

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19790725
 研究課題名 (和文)
 近交係数を指標とする小児遺伝性腎疾患の新しいマッピングの試み
 研究課題名 (英文)
 Identification of causative genes for hereditary renal diseases based on inbreeding coefficients
 研究代表者
 北村 明子 (KITAMURA AKIKO)
 徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：10448318

研究成果の概要：

スロイド反応性ネフローゼ (SSN) の発症には多因子が関与しているため遺伝学的解析が困難である。本研究では、家族性 SSN を対象に遺伝解析を行い、SSN の遺伝要因を解明することを目的とした。本研究で集積した 14 家系 28 患児は、家系内で疾患感受性が劣性の遺伝因子で規定されている可能性が高く、マッピング対象として適していると考えられた。そのうちの 3 家系について既報の候補遺伝子座への連鎖を解析し、いずれも連鎖を除外した。今後は、さらに家系を集積し、全ゲノム領域自己接合体マッピングを試みる予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

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：多因子疾患、マッピング

1. 研究開始当初の背景

近年の分子遺伝学的解析法の進歩により、糸球体や尿細管を主体とする様々な遺伝性腎疾患の原因が、分子レベルで明らかにされてきた。特に浸透率の高いメンデル遺伝形式を呈する単一遺伝子疾患については、ポジショナルクローニング法やホモ接合体マッピング法を駆使することにより原因遺伝子の

同定が可能である。事実、フィンランド型先天性ネフローゼや家族性ステロイド抵抗性ネフローゼから腎糸球体濾過膜の構築分子であるネフリンやポドシンが同定された。これらの発見は、遺伝性腎疾患の原因を解明したばかりでなく、慢性腎疾患の病態理解にも大きく貢献した。

一方、小児ネフローゼの 9 割を占めるスロ

イド反応性ネフローゼ (SSN) は、免疫系あるいは腎機能を制御する分子の機能異常を引き起こす遺伝要因 (疾患感受性遺伝子) と環境要因が関与する多因子疾患と推測されている。このような単純なメンデル遺伝様式を呈さない多因子腎疾患の多くは、罹患頻度が高く臨床的に重要であるにもかかわらず、遺伝的素因の解析方法が確立されていないため、病態発症の分子基盤は原因不明のままである。

2. 研究の目的

遺伝的パラメーターの想定を必要とする従来のゲノムワイド連鎖解析は、多因子遺伝性疾患の解析には適さない。しかし、遺伝的要因が明らかな家族性症例を対象に全ゲノム解析を行うことにより、疾患発症に決定的に寄与する遺伝的要因を解明できる可能性がある。

以上の研究背景から、本研究では、SSN のなかでも、劣性遺伝様式で発症する遺伝要因の濃厚な家族症例を対象にゲノム解析を行い、近交係数を指標に広義の血族家系を想定して自己接合体マッピングを適用し、SSN の表現型に大きく影響していると思われる同祖由来の遺伝的要因を解明することを目的とした。

本研究により、多因子疾患に対しても、強力な解析力を有する自己接合体マッピングの適用が有効であることが証明されれば、既知の仮説にとらわれない新規遺伝要因の同定法の確立が期待できる。さらに SSN の発症を規定する腎生理機能の破綻メカニズムの解明は、SSN の疾患特異的治療法の開発に大きく貢献すると期待できる。

3. 研究の方法

1) 症例調査

次の診断基準を満たす家族性 SSN を集積し、臨床像の調査及び検体収集を行った。

- ① 生後 3 ヶ月以降 15 歳未満で発症
- ② ステロイド反応性; プレドニゾロン (60 mg/m²/日) の連日投与で 4 週間以内に完全寛解を示す。
- ③ 腎組織像は、微小変化群 (腎生検施行例)
- ④ 劣性遺伝様式が最も疑われる。

⑤ 除外項目; 持続性血尿、高血圧、腎機能低下、低補体血症を伴うものは除外する。

2) 検体収集

患者あるいは健常家族から採血 (5-10ml) を行い、ゲノム DNA を抽出する。

腎生検が施行された症例は、顕微鏡・電顕、蛍光抗体による免疫染色を行い、腎組織病理診断を確定する。

3) 既報の候補遺伝子座の関与を確認

家族症例については、まず既報の候補遺伝子座として、

- ① ポドシン (*NPHS2*) 遺伝子座
- ② ネフリリン (*NPHS1*) 遺伝子座
- ③ 染色体 2 番 (2p12-13.2)

への連鎖の有無を、マイクロサテライトマーカーを用いて検討する。既報の遺伝子座への連鎖が除外された場合、自己接合体マッピングを試みる。

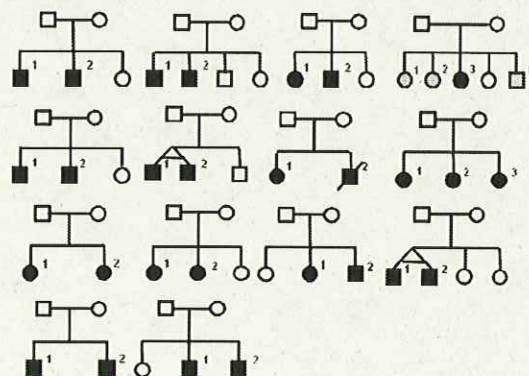
4. 研究成果

1) 症例収集

14 家系 28 患児の調査を行った (図 1)。発症年齢は 1-15 歳 (平均 4.3 歳) であった。罹患同胞間での再発頻度は必ずしも一致しなかった。最終再発年齢は 5-24 歳 (平均 10.8 歳) であった。いずれの症例もステロイド反応性を示し、腎不全への進行は認めなかった。腎生検例 8 名はすべて微小変化群であった。

今回収集した 14 家系は、家系内での疾患発症パターンから疾患感受性が劣性の遺伝因子で規定されている可能性が高く、マッピング対象として適していると考えられた。

図 1) SSN14 家系



2) 調査を行った 14 家系のうち、すでに検体収集の終了した 3 家系について、既報の候補遺伝子座への連鎖を検討した。ポドシン *NPHS2* 遺伝子座 (1q25-31, *DIS196-DIS218-NPHS2-DIS2818-DIS238*)、ネフリン *NPHS1* 遺伝子座 (19q13.1, *D19S414-NPHS1-D19S220-D19S420-D19S903*) 周辺にマイクロサテライトマーカーを配置し、ハプロタイプ解析及び LOD 値による連鎖の妥当性を検討した (図 2 a, b)。その結果、両遺伝子座への連鎖は除外された (LOD; $-\infty$)。

また、2 家系については、候補遺伝子座 2p12-13.2 (疾患遺伝子不明, *D2S303-D2S286-D2S2333-D2S388*) への連鎖を検討したが、1 家系は連鎖除外 (LOD; $-\infty$)、もう 1 家系は連鎖の可能性が示唆された (LOD; 0.72) (図 2c)。

図2a) *NPHS2* 遺伝子座への連鎖解析

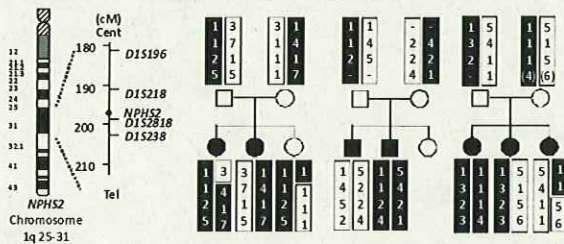


図2b) *NPHS1* 遺伝子座への連鎖解析

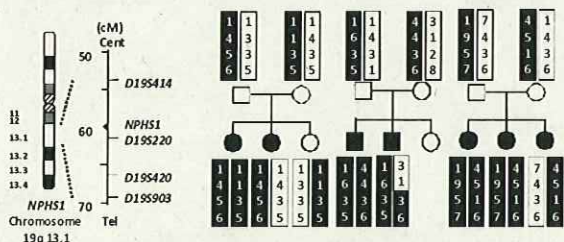
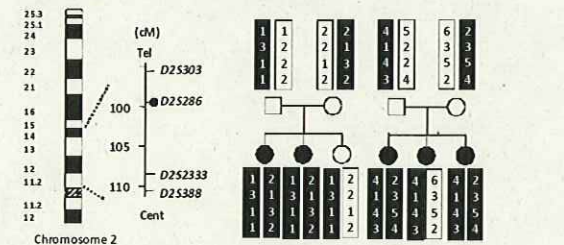


図2c) 2p12-13.2 への連鎖解析



今後は、その他の症例についても、既報の遺伝子座への連鎖の有無を検討する予定である。そして、連鎖が除外された症例については、全ゲノム領域を網羅する多型マーカーを用いてタイピングを行い、近交係数を指標

に自己接合体マッピングを行う予定である。

また、これまでに集積した症例だけでは、家系数が不足していると考えられることから、さらに家系を集積することが、本解析により疾患原因遺伝子を同定するためには必須である。

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 8 件)

1. 北村明子, 安友康二 全身性エリテマトーデスの原因遺伝子 小児内科 2009 年 41 巻 242-245. 査読無
2. Kitamura, A, Tsukaguchi, H, Maruyama, K, Shono, A, Iijima, K, Kagami, S & Doi, T: Steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 74:1209-1215, 2008. 査読有
3. Maekawa, Y, Minato, Y, Ishifune, C, Kurihara, T, Kitamura, A, Kojima, H, Yagita, H, Sakata-Yanagimoto, M, Saito, T, Taniuchi, I, Chiba, S, Sone, S & Yasutomo, K: Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol*, 9:1140-1147, 2008. 査読有
4. 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*, 12:341-346, 2008. 査読有
5. 北村明子, 香美祥二 先天性・乳児ネフローゼ症候群 腎と透析 2008 年 64 巻 963-972. 査読無
6. 塚口裕康, 北村明子 ネフローゼ症候群 責任遺伝子の探索 腎と透析 2008 年 64 巻 887-901. 査読無

7. 北村明子、香美祥二 ネフローゼの治療
最前線 - 先天性・乳児ネフローゼ症候
群の治療 小児科 2007 年 48 卷
137-148. 査読無
8. Kitamura, A, Tsukaguchi, H, Hiramoto,
R, Shono, A, Doi, T, Kagami, S & Iijima,
K: A familial childhood-onset
relapsing nephrotic syndrome. *Kidney
Int*, 71:946-951, 2007. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 明子 (KITAMURA AKIKO)

徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号 : 10448318