

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：24791062

研究課題名(和文) フィブロネクチン腎症の病因・病態の解明

研究課題名(英文) pathology of glomerulopathy with fibronectin deposits

## 研究代表者

大坪 裕美(Ohtsubo, Hiromi)

神戸大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：60568806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：病理学的にFN腎症と診断されている12家系の患者のFN1遺伝子解析を行った結果、患者全例にてFN1遺伝子の変異を同定し得た。5名は今までに報告のあるヘパリン結合部位に存在するp.Y973C変異を認め、他7名に新規の変異を認めた(p.W1925C, p.1472del, p.P969T, p.L1974P)。新規の変異のうち、1472delはこれまで報告のないインテグリン結合を制御する部位に存在した。変異によりp.1472delの3次元構造は大きく変化し、インテグリンとの結合はWild typeと比較して低下し、インテグリン結合部位を介した細胞接着も低下していた。

研究成果の概要(英文)：Glomerulopathy with fibronectin deposits (GFND) is a rare autosomal dominant disease showing chronic and progressive hereditary nephritis caused by mutations of fibronectin 1 gene (FN1) that encodes fibronectin. We could find mutations of all patients diagnosed as GFND by pathologically findings. And we found seven novel mutations of FN1. There are heparin-binding domains and integrin-binding domains in FN1, which play major roles in assembly of FN. We found one new mutation (p.1472del) located in integrin-binding domain. The p.P1472del mutant protein showed decreased cell binding ability via the integrin-binding site, and three-dimensional structures showed lower energetically stability and significantly weaker integrin-docking compared with the wild-type.

研究分野：小児科

キーワード：フィブロネクチン腎症 フィブロネクチン 遺伝性腎疾患 慢性腎臓病

## 1. 研究開始当初の背景

フィブロネクチン腎症は、1995年に、遺伝性腎疾患として初めて報告された。遺伝形式は常染色体優性遺伝である。糸球体内へのフィブロネクチンの多量の沈着を特徴とし、10台後半から30歳前後に発症し、半数近くの患者が高血圧を合併し、25%前後の患者が透析に至っている。免疫組織学的には血清由来のフィブロネクチンの糸球体内沈着物が著明であること、移植腎に再沈着が見られたことより、フィブロネクチンは糸球体内で産生されるより、血中由来(すなわち可溶性FN)であると考えられている。発症後おおむね15から20年で末期腎不全に至るばかりか、高率に移植後再発をきたす予後不良な疾患である。

2007年に本症の責任遺伝子としてFN1遺伝子が同定された。(proc Natl Acad Sci USA. 2008 Feb 19; 105(7):2538-43) 3種類の変異が同定されており、いずれもヘパリン結合部位の変異である。彼らは同定したヘパリン結合部位に位置する変異(p.W1925R, p.L1974R)の変異株を作り、バキュロウイルスシステムを用いて、蛋白発現を行った。そして、ELISA法、免疫抗体法を用いて、ヘパリン結合能の解析、培養ポドサイトへの接着能などの機能解析を行い、変異株はいずれもヘパリン結合能、ポドサイトへの接着能が低下していた。この結果より、彼らは、FN1遺伝子変異が存在すると、FN assemblyが障害され、糸球体基底膜の構成に利用されるべき可溶性FNの利用障害が起こり、不溶性FNと可溶性FNのバランスが崩れ、糸球体に可溶性FNが沈着するのではないかという仮説を立てた。この報告以来、FN1遺伝子とFN腎症についての報告はほとんどない。

## 2. 研究の目的

これまで、フィブロネクチン腎症患者のFN1遺伝子変異はヘパリン結合部位の変異のみ報告されている。今回我々は、本邦のフィブロネクチン腎症患者を集め、遺伝子解析を行ったところ初めてインテグリン結合部位に変異を同定した。このことより、病因がいまだ明らかになっていない本疾患の病態解明の一助となることを期待して、本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

対象は病理学的にFN腎症と診断されている12家系(男性4、女性8)の患者およびその家族12名である。方法は末梢血リンパ球からゲノムDNAを抽出し、PCRおよび直接シーケンス法を用いてFN1遺伝子解析を行った。同定し得たFN1遺伝子変異株(p.1472del, p.L1974P, p.L1974R)を作成し、バキュロウイルスシステムを利用して各変異株の蛋白を精製した。作成した変異蛋白にはインテグリン結合部位、ヘパリン結合部位の両方が含まれており、両者の相互作用にも注目した。まず、各変異遺伝子の蛋白とヘパリンおよびインテグリンに対する結合能の測定を行った。次に免疫染色法によりポドサイトとの接着能を測定した。その際、ヘパリン拮抗薬であるプロタミンを用いた実験も行い比較検討した。また、インテグリン結合を介した細胞内シグナル伝達に関して、リン酸化チロシンの定量を行った。

## 4. 研究成果

対象患者12家系全例にてFN1遺伝子の変異を同定し得た。3家系は孤発例であった。2家系は解析時に末期腎不全に至っていた。高血圧、血尿を呈した患者は約半数に認められた。5名は今までに報告のあるp.Y973C変異を認め、それはヘパリン結合部位に存在した。他7名に各々新規の変異を認めた。(p.W1925C, p.1472del, p.P969T, p.L1974P)。新規の変異のうち、p.1472delはこれまで報告のない

インテグリン結合を制御する部位に存在した。また、興味深いことに家系内で患者よりも年長者で同一の遺伝子変異があるにもかかわらず、尿検査異常もなく無症状である例が存在した。臨床像の検討において、50%の患者が20歳までに蛋白尿の出現を認めた。各変異遺伝子の変異蛋白(p.1472del, p.L1974R, p.L1974P)を作成し、ヘパリン結合能をELISA法にて測定したところ、WTと比較してヘパリン結合部位に変異を認めた2種類の変異蛋白の一つは優位に低下を認め、もう一方も低下傾向であった。インテグリン結合能も同方法で測定したところ、インテグリン結合部位に変異のある変異蛋白はWTと比較して有意に低下を認めた。各変異フィブロネクチン蛋白をデブシユにコートし、ポドサイトとの接着能を測定したところ、インテグリン結合部位を介する細胞接着能はWTと比較して変化は見られなかった。しかし、ヘパリン拮抗薬であるプロタミンを添加すると、インテグリン結合部位に変異を有する蛋白とポドサイトとの接着能はWTと比較して優位に低下した。これは、本実験で用いているフィブロネクチン蛋白はヘパリン結合部位とインテグリン結合部位の両方を有するため、どちらかに変異があり、ドメインの機能が低下していても、正常なドメインが機能を補うためと考えられた。インテグリン結合部位に変異を有する場合、ヘパリン結合部位が機能を補っていたが、ヘパリン拮抗薬の添加によりヘパリン結合部位が機能しなくなり細胞接着能が低下したと考えられる。各ドメインが相補的に機能するため、細胞骨格であるアクチンの形成は正常で、細胞骨格は正常に形成されていた。また、チロシンリン酸化の低下も認めず、細胞内シグナルは正常に伝達されていた。新規に同定したインテグリン結合部位の変異は、インテグリンとの結合を制御する重要な働きを有する場所に存在し、構造解析に影響を与えている可能性がある

ると考え、3D構造解析を行い、インテグリンとのドッキング実験を行った。結果、インテグリン結合制御部位の変異蛋白はWTと比較して、インテグリンとの結合回数が優位に低下した。これらの結果より、フィブロネクチン腎症は、これまでヘパリン結合部位の変異のみの関与が証明されていたが、インテグリン結合制御部位の関与が明らかになったことより、フィブロネクチン腎症の病態の解明の一助になる可能性がある。

#### 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5件)

#### 1. 学校検尿により発見されたフィブロネクチン関連腎症の1例

Author: 佐藤 泰征, 佐々木 聡, 岡本 孝之, 伊東 広臨, 楠 幸博, 鈴木 昭, 深澤 雄一郎, 大坪 裕美, 橋村 裕也, 貝藤 裕史, 飯島 一誠, 有賀 正

Source: 日本小児腎不全学会雑誌 (1341-5875)31 巻 Page156-158(2011.07) 査読有

2. Fu XJ, Nozu K, Kaito H, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Yoshikawa N, Ohtsubo H, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Matsumura C, Takagi N, Maekawa K, Taniguchi-Ikeda M, Iijima K.: Somatic mosaicism and variant frequency detected by next-generation sequencing in X-linked Alport syndrome.

Eur J Hum Genet. 2015 May

27.doi:10.1038/ejhg.2015.113. 査読有

3. Matsunoshita N, Nozu K, Shono A, Nozu Y, Fu XJ, Morisada N, Kamiyoshi N, Ohtsubo H, Ninchoji T, Minamikawa S, Yamamura T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Shima Y, Kaito H, Iijima K. :

Differential diagnosis of Bartter syndrome, Gitelman syndrome, and

pseudo-Bartter/Gitelman syndrome based on clinical characteristics.

Genet Med. 2015 Apr 16. doi:

10.1038/gim.2015.56. PMID: 25880437 査読有

4. Hashimura Y, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Fu XJ, Ohtsubo H, Hashimoto F, Oka M, Ninchoji T, Ishimori S, Morisada N, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Yoshikawa N, Iijima K. :

Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV 5 chain. Kidney Int. 2014 May;85(5):1208-13. 査読有

5. Hashimoto F, Nishiumi S, Miyake O, Takeichi H, Chitose M, Ohtsubo H, Ishimori S, Ninchoji T, Hashimura Y, Kaito H, Morisada N, Morioka I, Fukuoka H, Yoshida M, Iijima K. Metabolomics analysis of umbilical cord blood clarifies changes in saccharides associated with delivery method. Early Hum Dev. 2013

May;89(5):315-20. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 大坪 裕美, 岡田 太郎, 梶本 武利, 野津 寛大, 神吉 直宙, 松野下 夏樹, 忍頂寺 毅史, 貝藤 裕史, 中村 俊一, 飯島 一誠: フィブロネクチン腎症(FN)におけるFN1 遺伝子変異の同定およびその機能解析に関する研究  
第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会 (20140605) 秋田

2. 大坪 裕美, 野津 寛大, 神吉 直宙, 松野下 夏樹, 忍頂寺 毅史, 貝藤 裕史, 飯島 一誠: フィブロネクチン腎症におけるFN1 遺伝子変異の同定およびその機能解析に関する研究  
第 57 回日本腎臓学会学術総会(20140704)横浜

3. 石原 正行, 佐藤 哲也, 前田 賢人, 松本

学, 成瀬 桂史, 庄野 朱美, 大坪 裕美, 貝藤 裕史, 野津 寛大, 飯島 一誠, 藤枝 幹也: Fibronectin 腎症の 14 歳女兒例  
第 48 回日本小児腎臓病学会学術集会 (20130628) 徳島

4. 大坪 裕美, 橋本 総子, 石森 真吾, 忍頂寺 毅史, 橋村 裕也, 貝藤 裕史, 森貞直哉, 上杉 憲子, 飯島 一誠, 松尾 雅文: 本邦におけるフィブロネクチン腎症患者のFN1 遺伝子変異と表現型についての検討  
第 54 回日本腎臓学会学術集会(20110615)横浜

5. 大塚康洋、後藤憲彦、渡井至彦、打出和治、堀家敬司、稲熊大城、武田朝美、両角國男、城謙輔、大坪裕美、飯島一誠: 移植腎生検を契機に診断し得たFibronectin 腎症の1家系  
移植腎病理研究会・第 15 回学術集会 (20110716) 東京都

6. Hiromi Ohtsubo, Fusako Hashimoto, Shingo Ishimori, Takeshi Ninchoji, Yuya Hashimura, Xue Jun Fu, Hiroshi Kaito, Naoya Morisada, Noriko Uesugi, Kazumoto Iijima: Glomerulopathy with fibronectin deposits (GFND): novel mutations and asymptomatic patients with FN1 mutation  
Annual meeting American Society of Nephrology, 2011 米国

〔図書〕(計 1 件)

1. 大坪 裕美, 野津 寛大, 飯島 一誠  
【腎のたまり病】アミロイド以外の蛋白由来物質が蓄積する疾患 フィブロネクチン関連腎症の診断と治療  
腎と透析 (0385-2156)77 巻 2 号  
Page207-209(2014.08)  
東京医学社

〔その他〕

ホームページ等

1. 難病情報センター 腎・泌尿器系の希少難治性疾患群に関する調査研究研究班  
Fibronectin 腎症 (平成 24 年度)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大坪 裕美 (Hiromi Ohtsubo)

神戸大学 大学院

研究者番号: 60568806