

第5回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞講演

ステロイド感受性ネフローゼ症候群 新規原因遺伝子群の同定

Mutations in six genes cause steroid-sensitive nephrotic syndrome

工藤 宏紀^{*1,2}

Hiroki KUDO

はじめに

ネフローゼ症候群は小児で最も頻度の高い原発性糸球体疾患の一つである。標準的なステロイド治療により寛解に至るステロイド感受性ネフローゼ症候群(steroid-sensitive nephrotic syndrome : SSNS)と治療に反応しないステロイド抵抗性ネフローゼ症候群(steroid-resistant nephrotic syndrome : SRNS)に分類される。ネフローゼ症候群の病因は不明な点が多いが、何らかの液性因子や免疫異常、遺伝的要因など複数の因子が関与すると考えられてきた。そのなかで、臨床的にしばしば経験される家族性ネフローゼ症候群では、より強い遺伝的要因の関与が疑われる。これまで、家族性 SRNS の家系解析により、50 以上の原因遺伝子が同定されてきた。一方、SSNS では原因遺伝子の報告はほとんどなく、その遺伝的背景や SSNS と SRNS の病態の関連は明らかでない。

近年、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスを用いることで、従来は困難であった小規模家系の原因遺伝子検索が可能となった。全エクソンシーケンスでは、次世代シーケンサーの高出力特性を利用し、ヒトゲノム中の約 2% を占めるエクソン領域の配列を網羅的に解析する。参照配列との比較から同定される多数の変異に対し、家系情報を基に設定した条件にしたがって変異の絞り込みを行い、原因候補遺伝子を同定することができる。特に、常染色体劣性遺伝形式が疑われる同胞内発症例は、候

補変異の絞り込みに有利であることが知られている。われわれは、SSNS の新規原因遺伝子を同定することを目的に、家族性 SSNS の家系解析を実施した。

新規原因候補遺伝子 *ITSN2* の同定

発端となったのは、ネフローゼ症候群の兄妹例であった(図 1)。兄(II-2)は 2 歳でネフローゼ症候群を発症した。初期治療のプレドニゾロンに抵抗性を示し、シクロスポリンの併用により寛解した。以後、ステロイド依存性の非常に強い頻回再発型の経過であった。複数回の腎生検を実施し、病理所見はいずれも微小変化群(図 1)であった。17 歳時にリツキシマブを投与したところ、ステロイドを中断でき、19 カ月の寛解維持を達成した。妹(II-3)も 2 歳でネフローゼ症候群を発症した。早期から頻回再発型となり、ステロイド依存性の経過をたどった。病理所見は微小変化群であった。リツキシマブ投与によりステロイド中断が可能であった。このように 2 人は、臨床的特徴が共通する難治性 SSNS という表現型が一致することから、遺伝的要因の強い関与を疑った。家系情報より、単一遺伝子異常による常染色体劣性遺伝形式での発症との仮説を立て、全エクソンシーケンスを用いた家系解析を行った。罹患者 2 例に両親と非罹患同胞を加えた 5 例を対象に全エクソンシーケンスを実施した。末梢血より抽出したゲノム DNA を用いてエクソームライブラリを作成し、HiSeq2000 にてペアエンドでシーケンシングした。変異の同定には The Genome Analysis Toolkit を用いた。家系内で同定された全変異リス

*1 東北大学医学系研究科小児病態学分野, *2 岩手県立中央病院小児科

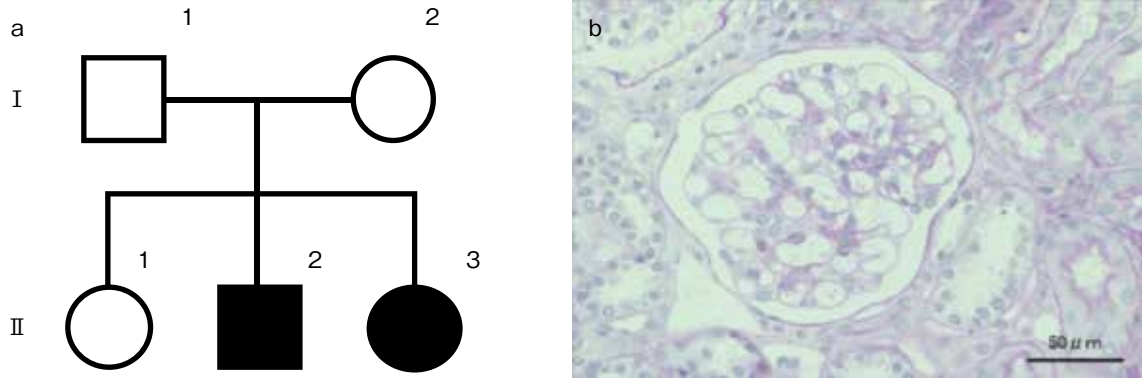


図1 ステロイド感受性ネフローゼ症候群兄妹例家系情報

a: 家系情報より常染色体劣性遺伝形式での発症が疑われた。

b: 症例 II-2 の初回腎病理所見。複数回の腎生検ではいずれも微小変化群の診断であった。

トに対し、以下のような条件で絞り込みを行った。すなわち、①翻訳アミノ酸の変化を伴う一塩基変異 (Single-nucleotide variation: SNV)、エクソン領域を含む挿入欠失、スプライス部位 (イントロンの 3', 5' 端各 2 塩基) の変異、② 1000Genome データベースにおける Minor allele frequency (MAF) が 0.01 以下、かつ日本人ゲノム情報 (Human Genetic Variation Database) にホモ接合体変異の登録がない変異、③ 常染色体劣性遺伝形式が成立する変異、すなわち患者がホモ接合体変異または複合ヘテロ接合体変異であり、両親はヘテロ接合体変異の保因者、健常同胞は患者と同じ変異の組み合わせを持っていないもの、である。絞り込みの結果家系内の候補変異が単一遺伝子だけに認められた場合、これを原因候補遺伝子とした。解析の結果、2 番染色体に存在する *ITSN2* が原因候補遺伝子として同定された (図 2)。父由来の 2 塩基欠失 (I1214fs) と母由来の 2 種類のミスセンス変異 (Y1442S, S339C) を *ITSN2* に認めた。2 人の罹患者は両親それぞれの変異を複合ヘテロ接合体変異の形式で有し、非罹患同胞は父由来の変異のみを有していた。

ITSN2 と CDC42

ITSN2 はアダプターたんぱく質インターセクチン 2 (*ITSN2*) をコードする遺伝子である。*ITSN2* には *ITSN2-S* と *ITSN2-L* の主要な 2 種類のスプライスバリエントが存在する¹⁾。*ITSN2-L* が持つ DH ドメインは、Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rho GTPase) の一種である CDC42 特異的な活性化作用を持つことが知られている²⁾。CDC42 は RhoA や Rac1 とともに糸球体上皮細胞のアクチン細胞骨格

を制御する重要な因子である。マウスにおいて糸球体上皮細胞特異的に CDC42 をノックアウトすると先天性蛋白尿を認める³⁾。また、SRNS の家系解析により Rho GTPase 制御因子をコードする *ARHGAP24* と *ARHGDI* が原因遺伝子として報告されている^{4,5)}。われわれは、*ITSN2* の CDC42 活性能に着目し、同定された変異による機能変化を評価した。

変異 *ITSN2* による CDC42 活性能の低下

野生型 *ITSN2* と家系内で同定された各変異を有する変異 *ITSN2* の各コンストラクトを作製し、COS-7 細胞にトランスフェクションした。ELISA 法を用いて活性型 CDC42 を測定した。野生型 *ITSN2* と比較して変異 *ITSN2* をトランスフェクションした細胞では、活性型 CDC42 が有意に低かった (図 3a)。また、CDC42 活性化によって形成される Filopodia と呼ばれる細胞の指状突起構造を有する細胞の割合を測定した (図 3b)。Filopodia 陽性細胞の割合も各変異群で有意に低かった (図 3c)。以上より、COS-7 細胞において家系から同定された *ITSN2* の変異により活性型 CDC42 を低下させることと Filopodia 形成を抑制することが明らかとなった。

Itsn2 ノックアウトマウスは LPS 刺激による蛋白尿が増加する

次に、*ITSN2* の機能喪失による表現型を解析するために、*Itsn2* ノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスは自然経過で高度蛋白尿を自然発症することはなかった。

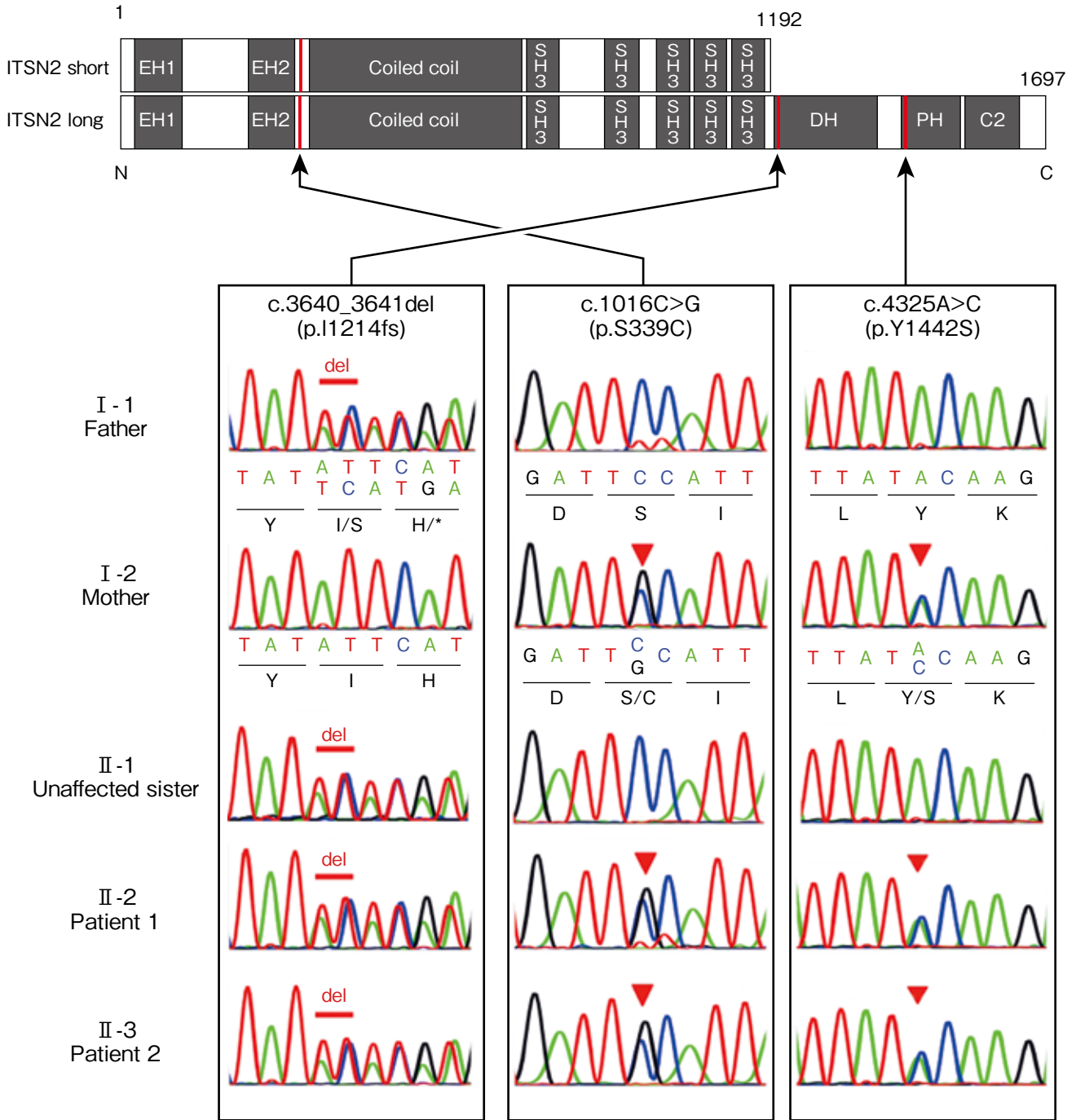


図2 家系内の *ITSN2* 変異情報

父親に2塩基欠失(I1214fs)を、母親に2種類のミスセンス変異(Y1442S, S339C)をそれぞれヘテロ接合体変異で認めた。2人の罹患者は両親それぞれの変異を複合ヘテロ接合体変異の形式で有し、非罹患同胞は父由来の変異のみを有していた。模式図で *ITSN2* の代表的な2つのアイソフォームにおけるドメイン構造を示す。

また、腎組織所見にも異常を認めなかった(図4a)。表現型の違いを観察するためには何らかの刺激が必要と考え、リポ多糖(LPS)投与による一過性蛋白尿モデルを用いた。4~6週齢の雌マウスにLPSを腹腔内投与し、投与後72時間

までの尿中アルブミンを経時的に観察した。野生型マウスではLPS投与により、24時間以内にピークを迎え72時間以内に消失する一過性アルブミン尿が観察される。*Itsn2* ノックアウトマウスでは尿中アルブミン値のピークが投与

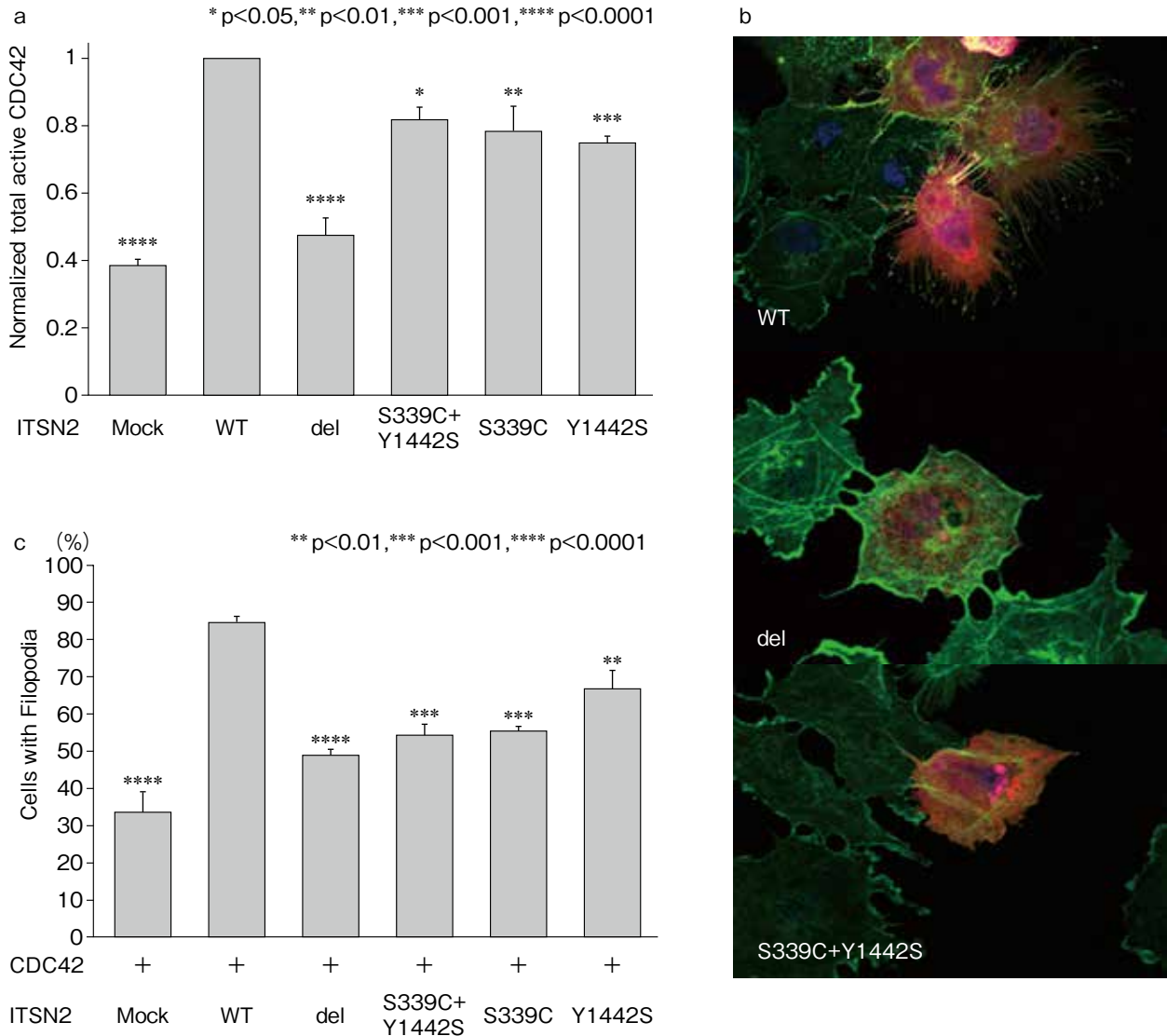


図3 変異 ITSN2 の機能喪失

- a: 患者から同定された変異を有する変異 ITSN2 (ITSN2-del, ITSN2-S339C, ITSN2-Y1442S, ITSN2-S339C + Y1442S) をトランスフェクションした COS-7 細胞では、野生型 ITSN2 (ITSN2-WT) をトランスフェクションしたものと比較して活性型 CDC42 が有意に低下した。
- b: Myc-CDC42 (赤) と FLAG-ITSN2 (ピンク) をトランスフェクションした COS-7 細胞の典型的な蛍光顕微鏡所見を示す。ITSN2-WT では全周性に密な Filopodia 形成が多数観察された。アクチンの染色には Phalloidine (緑) を用いた。
- c: 変異 ITSN2 をトランスフェクションした COS-7 細胞では、ITSN2-WT と比較して Filopodia 陽性細胞率が有意に低かった。

後 36 時間となり、投与後 12 時間、36 時間で野生型と比較して有意に高値であった (図 4b)。また、LPS 投与後 24 時間と 48 時間のマウスからそれぞれ腎臓を摘出し、透過型電子顕微鏡で観察した。野生型マウスでは投与後 24 時間で観察される糸球体上皮細胞の足突起消失が投与後 48 時間で回復しているのに対し、ノックアウトマウスでは 48 時間の時点でも足突起消失の残存が観察された (図 4c)。

ITSN2 変異を有するネフローゼ症候群孤発例の検索

本家系以外のネフローゼ症候群患者から ITSN2 変異を同定することを目的とし、SSNS 孤発例を解析した。東北大学小児科、群馬大学小児科、神戸大学小児科の協力により、SSNS 153 例のゲノム DNA を収集した。ITSN2 を含むターゲットシーケンスカスタムパネルを作成し、MiSeq

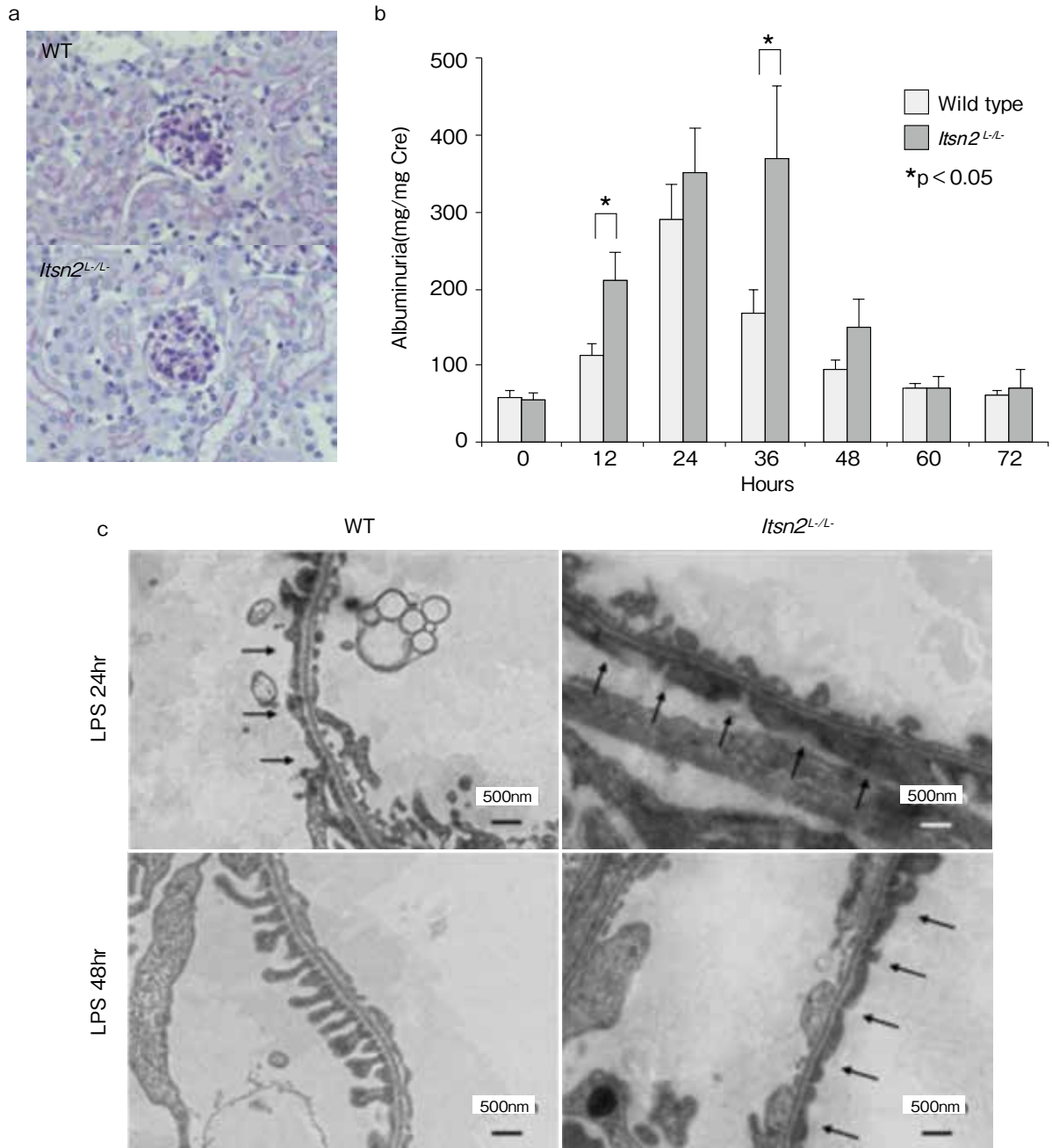


図4 *Itsn2* ノックアウトマウスの表現型

- a: ノックアウトマウスと野生型マウスの腎組織 PAS 染色像: ノックアウトマウスにおいて糸球体や尿管間質所見に明らかな異常所見を認めなかった。
- b: LPS 投与前から投与後 72 時間までの 12 時間毎の尿中アルブミン値の推移。投与後 12 時間から 48 時間でノックアウトマウスが高い値を呈し、12 時間、36 時間では有意に高値であった。
- c: LPS 投与後 24 時間、48 時間における糸球体系蹄壁の電子顕微鏡像: 24 時間の時点では野生型、ノックアウトマウスともに足突起消失(矢印)が観察された。48 時間では野生型で足突起構造がほぼ回復したのに対して、ノックアウトマウスでは広範囲で足突起消失が残存した。

または HiSeq2000 を用いてシーケンシングした。*ITSN2* の非同義低頻度変異を抽出したが、日本人孤発例に常染色体劣性遺伝形式を満たす低頻度変異を同定することはできな

かった。そこで、ボストン小児病院との共同研究により、新たに SSNS 800 例を含むネフローゼ症候群 2,000 例を対象とした解析を行った。その結果、アラブ系の血族婚家系の

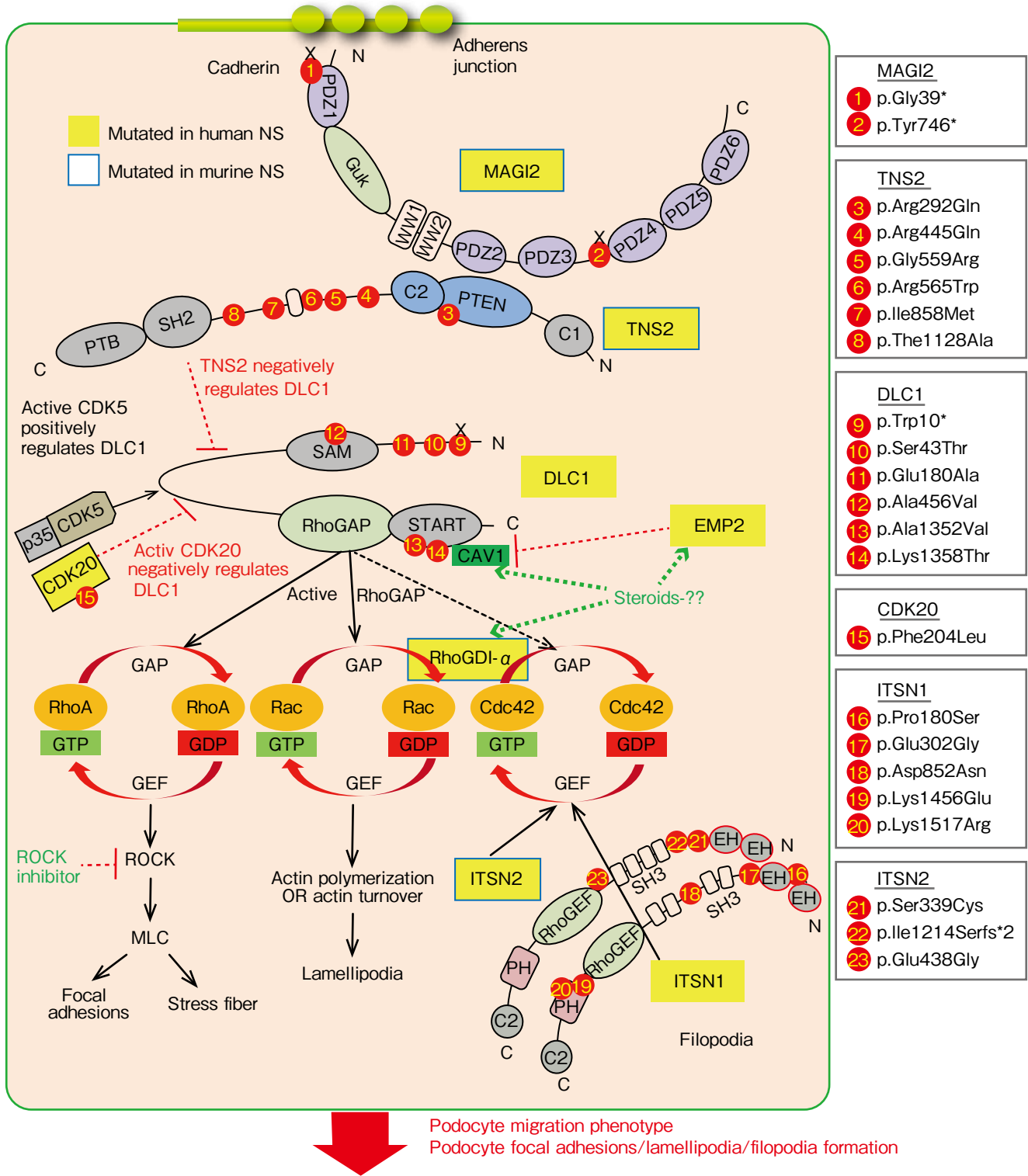


図5 RhoGTPase 活性調節系とネフローゼ症候群原因遺伝子群

SSNS 症例より、ホモ接合体の新規病原性変異(c.1313A>G)を同定した。これらの結果より、ITSN2 が SSNS の新規原因遺伝子であることが明らかとなった。

ネフローゼ症候群原因遺伝子群と RhoGTPase 活性調節パスウェイ

さらに、この解析のなかで新たに5つのネフローゼ症候

群新規原因遺伝子 (*MAGI2*, *TNS2*, *DLC1*, *CDK20*, *ITSN1*) が計 16 症例より同定された。この 16 症例はいずれも常染色体劣性遺伝形式で変異を有していた。また、すべての原因遺伝子でステロイド治療に反応を示す症例が含まれていた。*ITSN2* を加えた 6 つの原因遺伝子群はいずれも CDC42, RhoA, Rac1 といった糸球体上皮細胞で重要な役割を果たす RhoGTPase の活性調節に関与する同一パスウェイ上に存在していた (図 5)。RhoGTPase 活性調節因子である *ARHGDI*A や *ARHGAP24* といった既知の原因遺伝子では、報告された症例はすべて SRNS であった。われわれは SSNS と SRNS の一部において、共通の病態を有することを明らかにした。また、HEK293T 細胞を用いた *DLC1* の機能解析において、*DLC1* ノックダウンにより増加した活性型 RhoA がデキサメタゾン添加により抑制される結果が示された。このことはネフローゼ症候群において RhoGTPase 活性調節パスウェイがステロイド治療の作用ターゲットとなっている可能性を示唆する。今後、原因遺伝子群の相互作用機序の解明により、ネフローゼ症候群におけるステロイド感受性メカニズム解明に寄与することが期待される。

おわりに

ネフローゼ症候群兄妹例の解析を発端として、新規原因遺伝子群を同定した。SSNS において、単一遺伝子異常を原因とする症例はきわめて稀であると考えられる。しかしこうした稀少例の解析による知見の蓄積が、ネフローゼ症

候群の病態や治療反応性を理解するための一助となるであろう。

謝 辞

最後に、本研究を遂行するために多大なご指導、ご助力をいただいた呉 繁夫教授、熊谷直憲先生、菊池敦生先生、ならびにご協力いただいたすべての先生方に深く感謝いたします。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Pucharcos C, Casas C, Nadal M, et al. The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed. *Biochim Biophys Acta* 2001 ; 1521 : 1-11.
2. McGavin MK, Badour K, Hardy LA, et al. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *J Exp Med* 2001 ; 194 : 1777-1787.
3. Scott RP, Hawley SP, Ruston J, et al. Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1149-1154.
4. Akilesh S, Suleiman H, Yu H, et al. *Arhgap24* inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 4127-4137.
5. Gee HY, Saisawat P, Ashraf S, et al. *ARHGDI*A mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest* 2013 ; 123 : 3243-3253.