

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293126

研究課題名(和文) 腎コロボーマ症候群の遺伝子診断法確立と急性腎障害バイオマーカー開発

研究課題名(英文) Gene analysis of renal coloboma syndrome and biomarker development of acute kidney injury

研究代表者

古市 賢吾 (FURUICHI, KENGO)

金沢大学・大学病院・准教授

研究者番号：50432125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、希少な遺伝性疾患である腎コロボーマ症候群の遺伝子解析と急性腎障害のバイオマーカー開発を、PAX2遺伝子という視点から検討を行ったものである。本研究において腎コロボーマ症候群の症例から、PAX2以外の4つの遺伝子を同定した。その中には、世界初の報告となるヒトKIF26 B遺伝子異常の症例も含まれている。また、動物モデルおよび細胞実験による急性腎障害に関する検討において、腎障害進行に果たすPax2遺伝子の意義と、分子機序の一端が明らかになるとともに、バイオマーカーとなりうる遺伝子候補が示された。くわえて、急性腎障害の検討においても、新たなバイオマーカー分子の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, gene analysis of renal coloboma syndrome, which is a rare genetic disease, and biomarker development of acute kidney injury, were evaluated from the viewpoint of PAX2 gene. In this study, four genes other than PAX2 were identified from cases of renal coloboma syndrome. Among them, we reported a case of human KIF 26 B gene mutation, which is the world's first report. In addition, in the study of acute kidney injury by animal models and cultured cell experiments, the roles of the Pax2 gene in pathogenesis of kidney disease and molecular mechanisms were revealed. Moreover, candidates of new biomarkers were discovered. In addition, the possibility of a new biomarker molecule was also evaluated in the study of human acute kidney injury.

研究分野：腎臓病学

キーワード：腎コロボーマ症候群 急性腎障害 PAX2 KIF26B

## 1. 研究開始当初の背景

腎コロボーマ症候群は、世界で 170 例ほどしか報告のない稀少疾患である (Hum Mutat. 2012;33:457-66)。本症候群では、高頻度に腎機能障害の進展がみられ、末期腎不全に至り透析導入など腎代替療法が必要になる症例も少なくない。しかし、我々は診断スクリーニングポイントの明確化や地域ネットワークを用いた啓蒙活動により、これまでに、孤発例、家族集積例あわせて 26 例の症例を集積していた。本症候群には、約半数に PAX2 遺伝子変異が見られる事が報告されている。我々も 11 例に PAX2 遺伝子変異を同定しており、その内 4 つの変異は、これまでに報告のない新規の遺伝子変異であった。一方、残り半数の中にも腎障害の家族集積を認める症例群が存在し、遺伝子異常の可能性が示唆されていた。この様な知見から本症候群に関して、次の二つの可能性を考えた。(1) 腎コロボーマ症候群は、これまでの報告以上に多数存在する可能性がある。(2) 本症候群には、PAX2 以外の遺伝子異常が関与している可能性がある。この二つの可能性を検証するために、遺伝子診断法の確立が必須であると考え、本研究を企画した。

さらに、この腎コロボーマ症候群の症例群を詳細に検討すると、同一遺伝子異常を持つ家系なかでもでも腎不全に至らず、腎機能が比較的保持される症例と腎機能障害が進行し、末期腎不全にいたる症例が存在する事が分かった。これらのことから、PAX2 遺伝子異常は腎発生のみならず、後天的な腎障害の進展にも重要な役割を果たしていることが推測された。

一方、急性腎障害は、短期のみならず長期予後が不良であること、30 年以上前と変わらず、高い死亡率であること、および腎のみならず他臓器との関連が深い事から近年注目されている病態である。実際、慢性腎臓病 (CKD) 症例の腎機能悪化の一因としても急性腎障害が関与している事が示唆されており、急性腎障害の長期予後や心血管疾患を含めた他臓器連関は臨床上重要な検討課題であると考えた。我々は、それまで、急性腎障害に関してサイトカイン・ケモカインの観点から解析を行い、急性腎障害の病態には、“炎症カスケード”が存在する事を示してきた。これらの実績を背景に、最近では、腎修復・再生の観点から腎発生に関連した遺伝子発現に注目していた。成体の修復過程には発生に関連する因子が関与することがある。今回注目する PAX2 も、腎の発生に深く関与する遺伝子である。成体では一旦発現しなくなる PAX2 だが、急性腎障害後に再活性化する事が確認されており、障害進展・修復に重要な因子の可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

われわれは、最終目標を、稀少疾患である腎コロボーマ症候群の迅速な遺伝子診断法

の確立と急性腎障害の病態解明とし、PAX2 とする共通の因子からアプローチする事とした。さらに、これらの研究過程において、腎機能障害進展・修復機序の解明も行う。本研究は、(1) 腎コロボーマ症候の解析、(2) 急性腎障害に対する基礎研究、および (3) 急性腎障害の臨床研究の三つのプロジェクトからなるように計画した。

(1) 腎コロボーマ症候の解析では、多数例の症例集積を背景に PAX2 遺伝子変異および PAX2 に遺伝子変異を伴わない症例の遺伝子変異検索を行うこととした。本プロジェクトでは、PAX2 関連の複数の因子を次世代シーケンサーによりシーケンスし、腎コロボーマ症候群の新規原因遺伝子の検索を試みる計画とした。短時間で複数の遺伝子に対して遺伝子検索が可能になれば、本症候群の診断に有用であると考えた。

(2) 急性腎障害に対する基礎研究においては、これまで検討を積み重ねてきた腎虚血再還流モデルや細胞実験を通して、PAX2 の再活性化に関連したバイオマーカー候補分子の抽出を行う計画とした。成体では一旦発現が消失している PAX2 遺伝子発現は、虚血障害により再活性化する現象を利用して、PAX2 関連因子の検索を行うこととした。

(3) 急性腎障害の臨床研究では、臨床検体および臨床データを用いた検討を進める事とした。基礎的検討で得られた病理学的変化および遺伝子発現変化に関して、ヒトサンプルでの検証を進める計画とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、(1) 腎コロボーマ症候の解析、(2) 急性腎障害に対する基礎研究、および (3) 急性腎障害の臨床研究の 3 つのプロジェクトに関してそれぞれ以下の様に検討する計画とした。

(1) 腎コロボーマ症候の解析；遺伝子診断法の確立

PAX2 遺伝子が同定されない約半数の腎コロボーマ症候群に対して、標的遺伝子を絞った原因遺伝子の検索を行うこととした。

(2) 急性腎障害に対する基礎研究；急性腎障害修復・再生関連分子の検討

基礎研究では、障害後に PAX2 遺伝子が再活性化する事に着目し、急性腎障害修復・再生にはたす PAX2 の役割を検討することとした。マウスモデルにおける、PAX2 遺伝子発現解析や siRNA やヘテロノックアウトマウス、およびコンディショナルノックアウトマウスを用いて病態関連分子の検討を行う計画とした。

(3) 急性腎障害の臨床研究臨床

造影腎症を含めた急性腎障害症例の尿タンパク網羅解析により急性腎障害のバイオマーカー検索を行うとともに、基礎研究でえられた候補分子との関連を検討する異とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 腎コロボーマ症候の解析

腎コロボーマ症候群に関しては、33例の症例を収集した。PAX2 遺伝子の上流もしくは下流に位置し、腎の発生に重要な 25 遺伝子を抽出し検討対象とした。いずれの遺伝子においても標的とするエクソン配列の 90%以上を評価可能なプライマーセットを作成する事ができた。PAX2 遺伝子以外に、4 遺伝子 KIF26B, CHD7, SIX4, SALL4 に変異を有する症例を確認した。そのうち KIF26B 遺伝子はこれまでヒトでの遺伝子異常は報告されておらず、我々の報告が世界初の KIF26B 遺伝子異常の症例であった。本遺伝子は、マウスにおいて PAX2 と同様、腎の低形成を起こす事が報告されている。しかしながら、その分子機序は不明であると共に、PAX2 との関連も知られていない。また、基礎的検討においても、KIF26B の作用機序に着いても *in silico* の検討をおこなった。本症例は、経過にて末期腎不全に至り、弟をドナーとして腎移植を施行した症例であった。また PAX2 変異に加え、SALL4 の変異も伴った症例も確認した。これらの結果は PlosOne に報告した。

さらに、PAX2 遺伝子変異部位とその表現型について、詳細な検討を進め PAX2 の転写因子としての機能分析を行う事が可能であった。DNA 結合モチーフ解析による *in silico* での解析により、腎発生および修復にかかわる分子の候補 22 因子を見出す事ができた。これらの分子については、現状では腎コロボーマ症候群を示すとの報告は無いため重要で新規の知見と考える。これらの知見は、動物実験など基礎的な検討に用いる事ができた。詳細は次項。

##### (2) 急性腎障害に対する基礎研究

急性腎障害に対する基礎研究に関しては、siRNAによる制御による検討、およびヘテロノックアウトマウスやコンディショナルノックアウトマウスによる検討から多くの知見が得られた。マウス腎虚血再還流障害にて PAX2 遺伝子の再活性化とその発現抑制により線維化の低減が確認された。PAX2 遺伝子変異症例が腎不全に至る機序を説明する知見と考える。本知見を確認するために、ヘテロノックアウトマウスや尿細管上皮細胞のみで発現調節可能な PAX2 コンディショナルノックアウトマウスを作成し、Cre マウスと PAX2-*fllox* マウスとのかけ合わせを行い、線維化の検討を進めた。

網羅的解析から得られた結果や、データベースでの検討結果および前項で示したヒト検体から得られた知見を元に検討を展開した。これらの検討より、複数の標的分子が PAX2 に制御される可能性のある分子候補として特定された。候補となった 22 の分子の内、細胞周期に関連する一因子が病態に関与している可能性が推測された。

本因子に関しては、尿細管上皮細胞における虚血ストレスでの発現誘導が見られるこ

とが確認された。くわえて、siRNAにより発現制御される事が確認され、PAX2 との関連が示唆された。この分子は、細胞周期に関連する遺伝子であり、細胞周期を G2 期に停止させる働きを持つ事が報告されている。したがって、本分子が細胞分裂を抑制し、虚血刺激後の腎組織障害の進展に関与している事が推測された。

##### (3) 急性腎障害の臨床研究臨床

急性腎障害の臨床研究に関しては、各種病態の急性腎障害に対するサンプル収集、臨床情報収集を進めた。

代表例の経時的なサンプルにおける網羅解析から、急性腎障害発症時にみられ経過で消失していくピーク、急性腎障害後の経過で新たに出現してくるピークが確認された。1 つは、尿細管障害マーカーとして広く知られている分子であったが、障害時には、特徴的な分子断片として検出されることが確認された。しかしながら、これまでの検討結果からは、PAX2, KIF26B あるいは、候補となっている他の分子との関連は確認できなかった。

ヒトの遺伝子解析および基礎的動物実験からは、尿中、血中で同定できる様な候補分子は特定できなかった。しかし、今後、今回得られたヒト尿の網羅解析結果と新規分子との関連を進める必要があると考える。

以上のように、当初の検討はほぼ予定通り進められた。また、新規にヒトから発見した KIF26B に関する基礎的検討をスタートできた。PAX2 を主体とした一連の検討において、関連分子を含めた多くの新知見が得られた。一部は、腎発生異常や組織障害の病態形成に関する主体を担っている事が示唆され、腎障害進展機序の一端を解明出来たものと考えられる。

#### 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 11 件)

1. Furuichi K, Yuzawa Y, Shimizu M, Hara A, Toyama T, Kitamura H, Suzuki Y, Sato H, Uesugi N, Ubara Y, Hisano S, Ueda Y, Nishi S, Yokoyama H, Nishino T, Kohagura K, Ogawa D, Mise K, Shibagaki Y, Kimura K, Haneda M, Makino H, Matsuo S, Wada T. Nationwide multicentre kidney biopsy study of Japanese patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* Epub ahead of print, 2017 査読有
2. Sakai N, Chun J, Duffield JS, Lagares D, Wada T, Luster AD, Tager AM. Lysophosphatidic acid signaling through its receptor initiates profibrotic epithelial cell fibroblast communication mediated by epithelial cell derived connective

- tissue growth factor. *Kidney Int* 91(3):628-641, 2017 査読有
3. Oshima M, Iwata Y, Furuichi K, Sakai N, Shimizu M, Hara A, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Umeda E, Kaneko S, Arai S, Miyazaki T, Wada T. Association of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression with urinary protein and kidney dysfunction. *Clin Exp Nephrol* 21(1):35-42, 2017 査読有
  4. Sakai N, Furuichi K, Wada T. Inhibition of NLRP3 inflammasome as a therapeutic intervention in crystal-induced nephropathy. *Kidney Int* 90(3):466-468, 2016 査読有
  5. Hara A, Furuichi K, Yamahana J, Yasuda H, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T. Effect of autoantibodies to erythropoietin receptor in systemic lupus erythematosus with biopsy-proven lupus nephritis. *J Rheumatol* 43(7):1328-2334, 2016 査読有
  6. Okumura T, Furuichi K, Higashide T, Sakurai M, Hashimoto S, Shinozaki Y, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Sugiyama K, Kaneko S, Wada T. Association of PAX2 and Other Gene Mutations with the Clinical Manifestations of Renal Coloboma Syndrome. *PLoS One* 10(11):e0142843, 2015 査読有
  7. Toyama T, Furuichi K, Shimizu M, Hara A, Iwata Y, Sakai N, Perkovic V, Kobayashi M, Mano T, Kaneko S, Wada T. Relationship between Serum Uric Acid Levels and Chronic Kidney Disease in a Japanese Cohort with Normal or Mildly Reduced Kidney Function. *PLoS ONE* 10(9):e0137449, 2015 査読有
  8. Sakai N, Wada T. T Helper 2 Cytokine Signaling in Bone Marrow-Derived Fibroblasts: A Target for Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 26(12):2896-2898, 2015 査読有
  9. Komura T, Sakai Y, Harada K, Kawaguchi K, Takabatake H, Kitagawa H, Wada T, Honda M, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S. Inflammatory Features of Pancreatic Cancer Highlighted by Monocytes/Macrophages and CD4+ T cells with Clinical Impact. *Cancer Sci* 106(6):672-686, 2015 査読有
  10. Sakai N, Wada T. Revisiting inflammation in diabetic nephropathy: the role of the Nlrp3 inflammasome in glomerular resident cells. *Kidney Int* 87(1):12-14, 2015 査読有
  11. Iwata Y, Furuichi K, Hashimoto S, Yokota K, Yasuda H, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 443(3):969-974, 2014 査読有
- [学会発表](計 20 件)
1. 和田隆志: 糖尿病性腎症病期分類: 病理・バイオマーカーへの展望, 第 28 回日本糖尿病性腎症研究会 2016 年 12 月 4 日 東京
  2. 古市賢吾・和田隆志: 糖尿病性腎症のコホート研究とバイオマーカー, 第 46 回日本腎臓学会西部学術大会 2016 年 10 月 14 日 宮崎
  3. 坂井宣彦・和田隆志: 臓器線維化進展機序における生理活性脂質の意義, 第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 6 月 18 日 横浜
  4. 和田隆志・原章規・岩田恭宜・古市賢吾: 糖尿病性腎症におけるバイオマーカー: 抗エリスロポエチン受容体抗体の可能性, 第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 6 月 17 日 横浜
  5. 和田隆志: 腎臓病の病態とバイオマーカー探索, 日本薬物動態学会 第 30 回年会 2015 年 11 月 12 日 東京, 口頭, 招待講演 東京
  6. 古市賢吾・和田隆志: 本邦における糖尿病性腎症研究: 臨床, 病理, バイオマーカーの接点と展開, 第 45 回日本腎臓学会西部学術大会 2015 年 10 月 24 日 金沢, 口頭, 審査有
  7. Norihiko Sakai, Yasutaka Kamikawa, Akihiro Sagara, Yasuyuki Shinozaki, Shinji Kitajima, Akinori Hara, Yasunori Iwata, Miho Shimizu, Kengo Furuichi, Takashi Wada. LPA-LPA1 Signaling Regulates Fibroblast Proliferation and Myofibroblast Differentiation Dependent on Epithelial Cell-Fibroblast Interaction. *ASN Kidney Week 2015* 2015 年 11 月 7 日 San Diego, USA, ポスター, 審査有
  8. Takashi Wada. Albuminuria in diabetic nephropathy *Asian Nephrology Conference 2015* 年 4 月 26 日 Kaohsiung, Taiwan, 口頭, 招待講演
  9. 岩田恭宜・古市賢吾・橋本真一・奥村利矢・山村雄太・和田隆志: 次世代センサーが導くバイオマーカーの開拓, 日本臨床検査自動化学会第 46 回大会 2014 年 10 月 10 日 神戸, 口頭, 審査有
  10. 古市賢吾・和田隆志: 本邦における糖尿病性腎症のレジストリーと臨床疫学, 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7

- 月 5 日 横浜, 口頭, 審査有
11. 岩田恭宜・和田隆志: 炎症が妨げる再生, 第 57 回日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 5 日 横浜, 口頭, 審査有
  12. 和田隆志: 臨床検査の視点からみた腎臓と生体ネットワーク, 第 63 回日本医学検査学会 2014 年 5 月 17 日 新潟, 口頭, 招待講演
  13. Norihiko Sakai, Takashi Wada, Andrew M. Tager. LPA-LPA1 Signaling Directs Peritoneal Mesothelial Cell Migration and Myofibroblast Differentiation in the Pathogenesis of Peritoneal Fibrosis. ASN Kidney Week 2014 2014 年 11 月 13 日 Pennsylvania, USA, ポスター, 審査有
  14. Haruka Yasuda, Yasunori Iwata, Kengo Furuichi, Shinichi Hashimoto, Norihiko Sakai, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Yasuyuki Shinozaki, Akihiro Sagara, Takashi Wada. Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology 2014 年 5 月 15 日 Tokyo, Japan, ポスター, 審査有
  15. Kengo Furuichi, Miho Shimizu, Tadashi Toyama, Takashi Wada and The Research Group of Diabetic Nephropathy, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. Establishment and impacts of Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study (JDNCS). ISN NEXUS SYMPOSIUM 2014 2014 年 4 月 3 日 Bergamo, Italy, ポスター, 審査有
  16. 和田隆志: 糖尿病性腎症における炎症の意義とその制御, 第 28 回日本糖尿病合併症学会 2013 年 9 月 13 日 旭川, 口頭, 招待講演
  17. 古市賢吾・舟本智章・北島信治・遠山直志・北川清樹・岩田恭宜・清水美保・和田隆志: 糖尿病性腎症レジストリー Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study(JDNCS)の集積と展開, 第 28 回日本糖尿病合併症学会 2013 年 9 月 13 日 旭川, 口頭, 審査有
  18. 岩田恭宜・橋本真一・横田恭宣・古市賢吾・和田隆志: 高糖刺激下での培養メサンギウム細胞における炎症関連遺伝子発現, 第 56 回日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 11 日 東京, 口頭, 審査有
  19. Yasunori Iwata, Kengo Furuichi, Haruka Yasuda, Norihiko Sakai, Shinji Kitajima, Tadashi Toyama, Yasuyuki Shinozaki, Akihiro Sagara, Takashi Wada. Genome-Wide Profiling of Inflammation Related Genes in High Glucose Stimulated Mesangial Cells

- and Tubular Epithelial Cells. ASN Kidney Week 2013 2013 年 11 月 7 日 Atlanta, USA, ポスター, 審査有
20. Kengo Furuichi. Regulation of inflammatory transition from acute to chronic kidney disease. ISN World Congress of Nephrology 2013 2013 年 6 月 2 日 Hong Kong, 口頭, 招待講演  
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 腎コロボーマ症候群の遺伝子診断  
 発明者: 古市賢吾, 和田隆志  
 権利者: 国立大学法人金沢大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2015-063841  
 出願年月日: 平成 27 年 3 月 26 日  
 国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古市 賢吾 (FURUICHI, Kengo)  
 金沢大学・附属病院・准教授  
 研究者番号: 50432125

### (2) 研究分担者

和田 隆志 (WADA, Takashi)  
 金沢大学・医学系・教授  
 研究者番号: 40334784

岩田 恭宜 (IWATA, Yasunori)  
 金沢大学・附属病院・助教  
 研究者番号: 90432137