

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659504

研究課題名(和文)次世代技術を用いた腎系球体ポドサイトと末梢ニューロンを傷害する疾患遺伝子探究

研究課題名(英文)A next-generation sequencing-based strategy of searching for disease genes that are indispensable for viability of glomerular podocytes and peripheral neurons

研究代表者

塚口 裕康 (TSUKAGUCHI, Hiroyasu)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60335792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経細胞と腎系球体ポドサイトは終末分化した細胞であるため、変性・脱落を生じやすい。これらの細胞の健全な営みに必要な共通の生物学系路がわかれば、腎不全や神経変性症の病態理解に貢献できる。本研究ではネフローゼ(FSGS)と末梢ニューロパチー(CMTDIE)を発症した3症例の原因遺伝子を次世代シーケンサーを用いて探索した。その患児はいずれもINF2のミスセンス変異のヘテロ接合体であった。同じINF2変異でもFSGSとCMTを合併する病型を来すものは、腎系球体限局型(FSGSのみ)の変異部位に比較し、N端側に分布していた。現在発現実験を行い変異の生物学的効果を検討している。

研究成果の概要(英文)：Peripheral neurons and glomerular podocytes are terminally differentiated cells. They are therefore susceptible to injury and associated with the occurrence of neuronal and kidney diseases. Elucidation of common biological pathway needed for these non-regenerating cells to survive will provide clues for better understanding of mechanisms underlying peripheral neuropathy and focal segmental glomerulosclerosis(FSGS). We here explored the disease genes of patients exhibiting both FSGS and Charcot-Marie-Tooth type DIE by next-generation sequencing. The results demonstrated that the patients were heterozygotes for missense mutations in inverted formin-2(INF2). These mutations were clustered in a position closer to N-terminus in compared with those reported in patients with a single disease showing FSGS alone. Expression study using culture cell is now underway to investigate how the mutations could give rise to neuron degeneration in addition to loss of podocytes.

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：腎不全 疾患遺伝子 ネフローゼ ポドサイト シーケンス

1. 研究開始当初の背景

末梢神経細胞と腎糸球体ポドサイトはともに終末分化した細胞であるため、細胞障害の修復や再生が困難であり変性・脱落を生じやすい。これらの細胞の健全な構造・機能維持のために不可欠な共通の生物学系路がわかれば、腎不全や神経変性症の病態理解に貢献できる。

小児期腎不全の原因は、先天性腎尿路奇形が45%と首位で、ついで糸球体疾患(臨床疾患名:ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: SRNS, 病理診断:巣状分節性糸球体硬化症 FSGS)が35%を占めている(小児腎臓病学会 1998-2005)。これまでの遺伝学研究で、小児発症 SRNS の多くが糸球体毛細血管の外周を覆うポドサイトの構造・機能に関する分子の異常で発症することがわかってきた。

欧州では、1歳以下のSRNSの大部分が4つの代表的遺伝子(*NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *LAMB2*)のいずれかの変異で起こることが報告されている(APNS, 2007)。しかし欧米の主要疾患遺伝子である*NPHS2*が、本邦や韓国ではきわめてまれであり、遺伝背景に明かな民族差が存在する(Kitamura A, 2006, Cheong, 2011)。生後6ヶ月以降から10歳までに発症するSRNSの多くの原因が不明である(図1)。

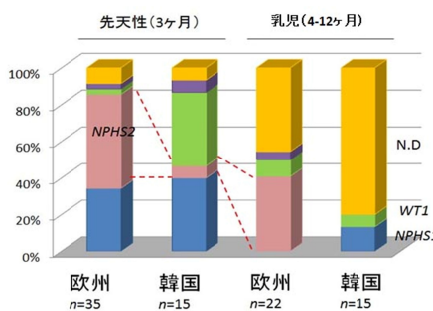


図1 先天性及び乳児期発症SRNS原因遺伝子の欧州とアジアの比較 欧州では先天性SRNSの約半数が*NPHS2*変異によるものであるが、アジアではわずか数例の報告しかない。生後6ヶ月以降の発症する小児SRNSでは、大部分の原因不明である。

一方シャルコー・マリー・トゥース病(Charcot-Marie-Tooth disease: CMT)は、下肢を中心とした運動障害・筋萎縮と感覚障害を主徴とする遺伝性末梢神経変性疾患

である。これまでに40種類以上の原因遺伝子が特定されている

(<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>)。欧米ではCMTの発症頻度は約3000人に1人とされている。しかし本邦では欧米より疾患頻度が低い。また欧米ではPMP22重複(CMT1A)がCMT1の約半数を占めているが、わが国では25%と低い。さらに過半数のCMT症例の原因についてはまだ解明されていない。従来からCMTとネフローゼ・腎不全が合併することは知られていた。しかしながらその原因については不明であった。

2. 研究の目的

FSGSは遺伝的要因と外因(感染、血圧、糖代謝・脂質等)が複雑に関与する多因子疾患である(図2)。たとえ遺伝素因の濃厚である小児例でも原因遺伝子を特定することは、困難であることが多い。

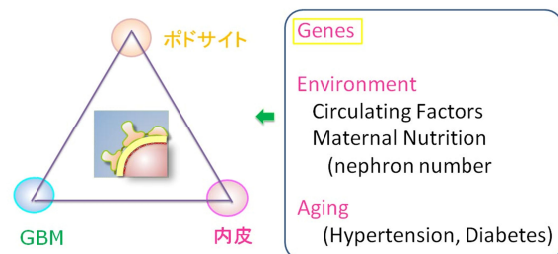


図2 巣状分節性糸球体硬化症の発症機構

糸球体血管系蹄を支持する内皮、GBM、ポドサイトのいずれの異常でも、構造不安定性を生じ硬化を生じる。遺伝的要因に加えて、感染、血行動態、代謝異常、エピジェネティクス修飾も関与する。

SRNSとCMTを合併する症例は非常にまれであるが、CMTを単独で発症する症例は原則的に単一遺伝病である。もし末梢神経ニューロパチーを合併するSRNS症例であれば、単一遺伝子異常で説明できる確率は高いと予想される。

そこでSRNS以外に、ニューロパチーというもう一つの臨床指標を加えることにより、さらに厳密なmonogenicな亜型群を選別できると考えた。また早期発症の難病ではゲノム上に発症効果の高い変異が存在する可能性が高い。そしてさらに近年開発された次世代シーケンサを活用すれば、少数例

の解析でも原因因子の究明が可能と考えた。

そこで本研究では SRNS と同時に CMT を合併するまれな 3 症例について、次世代シーケンサを用いて、網羅的に原因遺伝子をスクリーニングすることにした。

3. 研究の方法

(1) 対象

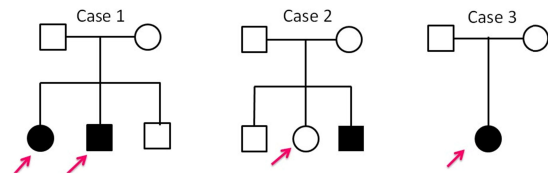


図3 解析した CMT と FSGS の合併例 いずれの例も 10 歳までにネフローゼと歩行障害がほぼ同時期に出現し、20 歳までに腎不全となっている。臨床症状から OMIM 614455: Charcot-Marie-Tooth Disease, dominant intermediate E(CMTDIE)に分類される。

倫理委員会承認済みの計画書に基づき、3 症例の血液検体を採取した(図 3)。ゲノム DNA は、QIAamp DNA blood キットを用いて抽出した。

(2) 遺伝学的解析

連鎖解析：マイクロサテライトマーカー (ABI linkage mapping set) を 20cM 間隔で配置してタイピングを行った。また Human SNP 6.0 マイクロアレイ (Affymetrix) で決定した遺伝子型を、Merlin プログラムを用いて、尤度 HLOD 値を計算した。連鎖が疑われる部分については、ハプロタイプ解析を行った。

エクソーム解析：SureSelect Kit (version 4 50Mb, Agilent) で全エクソームライブラリーを作成し、次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いて、paired-end 75 bp, depth x30-50, total 5-6 Gb の条件で変異を検索した。リードのマッピング状況については、IGV ブラウザで目視にて確認した。

Sanger シーケンサ：

次世代シーケンサで検出された変異は PCR 直接シーケンサ法により塩基置換を再確認した。一般日本人のアレル頻度は、公共データベース (dbSNP 141, 1000 Genomes, Human Genome Variation Database) を参考に算定した。

(3) 候補遺伝子の発現実験：

候補遺伝子のヒト腎での局在を、免疫組織染色法で検討した。ゲノム解析で検出したミスセンス変異の生物学的効果を発現実験で確認するために、真核細胞発現コンストラクトの構築を行った。cMyc-tagged full-length cDNA を鋳型にしてオリゴヌクレオチドを用いた PCR-based Quick-change 法あるいは人工遺伝子合成を併用し点変異導入を行った。変異 cDNA を pcDNA3.1 ベクターに組み込み込んだ後、トランスフェクションして、変異体の細胞内局在と蛋白特性、細胞骨格の変化、アクチン調節シグナルの特性を検討した。

倫理的な配慮 3 省合同の「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従った計画書を作成して本学倫理委員会の審査承認を受けた後(ヒ-0805 号)、カウンセリングを提供する体制を整えた。

4. 研究成果

FSGS の原因となるポドサイト異常を来す疾患遺伝子を効率的に探索するために、ポドサイトと末梢ニューロンの変性を合併するまれな症例 (FSGS+CMT DIE) の原因遺伝子を探索した。次世代シーケンサの技術を導入することによって、これまでよりも大幅に遺伝子解析期間の短縮を図ることができた。

患児はいずれも *INF2* のミスセンス変異のヘテロ接合体であることがわかった (Toyota K, 2013)。いずれも変異も一般人口中のアレル頻度は 0.1% 以下で、まれな変異と考えられた。また変異効果の予測プログラム (SIFT, Polyphen-2, Mutation taster) の解析上 deleterious, pathogenic と判定された。Case 1 の両親 (図 3) のゲノム DNA シーケンサ解析では変異はなく、同胞発症は性腺モザイクが原因である可能性が示唆された。

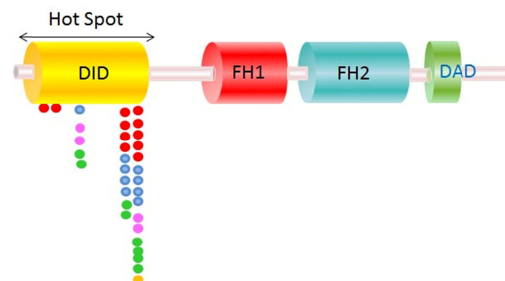


図 4 *INF2* のドメインの構造と変異の位置 FSGS を来す疾患変異 (○で示す) は、N 端側の DID (diaphanous inhibitory domain) と呼ばれる領域に集中している。

INF2 変異はもともと腎糸球体に限局した症状を示す優性遺伝型家族性 FSGS の原因として報告されていた。本研究の結果は同じ INF2 変異でも FSGS のみ、あるいは FSGS に加えて末梢神経変性を合併する例があることを示しており、その分子機序の解明が今後の課題である。腎糸球体硬化 CMT を合併する病型(CMT+FSGS)を来すものは、腎糸球体限局型(FSGS のみ)の疾患変異部位に比較して、N 端側に分布していた(図 4)。現在、発現実験を行い変異が起こる部位により細胞の機能・構造にどのような差を生じるのかを検討している。

謝辞

本研究についてご助言いただいた、東京女子医科大学・服部元史教授、山形大学小児科・早坂清教授に深謝いたします。

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 5 件)

- (1) 上田 啓子, 塚口裕康 遺伝子異常(総説) 特集 ネフローゼ症候群: 病因・病態と治療に関する最新の知見 腎と透析 76 巻 6 号, 801-810, 2014
- (2) Toyota K, Ogino D, Hayashi M, Taki M, Saito K, Abe A, Hashimoto T, Umetsu K, Tsukaguchi H, Hayasaka K. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease complicated with focal segmental glomerulosclerosis. *J Peripher Nerv Syst.* 18(1):97-98, 2013.
- (3) 山本準也, 中沢大悟, 塚口裕康, 豊山貴之, 佐藤亜樹子, 中垣祐, 石川康暢 柴崎跡也, 西尾妙織, 渥美達也 フォルミン INF2 変異が同定された腎移植希望の家族性 糸球体硬化症(FSGS) の 1 例 日内会誌 102:1220-1222, 2013
- (4) Kimata T, Tsuji S, Yoshimura K, Tsukaguchi H, Kaneko K. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus-related glomerulonephritis in a child. *Pediatr Nephrol.* 27(11):2149-2152, 2012
- (5) 塚口裕康 ゲノムからみた慢性腎臓病の発症分子機序解明へのアプローチ 細胞 44(5):20-26, 2012

[学会発表](計 11 件)

- (1) 日高義彦、小池涼介、塩入崇弘、野田俊輔、小池健一、木下達也、塚口裕康 フォルミン INF2 変異による家族性巣状分節性糸

球体硬化症の同胞例 第 49 回日本小児腎臓病学会 秋田ビューホテル 2014 年 6 月 5-7 日

- (2) 草部牧子, 塚口裕康, 中野力, 上田啓子, 染矢和則, 中東三聖, 菊池早苗, 今田崇裕, 塩島一郎「特徴的な線維構造物を認めた膜性増殖性糸球体腎炎の一例」第 43 回日本腎臓学会西部学術大会 松山全日空ホテル 2013 年 10 月 11-12 日(日本腎臓学会誌 55 巻 6 号 1212, 2013)
- (3) 中野力, 塚口裕康, 中東三聖, 上田啓子, 草部牧子, 染矢和則, 菊池早苗, 今田崇裕, 塩島一郎「腎性低尿酸血症に基底膜異常症を合併した 1 例」第 43 回日本腎臓学会西部学術大会 松山全日空ホテル 2013 年 10 月 11-12 日 (日本腎臓学会誌 55 巻 6 号 1194, 2013)
- (4) 上田啓子, 中野力, 中東三聖, 土手絹子, 染矢和則, 草部牧子, 菊池早苗, 山原英樹, 今田崇裕, 正木浩哉, 塚口裕康, 塩島一郎「透析困難症を呈したミトコンドリア異常症による肥大型心筋症の一例」第 58 回日本透析医学会学術集会、福岡国際会議場 2013 年 6 月 20-23 日 (日本透析医学会雑誌 46 巻 Suppl.1 464, 2013)
- (5) Goto S, Hosomichi I, Tsukaguchi H, Inoue I, Narita I. Exome sequencing identifies a novel EEA1 variant in Japanese familial IgA nephropathy (Abstr). ASN Renal Week 2012, San Diego, USA 査読有 November 1 – 4th
- (6) 塚口裕康, 金子一成, 木全貴久, 佐藤秀典 発達遅滞と無眼球症を主徴としたモザイク型 16 番染色体長腕トリソミーの一例 第 57 回日本人類遺伝学会、京王プラザホテル 2012 年 10 月 24-26 日
- (7) 塚口裕康 第 47 回 日本小児腎臓病学会招待教育講演「ネフローゼの原因遺伝子探索」都市センターホテル 2012 年 6 月 29-30 日
- (8) 上田啓子, 塚口裕康, 日高義彦, 中沢大悟, 西尾沙織, 鈴木信夫, 岩田 恭宣, 飯田博行, 岩坂壽二 家族性優性遺伝巣状糸球体硬化症におけるフォルミン INF2 変異の意義 第 55 回 日本腎臓学会学術総会, パシフィコ横浜, 2012 年 6 月 1-3 日
- (9) 後藤眞, 成田一衛, 塚口裕康, 井ノ上逸朗, 成田一衛 次世代シーケンサーを用いた腎臓病研究 第 55 回 日本腎臓学会学術総会 会長主導企画シンポジウム パシフィ

- コ横浜, 2012年6月1-3日
- (10) **Hiroyasu Tsukaguchi** 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research. "Molecular Genetics of Proteinuric Disorders", Seoul, Korea, May 16-18, 2012
- (11) **塚口裕康** シンポジウム招待講演「遺伝性・症候性ネフローゼ症候群の遺伝子解析」第115回日本小児科学会福岡国際会議場, 2012年4月20-22日

〔図書〕(計1件)

- (1) 塚口裕康 Galloway-Mowat 症候群(脳・腎系球体異形成) 別冊 日本臨床 腎臓症候群(上): page 411-419, 2012, 日本臨床社

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
該当なし

取得状況(計0件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等

腎尿路器系の稀少難治性疾患群に関する調査研究班
http://www.cis-trans.org/kobe_ku/research.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
塚口裕康 (TSUKAGUCHI, Hiroyasu)
関西医科大学・医学部・講師
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