

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591045

研究課題名（和文） 家族性間質性腎炎の分子遺伝学的研究

研究課題名（英文） Genetic studies on familial interstitial nephritis

研究代表者 塚口 裕康

(HIROYASU TSUKAGUCHI)

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）：

腎不全への進行リスク群である慢性腎臓病は 8 人に 1 人の頻度であり、疾病対策は国民健康の大きな課題となっている。尿細管間質は糸球体と同等に慢性腎臓病の腎機能予後を左右する主要病変であるが、その病初期は尿蛋白など臨床所見に乏しいため、見逃されることが多い。したがって尿細管間質障害の早期治療や予防を推進するためには、病変を鋭敏に反映する疾患マーカーや疾患リスク因子の理解を深めることが必須である。

そこで本研究は、腎間質障害発症に関わる未知の分子群を明らかにするため、優性遺伝様式で尿細管間質炎が集積する家系の疾患遺伝子の探索を試みた。ゲノムワイド連鎖解析と全エクソーム解析を組み合わすことにより、候補遺伝子の探索過程を大幅に効率化できた。最終的に疾患感受性遺伝子の候補を 2 つに絞りこみ、生物学的意義づけを行っている。

研究成果の概要（英文）：

Chronic kidney disease (CKD) is clinically heterogeneous groups of diseases at a higher risk of potentially progressing to the end stage renal failure. The CKD is becoming a global health problem since it is indeed highly prevalent at one in eight adult individuals. The tubule-interstitial injuries significantly contribute to the pathogenesis of CKD as a primary initiating factor and/or a secondary exacerbating changes resulting from the glomerular insults. However, earlier tubule-interstitial injuries are often under-recognized because the patients barely manifest overt proteinuria and renal dysfunction. To improve the treatment for CKD, there is a need for elucidation of new disease biomarkers and genetic risk factors underlying tubule-interstitial diseases.

This study aimed to identify the disease genes underling a large dominant family with tubule-interstitial nephritis. A combined approach of linkage analysis and next generation sequencing revealed that two novel single nucleotide variants may explain the susceptibility for interstitial nephritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：臨床医学

科研費の分科・細目：腎内科学

キーワード：尿細管、ゲノム、疾患遺伝子、慢性腎臓病、腎不全

## 1. 研究開始当初の背景

近年腎不全に進行する予備群に対し、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease; CKD) という新しい疾患概念が提唱され、全世界的に早期診断や治療の対策が進められている。高血圧や高血糖は、CKD の発症を数倍高めるリスク因子であり、生活習慣の改善が国民健康の中心的課題となっている。これに加えて遺伝的要因は、糖尿病、高血圧ならぶ重要なリスク因子と考えられている。したがって CKD の病態を理解し、疾患対策を進めるには、CKD に関与する遺伝因子の解明が重要課題である。

わが国の成人の末期腎不全の 3 大原疾患は、糖尿病性腎症、慢性腎炎、高血圧である。これらの疾患に共通する終末病変は、糸球体硬化症と尿細管間質線維化である。腎の基本単位であるネフロンは、糸球体と尿細管からなるひとつながりの構造である。したがって CKD は糸球体と尿細管の病変は、相互に密接に関与しながら進展していく。CKD の病態理解を深めるには、糸球体、尿細管に作用する因子の両方を視野に入れた考察が必要である。そこで研究代表者らは、尿細管間質障害を来す疾患(感受性)遺伝子を明らかにしたいと考え、間質性腎炎が家族内に集積する症例の臨床調査を開始した。

家族性の間質性腎障害は、明らかな尿細管嚢胞形成を特徴とするもの(多発性嚢胞腎、ネフロン癆)から、嚢胞形成がはっきりせず緩徐に進行する間質性腎炎を主徴とする症例まで幅が広い。比較的早期に発症するネフロン癆 Nephronophthisis については、すでに 13 種類の疾患遺伝子 (*NPHP1-NPHP11*, *AHI1*, and *CC2D2A*) が同定されている。これに対して主として成人発症の髄質嚢胞形成と高尿酸血症を特徴とする家族性間質性腎炎の一病型に、若年性高尿酸血症腎症/髄質性嚢胞腎複合体 (Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy (FJHN)/Medullary Cystic Kidney Disease (MCKD) complex) と呼ばれる疾患範疇がある。FJHN/MCKD は一般に優性遺伝形式に従い 10 歳代で発症することもあるが、多くは 20-40 歳代に腎機能障害が顕性化し、50-60 歳で末期腎不全に至ることが多い。欧米の FJHN/MCKD 家系の連鎖解析により *MDCK1* (1q21), *MDCK2* (16p12) の 2 つの遺伝子領域が同定されている。*MDCK2* (16p12) の原因遺伝子は *UMOD* であることがわかっている (Kudo E, *Kidney Int*, 2004)。

FJHN/MCKD の 30-40% は、尿細管に分泌される糖蛋白である Uromodulin をコードする *UMOD* 遺伝子 (*MDCK2*, 16p12) の変異が原因である。

しかし残り 60-70% の症例の疾患遺伝子は未だ不明である。これらの症例の疾患遺伝子を明らかにすることにより、尿細管間質障害の分子機序の全貌の解明の糸口にしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、優性遺伝様式を示す FJHN/MCKD 家系 (*UMOD* 変異はないことを確認済み) の疾患遺伝子を、分子遺伝学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。また本症例から学ぶ尿細管間質性障害の分子機序を基に、さらに新しい診断・治療法開発へと展開するために必要な研究基盤の構築を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床情報と検体収集 :

本学医学研究倫理委員会の承認を得たプロトコール(ヒトゲノム、疫学研究)に従い、臨床調査と検体収集を行った。共同研究者と連携し問診票や診療録調査を行い、新たな症例情報をデータベース化した。他機関からの検体提供をうける場合は、事前に送付機関の倫理委員会で研究計画の審査を受け、承認後に検体の受け入れを行った。

### (2) ゲノムワイド SNP 連鎖解析 :

先行研究で収集した FJHN/MCKD の大家系 (図 1, Zhang H. et al, *Am J Kidney Dis* 1999) の患者 9 名と健常者 17 名の検体を Affymetrix Human SNP ver. 6 を用いて全ゲノム SNP の遺伝子型タイピングを行った。

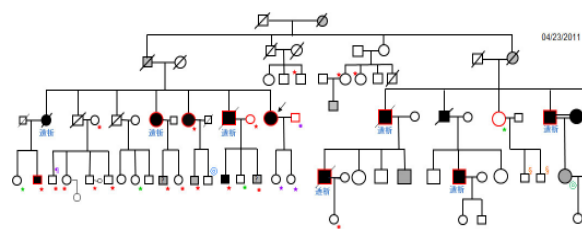


図 1 家系図 発端者は 51 歳時の検診で偶然に蛋白尿・血尿と腎機能低下を発見され、腎生検で間質性腎炎と診断されている。家系内 2 世代以上にわたって腎機能障害を呈する罹患者があり(●,■)、常染色体優性遺伝と考えられる。11 名の罹患者中 7 名が末期腎不全で維持透析中である。

### (3) 全エクソーム解析 :

家系内の 8 名(患者 4、健常 4 名)について、Sure Select Kit (Agilent, version 3, 50Mb) で全エクソームライブラリーを作成した。次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いて、paired-end 75bp, Depth x 30-50, total 6 Gb の条件で変異を検索した。ショートリードを Burrows-Wheeler Aligner (BWA) を用いてリファレンスゲノム GRCh37/hg19 にマップした。

dbSNP132に登録されているアレル頻度5%以上のcommon, non-synonymous SNPは除外した。健康人の比較的正常な塩基型を網羅する1000 genomes データベースの中で、日本人のアレル頻度が公開されている塩基型リストを作成し、検出した塩基変化が病的か否かを鑑別する際の参考資料にした。疾患変異が疑われた場合は、Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad Institute) を用いて目視でリードのマッピング状況を確認した。またABI PRISM 3100 Capillary Sequencer を用いたPCR-直接シーケンス(Sanger法)で確認を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ゲノムワイド連鎖解析

家系患者9名と健康者17名の全ゲノムSNPの遺伝子型タイピングを行った。結果を基にMerlin, HitLINKプログラムを用いてパラメトリック、ノンパラメトリックモデルの双方を想定し、スコアを算出した。その結果Locus A, Locus Bの2か所にLOD値ピークを得た(図2, 論文作成中、文部科学省、ゲノム支援班及び新潟大学との共同研究)。

優性遺伝のパラメトリックモデルより、ノンパラメトリックモデルのスコアが高く、遺伝子浸透率は比較的低い可能性が疑われた。Locus Aは患者に共通してみられる疾患候補ゲノム部分が47.8Mbと長いのに対し、Locus Bは1.9Mb短かった。この2か所以外に(*UMOD*の存在する16p12.3を含め)、連鎖のピークはなかった。

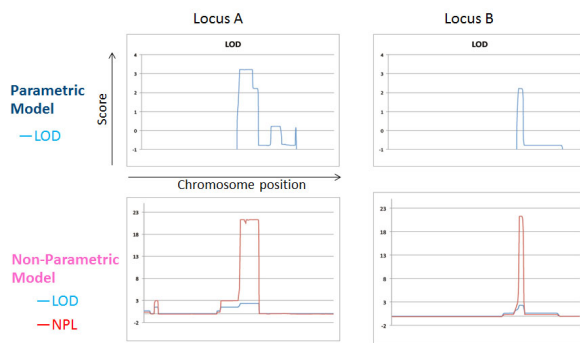


図2 家系サンプルを用いた全ゲノムSNP連鎖解析

Parametric(単一優性遺伝子を仮定), Non-parametric(罹患者が疾患 allele を共有すると仮定)の2つのモデルを用いて解析したところ、locus A と locus B の2か所にピークを認めた。特に Non-parametric モデルで高いピークスコアを検出した(NPL Score ~20, 赤線)。またゲノムの2か所にピークが存在することは、疾患が単一優性遺伝モデル以外に、浸透率が低い複数の遺伝子群が関与する oligogenic モデルにより発症する可能性が考えられる。

またマイクロアレイの各スポットの pixel

輝度を数値化した CEL. file を用いて、コピー数の判定量的解析を行ったが、既知のCNVのみが検出され、疾患に関わる構造異常は見いだせなかった。また家系内代表的な3名の患者について、より構造変異の検出に特化したCytoSNP-12 microarray (Illumina)を実施したが、有意な変化は認めなかった。そこで次にこの2つの候補領域内(Locus A, B)の疾患変異を、シーケンス解析で探査することにした。

##### (2) 全エクソーム解析:

次世代シーケンスにより一人あたり約10,000のsynonymous coding single nucleotide variant (SNV)が検出された。この中から疾患変異を絞り込むため、家系内の8名(患者4、健康4)について浸透率70-80%と仮定した優性モデルを想定して、まず患者全員に共通する塩基変置換を拾い上げた。さらに変異検出の見逃しを防ぐためmultiple sample calling 法を用い、変異が全リード中で4割以上の頻度で検出される場合、優性効果しめす塩基変化として拾い上げた。その結果候補遺伝子は10数個に絞られたが、連鎖解析で疾患との連鎖が示唆されるLocus A内(47.8Mb)に限定すると、残る候補はミスセンスをきたす一塩基置換(single nucleotide variant; SNV)は、2個のみであった。これら2つのSNVを、機能予測プログラム(PolyPhen-2, VAAST)で解析したところ、いずれも蛋白機能・構造に影響を与える可能性が示唆された(図3)。

	Substitution	SIFT	PolyPhen-2
Gene A	P438A	0.03 Damaging	0.998 Probably damaging
Gene B	A1199P	0.11 Tolerated	0.838 Possibly damaging

図3 構造予測プログラムを用いたミスセンスSNVの生物学的効果の判定

そこでこのGene A, Bの2つのSNVを最終的候補として、病的意義があるかを詳しく調べることにした。

(3) 候補遺伝子の意義付け: エクソーム解析で検出されたGene A, Bの2つのSNVは、いずれも1000 Genomesデータベースに登録されていた。したがってこれらのGene A, Bが、発症リスク遺伝子として機能するという結論付けには、この家系以外の間質性腎炎の症例においてもGene A, B変異が存在することを証明する必要がある。

そこでFJHN/MCKDの9家系の検体を新たに収集し、上記の2つのGene A, BのSNVの有無を、サンガー法シーケンスで確認中である（東京薬科大学・市田公美教授との共同研究）。また2つのGene A, Bのヒト腎（凍結、パラフィン包埋切片）における局在を、Human Atlasに登録されているポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色法で検討した。尿細管での染色シグナルがはっきりしない場合は、尿細胞を濃縮した後にウェスタン解析を行い、発現を確認中である。

#### [意義・重要性]

本研究により、間質性腎炎の発症感受性に関わる可能性のある新しい2つの候補遺伝子Gene A, Bを明らかにすることができた。現在、これらの遺伝子の生物学的意義の検討を行っている。

今回の解析条件で患者群に検出しえたGene A, B 2つのミスセンスSNVは、いずれも健常人でのアレル頻度が1%前後であった。しかしながらこれらのSNVは家系内の罹患者にほぼ100%存在しており、疾患表現型とほぼ完全に cosegregate していた。この結果より、本家系の候補遺伝子領域 Locus A には、浸透率は低いが発症リスク規定する感受性遺伝子が存在することは間違いないと考えている。

しかし家系内でこれらのGene A, BのミスセンスSNVは、① 家系特異的な良性多型で単なる Surrogate marker として振る舞っているのか？（=真の疾患変異は近傍にある）、あるいは② それ自身が疾患リスク因子として作用するのか？ についての結論が得られていない。現在、これらの2つのSNVの意義を検証するために、① 新たな家族性間質性腎炎FJHN/MCKD 9症例について変異の有無を探索し、② 遺伝子の尿細管での局在・分布、尿中細胞での発現、Uromodulin との蛋白相互作用の有無についても確認中である。

今回、次世代シーケンス技術を導入し、疾患変異のスクリーニングを効率化できた。しかし(1)10塩基より長い挿入・欠失(indels)は解読できない、(2)短いエクソン欠損は検出できない、(3)複数のゲノム領域に散在する反復配列の領域は読みにくい等、まだ克服すべき点が残されている。また非特異的なSNVが多く混在するため真の病的変異を検出するのに、多大な時間と労力を要するのが現状である。今後非特異的SNVを除去するためのフィルター化行程を、どう工夫するかが、今後疾患遺伝子探索を効率化する上で重要と考える。また日本人独自の多型データを集

約したデータベースの立ち上げにも期待したい。

今、全世界的に慢性腎臓病(CKD)の早期診断と治療の必要性が叫ばれている。CKDの病態の解明は、疾患対策を推進する上で、根幹をなす最も基本的な課題といえる。FJHN/MCKDの約半数に、高尿酸血症を合併しており、本症の病態解明は排泄的低下型の高尿酸血症の診断治療にも貢献すると考える。本研究の成果を踏まえて、CKDの主因の一つである腎尿細管間質障害の疾患因子を明らかにし、治療薬開発や予防方策の充実化に貢献したい。

[謝辞] 本研究は、下記の研究者(敬称略)との共同研究で行われたもので紙面をお借りし、深謝申し上げます。

新潟大学: 成田一衛、後藤眞、和田真一

新潟腎研構造病理: 矢尾板永信

岡山大学: 和田淳

徳島市民病院: 工藤英治

東京薬科大学: 市田公美

国立遺伝学研究所: 井ノ上逸朗、細道一善

#### 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) Kimata T, Tsuji S, Yoshimura K, Tsukaguchi H, Kaneko K. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus-related glomerulonephritis in a child. *Pediatr Nephrol. In press.* 査読有り
- 2) 塚口裕康 ゲノムからみた慢性腎臓病の発症機序解明へのアプローチ 細胞 44: 20-26 2012 査読無
- 3) 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.* 25: 1785-1795, 2010 査読有り
- 4) Grünfeld JP, Hwu W, Chien Y, Brown E, Schlöndorff J, Becker Dj, Tsukaguchi H, Uschinski A, Higgs H, Henderson J, Pollak M et al. More on clinical renal genetics. *Clin J Am Soc Nephrol.* 5: 563-567, 2010 査読無
- 5) 飯島一誠、塚口裕康 遺伝子異常に起因するネフローゼ症候群 日本腎臓学会誌 52: 914-923, 2010 査読無

- 6) 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.* 41: 72-76, 2010 査読有り
- 7) 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.* 18: 2943-2956, 2009 査読有り
- 8) 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* 20: 2534-2545, 2009 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- 1) **塚口 裕康** 分子病態理解に基づく難治性ネフローゼ克服へのアプローチ 第47回日本小児腎臓病学会 2012年6月29日 都市センターホテル
- 2) 次世代シーケンサを用いた腎臓病研究: 家族性 IgA 腎症のエクソーム解析 後藤眞、細道一善、**塚口 裕康**、井ノ上逸朗、成田一衛 第55回日本腎臓学会学術集会 2012年6月1日 パシフィコ横浜
- 3) **Hiroyasu Tsukaguchi**. Molecular Genetics of Steroid-Resistant Nephrotic Syndromes The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research Mini-symposium in Nephrology 2012 May 18-19 Seoul Korea
- 4) **塚口 裕康** 分子病態理解に基づく難治性ネフローゼ克服へのアプローチ 第115回日本小児科学会学術集会 2012年4月21日 福岡国際会議場
- 5) **塚口 裕康**、仲里仁史、森貞直哉、服部元史、伊藤秀一、小崎里華、飯島一誠 Galloway-Mowat 症候群(脳・腎糸球体異形成)のエクソーム解析 第55回日本人類遺伝学会 2011年11月10日 千葉・幕張
- 6) Goto S, **Tsukaguchi H**, Wada M, Narita I Genome-wide Linkage Scan of Japanese Families with IgA Nephropathy. 44th Annual Meeting American Society of Nephrology, Philadelphia, November 12, 2011,

[図書] (計 2 件)

- 1) **塚口 裕康** (分担執筆) 「腎疾患治療マニュアル 2012-2013」腎性尿崩症 腎と透析 2012 年増刊号 393-399 頁、東京医学社、2012 年

- 2) **塚口 裕康** (分担執筆) 「腎臓症候群 第2版 上巻」V. 先天性遺伝性疾患 Galloway-Mowat 症候群 411-419 頁、日本臨床社、2012 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塚口 裕康 (HIROYASU TSUKAGUCHI)  
 関西医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：60335792

### (2) 研究分担者 該当なし

### (3) 連携研究者 該当なし