

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子解析によるネフローゼ症候群の病因解明

氏名 本田謙次郎

近年、岡本らはネフローゼ症候群患者における全ゲノム関連解析 (genome-wide association study, GWAS) において、rs16946160, rs11086243 の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) がその発症に関与していることを報告した。前者は *GPC5* 上にあつて *glypican 5* の発現に関与していること、*glypican 5* が蛋白尿発症や腎糸球体上皮細胞障害に寄与することを示されている。一方、後者は *SULF2* 遺伝子と *PREX1* 遺伝子の間、*SULF2* 遺伝子の約 400kb もの上流、*PREX1* 遺伝子の約 700kb もの下流に存在し、蛋白尿発症における機能的意義は明らかにされていない。私は rs11086243 の genotype が *SULF2* の発現を制御することをまず確認した。GWAS の結果とあわせると *SULF2* の低発現がネフローゼ症候群発症の risk となっていたことから、*SULF2* が蛋白尿発症に保護的に働くことで病態に関与しているという仮説を立てた。

さて、*SULF1* や *SULF2* といった細胞外で働くスルファターゼは、細胞接着や増殖因子の受容体とし

て機能する細胞表面型のヘパラン硫酸プロテオグリカン糖鎖の硫酸化パターンを調節することで、細胞の増殖や分化と運動の制御に関与している。また、SULFの下流にあるシグナルとしては、Wnt、骨形成因子（Bone morphogenetic protein, BMP）、グリア細胞由来神経栄養因子（Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF）、FGF-2の pathway が知られている。近年、Wnt/ β catenin pathway は腎糸球体上皮障害に関与することが報告され、BMPシグナルも糸球体上皮細胞障害やメサンギウム基質の増生に影響することが明らかになってきた。これらの報告は、SULF2が蛋白尿発症に影響するGWASの結果に合致する。

本研究ではまず、SULF2遺伝子から約400kbも離れたrs11086243と比べてより遺伝子に近い位置に強く疾患発症に関与するSNPがあるという仮説を立てた。SULF2・PREX1遺伝子間の約1Mbにわたる領域における20のタグSNPをもとに、e-QTL（expression Quantitative Trait Locus）解析、transcription factor-related research、imputation analysisを用いて同領域の詳細なSNP解析を行った。e-QTL解析、transcription factor-related research、imputation analysisでは、SULF2/PREX1領域にrs11086243よりもSULF2遺伝子に近いSNPを中心として、それぞれ2、4、6の候補SNPが得られた。これらの候補SNPについて、健常群300検体、ネフローゼ症候群患者群201検体を用いてgenotypingを行った。このうち、疾患発症について統計学的に有意なSNPを同定した。さらに得られたgenotyping dataをもとに施行したハプロタイプ解析において、SULF2/PREX1領域の2SNPにおいて疾患発症に有意なハプロタイプを得た（ $P=0.0088$, $5000\times$ permutation test）。Transcriptional start sites (TSSs)とそれから遠い領域にあるenhancerやpromoter, insulator element (CTCF)の相互作用や、TSSsから2.5kb以上離れた領域に約95%のDNase I hypersensitive sites (DHSs)が存在し、それらの多くはイントロンや遺伝子間領域であること

が本年報告された。本研究においてハプロタイプ解析で得られた SNP についても、遠い遺伝的距離であつても遺伝子を制御している可能性がある。

次に腎における SULF2 の機能解析を行った。まずマウスおよびヒトの腎切片の免疫蛍光染色において、糸球体内における SULF2 の発現を確認した。ヒトの腎切片の免疫蛍光染色では、peritubular capillaries における発現も認めた。マウスの糸球体上皮細胞にも SULF2 の発現を認め、主に核と細胞表面に分布していた。続いてマウスのネフローゼ症候群モデルとして、puromycin aminonucleoside (PAN) + FGF2 nephropathy model および adriamycin nephropathy model を確立した。PAN + FGF2 および adriamycin 投与により、nephrin の発現低下に伴って SULF2 の発現は低下していた。ラット糸球体上皮細胞に SULF2 siRNA を transfection すると、Q-PCR および Western blot 解析において、それぞれ 95%以上、約 40%の SULF2 発現の低下が見られた。これを用いると、SULF2 の下流にある Wnt/ β catenin pathway は SULF2 の発現低下により活性化され、これは PAN による障害により増幅されていた。また、AN model では継時的な β catenin の発現上昇及び β catenin の核内移行がそれぞれ Western blot 解析、蛍光免疫染色で見られた。これらは、SULF2 の発現低下により Wnt/ β catenin pathway が活性化され糸球体上皮細胞障害につながることを示していた。次に、SULF2 の下流にある BMP の一つである BMP6 について評価を行った。マウスの腎糸球体内での BMP6 の発現は、SULF2^{-/-}マウスにおいて増加していた。この BMP6 増加は、PAN + FGF2 nephropathy model, AN model においても、薬剤投与後に同様に認められた。また、培養細胞では、SULF2 の knock down によりラット糸球体上皮細胞での BMP6 発現は上昇するのに対して、ラットメサンギウム細胞では低下していた。BMP6 下流の phospho-Smad1/5 も同様の変化を示していたことから、障害による SULF2 低下が糸球体上皮細胞において BMP6 発現を増加させ、その

下流のシグナルを活性化させていることが示された。また、ラットメサンギウム細胞において *SULF2* を knock down すると、*FNI* の発現は有意に上昇し、*COL4A2* の発現も上昇する傾向が見られた (*FNI*, $P = 0.0152$, *COL4A2*, $P = 0.0505$)。これは *SULF2* がメサンギウム基質の増生にも関与することを示しており、メサンギウム領域の拡大を伴う腎炎においても rs11086243 の多型が影響するという GWAS のサブ解析の結果に一致する。

本研究では GWAS に引き続いた詳細な SNP 解析を行い、ネフローゼ症候群発症に強く関わるハプロタイプを同定した。*SULF2* 低発現が障害時に出現すること、またそれが腎障害のリスクとなることを *in vitro*, *in vivo* の系を用いて明らかにし、その下流にある複数の pathway が腎糸球体内の複数の細胞に作用することを発見した。今後は戻し交配を進めた上で *Sulf2*^{-/-}マウスを用いたネフローゼモデルの評価を行うとともに、サンプル数を増やした段階で上述のハプロタイプが genome-wide significance level を超えるどうかを評価していく予定である。