

Galloway-Mowat 症候群(腎系球体・脳異形成)の診断基準策定と
新規治療開発に関する研究

研究分担者 塚口裕康 関西医科大学・第2内科

研究要旨 Galloway-Mowat 症候群は、腎系球体硬化症(ネフローゼ)、小頭症(精神運動発達遅滞、てんかん)を2主徴とし、顔面四肢奇形を合併する原因不明の難治性遺伝疾患である。平成22年フィージビリティスタディにおける全国調査で、診療患者数は約200例と推定されている。本研究ではこの結果を踏まえて、暫定診断基準案を作成して班研究ホームページ(小児腎臓病学会ホームページにリンク)で公開した。しかし本症の疾患遺伝子は未だ不明であり、分子機序の基づくさらなる診断基準の改訂と治療開発を目標とし、次世代シーケンス拠点と共同で全エクソン解析による疾患遺伝子の探索を行った。その結果新たな2つの候補遺伝子に変異を見出し、病的意義を検討中である。また患者特異的 iPS 細胞樹立し、病態モデル作成や創薬探索のための基盤技術を構築した。

研究協力者

- 松本直通 横浜市立大学・人類遺伝学・教授
- 赤松和土 慶應義塾大学医学部生理学・講師
- 加藤光広 山形大学・小児科学・講師
- 伊藤秀一 国立成育医療研究センター
腎リウマチ膠原病・医長
- 米田香織 熊本大学・生命科学部・小児科
- 庄野朱美 神戸大学・小児科・リサーチレジデント

A. 研究目的

疾患概要：Galloway-Mowat 症候群(以下、GM 症候群と略す、OMIM 251300、腎系球体・脳異形成)は、腎系球体硬化症(ネフローゼ)、小頭症(てんかん、精神運動発達遅滞)を2主徴とし、顔面・四肢奇形を合併する原因不明の先天性症候群である。

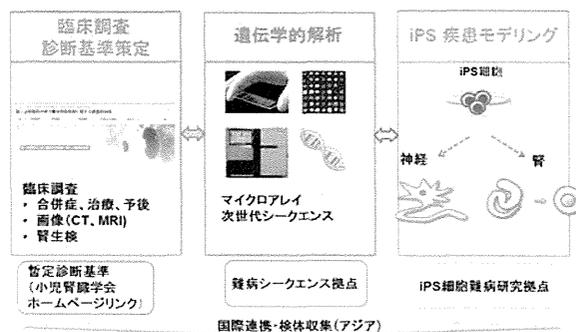
これまでの研究でわかっていること

- 1) **実態**：平成22年のフィージビリティスタディ(H22-一般-症例 027)で全国調査を行い、わが国の診療患者数は約200例と推定されている。臨床所見と重症度が多彩であり、軽症や診断未確定例が潜在し実患者数はさらに多いと思われる。
- 2) **病態と原因**：典型例は3歳までに発症し、遺伝的な原因で発症すると考えられる。また本症は中枢神経と腎系球体に器官形成不全を生じることが特徴で、この2組織に共通する発達因子の異常が原因と推測される。疾患遺伝子探索は全世界で進められているが、まだ特定に至っていない。2008年に欧州 GM 症候群コホート(50例)で、疾患遺伝子座位 *GMS-1* が報告された。本研究班でも別の疾患遺伝子座 *GMS-2* を同定し、疾患遺伝子は複数あると考えられるが、実体は不明である。

- 3) **難病支援のニーズ**：患者は難治性てんかん・発達障害に加えて腎不全を合併し、長期にわたる専門医療(腎移植、透析)、療育、福祉の多面的なケアが必要となる。

未解決の問題と研究の必要性

- 1) **疾患情報の不足**。病早期からの医療・福祉支援受給を実現する施策提言の根拠となる資料(実態調査、診療ガイドライン、重症度分類)が必要。
- 2) 統一された**診断基準**がない。軽症成人例を含めた疾患概念の見直しと、疾患分子を基軸とした診断基準と亜型群の分類枠組みの作成が望まれる。
- 3) **根治的治療**がない。てんかんや腎移植に対する長期薬物療法を余儀なくされている。iPS 細胞をはじめ先端技術を活用した根治的な分子標的治療薬、遺伝子治療、細胞治療の開発が待たれる。
- 4) **社会参加支援**が遅れがちである。患者・家族と医療・療育・社会支援スタッフが協働する包括的支援体制の構築と連携強化が必要。



個別化医療、再生医療、病態分子を標的とした新規治療薬の開発

図1 研究の概略図

A. 申請研究の目的 (図 1)

- 1) 診断基準策定: 平成 22 年度全国疾患実態調査を反映した暫定診断基準案作成し、研究班や学会のホームページに公開し、コンセンサスを得るための意見交換を行う。
- 2) データベース構築: 班研究で得られた患者情報の臨床所見(脳 MRI、腎病理、形態特徴、自然歴、予後)の統合データベースを作成する。
- 3) 疾患遺伝子同定: 次世代シークエンス拠点と連携して、診断の確定根拠となりえる疾患遺伝子変異を同定する。
- 4) 新規治療法の開発: iPS 細胞分化誘導拠点と連携して、疾患モデル細胞を作成し、創薬探査、細胞治療に役立つ技術基盤を構築する。
- 5) 長期療養と社会参加を支える総合対策の充実化: 班研究成果を患者支援に還元するために、難病医療支援ネットワーク、難病相談・支援センター、福祉施設との連携を推進できるコーディネータを育成できる体制整備を行う。

B. 研究方法

- 1) 診断基準策定: 平成 22 年度先行研究で行った質問紙法による全国実態調査(1560 施設、回収率 64%)の結果を基に、本疾患の診断に有用な症状・検査所見を抽出整理し、過去の文献を参考にして暫定診断基準を作成した。
- 2) データベース構築: 調査で「患者あり」の回答を得た 47 施設・患者数 70 名の中から診断確実性の高い症例を抽出し(図 2)、2 次調査票を送付した。疾患の基本情報(自然歴、治療など)を調査するとともに、一次調査で不足している情報: 頭囲(出生時、経過)、てんかん(脳波)の種類、発達遅滞の程度(IQ/DQ)、四肢(クモ状指)や骨格(低身長、側彎)等、の頻度を確認した。また臓器障害の臨床像と重症度を、脳画像診断(CT, MRI)、腎生検組織を用いて再検討した(研究協力者 加藤、伊藤)。
- 3) 疾患遺伝子同定: 本研究では、「次世代遺伝子解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発プロジェクトシークエンス拠点 (横浜市立大学・松本直通教授)」と共同で、エクソーム解析を行った。次世代シークエンスは HiSeq2000 を用い、paired-end 75 bp, 断片長 200 bp の条件で解析した。また必要に応じて染色体分染色法(G-band)や細胞遺伝学マイクロアレイ(CytoSNP-12)によるゲノム構造異常の解析を行った。
- 4) 新規治療法の開発: 本症はネフロン(中胚葉)とニューロン(外胚葉)の 2 つの胚葉由来の組織発達障害を特徴とするが、まずプロトコルが確立している神経系への分化誘

導から着手することにした。再生医療の実現化プロジェクト・「疾患特異的 iPS 細胞技術を用いた神経難病研究」(代表者: 慶應義塾大学医学部生理学・岡野栄之教授)の分担課題として採択された計画書「Galloway-Mowat 症候群の患者 iPS 細胞を用いた新しい診断・治療開発」に従い、平成 25 年 9 月から、本研究班リサーチレジデント(神戸大学・庄野)が慶應大学に短期滞在し、分化誘導実験を行った。まず最初に平成 22 年フィージビリティ研究において、仲里・米田ら(熊本大学小児科)、江良ら(熊本大学発生医学研究所)と共同で作成した本症患者 1 名(図 3, GMS1 矢印)の皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞(継代数 12 回、3 クローン)を、研究倫理審査承認後に慶應大学に送付し解析した。次に慶應大学に同一患者の血液を送り、Seki らの方法(2012)に従い、T リンパ球由来の iPS 細胞も樹立した。いずれも山中 4 因子(*OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC*) を Sendai ウイルスベクターを用いて初期化したもので、未分化マーカーの発現は RT-PCR 法あるいは免疫染色で確認した。正常対照として、201B7(山中研)、WD39(神経分化誘導の最適株)を用いた。

5) 難病総合対策の充実化:

本研究事業で得られた疾患情報(診療ガイドライン案、重症度分類)を効果的に医療相談・養育指導・福祉支援に活用するための参考文献とホームページを作成した。また難病相談やカウンセリング実施に必要な疾患自然歴、予後などの情報を収集と整理を行った。

(倫理面の配慮)

厚労省の倫理指針に準拠した医学研究倫理委員会承認済みのプロトコル(ヒトゲノム遺伝子解析、疫学研究、ヒト幹細胞、遺伝子組換え生物等)を用いて、研究を実施した。

C. 結果

1) 暫定診断基準策定

診断に必須である臨床症状主項目 2 つ(①ネフローゼ or 蛋白尿 > 0.5g/日)、② 精神運動発達遅滞、てんかん)と、副項目 1 つ以上を満たす場合に本症と診断する案をまとめ、班研究ホームページに公開した(<http://www.med.kobe-u.ac.jp/sgridk/>)。さらに日本小児腎臓病学会のホームページ(<http://www.jspn.jp/>)にもリンクさせ、一般の意見を広く求め、最終案に反映できるよう配慮した(別添資料 1,2)。

2) 疾患データベースの構築

これまで調査不足であった表現型特徴(脳 MRI、腎生検所見、形態異常)に焦点をあて比較検討した。脳 MRI あるいは CT 画像の得られた 10 例について

検討したところ、髄鞘化遅延あるいはびまん性の低形成(simplified gyral pattern)を示す例が多く、明らかな皮質形成異常を示す症例は2例のみであった。なお大脳だけでなく、小脳の低形成も約1/3程度の症例にみられた。難聴、眼症状(白内障、網膜変性)の頻度は1割程度であった。小頭症が明らかな例には、耳介低位、高口蓋、小下顎等に mildな dysmorphism を認めたが、疾患特異的といえる所見は見いだせなかった。また四肢については、クモ指、偏位などの小奇形がほとんどで、約1/4の症例に認めた。四肢症状は早期発症例ほど頻度が高いが、多指、合指などは認めなかった。腎生検が行われた症例では、巣状分節性糸球体硬化症を示すことが多く、ポドサイトの機能・発達障害が疑われた。一部の症例では内皮傷害を示唆する所見がみられ、症例の蓄積が必要である。

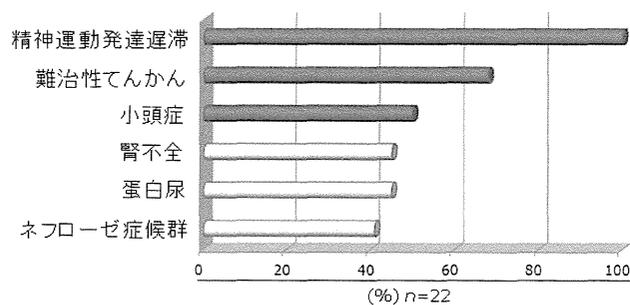


図2 患者の主要症状の出現頻度
平成22年全国調査で一次調査票に回答を得た20症例の症状の頻度を示した。この情報を基に2次調査を行っている。

3) 疾患遺伝子同定

G-band 分染法や細胞遺伝学マイクロアレイ (CytoSNP-12)解析では、疾患特徴的な構造異常は認めなかった。2症例はホモ接合体マッピングが可能で候補領域を推定できた。うちGMS-1家系(Nakazato, 2002, 図3)には、約10 Mbのホモ接合体の候補領域を確認したが、欧米で報告された疾患座位とは異なっていた。他の症例は孤発性あるいは家系構造が小さく、連鎖解析を用いた疾患遺伝子の位置決めは困難であった。全16家系(図3)について全エクソーム解析を行い、網羅的な変異探索を行った。1人あたり約5000-8000個の一塩基置換(single nucleotide variation SNV)が検出された。さらに劣性ホモ、劣性複合ヘテロ、新生変異、の3つの遺伝モデルを想定し、原因となり得るSNVを絞り込んだ。最終的に10-30個のSNVが候補として残った。

16例中2家系に有力な遺伝子変異(GM-1家系に遺伝子Aのスプライス変異を、GM-13家系に遺

伝子Bのナンセンス変異)を検出できた(図3)。スプライス変異はアクセプター部位から-11塩基上流の点変異で、*in silico*予測上 cryptic splice activationにより3アミノ酸のin-frame insertionを生じると推測された。実際にリンパ球を用いた転写産物の解析でも、予測通りの結果を確認できた。2者ともにアレル頻度0.1%以下のrare variantで、家系内では疾患表現型と cosegregate していた。またPicardiらの方法(Nature Methods 2012)に基づき Exome capture で得られたミトコンドリア遺伝子の情報を抽出し、ミトコンドリア変異の有無を検出した。しかし病因変異は、検出できなかった。

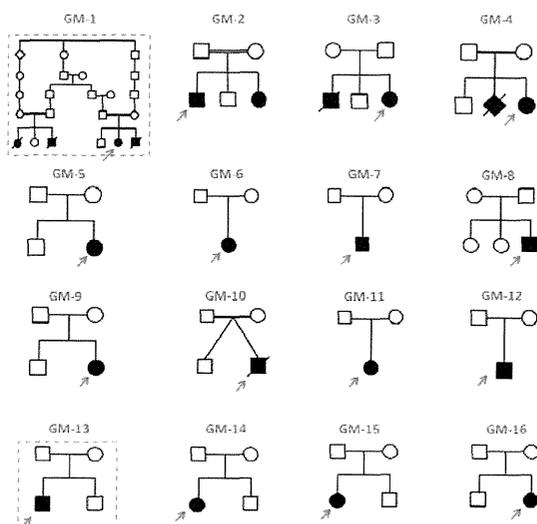


図3 全エクソーム解析を行った16家系患者22名(男女比1:1.2)のネフローゼの発症年齢の中間値は3歳、約4割が10歳までに末期腎不全となっている。点線枠の2家系(GM-1, 13)で、それぞれ疾患候補遺伝子A,Bの変異を同定した。

4) iPS細胞樹立と治療開発基盤の整備

先行研究で作成済の3系統の線維芽細胞由来iPS細胞において、免疫染色(*Nanog*, *OCT3/4*, *SSEA4*, *TRAI-60*)、あるいはRT-PCR(*GDF3*, *REX1*, *Sal4f*,等)を行い、未分化マーカーの発現を確認した。さらに品質管理のために核型分析を行ったところ、1系統に部分的なトリソミーがみられ、以降の分化誘導には使用しなかった。患者Tリンパ球から新たに作成したiPS細胞コロニーを75クローン単離し、うちベクターを除去できた継代6回未満の株を厳選して分化誘導に用いることにした。神経系への誘導はOkadaらの方法(2008)に従い、iPS細胞コロニーを浮遊培養に移し、胚様体を基にニューロスフェアと呼ばれる神経前駆細胞塊へと誘導した(添付資料3)。その結果得られた1次、2次、3次ニューロスフェアを、種々の特殊コートを施した硝子板の上にdisperseし、付着培養することで最終分化した神経細胞に分化誘導した。

5) 長期療養と社会参加を支える総合対策の充実化

研究班ホームページ開設とともに、疾患に関する問い合わせが増加し、分担機関(塚口)でも遺伝カウンセリングを提供できる体制を整えた。患者と家族の多様なニーズに対応し療養生活の質向上には、神経小児(てんかん、精神運動発育遅滞)、小児腎不全(移植、透析)、遺伝・療育相談、福祉支援など、多分野の医療・支援スタッフ間の情報共有が不可欠である。そのためには、まず疾患を理解するための基礎資料が必要と考えた。個々の病状(頻度、重症度、予後等)に基づいて適切な医療助成と養育・福祉支援の受給が実現するように、相談窓口、社会福祉制度・資源に関する情報や資料の収集と整理を行った。その一部はホームページに掲載したが、今後も班研究で得られた情報を基に、随時最新の疾患情報を提供していく予定である。

D. 考察

1) 診断基準の策定について 1986年英国小児科医 Galloway と Mowat が報告した原著症例は、先天性ネフローゼと小頭症を合併する重症例であった。本研究班の予備調査では、1-2歳で死亡する古典的な重症例に比し、成人まで達する軽症例の頻度が高いことがわかった。小児期を越えて生存しえた予後良好例では、長期にわたる治療や福祉支援が必要になると思われる。また脳異形性は最重症型(滑脳症)から軽症型(小頭症が明確でないが大脳皮質髄鞘低形成や小脳萎縮をしめす)例まで、幅広い臨床像を示しうる点を、診断基準に反映させる必要がある。

また腎病理についてはこれまで巣状糸球体硬化(FSGS)が特徴であることがわかっていたが、形態の細部に関する情報が不足していた。今回腎生検が得られた数例の組織像を詳しく検討すると、共通してメサングウム融解像が観察された。この変化はてんかん病態(例えば低酸素、薬剤)に続発して生じる腎障害例では認められなかった。したがって本症においては、内皮傷害を来す特異的な病態機序が存在する可能性が示唆され、注目に値する(伊藤秀一ら、論文作成中)。

上記の点を踏まえて、① 診断未確定に終わっている成人軽症例を包括する、② 診断根拠となるMRI画像、腎病理、形態所見(顔面、四肢)の具体的情報を盛り込む、の2点を盛り込んだ暫定診断基準を策定した(別添資料2)。この暫定診断基準を、班研究ホームページを学会ホームページとリンクして公開した。今後さらに実用性に富んだ基準になるように、意見交換を進めている。できれば原因遺伝子を明らかにし、責任分子を基軸にした亜型分

類、そしてそれに基づく個別化医療を含めたガイドラインの完成を目標としたい。

また今後診断ガイドラインを普及させることにより診療、療育、福祉支援スタッフ間での疾患情報の共有化を進め、難病対策の改革に関する施策の具体化に役立つ基礎情報を提供し、さらに広く国民の理解が得られるように啓蒙普及に努めていく。

2) 疾患遺伝子の探索

GM症候群の典型例のほとんどが3歳までに発症するため、遺伝因子が発症に関与すると考えられる。しかしながら、疾患遺伝子の実体は明らかになっていない。本症に特徴的染色体・ゲノム構造異常の報告はなく、点変異あるいは小さなゲノム欠失・重複が原因と推測される。症例の1-2割に劣性の家族集が疑われるが、発症に民族差はなく、新生変異で発症する可能性も高い。本症の病変主座である腎糸球体や脳は、細胞突起の綿密なネットワーク構造を基盤とし器官を構築している。このことから本症には、ニューロンと糸球体上皮(ポドサイト)の2者に共通する形態・構築制御機構の異常が関与していると予想される。

今回の解析で、16家系中2家系で2つの新規遺伝子が原因となり得る可能性を明らかにした。どちらの遺伝子も、神経発達異常の患者あるいはマウスモデルにおいて、神経細胞の機能・形態維持に重要であることが示されている。しかし今のところこれらの遺伝子の変異を他の家系で確認できず、また機能的にも腎ネフロン器官形成における役割は知られていない。したがってさらなる症例で変異スクリーニングする、疾患遺伝子の組織局在を確認するなどして、候補遺伝子が本症に普遍的に関与するのか、その病的意義の検証する必要がある。

疾患遺伝子の確定が難しい最大の要因は、疾患遺伝子が複数存在するためと考えている。したがって、国際協力で症例を多く収集し、集中的に疾患変異を探索し、疾患遺伝子の全体像を把握することにより、診断・治療開発に結びつく病態機序を解明したい。その他、次世代シーケンズの技術的限界、すなわち① GC rich な2次構造をとる遺伝子領域を Capture できていない、② リポート配列に富む領域はリファレンス配列にマップできていない、③ 次世代シーケンサはショートリードであるため exon の欠失、重複、Indels等は、検出が難しい、④ ヘテロプラスミーのミトコンドリア変異は検出が難しい、等については、解析拠点と協力して克服したい。

3) iPS細胞を用いた治療開発基盤の整備

本症のように病的組織(例えば脳)を採取しがた

い疾患研究において、試験管内で病態を再現できる iPS 細胞技術は、非常に有用なツールとなる。患者 iPS 細胞を用いた疾患モデルを作成し、創薬、細胞治療開発へと橋渡しするには、幹細胞からニューロンや腎前駆細胞への分化誘導技術を構築する必要がある。本症では脳神経と腎糸球体の 2 組織に共通する生物経路に病因が存在するはずである。そこでまず技術が確立している患者 iPS 細胞から神経細胞への誘導を行い、その表現型(分裂、遊走、突起形成等)を手がかりに、疾患の生物学経路やシグナル系の情報を引き出したいと考えた。GMS では小頭症(単純化脳回)、あるいは白質髄鞘化遅延を来す例が多く、障害される部位(大脳、小脳)やニューロン・グリアの種別は、症例によりさまざまである。おそらく神経前駆細胞群の全般的な分裂・遊走機能が障害されていると推測される。したがってまず、fore-, mid-, hind-brain の各領域を形成するニューロンやグリアへの誘導を試み、形態や機能を調べる予定である。

また本研究の注意点としては、(1) 疾患遺伝子の多様性、(2) 細胞株間の特性の違い、がある。(1)については、まず最初の iPS 樹立の対象として、単一劣性遺伝子(ホモ接合体)の関与が明確な大家系(GMS-1)の患者細胞を選んだ。さらに、CRISPR/Cas システムによる遺伝子編集技術をもちいて疾患変異を正常に戻し、疾患表現型が補正されるか検討する予定である。またヘテロ接合体である両親の細胞を、対照に置くなどを考えている。(2)に関しては、クローンによって分裂速度や分化特性に違いがあり、対照との比較を厳密に行う必要がある。

腎は構成細胞の数が多く、複雑な構造を取るため他の臓器に比して再生研究は遅れている。まず神経細胞で得られる情報を参考に、ネフロン前駆組織までを試験管内で誘導する系を構築し、患者で見られる糸球体発達異常の分子機序解明を前に進めたい。2013 年末に日本、豪州から相次いでヒト iPS 細胞、ヒト ES 細胞からのネフロン誘導法に関する論文が発表された。今後益々研究が進むものと期待される。

4) 長期療養と社会参加を支える総合対策の充実化 本症では、多臓器におよぶ症状(てんかん・発達遅滞、腎不全、四肢奇形)があるため、単一診療科受診では本症候群の診断がつかず、医療や福祉支援の受給が遅れる可能性がある。本研究で策定する診断基準や疾患情報の蓄積を活用し、今後さらに包括的医療・患者ケアの提供と社会参加を支援するチーム体制が充実するよう事業を進める。患児は成長(療育)や合併症(発達遅滞、透析・腎移

植)について、長期的ケアを必要とする。したがって発育段階に応じた養育相談と福祉資源を紹介し、継続的な支援を行うことが QOL 向上に重要である。班研究の疾患情報(自然歴・予後等)を基に、段階的に健康管理の目標を設定し、成長発達を支援できるように、多施設の連携強化が望まれる。そのためには社会参加に必要な支援制度や療育・福祉施設の情報を集約・整理して、各施設間の連携を仲介できるコーディネータを育成が重要であり体制整備を継続していきたい。

E. 結論

1) 達成度

診断基準については、暫定案を研究班ホームページ(小児腎臓病学会 HP にリンク)や総説(文献番号 11)に掲載し、本症の概念の普及と認知度の向上に貢献できたと考えている。今後学会コンセンサスが得られるよう議論を積み重ねる必要があるが、その土台を作ることができた。実際に暫定案の公開後、患者紹介率が増え、病態解明は前進した。

本症の疾患遺伝子探索は、原因となる分子が複数存在すると予想され、その全体像を把握するためには、もうすこし症例を増やし確認作業を行う必要がある。今回の研究で、候補となる分子の情報、シグナル経路の引き出せたことは大きな進歩であったと考える。

2) 学術的、国際的、社会的意義

本症の疾患遺伝子は、各国で進められているが、未だ確定しておらず、原因不明である。本研究班では、世界に類を見ない大きな家系や台湾を含む、全 16 例のエクソーム解析データを蓄積しており、今後国際的にも先端的な競争力を持った研究成果の発信が可能である。疾患遺伝子の同定は、まれな疾患にとどまらず、国民健康に関わるありふれた疾患(CKD 成人 10% 前後、てんかん・発達障害 1-2%)の診断治療にも新たなヒントを与え、社会的意義は大きい。

3) 今後の展望

本研究で構築した、診断基準策定、疾患遺伝子同定、患者 iPS 細胞による疾患モデリングの 3 つの柱を統合することにより、新しい疾患分子の発見、創薬探索、再生医療など次世代の医療開発への道が開ける。独自の疾患分子を機軸に診断・治療開発を展開することにより、産業的波及効果も期待できる。

4) 研究内容の効率性

疾患遺伝子探索は、次世代遺伝子解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発プロジェクトシークエ

ンス拠点」と、さらに患者 iPS 細胞樹立と分化誘導は、再生医療の実現化プロジェクト「疾患特異的 iPS 細胞技術を用いた神経難病研究」(分担課題「Galloway-Mowat 症候群の患者 iPS 細胞を用いた新しい診断・治療開発」)と連携して共同研究を行った。最先端技術・知識を共有することで、個別研究では不可能であった壁を克服し、大幅に解析作業の時間やコストを効率化できた。

本症患者のてんかんや腎障害は薬剤抵抗性でしばしば治療が難渋し、患者や家族は長期療養と多大な身体・精神負担を余儀なくされている。現在のところ原因が不明であり、根治的に結びつく治療開発を含めた疾患対策が切望されている。

本研究班でこれまでの診断が確定しにくいため対策が遅れていた GM 症候群の疾患対策を推進することができた。とくに次世代シーケンシング、iPS 細胞分化誘導拠点と連携することにより、検体収集、病因解明、創薬開発、疾患支援までをつなぐ、体系的なパイプラインを構築できた。今後これらの研究基盤を基にさらなる研鑽を積み、疾患情報や最新の研究成果を効率良く臨床へと橋渡しし、また社会的にも難病対策改革の施策に貢献できるよう、事業の推進に努力したい。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表	9 件
原著論文による発表	1 件
それ以外(レビュー等)の発表	3 件

1. **塚口裕康** ポドサイトとニューロンの共通点から探る難治性腎疾患の病態機序 九州ネフロロジー 2013 年 7 月 20 日-22 日熊本県・アソシエート
2. **塚口裕康** ポドサイトとニューロンの共通点から探る小児糸球体硬化の病態機序 2013 年 11 月 9 日 第 22 回長野県小児腎臓病研究会長野県・ブエナビスタ
3. 後藤 眞, 細道 一善, **塚口裕康**, 渡辺 博文, 井ノ上 逸朗, 成田 一衛 次世代シーケンサーが開く新しい腎臓基礎研究の展開: 家族内集積を示す腎疾患のエクソーム解析 第 56 回日本腎臓学会学術総会シンポジウム (日本腎臓学会誌 55(3): 283, 2013)
4. **塚口裕康** 日本小児科学会 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」2012 年 4 月 20 日 福岡国際会議場
5. **塚口裕康** 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」2012 年 6 月 30 日 都市センターホテル
6. 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

7. 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
7. 上田 啓子, 中野 力, 中東 三聖, 土手 絹子, 染谷 和則, 草部 牧子, 菊地 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 日本透析医学会雑誌 46 巻 Suppl.1 Page 464, 2013
8. 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 日本腎臓学会誌 55 巻 6 号 Page 1194, 2013
9. **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染色体 16 番長腕 第 57 回日本人類遺伝学会、京王プラザホテル 2012 年 10 月 26 日
10. Yamamoto J, Nakazawa D, **Tsukaguchi H**, Toyoyama T, Sato A, Nakagaki T, Ishikawa Y, Shibasaki S, Nishio S, Atsumi T. A case of familial focal segmental glomerulosclerosis with a mutation in the formin *INF2*. Nihon Naika Gakkai Zasshi. 2013 102(5):1220-1222.
11. **塚口裕康** Galloway-Mowat 症候群(脳・腎糸球体異形成) 別冊 日本臨床 腎臓症候群(上): page 411-419, 2012
12. **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 査読無
13. **塚口裕康**, 飯島一誠, 仲里仁史, 服部元史, 伊藤秀一, 小崎里華 難治性疾患克服事業(奨励研究)「Galloway-Mowat 症候群診断基準作成のための実態調査(H22 -難治-一般-027)」平成 22 年度成果報告書 厚生労働科学研究成果データベース [http://mhlw-grants.niph.go.jp/index.html ; 201024083A](http://mhlw-grants.niph.go.jp/index.html;201024083A)). 研究班ホームページ http://www.cis-trans.org/kobe_ku/research.html

2) 海外

口頭発表	2 件
原著論文による発表	3 件
それ以外(レビュー等)の発表	0 件

1. 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.* 2013 18(1):97-98.
2. Mae S, **Shono A**, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S,

Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2013;4:1367.

3. **Tsukaguchi H** 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research. "Molecular Genetics of Proteinuric Disorders", Seoul, Korea, May 16-18 2012
4. **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
5. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

別添資料 1 [暫定診断基準案]

主症状 2 項目を両方満たし、かつ副症状 1 項目以上満たす場合、ギャロウェイモワト症候群と診断する^{注1}。

主症状

1. 中枢神経症状 (精神運動発達遅滞、難治性てんかん)

典型例では小頭症(頭囲が性別・年齢平均値に比し、- 2 SD 以上小さい)を伴う^{注2}。理学的に小頭症がなくても CT・MRI で、大脳皮質形成異常(脳回異常、白質髄鞘化遅延)や小脳低形成を認めることがある^{注3}。

2. 腎障害(糸球体硬化症)

典型例ではネフローゼ症候群(尿蛋白 ≥ 50 mg/kg/day)を呈し、腎不全へと進行する。発症時期は、出生3ヶ月までの先天性、3ヶ月以降から3歳までの乳幼児期発症が、それぞれほぼ同頻度である。腎障害は進行し末期に至る年齢は3-10歳までと幅が広い^{注4}。腎機能が成人期まで保たれ、尿蛋白が中等度にとどまることもある^{注5}。腎生検組織像は巣状糸球体硬化症を示すことが多い^{注6}。

副症状 下記の幾つかを、主症状と合併する。

1. 外表奇形

顔面形成異常(前額狭小化、大きくて柔らかい耳、耳介低位、小下顎、高口蓋、眼間開離等)
四肢奇形(くも状指、屈指など)

2. 筋症状

筋症状(四肢緊張低下、斜視など)
食道裂孔ヘルニア^{注7}

[注釈]

注1 大部分は孤発性で、新生変異が疑われる。1-2 割は劣性の家族性集積を示す。疾患特異的な染色体異常の報告はない。

注2,3 小頭症は、胎生期から出生早期にかけての脳発達障害が障害され、正常な大きさに達しない病態である。原因として遺伝的要因の他に、外因(低酸素、感染、催奇形因子への暴露)も関与する。神経幹細胞の分裂、遊走が脳発達過程で障害されることにより脳皮質の萎縮もしくは低形成を来すと考えられる。出生時頭囲は正常でも、生後に発達遅滞が見られることがある。また症例の約 1/3 から半数の例で小脳低形成がある。剖検脳病理診断を実施した例では、大脳皮質ニューロンの層状形成異常や遊走異常が報告されている。

早期発症型(early-onset type, 3歳までにネフローゼとなる)の頭部画像診断では、通常単純性小頭症あるいは、脳回異常(帯状脳回、多小脳回、滑脳など)が見られる。一方晩期発症型(late-onset type, 3歳以降にネフローゼとなる)では CT 上明らかな脳形態異常がないことが多い。MRI により質的異常(髄鞘形成遅延、T2 強調画像で白質信号増強、等)を検出できる場合

がある。

注 5 Galloway-Mowat が原著で報告したいわゆる早期発症型(early onset type)の症例の多くは、3 歳までにネフローゼ・末期腎不全を呈する。しかし発症が緩除かつ遅れて発症する例(late onset type)もある。たとえば城ら、椎原らの、てんかん、小頭症、糸球体硬化症を合併する症例は、いずれもネフローゼの発症は遅く、10 歳を超えても腎機能が保たれている(*Am J Kidney Disease* 17:569-577,1991, *J Child Neurol* 18,147-149, 2003)

注 6 腎生検の組織像として、巣状分節性糸球体硬化症(Focal segmental glomerulosclerosis; FSGS)以外に、微小変化(minimal change disease; MCD)、びまん性メサンギウム硬化症(Diffuse Mesangial Sclerosis; DMS)、メサンギウム増殖性糸球体腎炎 mesangioproliferative glomerulonephritis の報告がある。本症では通常、周産期異常を認めないが、低出生体重の例では、ネフロン数の低下(Oligomeganephronia)との鑑別が必要になる。一般にステロイド治療抵抗性であるが、治療に反応した報告もある。

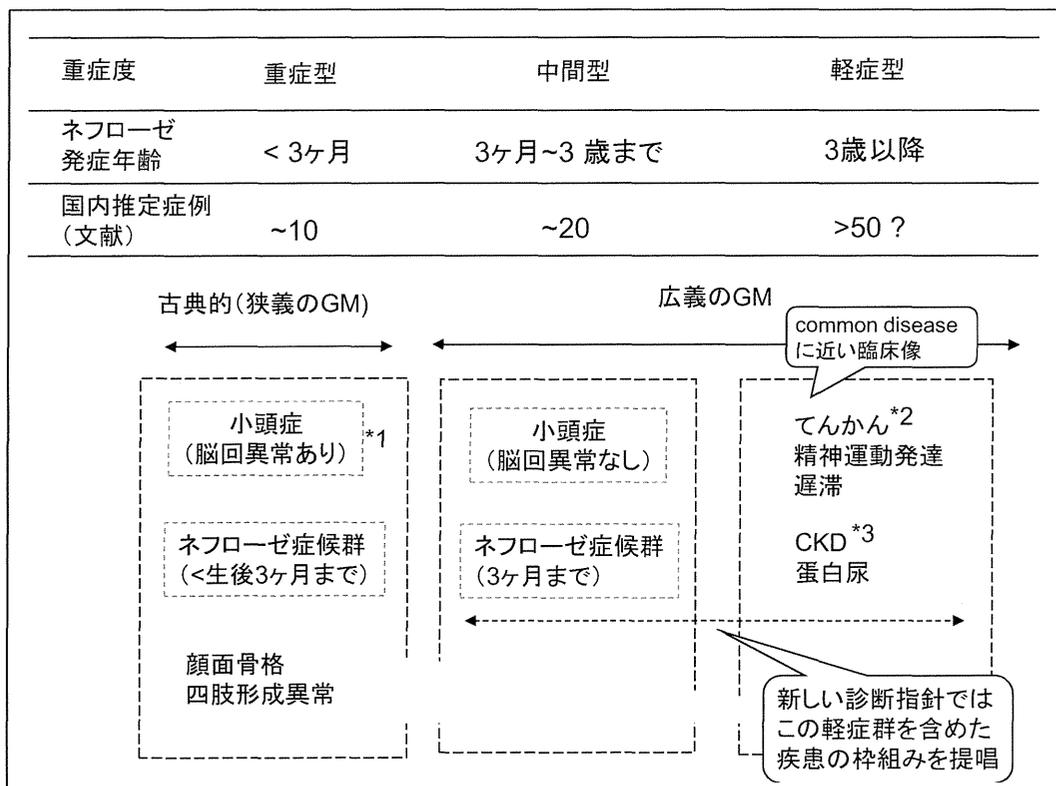
研究班でギャロウェイ-モワト症候群および類縁疾患の 5 症例の腎生検組織を検討したところ、全例に共通して FSGS パターンの硬化、およびメサンギウム増殖像を伴う病理変化が認められた。うち 1 症例では、内皮腫大、メサンギウム融解、管内増殖 が目立ち、内皮障害が示唆された。内皮障害を示唆するメサンギウム融解像や、微小血管瘤は、過去にも報告されている(Sano H, *Pediatr Nephrol.* 6:711-714, 1995).

これと関連して、城らは、てんかん・小頭症とネフローゼ症候群を合併する 5 症例の腎病理を検討し、メサンギウム融解像を伴う FSGS 所見が特徴であると指摘している(Joh K, *Am J Kidney Dis* 17:569-577, 1991)。これらの患者はギャロウェイ-モワト症候群という診断名が用いられていないが、班研究で検討した 5 例と臨床像に類似している(1-5 歳でタンパク尿が出現、3-10 歳でネフローゼとなり、一部は 10 歳前後で腎不全となる)。また全国調査において、メサンギウム増殖性糸球体腎炎(MPGN)がてんかん、精神運動発達遅滞に合併したと症例情報がいくつか寄せられている。したがって、本症における糸球体硬化の発症には糸球体上皮細胞(ポドサイト)以外に、血管内皮の異常も関与する可能性があり、症例の蓄積が待たれる。

注 7 Galloway-Mowat の原著では、罹患同胞 2 名が経過中に裂孔ヘルニアを合併し、小頭症、ネフローゼとともに疾患 3 徴のひとつに挙げられている。しかし上記患者の剖検時には裂孔ヘルニアを確認できなかったと報告されており、繰り返す嘔吐などで一過性、機能性に合併する随伴症状である可能性が考えられる。過去の症例報告をみても出現頻度は 1 割以下で、必発症状とはいえない。

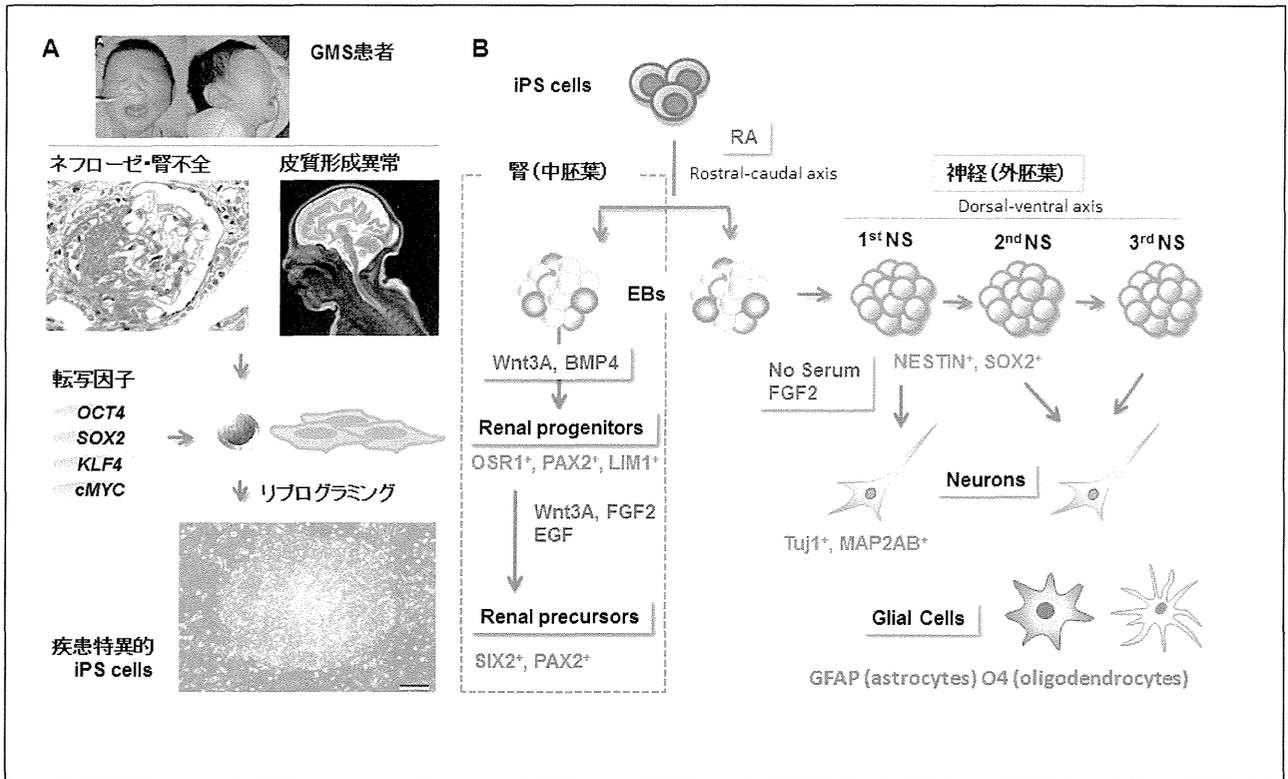
別添資料 2 疾患スペクトラムの広がり を考慮した診断基準改定案

古典的 Galloway-Mowat 症候群(GMS)の疾患概念の広がり と診断基準改定のポイント



- *1 GMS の古い文献報告には頭部画像診断情報が乏しく、脳発達障害の臨床的特徴を把握するにはさらなる情報収集が必要である。MRI 画像は脳皮質構造(脳回、脳溝の変化)のみならず髄鞘化遅延等の質的変化の検出も可能であり、病態評価に有用である。研究班では、これらの脳神経所見、腎生検、遺伝子異常等の情報を統合し、分子機序を基軸とした新しい疾患概念と亜型分類の作成を行っている。
- *2 小頭症や蛋白尿が軽症である例(広義の GMS)は、古典的な GMS 診断基準を満たさないため、単にてんかん、あるいは、精神運動発達遅滞と診断され、本症の診断に至らないという現状がある。そこで研究班では、成人に達する軽症例を含めた患者実数を調査し、疾患表現型の広がり を考慮した自然歴・予後の実態把握を進めている。
- *3 CKD; chronic kidney disease: 慢性腎臓病 慢性の腎機能障害(eGFR<60ml/分/1.73m²)と蛋白尿を来す病態・疾患群を包括する概念。

添付資料 3 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と病態モデリング



(A) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立 Galloway-Mowat 症候群(GMS)患者の線維芽細胞あるいはリンパ球に、Sendai Virus Vector を用いて山中 4 因子を導入し、多能性幹細胞への初期化を行う。

(B) 神経と腎前駆細胞への分化誘導ストラテジー

浮遊培養で形成される EBs (Embryoid Bodies)に 誘導因子(神経系: RA、腎前駆細胞: Wnt3A, BMP4)を添加した後、附着培養へと移行し分化誘導を行う。ニューロン、グリアへの誘導は、Neurosphere (NS) と呼ばれる自己増殖と可塑性を保持した神経前駆細胞群を介して行う(Okada Y, Stem Cell 2008)。誘導因子の、添加濃度、期間、組み合わせにより、EB での神経組織の頭尾軸決定、NS での腹背軸の決定を再現可能である。分化マーカー発現(赤字)を指標に分化誘導に最も適した条件を設定する。腎ネフロン分化誘導法については、既報の方法を応用する(Mae S, Shono A, et al 2013)。

腎・泌尿器系の希少難治性疾患群に関する調査研究
研究代表者 飯島一誠 神戸大学大学院医学研究科内科系講座

アルポート症候群に関する遺伝子型—表現型関連解析研究
研究分担者 野津寛大 神戸大学医学部附属病院助教

研究要旨 アルポート症候群患者において、日本国内で網羅的に遺伝子診断を行った。その結果、X染色体連鎖型アルポート症候群患者の中に、非典型的に4型コラーゲン $\alpha 5$ (IV)の発現を認める症例が29%存在した。そのため、 $\alpha 5$ (IV)陽性群と陰性群の2群に分けて、臨床的および分子生物学的特徴につき検討を行った結果、陽性群では有意に臨床症状が軽症であり、また陽性群においてはCOL4A5遺伝子にtruncating-mutationを認めなかった。これまでも $\alpha 5$ (IV)陽性XLAS患者が存在することは報告されてきたが、本研究はその臨床的および分子生物学的特徴を明らかとした初めての報告である。

1 研究目的

アルポート症候群は重篤な遺伝性腎疾患で、そのほとんどが30歳までに末期腎不全へと進行する。最も頻度の高いX染色体連鎖型アルポート症候群(XLAS)は4型コラーゲン $\alpha 5$ (IV)をコードする遺伝子COL4A5遺伝子の異常で発症する。典型例においては腎組織において $\alpha 5$ (IV)の発現を認めないことを特徴とする。私たちはこれまで、200家系以上のアルポート症候群患者の遺伝子診断を行ってきた結果、XLAS患者において、約20%の患者で $\alpha 5$ (IV)を発現していることが判明した。この $\alpha 5$ (IV)陽性患者群と陰性患者群における臨床的および分子生物学的違いについて検討を行った。

2 研究方法

対象は遺伝子診断でXLASと確定診断された男性患者62例のうち、 $\alpha 5$ (IV)発現解析を施行された52例で研究を行った。 $\alpha 5$ (IV)陽性群15例と陰性群37例の2群に分類し、臨床経過(尿タンパク出現年齢、腎不全進行年齢、難聴発症年齢、眼合併症の有無など)、検査値(尿タンパク量、推定GFRなど)、遺伝子変異の種類、遺伝子上の変異の場所等につき検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画の実施に際して、患者およびその家族からインフォームドコンセントを得た上で、神戸大学医学部倫理委員会の規約を遵守し、学内の現有設備を用いて研究を実施した。患者の個人情報機関外に漏洩せぬよう、資料や解析データは万全のセキュリティシステムをもって厳重に管理を行った。また、成果のとりまとめを行い、内外の学会や学術雑誌に積極的に研究成果の発表を行ったが、発表に際しては個人情報が漏洩することのないように、また患者やその血縁者を含めた家族に不利益のないよ

うに十分配慮した。

3 研究結果

患者52例中15例(29%)で $\alpha 5$ (IV)陽性であった。陽性群では尿タンパク発症年齢が有意に遅く(6歳vs4歳)、腎不全進行年齢も遅く(37歳vs24歳)、難聴は1例も認めなかった(0%vs54%)。また、陽性群の全例において、遺伝子変異はnon-truncating mutationであった。さらにミスセンス変異を有する患者で比較した結果、陽性群では変異はexon25より5'側に存在し、陰性群ではexon26より3'側に存在した。

4 考察

XLAS患者において $\alpha 5$ (IV)発現陽性例が存在することは以前より知られていたが、今回の研究により、その臨床的、遺伝学的特徴が世界で初めて明らかとなった。(Kidney Int, 2013 Dec 4 [Epub ahead of print])

5 結論

アルポート症候群は遺伝子変異の種類により、腎組織において $\alpha 5$ (IV)を産生する場合があります。その場合、臨床的に、腎症状は軽く、難聴も合併しないことを世界で初めて明らかとした。今後、ナンセンスリードスルーなど、遺伝子からの転写を制御する薬剤を使ってtruncating mutationをnon-truncating mutationへと変換することで、重症アルポート症候群患者を軽症にすることが可能と考えられる。今後、遺伝子治療への大きなヒントとなる研究成果であった。

6 研究発表

論文発表

それ以外(レビュー等)の発表 1件
そのうち主なもの

1 論文発表

1) Hashimura Y, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Fu XJ, Ohtsubo H, et al. Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV alpha5 chain. *Kidney international*. 2013 Dec 4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24304881.

2) Hasui M, Kaneko K, Tsuji S, Isozaki Y, Kimata T, Nozu Y, Nozu K et al. Different phenotypes of HNF1s deletion mutants in familial multicystic dysplastic kidneys. *Clinical nephrology*. 2013 Jun;79(6):484-7. PubMed PMID: 23725647.

3) Iijima K, Sako M, Oba MS, Ito S, Hataya H, Tanaka R, Nozu K et al. Cyclosporine C2 Monitoring for the Treatment of Frequently Relapsing Nephrotic Syndrome in Children: A Multicenter Randomized Phase II Trial. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2013 Dec 5. PubMed PMID: 24262503.

4) Ishimori S, Kaito H, Matsunoshita N, Ohtsubo H, Hashimoto F, Ninchoji T, Nozu K et al. SLC26A3 gene analysis in patients with Bartter and Gitelman syndromes and the clinical characteristics of patients with unidentified mutations. *The Kobe journal of medical sciences*. 2013;59(2):E36-43. PubMed PMID: 23756661.

5) Kaito H, Ishimori S, Nozu K, Shima Y, Nakanishi K, Yoshikawa N, et al. Molecular background of urate transporter genes in patients with exercise-induced acute kidney injury. *American journal of nephrology*. 2013;38(4):316-20. PubMed PMID: 24107611.

6) Shima Y, Nakanishi K, Hama T, Mukaiyama H, Togawa H, Sako M, Nozu K et al. Spontaneous remission in children with IgA nephropathy. *Pediatric nephrology*. 2013 Jan;28(1):71-6. PubMed PMID: 22940909.

7) 貝藤 裕史, 野津 寛大, 飯島 一誠. 【腎疾患治療薬マニュアル2013-14】腎疾患に対する薬剤の使用法 Bartter症候群、Gitelman症候群. *腎と透析*. 2013 2013.04;74(増刊):280-2. PubMed PMID: N819010064<Pre 医中誌>. 日本語.

8) 貝藤 裕史, 野津 寛大, 飯島 一誠. 【クローズアップ 症例でみる水電解質異常】低カリウム血症 Bartter症候群、Gitelman症候群. *小児内科*. 2013 2013.09;45(9):1612-6. PubMed PMID: 2013355907. 日本語.

9) 野津 寛大. 【クローズアップ 症例でみる水電解質異常】低マグネシウム血症 遺伝性低マグネシウム血症. *小児内科*. 2013 2013.09;45(9):1704-8. PubMed PMID: 2013355929. 日本語.

10) 野津 寛大. 【尿細管トランスポーターの機能制御と疾患治療-トピックス】Bartter症候群・Gitelman症候群 遺伝性塩類喪失性尿細管機能異常症(salt-losing tubulopathy). *腎と骨代謝*. 2013 2013.07;26(3):237-44. PubMed PMID: 2013285826. 日本語.

11) 野津 寛大. 【クローズアップ 負荷試験の実際2013】腎機能検査 フロセミド負荷試験(尿酸性化能). *小児内科*. 2013 2013.05;45(5):940-1. PubMed PMID: 2013245335. 日本語.

12) 野津 寛大. Clinical nephrology 尿細管・間質障害 先天性尿細管チャンネル・輸送体異常の新たな分子機構. *Annual Review腎臓*. 2013 2013.01;2013:193-203. PubMed PMID: 2013179539. 日本語.

2学会発表

1)ネフローゼ症候群を呈したX染色体連鎖型Alport症候群の2例 松野下 夏樹, 貝藤 裕史, 石森 真吾, 忍頂寺 毅史, 野津 寛大, 吉川 徳茂, 飯島 一誠、日本小児腎臓病学会2013.05

2)Fibronectin腎症の14歳女兒例 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、日本小児腎臓病学会2013.05

3)早期に末期腎不全に至ったSALL1ヘテロ全欠失によるTownes-Brocks症候群の1男児例 石森 真吾, 松野下 夏樹, 忍頂寺 毅史, 貝藤 裕史, 野津 寛大, 森貞 直哉, 足立 昌夫, 飯島 一誠、日本小児腎臓病学会雑誌2013.05

4)常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の間質線維化における上皮間葉系形質転換(EMT)の関与に関する研究 野津 寛大, Sweeney Williams, Schwasingar Emma, Kampa Nicholas, 飯島 一誠, Avner Ellis 日本小児腎臓病学会2013.05

7 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

- 1 特許取得 なし。
- 2 実用新案登録 なし。
- 3 その他 なし。

腎・泌尿器系の希少難治性疾患群に関する調査研究
(研究代表者 飯高一誠 神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野教授)

Gitelman症候群・Bartter症候群に関する検討

分担研究者 貝藤裕史
神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野特定助教

研究要旨

【背景】Bartter・Gitelman症候群(BS/GS)は主要な先天性尿細管機能異常症であるが、わが国における疫学は不明である。またこれらは長らく臨床診断がなされてきたが、この方法では正確な病型分類が困難である。今回我々は厚労科研難治性疾患等克服研究事業としてBS/GSの全国調査を行い、BS/GSの受療者数と現況を検討した。

【方法】本研究は書面によるアンケート調査で、(1)2010～2012年の3年間に診療した患者数、(2)患者の病型、(3)遺伝子解析施行の有無を問うた。調査対象施設・医師を(1)200床以上の病院小児科医、(2)200床以上の病院腎臓・泌尿器・内分泌科医、(3)小児専門病院小児科医及び200床未満の一般病医院腎臓・泌尿器・内分泌科医に層別化し、無作為に選定した。受療者数は調査実施施設の抽出率と調査の回収率を用いて対象施設の層ごとに推計した。

【結果】調査実施施設は2216施設で、うち48.3%から回答を得た。BS、GSの推計受療者数はそれぞれ207名、358名であった。計184名(77.3%)が病型診断を受けていたが、うち遺伝子解析施行例は84名(45.7%)であった。この84名のうち最も多い病型はGS(54名、60%)、次いで3型BS(21名、23%)、1型BS(6名、6.7%)であった。

【総括】わが国におけるBS/GSの受療者数と病型別頻度をはじめて明らかにした。またおよそ4割が臨床所見のみで病型診断を受けていることも明らかとなった。

1 研究目的

Bartter症候群(BS)/Gitelman症候群(GS)は、低カリウム性代謝性アルカローシスを呈する先天性尿細管機能異常症である。有病率は欧米のデータではBSがおおよそ100万人に1人、GSがおおよそ4万人に1人とされるが、わが国における報告はこれまでに存在しない。

BS/GSの診断にあたってはいくつかの問題がある。まず第一に、実地臨床上頻用される、厚生労働省班会議による診断基準に関する問題である。診断基準のひとつである「アンギオテンシンIIに対する昇圧反応の低下」であるが、アンギオテンシンII(デリバート注[®])がすでに発売中止となっており、実際に施行することは困難である。また、BS/GSを臨床診断するに当たっては、低カリウム性代謝性アルカローシスを呈する他の病因を除外することが必須であるが、本調査班の研究結果から、神経性食欲不振症や利尿薬の長期投与などについては、完全に否定するに足るだけの臨床パラメータが存在しないことがすでに明らかとなっている。これらに加えて、従来の臨床病型と責任遺伝子は必ずしも1対1対応でなく、またGSの特徴とされてきた低マグネシウム血症と低カルシウム尿症を認めない症例も少なくない。

そこで今回我々は、厚生労働省班会議による診断基準の問題点を明らかにした上で新たな診断基準の作成を目的に、わが国における患者数調査を行った。

2 研究方法

(患者数推計の枠組み)

推計する数：定めた期間内に対象施設で診療を受けた患者数

期間：3年間(2010年～2012年)

対象施設：以下の3層に分けて対象施設を設定した。

(1) 病床数が200床以上の全国の一般病院の小児科(以下の層に含まれるものを除く)

(2) 特別施設1(200床以上の全国の一般病院の中で、本疾患での受診の可能性が高いと予想される科(腎臓/泌尿器/内分泌科など(但し小児科を除く))を持つものを調査により抽出)

(3) 特別施設2(全国の小児専門病院及び、全国の200床未満の一般病院/クリニックの中で、本疾患での受診の可能性が高いと予想される科を持つものを調査により抽出)

(推計の前提)

対象施設以外の患者数は0とした。調査実施施設は対象施設の中から無作為に選定し、回収率100%で患者数が報告されれば、その合計を真の患者数と見なした。

調査実施施設の平均患者数は、対象施設全体の平均患者数と同じと見なした（特別施設層では対象施設数=調査実施施設数）。

回答があった施設の平均患者数は、調査実施施設の平均患者数と同じと見なした。

（推計の方法）

調査実施施設の全国の対象施設数に対する抽出率と、調査実施施設における回収率を用いて、対象施設の層ごとに患者数の推計を行った。患者数別の回収施設数を用い、95%信頼区間は近似的に求めた。

（倫理面への配慮）

本研究計画の実施に際して、神戸大学医学部倫理委員会の承認を受けた。本研究は、臨床データのみを用いる研究であり、人体から採取した試料等を用いる研究ではないため、対象者への説明および同意取得は行わないが、院内掲示を通じて本研究実施について情報公開を行うとともに、これにより、対象者に当該臨床データの利用の撤回が可能となる機会を提供した。資料や解析データは万全のセキュリティシステムをもって厳重に管理を行った。また、学会発表に際しては個人情報漏洩することのないように、また患者やその血縁者を含めた家族に不利益のないように十分配慮した。

3 研究結果

調査実施施設数は2216施設で、うち1070施設（48.3%）から回答が得られた。回答のあった施設のうち、患者を有する施設はBSが66施設、GSが100施設で、総患者数はそれぞれBSが91名でGSが147名であった。これより得られた推計患者数は、BSが207名（95%信頼区間：170-250名）、GSが358名（95%信頼区間：300-420名）であった。

本調査では、患者数と同時に以下の調査も行った。遺伝子解析によって診断を確定している症例は、BS/GSあわせて90例（38%）であった。遺伝子解析を施行していない148例のうち104名（70.3%）は臨床所見のみからBS/GSの病型診断が行われていた。さらに診断上の問題点があるかどうかについて調査したところ、「厚生労働省班会議による診断基準に合致しない項目がある」との回答があった症例が46例（23.4%）、「診断基準内に未検査項目がある」との回答があった症例が66例（27.7%）であった。

4 考察

本調査研究は、わが国におけるBS/GSの患者数（受療者数）をはじめ明らかなにしたものである。さらに、厚生労働省班会議による診断基準の問題点についても明らかにすることができた。レニンアルドステロン値や血清マグネシウム値、あるいは尿中カルシウム値による病型の臨床的鑑別はもはや実地臨床でも形骸化しており、新たな診断基準の作成が急務である。現在も我々はBS/GSの遺伝子解析を継続して行っており、

今後は遺伝子型と表現型の相関あるいは遺伝子型と臨床データの特徴を明らかにした上で新診断基準の作成を手掛ける予定である。

5 評価

1) 達成度について

本研究は本年で完結した。これに付随したBS/GSの遺伝子解析については今後も継続する予定である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本調査研究は、わが国におけるBS/GSの患者数（受療者数）をはじめ明らかなにしたものである。また同時に診断基準の問題点についても明らかにすることができた。

3) 今後の展望について

本調査研究結果および従来から我々が施行しているBS/GSの遺伝子解析研究結果を用いて、BS/GSの新診断基準を作成する予定である。

4) 研究内容の効率性について

本研究は特定非営利活動法人日本臨床研究支援ユニットと業務委託契約をし、調査書の送付および統計学的解析を依頼した。効率よく、かつ適切に結果の処理を行うことができた。

6 結論

わが国におけるBartter症候群の3年間の受療者数（推計）は207名（95%信頼区間：170-250名）、Gitelman症候群のそれは358名（95%信頼区間：300-420名）であった。遺伝子解析未施行例のうちおよそ70%は病型診断がなされていた。またレニン・アルドステロン値や血清マグネシウム値、あるいは尿中カルシウム値による病型の臨床的鑑別はもはや実地臨床でも形骸化している。新たな診断基準の作成が急務である。

7 研究発表

1) 国内

口頭発表	0件
原著論文による発表	0件
それ以外（レビュー等）の発表	6件

そのうち主なもの
論文発表

1. 貝藤 裕史, 野津 寛大, 飯島 一誠.
【腎疾患治療薬マニュアル2013-14】腎疾患に対する薬剤の使用法 Bartter症候群、Gitelman症候群. 腎と透析. 2013 2013. 04; 74(増刊):280-2. PubMed PMID: N819010064 <Pre 医中誌>. 日本語.

2. 貝藤 裕史, 野津 寛大, 飯島 一誠.
【クローズアップ 症例でみる水電解質異常】低カリウム血症 Bartter症候群、Gitelman症候群. 小児内科. 2013 2013. 09; 45(9):1612-6. PubMed PMID: 2013355907. 日本語.

学会発表

1. ネフローゼ症候群を呈したX染色体連鎖型 Alport症候群の2例 松野下 夏樹, 貝藤 裕史, 石森 真吾, 忍頂寺 毅史, 野津 寛大, 吉川 徳茂, 飯島 一誠、日本小児腎臓病学会2013.05

2. Fibronectin腎症の14歳女児例 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、日本小児腎臓病学会2013.05

3. 早期に末期腎不全に至ったSALL1ヘテロ全欠失によるTownes-Brocks症候群の1男児例 石森 真吾, 松野下 夏樹, 忍頂寺 毅史, 貝藤 裕史, 野津 寛大, 森貞 直哉, 足立 昌夫, 飯島 一誠、日本小児腎臓病学会雑誌2013.05

2) 海外

口頭発表 0件
原著論文による発表 4件
それ以外（レビュー等）の発表 0件
そのうち主なもの
論文発表

1. Hashimura Y, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Fu XJ, Ohtsubo H, et al. Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV alpha5 chain. *Kidney international*. 2013 Dec 4. PubMed PMID: 24304881.

2. Ishimori S, Kaito H, Matsunoshita

N, Otsubo H, Hashimoto F, Ninchoji T, Nozu K et al. SLC26A3 gene analysis in patients with Bartter and Gitelman syndromes and the clinical characteristics of patients with unidentified mutations. *The Kobe journal of medical sciences*. 2013;59(2):E36-43. PubMed PMID: 23756661.

3. Kaito H, Ishimori S, Nozu K, Shima Y, Nakanishi K, Yoshikawa N, et al. Molecular background of urate transporter genes in patients with exercise-induced acute kidney injury. *American journal of nephrology*. 2013;38(4):316-20. PubMed PMID: 24107611.

4. Shima Y, Nakanishi K, Hama T, Mukaiyama H, Togawa H, Sako M, Nozu K, Kaito H et al. Spontaneous remission in children with IgA nephropathy. *Pediatric nephrology*. 2013 Jan;28(1):71-6. PubMed PMID: 22940909.

8 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1 特許取得
なし。
- 2 実用新案登録
なし。
- 3 その他
なし。

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
腎・泌尿器系の希少難治性疾患群に関する調査研究
分担研究報告書

尿細管性アシドーシスの全国疫学調査

分担研究者 五十嵐 隆 国立成育医療研究センター総長
研究協力者 三浦健一郎 東京大学医学部小児科特任講師

研究要旨

原発性尿細管性アシドーシス (renal tubular acidosis; RTA) は稀な疾患であり、疫学調査は世界的にも行われておらず、本邦における頻度も不明である。そこで本研究では、原発性 RTA の本邦における頻度と臨床情報を全国規模で調査した。

原発性の 2 型、3 型 RTA はそれぞれ 2 名、1 名ときわめてまれであった。1 型は 67 名が報告され、推定患者数は 130 名 (95%信頼区間 ; 90~170 名) であった。1 型 RTA で、常染色体優性遺伝が示唆される家系において幼少児期の発症例があり、少なくとも 1 歳以降の発症では常染色体劣性 RTA のほかに常染色体優性 RTA も考慮する必要があると考えられた。1 型 RTA の 59 家系中、15 家系で遺伝子解析が施行されており、ATP6V1B1 変異を 2 家系、ATP6V0A4 変異を 5 家系、SLC4A1 変異を 1 家系に認め、変異なしが 5 家系であった。発症時には低 K 血症を 63%に、高 Ca 尿症を 74%に認めた。また、高アンモニア血症を 81%と高頻度に認めるとともに、近位尿細管障害の存在も示唆された。経過中、腎石灰化/結石を 76%に認めた。アルカリ補充療法でおおむね良好な成長発育が得られていたが、最終観察時の腎機能低下を 5 名 (7.7%) に認めた。遺伝子解析を施行された例が少数であったため、遺伝子変異と臨床症候の関連性については十分に検討することができなかったが、ATP6V1B1 または ATP6V0A4 遺伝子に変異を有する患者においては 9 名中 3 名 (33%) に難聴を認め、全体 (15%) よりは頻度が高かった。今後、遺伝子解析を進め、臨床症候との関連性をより明らかにする必要がある。

A. 研究目的

尿細管性アシドーシス (renal tubular acidosis ; RTA) はまれな疾患であり、発症頻度はこれまで世界的にも報告されておらず、長期的な経過、予後も不明である。また、診断基準や治療目標も確立していない。本調査は、わが国における RTA

の患者数と長期予後も含めた基本的な臨床情報を知り、RTA の診断基準を策定することを目的とする。

B. 研究方法

全国の病床数 200 床以上の一般病院小

児科、および腎臓科、内分泌科、泌尿器科を標榜した病院、小児病院、小児腎臓病学会評議員の所属する施設を対象に、アンケート調査を行った。

一次調査では2010年～2012年の3年間に診療した患者数と診断名（1型、2型、3型 RTA）を調査した。対象疾患はアニオンギャップ正常の代謝性アシドーシスで、1型はアシドーシス存在下の尿 pH が 6.0～6.5 以上で腎結石/腎石灰化や感音性難聴の頻度が高い、2型はアシドーシス補正後の重炭酸排泄分画 (FEHCO_3^-) が 15% 以上、典型的には白内障、緑内障、帯状角膜変性などの眼症状を呈する、3型は1型と2型の両方の要素をもつものとした。Fanconi 症候群、Lowe 症候群、偽性低アルドステロン症、二次性 RTA（シェーグレン症候群、腎移植後など）、下痢、薬剤性 RTA は除外した。

二次調査では、回答のあった施設を対象に再度アンケート用紙を送付し、生年月、性別、血族婚、家族歴、遺伝子解析結果、発症/診断時の身体計測値、血液・尿所見等のデータ、発見理由、難聴、腎石灰化/結石、現在のデータ、治療薬剤、透析/移植の有無等を調査した。

本研究は疫学研究に属し、疫学研究に関する倫理指針における既存資料のみを用いる観察研究に該当し、人体から採取された試料を用いず、研究対象者に対して危険を含むものではない。「疫学研究に関する倫理指針」によれば、研究の実施について広報すれば、患者または患者家族から個別に同意を得ることは必ずしも必要ではない。また、全国の小児科医、内科医へのアンケート調査であり、患者

または患者家族から個別に同意を得ることは現実的ではないため、既に作製済みのオリジナルホームページ（http://www.cis-trans.org/kobe_ku/index.html）にて研究実施について広報を行った。これにより、調査対象者となる患者又はその代諾者が調査対象者となることを拒否できる機会を設けた。

C. 研究結果

1) 一次調査結果

上記の2315施設に調査を行い、1083施設（46.8%）から回答を得た。回答のあった総患者数は88人であり、3年間の推定診療患者数は189人（95%信頼区間：150～230人）であった。

2) 二次調査結果（患者数）

一次調査で「患者あり」と回答のあった76施設に対し、二次調査票を送付した。52施設（68.4%）から回答があり、重複症例2名、除外症例12名（シェーグレン症候群、薬剤性、Fanconi 症候群等）を除くと70名（59家系）の回答であった。このうち、1型67名（59家系）、2型2名、3型1名であった。この結果、全国の RTA の推定患者数は140（95%信頼区間；100～180）名、1型 RTA の推定患者数は130（95%信頼区間；90～170）名であった。

1型以外はきわめて少数例であったため、以下1型についてのみの記載とする。

3) 二次調査結果（1型 RTA）

①男女比

男：女=29：38であった。

②家族歴

全59家系中血族婚が3家系あった。同

一疾患の家族歴を有するものが9家系あり、親に家族歴があるものが5家系、同胞が7家系であった。

③遺伝子解析

全59家系中、遺伝子解析を施行されていたのは15家系であった。このうち、ATP6V1B1変異が2家系（フレームシフト1、3塩基挿入1）、ATP6V0A4変異が5家系（広範囲欠失3、フレームシフト2、ミスセンス1、片親性ダイソミー1、詳細不明2）、SLC4A1変異が1家系（ミスセンス1）、変異なしが5家系、詳細不明が2家系であった。

④発症年齢

全67名の患者中、50名が10歳未満の発症であり、32名が乳児期の発症であった。21名が3か月未満の発症であり、乳児期早期の発症が多かった。

⑤発見理由

乳児期発症が多いことを反映して、体重増加不良、哺乳不良で発見される症例が25名と多くを占めた。次に多いのが低K血症の症状である脱力、筋力低下で、8名であった。以下、低身長6名、代謝性アシドーシス4名、尿中 β_2 MG高値または蛋白尿4名、腎結石2名、多飲・多尿2名、家族検索2名、その他が8名であった。

⑥診断時所見

血液pHは 7.26 ± 0.09 、血清 HCO_3^- は 14.2 ± 3.9 mmol/lであった。低K血症を63%に、高Ca血症を20%に、低P血症を33%に認めた。また高アンモニア血症を測定された16名中13名（81%）に認めた。尿pHは全例で6.0以上、尿中アニオンギャップは94%の症例で正であった。高Ca尿症を74%に認め、尿中 β_2 MGは全例上昇していた。

FE HCO_3^- は全例10%未満で、U-Bp CO_2 は93%で15 mmHg未満であった。診断時に腎機能低下を認めた症例（血清Crが年齢ごとの基準値の2倍以上または1.5 mg/dL以上）は15%であった。

⑦経過中の症候

腎石灰化または腎尿路結石を76%に、腎嚢胞を17%に認めた。難聴は10名（15%）に認め、うち7名が10歳未満での発症、1名が10歳台での発症、2名が発症時期不明であった。両側性が6名、片側性が3名、不明が1名であった。ATP6V1B1またはATP6V0A4遺伝子に変異を有する患者においては、9名中3名（33%）に難聴を認めた。最終観察時での腎機能低下は5名（7.7%）あり、うち3名は成人発症例であった。くる病は8名（15%）に認めた。診断時に腎機能低下のあった7名のうち、6名は経過中に改善していた。透析導入になったのは1名（1.5%）であった。

⑧成長

診断時と最終観察時の両方で計測値のあった29名（身長）と30名（体重）で検討した。身長のSDスコアは平均12.6年の観察期間で -1.6 ± 1.2 SDから -0.9 ± 1.4 SDに($p=0.016$)、体重のSDスコアは平均11.0年の観察期間で -1.9 ± 1.2 SDから -0.6 ± 0.9 SDに有意に改善していた($p<0.01$)。

⑨アルカリ補充療法

67名全例でアルカリ補充療法が施行されていた。補充量は 1.7 ± 1.0 mEq/kg/dayで、5歳未満では 2.7 ± 1.2 mEq/kg/day、5～10歳未満では 1.8 ± 1.2 mEq/kg/day、10歳以上では 1.4 ± 0.7 mEq/kg/dayであった。

D. 考察

原発性の1型RTAには常染色体劣性遺伝(ATP6V1B1遺伝子、ATP6V0A4遺伝子の異常による)と常染色体優性遺伝(SLC4A1遺伝子)のものがあり、一般的に前者は幼少期の発症、後者は青年～成人期の発症である。本調査では大半が幼少期の発症であり、常染色体劣性遺伝の1型RTAが主体と思われる。ただし、親に家族歴のある家系で、患者発症年齢が1～2歳の症例もあり、常染色体優性の1型RTAでも幼少時の発症がありうるということがわかった。したがって、少なくとも1歳以降に発症した症例では、優性遺伝と劣性遺伝の両方を考慮する必要がある。

遺伝子解析は59家系中15家系のみで施行されていた。うちいずれかの遺伝子に変異を認めたのは8家系であり、遺伝子異常と臨床症候との関連性を検討するには不十分であった。ただし、ATP6V1B1またはATP6V0A4遺伝子に変異のある症例においては比較的難聴の頻度が高かった。ATP6V1B1遺伝子異常では若年発症の難聴の合併頻度が高いとされているが、近年ATP6V0A4遺伝子異常においても若年発症の難聴が報告されている。本調査でもATP6V1B1遺伝子変異の症例においては3名中2名に難聴を認め、ATP6V0A4遺伝子異常の症例1名において生後1か月で片側の感音性難聴が確認された。

発症年齢は乳児期が圧倒的に多く、特に3か月未満が多かった。発見理由は体重増加不良、哺乳不良が最多であったが、1歳以上で発症した症例では低K血症の症候である脱力、筋力低下の頻度が増え、1型RTAの重要な初発症候であることが

わかった。その他、低身長、代謝性アシドーシス、尿中 β_2 MG高値が初発症状として報告されていた。

診断時検査では、全例が尿pH 6.0以上であり、アシドーシス補正後のFE HCO_3^- は全例10%未満、U-Bp CO_2 は93%の症例で15 mmHg未満であった。これらは1型RTAを他の型のRTAと鑑別する指標として使用できる可能性があるが、本調査では2型、3型がほとんど捉えられなかったため、真に鑑別に有用かどうかを検証することができなかった。このため、診断基準案を作成するには根拠が乏しいと考えられた。本調査では診断時に低P血症を33%(測定された43名中14名)に認めた。この中で高Ca血症を呈していたのは1名であり、血清Caの上昇に対する反応として血清Pが低下しているわけではない。尿中 β_2 MG高値(100%)と合わせて、発症時の近位尿細管障害を示唆しているのかもしれない。ただし、本調査では尿中リン排泄を解析対象としておらず、正確な評価はできていない。また、血清尿酸値やアミノ酸尿についても解析対象としていないため、近位尿細管障害の全容を明らかにしているとは言えない。低P血症の患者のうち、くる病の所見を認めたのは3名(21%)であった。また、高アンモニア血症を高頻度に認め、高アンモニア血症の鑑別診断として本症が重要であることが示された。高アンモニア血症の機序として、アンモニアの排泄障害、アシドーシス下でのアンモニア産生亢進が指摘されているが、詳細は不明である。診断時に腎機能低下を認めた症例は7名であったが、うち6名は経過中に