作用ではないかとし、当教室では再発時MCNS患者の末梢血リンパ球培養上清中に存在する血管透過性因子はCD4陽性細胞から産生されることを報告した。（Tomizawa S, et al The release of vascular permeability factor in minimal change nephritic syndrome is related to CD4+ lymphocytes. Nephrom 56: 341-342, 1999）また、MCNS発症時のT細胞分画や血清中のサイトカイン、そのmRNAの発現について様々な検討がなされてきた。MCNSとアトピー性疾患の関連や発症時に血清IgE値の上昇を

認めることが知られており、MCNSの発症にヘルパーT細胞サブタイプ2 (Th2) サイトカンが関与することが示唆されてきた(Sahari D et al, A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal-change nephrotic syndrome using subtracted cDNA library screening. J Am Soc Nephrol. 2002 13:1238-47.)。申請者らはこの点に着目し日本人小児MCNSにおけるTh2 関連サイトカンの遺伝子多型について検討し、MCNSの発症やその臨床経過に関与することを報告した。(Kobayashi Y. et al Polymorphisms of Interleukin 4-related genes in Japanese children with minimal change nephrotic syndrome. American Journal of Kidney Diseases 42: 271-276, 2003) また近年、糸球体上皮細胞足突起間のスリット膜関連蛋白であるネフリンが発見されて以来、先天性ネフローゼ症候群や家族性巣状糸球体硬化症などの難治のネフローゼ症候群でその分子病態が解明され、糸球体上皮細胞の蛋白尿出現にかかわる重要な役割が明らかにされてきた。ネフローゼ症候群においてもこれらのスリット膜関連蛋白遺伝子の検討がなされているが、しかしこれらの疾患は基本的には遺伝子変異によるスリット膜関連蛋白の異常により発症するもので、多くはステロイド抵抗性である。このようにネフローゼ症候群の病因はT細胞由来の液性因子あるいは糸球体上皮細胞性因子が示唆され、家族性MCNSの家系では責任遺伝子の検索がすすめられている。一方で、ステロイド感受性MCNSでは、特徴的な大量蛋白尿を呈する発症期と、まったく正常な寛解期を繰り返す、いわばスイッチのオン・オフの状態にたとえられると言えよう。また、年齢依存的に再発率を減じ、成人までキャリーオーバーするのは約2割にすぎない。このような病態は遺伝子塩基配列の多型や変異の違いといった遺伝的因子(ジェネティクス)によるのではなく、ゲノムDNAの後天的な修飾であるエピジェネティクスによる遺伝子発現の制御を示唆するものである。この遺伝子発現の制御はDNAのメチル化やヒストンの修飾(アセチル化、メチル化など)によってなされており、特にDNAメチル化修飾は主に遺伝子発現抑制に関与している。申請者らは同じくTh2 に偏向していると考えられるアレルギー疾患で、樹状細胞に分化しうる単球において、Th1/Th2 細胞分化を決定するIL-12のうち、その構成蛋白であるIL-12p35 遺伝子の転写調節領域におけるDNAメチル化頻度についてbisulphite-sequence法を利用して検討してきたが、Th細胞分化のバランスをダイナミックに解析するうえでは、同時にTh1、Th2 双方のサイトカンについて検討する必要性に気付いてきた。また近年、T細胞の分化にDNAメチル化修飾が関与しているという報告がなさ

れた(Yano S, et al Effect of promoter methylation on the regulation of IFN-gamma gene during in vitro differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population. J Immunol. 171:2510-6 2003)。そこで申請者らは MCNS の分子生物学的な病因を解明する目的でエピジェネティクスに注目し、全ゲノムを対象としたDNAメチル化を網羅的に検討するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究はマイクロアレイによるゲノムワイドなメチル化解析法(Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers (MIAMI)法)を用いて、MCNS再発時と寛解時の同一個体のゲノムDNA間でDNAメチル化の状態に差がある遺伝子座があるかを検討するものである。特にMCNSにおけるT細胞の果たす役割に注目して、Th細胞分画でのDNAメチル化修飾について検討する。同時にTh細胞分化を決定する樹状細胞の前駆細胞である単球についてもメチル化の状態に差があるかを検討する。メチル化の状況に差のある部位を認めた場合には、遺伝子座の位置を同定し、その働きについて検討することで、MCNSの病因を探るとともに、MCNS発症のメカニズムにせまることを目的とする。また健常コントロール群とMCNS再発時、及び寛解時の単球及びナイーブT細胞でも同様の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

対象

International Study of Kidney Disease in Children の診断基準を満たす小児期発症のステロイド感受性ネフローゼ症候群の患者の男児6人を対象とした。いずれも頻回再発型で初発時年齢は5歳4カ月～11歳11カ月、検体採取時年齢は再発時5～19歳、寛解時5～19歳。使用薬剤はステロイド以外の免疫抑制剤の使用状況は再発・寛解間で同じである。コントロール群は腎疾患のない成人ボランティア男性5人で年齢は23～24歳。すべての対象で本人および保護者から同意を得た。

検体及び方法

検体を採取し、収集検体から随時DNAを抽出し、DNAメチル化解析を行った。エピジェネティックなDNA修飾は細胞特異的に異なるものであるが、本研究ではMCNSの病因をとして液性因子に注目し、CD4陽性細胞であるヘルパーT細胞分画、特にナイーブT細胞で検討を行う。同時にナイーブTh細胞に対してTh1/Th2分化誘導能を有することが知られている樹状細胞

胞の前駆細胞である単球も単離して解析をおこなう。

1) 検体の収集

上記のMCNS患者の再発時、寛解時および健常ボランティアから倫理的側面に充分配慮して、末梢血を採取、収集した。

2) ナイーヴT細胞、単球の分離

収集した末梢血は比重遠心法にて単核球を分離する。それぞれ磁気ビーズ細胞分離システムを用いて、CD14陽性分画は単球として、CD14陰性分画のうちCD4陽性分画はヘルパー細胞、そのうちCD45RO一分画をナイーヴT細胞として分離し、ゲノムDNAを抽出した。

3) マイクロアレイによるゲノムワイドなメチル解析法 (Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers (MIAMI)法)によるメチル化の検討

これまでのメチル化アレイではメチル化に起因する制限酵素認識部位の切れ方の違いだけでなく、サンプル間の制限酵素認識部位の多型や、DNA品質の違いなどによる制限酵素による切れ方の違いを、あたかもメチル化の差として検出してしまう可能性があった。そこで研究協力者(畑田)らはメチル化感受性酵素(*Hpa* II)による切れ方の差だけではなく、同じ認識部位を切断するメチル化非感受性酵素(*Msp* I)による切れ方の差を検出し、その両者を比較してメチル化に起因するサンプル間の差とするMIAMI (Microarray-based Integrated Analysis by Isoschizomer)法を開発した。(Hatada I, et al Oncogene. 2006 May 18;25(21):3059-64. Genome-wide profiling of promoter methylation in human.)この方法ではDNAメチル化の検出に制限酵素を用いる。DNAのメチル化はシトシン塩基の5の位置で起こることが知られているが、そのほとんどがCGという配列のシトシンに集中していることがわかっている。*Hpa* IIという制限酵素はCGを含むCCGGという配列を認識して切断するが、内側のCがメチル化されているとDNAを切断できない(メチル化感受性酵素)。一方*Hpa* IIと同じCCGG配列を認識する制限酵素に*Msp* Iがあり、この酵素は*Hpa* IIと異なり内側のCがメチル化されていてもされていなくてもDNAを切断することができる(メチル化非感受性酵素)。MIAMI法では、比較するサンプル間で*Hpa* IIによる切れ具合の差と同時に*Msp* Iによる切れ具合の差を比較することによりサンプル間のメチル化の差を検出するものである。*Hpa* IIの切れ具合の差はサンプル間のメチル化の差と関係しているが、*Msp* Iによる切れ具合の差も測定することにより信頼性を検定することができる。もしサンプル間に多型や質の差があればメチル化の差がなくても*Hpa* IIの切れ具合の差が観察されるが、この場合は*Msp* Iによる切れ具合の差も観察されるのでfalse positiveと判定することができる。

る。

Hpa II (メチル化感受性酵素)による切れ方の違いの検出

(1) 比較するサンプルをそれぞれ*Hpa* IIで消化する。メチル化で切れない認識部位は断片中に残る。

アダプターを付加してアダプターに相補的なプライマーで数サイクルのPCRをおこなう。

(2) *Hpa* IIと同じ制限酵素認識部位を持つメチル化非感受性酵素の*Msp* Iで消化する。これによりメチル化が内部に残った断片では認識部位が切断され、今後のPCRにより増幅しなくなる。

(3) アダプターに相補的なプライマーでPCRをおこなうと内部にメチル化がなかった断片のみが増幅される。結果としてメチル化されていたDNA断片は増幅しない。

(4) それぞれのサンプルから増幅したDNAをCy3とCy5で標識してマイクロアレイにハイブリダイズし切れ方の違いを蛍光強度の差として検出する。

Msp I (メチル化非感受性酵素)による切れ方の違いの検出

比較するサンプルをそれぞれ*Msp* Iで消化する。メチル化と関係なくすべての認識部位が切断される。

Hpa IIによる切れ方の違いの検出の場合の(2)~(5)と同様の操作をおこなう。もしメチル化以外の因子によりサンプル間の違いがあれば蛍光強度の差として検出される。

なおアレイのプローブ数は約41,100個で、いずれも遺伝子転写調節領域であり、上流・下流500bp以内にHap IIサイトを含まものである。

本研究は群馬大学倫理委員会の承認を得た。

4. 研究成果

MCNS患者単球では再発一寛解間でDNAメチル化頻度に差を認めなかった。ナイーヴT細胞では寛解時に比較して再発時に優位に低いメチル化頻度を示す遺伝子領域が3か所検出された。それぞれプローブはA_17_P02574948 (3q21)、A_17_P10909964 (19p13)、A_17_P11717994 (Xp11.4)であった。ナイーヴT細胞で患者再発時と健常人コントロール間で比較した解析においても同3遺伝子は同様にメチル化頻度の低下を検出した。

単球及びナイーヴT細胞で患者再発時、寛解時をそれぞれ健常人コントロールと比較した。単球再発時でコントロールに比較してメチル化頻度の増加を認めた遺伝子領域が6か所、単球寛解時でメチル化頻度の上昇を認めたのは、いずれも再発時と同じ6か所、メチ

ル化頻度の低下を認めたのは7 遺伝子領域であった。

ナイーブT細胞再発ではメチル化頻度の上昇を認めた遺伝子領域が64か所、低下を認めたのは143か所であった。ナイーブT細胞寛解ではメチル化頻度上昇は15か所、メチル化頻度低下では7か所の遺伝子領域を検出した。このうちナイーブT細胞の再発、寛解の双方でコントロール群と有意にメチル化頻度に差のあった遺伝子領域は16か所でうち11か所でメチル化頻度の上昇を、5か所でメチル化頻度の低下を認めた。

以上より、患者群ナイーブT細胞では再発-寛解間でDNAメチル化頻度が変化する可能性が示唆され、これらの遺伝子は蛋白尿の出現に寄与する可能性が考えられた。また患者群-コントロール群間での比較で再発、寛解にかかわらずメチル化頻度の変化が見られた遺伝子は、疾患発症に関与する可能性が示唆された。

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6件)

①Ikeuchi Y, Kobayashi Y, Arakawa H, Suzuki M, Tamra K, Morikawa A.

Polymorphisms in interleukin-4-related genes in patients with minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 24, 489-495. 2009, 査読有

②荒川浩一、小林靖子. 小児アレルギー疾患とエピジェネティクス、*International Review of Asthma*, 11巻、44-53、2009、査読無

③小林靖子、荒川浩一、滝沢琢己、森川昭廣. 【アレルギー疾患発症の胎内・胎外因子遺伝、環境とエピジェネティクスを中心に】胎内因子 アレルギー疾患発症にエピジェネティクスは関与するか?、*アレルギー・免疫*、15巻、154-160、2008、査読無

④小林靖子、荒川浩一、森川昭廣. 小児アレルギーとエピジェネティクス、*臨床検査*、52巻6号、675-678、2008、査読無

⑤ Kobayashi Y, Takizawa T, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. Methylation Status in the promoter legion of IL-12 gene might be correlated with allergy The 4th Congress ASPR, Program and abstracts, p81, 2008, 査読有

⑥ 森川昭廣 アレルギー性疾患の予知・予防と早期介入、*アレルギー* 56巻7号、663-669、2007、査読有

[学会発表] (計7件)

① 荒川浩一、アレルギー疾患 治癒への挑戦 小児アレルギー疾患の治癒への挑戦、第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008年11月28日、東京

② 小林靖子、相澤明、望月博之、荒川浩一、森川昭廣、特別シンポジウム4、アレルギー疾患と環境因子 アレルギー疾患とエピジェネティクス ～遺伝子の発現における環境因子の作用性～ 第58回日本アレルギー学会秋季大会 東京 2008年11月28日

③ 荒川浩一、アレルギー疾患の一次予防の現状、第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008年11月27日、東京

④ Kobayashi Y, Takizawa T, Arakawa H, Mochizuki H, Morikawa A. Methylation Status in the promoter legion of IL-12 gene might be correlated with allergy. 4th Asian Society for Pediatric Reserch, Honolulu, Hawaii. May 2nd, 2008 (May 2-6, 2008)

⑤ 小林靖子、池内由果、懸川聡子、渡部登志雄、森川昭廣、群馬大学医学部附属病院で経験された小児腎疾患領域における遺伝子異常、第7回群馬遺伝子診療研究会、前橋、2007年8月1日

⑥ 小林靖子、池内由果、懸川聡子、渡部登志雄、森川昭廣 (他9名注番目、4番目)、WT1 遺伝子イントロン9 splice-donor site に変異 (IVS9 +5G>A) を認めた Frasier症候群の一例、第42回小児腎臓病学会、横浜、2007年6月30日

⑦ 小林靖子、滝沢琢己、荒川浩一、望月博之、徳山研一、森川昭廣、IL-12p35 遺伝子転写調節領域におけるDNAメチル化の検討、第110回小児科学会、2007年4月20日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 昭廣 (MORIKAWA AKIHIRO)

群馬大学・名誉教授

研究者番号：40125878

(2) 研究分担者

荒川 浩一 (ARAKAWA HIROKAZU)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50272232

小林 靖子 (KOBAYASHI YASUKO)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60451720