



Identification of mutations in FN1 leading to glomerulopathy with fibronectin deposits

Ohtsubo, Hiromi

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2017-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6772号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006772>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Identification of mutations in *FN1* leading to glomerulopathy with fibronectin deposits

フィブロネクチン腎症の原因となる FN1 遺伝子の同定

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

小児科学

(指導教員 飯島 一誠教授)

大坪 裕美

【緒言】

フィブロネクチン (FN) は高分子の糖タンパク質であり、細胞外マトリックスの一つである。細胞の接着・増殖・分化・移動に関与しており、インテグリンファミリーなどを介して、細胞間を互いに連絡し、細胞膜の複数の細胞接着分子、プロテオグリカン、他の細胞外マトリックス (フィブリン、コラーゲンなど) と結合する。可溶性の血漿 FN、不溶性の細胞性 FN が存在し、それぞれ、FN1 遺伝子から選択的スプライシングにより各 FN が精製される。可溶性 FN は 220kDa の単量体が C 末端でジスルフィド結合し、二量体として存在する。それぞれの単量体は繰り返し構造で構成されている。細胞への接着や結合、FN 同士の会合は、それぞれ独立した機能を持つドメインで行われる。Ⅲ₁₀ ドメインでは Arg-Gly-Asp(RGD) を介してインテグリンと結合する。Ⅲ₉ ドメインはⅢ₁₀ への相乗作用を持つことが知られている。さらにインテグリン結合部位、ヘパリン結合部位ともにⅢ型繰り返し構造の 12-14 内に位置する。FN のヘパリン結合活性は焦点接着の際に、インテグリンと連携して働いているのではないかと考えられている。

フィブロネクチン (FN) 腎症は、稀な優性遺伝性腎疾患である。蛋白尿、顕微鏡的血尿、高血圧が主な症状であり、メサンギウム領域および内皮下に多量の FN の沈着物を認め、いずれ末期腎不全に至る。免疫組織学的には血中由来 FN (可溶性の血漿 FN) の糸球体内への沈着物を認めることから、FN 腎症は血漿 FN の糸球体内への沈着が病因であると考えられている。FN 腎症患者はあらゆる年代でみられるが、尿検査異常は 10 代から出現する。20~60 代で末期腎不全に進展し、現在でも疾患特異的な治療はない。

FN 腎症の遺伝学的背景は不明な点が多い。2007 年に責任遺伝子 (*FN1*) が同定されたが、これまでヘパリン結合部位に位置する変異のみであり、インテグリン結合部位に位置する変異は報告されていない。病因・病態もいまだ解明されていない。

Castelletti らは 2007 年に *FN1* 遺伝子変異により FN 腎症が発症することを明らかにした。3 種類の変異 (p Tyr973Cys p Trp1925Arg, p Leu1974ArgCys) を同定したが、いずれも *FN1* 上のヘパリン結合部位の変異であった。彼らはうち二つの変異に関して (W1925R, L1974R) 変異株を作製し蛋白精製を行った。そして、ELISA 法、免疫抗体法を用いて、内皮細胞表面およびポドサイトへの親和力が低下していることを報告した。これまでインテグリン結合部位に位置する変異は

報告されておらず、FN 腎症の原因となる分子病態が正確に明らかになっていないままである。

我々は、12 家系の FN 腎症家系で 5 種類の新規の FN1 遺伝子変異を同定した。新規の変異のうち、p pro1472del はこれまで報告のないインテグリン結合部位に存在した。病態解明するうえで重要と考え、インテグリンおよびヘパリン結合部位の両方を含むリコンビナント変異蛋白を作製し、物理化学実験および機能解析を行った。

【方法】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 22 名の FN1 遺伝子解析を行った。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シング法を用いて *FN1* 遺伝子の解析を行った。次に、ヘパリン結合部位とインテグリン結合部位の両方を含むⅢ₈₋₁₄ の蛋白をバキュロウイルスシステムを利用して作製した。p pro1472del（インテグリン結合部位）、p Leu1974Pro（ヘパリン結合部位）、p Leu1974Arg（ヘパリン結合部位）のリコンビナント蛋白を Quick change 法で精製した。その 3 種類のリコンビナント蛋白と WT のヘパリン結合能を ELISA で比較した。また、共焦点顕微鏡を用いてポドサイトとの結合も比較した。ポドサイトをガラスボトムディッシュにコートし、共焦点顕微鏡を用いて、WT およびリコンビナント蛋白との結合を比較した。

また WT と p pro1472del のⅢ₇ EDB、Ⅲ₈、Ⅲ₉、Ⅲ₁₀ ドメインの 3-D 構造解析を行った。

【結果】

臨床的特徴と GFND 家系の FN1 遺伝子変異

家系内で患者と同一の変異を有した 6 名中 4 名は患者より高齢であるにも関わらず無症状であった。それぞれの患者に FN1 遺伝子解析を行ったところ、12 家系の全患者に 6 種類の *FN1* 遺伝子変異を同定し得た。5 名は過去に報告のある変異（p Tyr973Cys）であり、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 trp1925Cys, p pro1472del, p Leu1974Pro, p pro969Leu, p Leu1974Pro, p Lys1953-Ile1961del）。p trp1925Cys, p Leu1974Pro, p pro969Leu, p Leu1974Pro の 4 種類のミスセンス変異は進化の過程で高度に保存されていた。また Polyphen2 と SHIFT 解析にて、アミノ酸は変異により損傷あるいは高い確率で損傷しているとの結果となった。新規の変異のうち、p pro1472del はこれまで報告のないインテグリン結合部位に存在し、

他の変異は全てヘパリン結合部位に存在した。

ハプロタイプ解析

p pro1472del, p Leu1974Pro は Haplotype 解析で創始者変異であることが分かった。p Tyr973Cys はこれまでも異なった人種から数家系報告されており、hot spot と考えられている。この変異に関しては創始者効果は認めなかった。

発現および機能解析

p pro1472del（インテグリン結合部位）はインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ への結合が WT と比較して有意に低下し、p Leu1974Pro, p Leu1974Arg（いずれもヘパリン結合部位）は WT と比較してヘパリン結合が有意に低下していた。

次に、ポドサイトを用いて細胞接着能を測定したところ、いずれも WT と差は認めなかった。ヘパリン拮抗薬であるプロタミン使用下では、インテグリン結合部位の変異蛋白 p pro1472del の細胞接着能は低下した。このことからポドサイト表面に接着するにはインテグリン結合部位あるいはヘパリン結合部位のどちらか一方が正常に働けば十分であることが示唆された。また、インテグリンを介した細胞内シグナルを調べるため抗チロシンリン酸化抗体で染色すると細胞表面への接着の有無に関わらず、WT も各変異蛋白も通常の focal adhesion を示した。

以前の報告では、ヘパリン結合部位の変異蛋白の細胞接着能の低下を認めていたが、今回は差を認めなかった。考えられる理由として、今回作製したリコンビナント蛋白はヘパリン結合部位、インテグリン結合部位の両方を含み、以前報告のあったリコンビナント蛋白はヘパリン結合部位のみを含んでいたことが挙げられる。

プロタミン存在下では、プロタミンがヘパリンと競合して、ヘパリン結合部位に結合するため、p pro1472del とポドサイトの結合は著明に低下した。これは、インテグリン結合ドメインを介する p pro1472del とポドサイトとの結合能が著明に低下し、インテグリン結合ドメインあるいはヘパリン結合部位のいずれか正常なドメインを介して、ポドサイトの細胞表面に接着することが示唆された。これらの変異蛋白でインテグリンシグナルを伝達する能力が残っているかを調べるため、ガラスボトムディッシュに WT またはリコンビナント蛋白をコートし、2 時間低温放置した。全てのリコンビナント蛋白で WT と同様にポドサイトの伸展およびアクチンストレスファイバーの形成が見られた。インテグリンを介した細胞内シグナル伝達は、抗チロシンリン酸化抗体を用いた免疫染色

にて評価した。WT も変異蛋白もいずれも典型的な focal adhesion 様構造を認め、チロシンリン酸化が誘導された。このことは、インテグリン結合部位あるいはヘパリン結合部位のどちらかだけでは、細胞表面の結合には十分ではないが、細胞内シグナル伝達には十分であると考えられた。

3-D 構造の構築とドッキングシュミレーション

リコンビナント蛋白は、WT 蛋白と比較してインテグリンとのドッキングは有意に低下していただけでなく、分子配座と表面の静電気的な電位も変化していた。

考察

Castelletti らは、いくつかの GFND の原因となる FN1 遺伝子変異について報告しているが、これらの変異はいずれもヘパリン結合部位のⅢ₄、Ⅲ₁₃に位置する。彼らは、ヘパリン結合部位のみ(Ⅲ₁₂-Ⅲ₁₄)を含むリコンビナント蛋白を作製し、リコンビナント蛋白はヘパリン、血管内皮細胞、ポドサイトとの結合が低下し、血管内皮細胞の伸展、細胞骨格の構築が障害されることを発見した。今回の研究では、我々はⅢ₉に p pro1472del、Ⅲ₁₃に(p trp1925Cys, p Lys1953-Ile1961del, p Leu1974Pro)を発見した。そこで我々はヘパリン結合部位とインテグリン結合部位の両方を含むリコンビナント蛋白を作製した(Ⅲ₈-Ⅲ₁₄)。Ⅲ₉に位置する synergy site はⅢ₁₀にある RGD 配列と協調してインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介して matrix assembly を行う。機能解析を行ったところインテグリン結合部位の変異(p pro1472del)、インテグリン結合部位の変異(p Leu1974Pro, p Leu1974Arg)はWTと同等のアクチン繊維の再配列およびインテグリンシグナルの伝達が可能であった。しかし、それぞれの変異は、インテグリンあるいはヘパリンへの結合がプロタミン存在下で有意に低下していた。さらに 3-D 構造解析では、インテグリン結合部位の変異ではインテグリン結合能が著明に低下していた。

我々の研究と Castelletti らの報告では研究デザインの異なりから、インテグリン結合部位もヘパリン結合部位もどちらも細胞表面への結合、インテグリンシグナル伝達能力が十分にあることが示唆された。インテグリンまたはヘパリン結合部位のいずれかのみでリコンビナント蛋白とポドサイトとの結合は十分であった。WTと比較して、インテグリン結合部位の変異 p pro1472del はヘパリン結合が増加、ヘパリン結合部位の変異(p Leu1974Pro, p Leu1974Arg)はインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ との結合が増加していた。このことより、インテグリン結合部位とヘパリン結合部位は互いに相互作用をしており、変異により相互作用が阻害されることが示唆された。

我々の研究において、血管内皮細胞の伸展、細胞骨格の再構成の減弱を示すことはできなかった。これは in vitro の実験の限界であり in vivo での GFND の病態を反映していない。

家系 1・3・4 で遺伝子変異を有するも無症状の患者を発見した。家族内で不均一にみられているので、遺伝子型と表現型に相関はないと考えられるが、さらなる研究が必要である。

GFND はとても稀な疾患であるが多くの患者が幼少期から蛋白尿を認めている。小児腎臓科医による早期診断、早期治療が望まれる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2632号	氏 名	大坪 裕美
論文題目 Title of Dissertation	Identification of mutations in FN1 leading to glomerulopathy with fibronectin deposits フィブロネクチン腎症の原因となる FN1 遺伝子の同定		
審査委員 Examiner	主 査 西 慎一 Chief Examiner 副 査 錦織 千佳子 Vice-examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景】フィブロネクチン(FN)腎症は常染色体優性遺伝性の腎疾患で、FNが糸球体内に沈着し腎不全を呈する。その病因は 責任遺伝子 FN1 の異常とされている。これまで、同遺伝子のヘパリン結合部位の異常は発見されていたが、インテグリン結合部位の異常は報告されていない。

【方法と結果】腎生検で FN と診断されている 12 家系、22 名症例を対象として、FN1 の遺伝子解析を行った。対象患者より 6 種類の FN1 遺伝子変異を同定した。5 名は既報のヘパリン結合部位の変異(p Tyr973Cys)を有していた。その他の症例からは、新規の変異が確認された (p Pro969Leu, p Pro1472del, p Trp1925Cys, p Lys1953_Ile1961del, p Leu1974Pro)。3 つの変異、p Tyr973Cys、p Pro1472del、p Leu1974Pro は多くの家系で認められた。ハプロタイプ検索からは、p Pro1472del、p Leu1974Pro が創始者変異と判定された。同定した変異遺伝子のうち p Pro1472del がインテグリン結合部位の異常として新規に見つかった。

次に蛋白機能検査として、遺伝子異常が同定された p Pro1472del、p Leu1974Pro(ヘパリン結合部位)、p Leu1974Arg(ヘパリン結合部位)を有するリコンビナント蛋白を精製し、ELISA、あるいは細胞免疫法を用いてヘパリン結合能、細胞接着能を検討した。また構造蛋白解析も実施した。

新規のインテグリン結合部位の遺伝子異常 p Pro1472del を有するリコンビナント FN は、ワイルドタイプ FN と比較して、ELISA 法で有意にヘパリン結合能が高く、有意にインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ への結合能が低下していた。

培養足細胞を用いた細胞接着能検査では、p Pro1472del 変異を有するリコンビナント FN とワイルドタイプ FN の間に有意差はなかった。しかし、プロタミンを使用しヘパリン機能を阻止すると、p Pro1472del 変異を有するリコンビナント FN の細胞接着能は低下を示した。

ワイルドタイプ FN、遺伝子異常を有するリコンビナント FN をコートしたガラス台で培養した足細胞を抗チロシン酸化抗体で染色し、接着状態を判定したが、どちらも focal adhesion を示した。

蛋白の3次元構造及びドッキング実験にて、ワイルドタイプ FN と比較して p Pro1472del 変異を有するリコンビナント FN のドッキング能は低下していた。

【結論】本研究において、初めて FN 腎症においてインテグリン結合部位の遺伝子異常 p Pro1472del を発見した。機能実験により、この p Pro1472del 遺伝子異常があるとインテグリン結合能が低下していると考えられ、FN 腎症の発症に関与する可能性が示唆された。

本研究は、フィブロネクチン(FN)腎症を対象として、責任遺伝子 FN1 のインテグリン結合部位における新規遺伝子異常 p Pro1472del を発見し、同異常を有するリコンビナント FN 蛋白は、機能実験からインテグリンとの結合能低下があることを証明した点で、重要かつ新規知見を得た価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。