



報道資料

平成 30 年 6 月 25 日

学校法人昭和大学

学校法人関西医科大学

国立大学法人筑波大学

デュアン症候群（DRS）と巣状糸球体硬化症（FSGS）を合併する稀少疾患（DRS-FSGS）の責任遺伝子 *MAFB* を同定

次世代型シークエンサーによる解析と CRISPR/Cas9 での疾患モデルマウスでの確認

概要

昭和大学（東京都品川区）医学部内科学講座腎臓内科学部門藤が丘病院（神奈川県横浜市）腎臓内科の佐藤芳憲助教、関西医科大学（大阪府枚方市）内科学第二講座の塚口裕康講師、筑波大学（茨城県つくば市）医学医療系の高橋智教授、京都大学（京都府京都市）ゲノム医学センターの松田文彦教授、日笠幸一郎准教授（現・関西医科大学附属生命医学研究所・ゲノム解析部門学長特命教授）らの共同研究グループは、先天性の眼球運動障害の原因となるデュアン症候群(DRS)と巣状糸球体硬化症（FSGS）とを合併するまれな患者（DRS-FSGS）さんの、発症原因を次世代シークエンス技術*で解析し、腎ポドサイト*と脳神経の発生・機能を調節する転写因子**MAFB* 遺伝子の変異が原因であることを突き止めました。

本研究では、CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子を改変した実験用マウスでも同様の腎臓の異常が観察されており、今後同マウスを用いた研究によるメカニズムの解明が期待されます。

なお、これらの結果は、国際腎臓学会の学会誌「*Kidney International*」電子版に、5/17（木）付で公表されました。詳しくは、別添プレスリリースを参照下さい。

用語解説

「次世代シークエンス技術」

従来のサンガー法（Deoxy-termination）と異なり、迅速かつ大量の塩基を解読する革新的な遺伝子解析技術

「腎ポドサイト」

腎臓の毛細血管の最外層を構成し、血中毒素の濾過膜として機能する。多数の突起を有することから、足（あし）細胞とも呼ばれる

「転写因子」

からだの遺伝情報 DNA が、蛋白に変換されるメッセージとなる RNA への変換過程を調節する因子で、組織を精密に形成する際に重要な役割を演じる

略語

DRS: Duane Retraction Syndrome, FSGS: Focal Segmental Glomerulosclerosis, MAFB v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B

平成 30 年 6 月 25 日

報道機関各位

学校法人昭和大学
学校法人関西医科大学
国立大学法人筑波大学

転写因子 MAFB 変異によるデュアン眼球後退症候群(DRS)と巣状糸球体硬化症(FSGS)合併の分子機序の解明

発表のポイント

次世代ゲノムシークエンス技術を用いて腎糸球体硬化(FSGS)と脳幹神経形成(斜視、難聴)を合併する稀な 2 家系・3 患者の原因が、転写因子 MAFB (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B) の DNA 結合領域のミスセンス変異であることを同定しました。

稀な家系の変異が腎病変の原因となることを、ゲノム編集 CRISPR/Cas9 技術で疾患モデルマウスを作成して、証明しました。

今回の MAFB C 端 DNA 結合部位のミスセンス変異の患者臨床像は、FSGS・眼筋異常(軽度難聴、骨融解なし)で、既報の N 端側ミスセンス変異表現型である骨融解 + FSGS (Multicentric carpotarsal osteolysis syndrome : MTCO MIM166300, 多中心性手根骨足根骨融解症候群、眼筋異常、難聴なし)、とは異なっていた。

転写因子の機能は、領域ごとに分化しており、発達時期や組織において厳密に転写ネットワークの制御が行われる点が注目され、今後のさらなる病態解明と治療開発につながると期待されます。

概要

昭和大学藤が丘病院・腎臓内科の佐藤芳憲助教、関西医科大学・内科学第二講座の塚口裕康講師、筑波大学・医学医療系の高橋智教授、京都大学ゲノム医学センターの松田文彦教授、日笠幸一郎准教授(現・関西医科大学附属生命医学研究所ゲノム解析部門学長特命教授)らの共同研究グループは、

先天性眼球運動障害であるデュアン眼球後退症候群(DRS [用語 1,2](#))と巣状分節性糸球体硬化症 (Focal Segmental Glomerulosclerosis: FSGS, [用語 3](#))を合併する稀な 2 家系 3 患者(DRS-FSGS)について、次世代型シークエンサーを用いた全ゲノムシークエンスを行い、腎糸球体ポドサイトおよび脳幹神経形成に関わる転写因子 MAFB 変異([用語 4](#))が原因であることを、見出しました。

本研究では、CRISPR/Cas9([用語 5](#))を用いて患者ミスセンス変異をマウスに導入し、患者と同様の



FSGS 病変が起こることを確認しました。今後、同マウスを用いて、さらなる病態解明が進むと期待されます。

研究結果は、国際腎臓学会の学会誌『*Kidney International*』に、2018 年 5 月 17 日付けで発表されました。

背景

デュアン眼球後退症候群(Duane Retraction Syndrome)の発症頻度は約 1,000 人 1 人で、斜視の原因の 1%を占める、とされています。大部分は家族歴のない孤発性で、約 10%に優性の集積を認め、遺伝因子の関与は示唆されます。これまでの研究で優性遺伝を示す家族性単独 DRS の症例の原因として、*CHN1* ($\alpha 2$ -Chimaerin)変異が報告されていました。また DRS の類縁疾患である眼球運動障害である Congenital fibrosis of the extraocular muscles (CFEOM)が⁶、*KIF21A*(MIM135700)や*PHOX2A*(MIM602078)変異で起こることが、知られています(*Congenital Cranial Dys-innervation Disorders : CCDDs 用語 2*)。全体の 30%は症候性(眼外症状を合併)の臨床像を示します。その中でも腎低形成、四肢短縮を合併する稀な例は、Okihiro 症候群(Duane-radial ray syndrome, MIM # 607323)とよばれ、*SALL4* 遺伝子が原因であることが、報告されています。

これらの知見から、FSGS と DRS が何らかの单一遺伝子変異により生じるのではないか、という仮説を立てました。そして本研究チームでは、30 年前に報告されている DRS と FSGS を合併する家系(Sato H, Nephron 1989)を追跡調査し、この仮説を検証すべく、原因を探索してきました。

成果

研究グループは、DRS と FSGS を合併する稀な 2 症例(家系 S,Y)の臨床像を調べました(図 1,2)。家系 S の 1 患者と、家系 Y の 3 患者(母親は逝去)に共通して、内転障害を主徴とする DRS1 型の眼球運動障害(10 歳台に発症)と、ネフローゼ症候群(10-20 歳台から蛋白尿と腎機能障害を発症、30-40 歳で末期腎不全に進行)を認めました。家系 S の 1 患者は難聴を認めました。家系 Y の 2 患者での MRI では、外転神経の消失、や外眼筋萎縮などが、確認されました。

これらの臨床所見から、何らかの遺伝的な原因で、脳幹神経障害と腎糸球体傷害を生じている可能性が考えられました。

症例の原因を調べるために、次世代型シークエンサーを用いた全ゲノム解析により、新規遺伝性疾患である DRS-FSGS の 2 家系 3 名の患者において、同一の *MAFB* の p.Leu239Pro ミスセンス変異(1 塩基の変異によりアミノ酸が別のものに入れ替わる)を同定しました(図 3)。

MAFB は、マウスでは、胎生期に脳幹(菱脳 Rhombomere 第 5-6 節目)、腎糸球体ポドサイト、内耳



に発現しており、患者の病変分布(DRS, FSGS, 難聴)と合致しています。

健常対照の腎生検組織の免疫染色において MAFB は主として糸球体ポドサイト核内に発現していました。しかし DRS-FSGS 患者(家系-S, -Y)では、同じポドサイト核内転写因子である WT1 に比し、MAFB 発現が低下していました。MAFB 変異を有する患者ポドサイトでは、核内 MAFB 発現の低下を介し、その結果徐々にポドサイト傷害が惹起され、FSGS パターンの糸球体硬化を来すと考えられました。

3 次元立体構造解析でも、p.Leu239Pro は、MAFB が標的遺伝子 DNA プロモーター領域との結合重要な DNA 結合領域の構造障害を来すことがわかりました。また培養マクロファージ細胞や、胎児腎細胞を用いて、MAFB p.Leu239Pro 変異体のプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで調べたところ、野生型に比較して、変異体の転写活性は低下していました。

2 家系の解析から MAFB の p.Leu239Pro ミスセンス変異が、DRS、FSGS、難聴の病因となることが疑われましたが、同様の症状を示す家系は稀で、MAFB 変異の追加確認が困難でした。

ヒト稀少家系解析の難点を克服するため、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 で、患者と同じ *Mafb* p.Leu239Pro ミスセンス変異を、マウス受精卵のゲノムに挿入し、表現型を観察しました。ホモ接合マウスは、出生直後に死亡し、広範囲の足突起癒合を確認できました(図 4)。

これらの結果は、MAFB の p.Leu239Pro ミスセンス変異が、患者の FSGS の原因となることを示唆するものです(図 5)。MAFB 変異によるヒト疾患は、全てヘテロ接合性で、(1) N 端 Transactivation 領域のミスセンス変異による手根足根骨融解症候群 Multicentric Carpotarsal Osteolysis Syndrome (MCTS MIM #166300、約半数に FSGS を合併する、**黄色**)、(2) C 端側の広汎欠失(large deletion)による、DRS 難聴症候群(**青色**)という、2 つの疾患群が報告されていました(図 5)。

今回の研究は、初めて C 端の DNA 結合領域のユニークなミスセンス変異で、FSGS、DRS、および難聴を合併する(骨病変なし、**赤色**)、ことを示しました。同じ MAFB 転写因子の変異でも、どの機能的領域が、どの程度の立体構造障害を来すか、に基づき、MAFB の転写活性(DNA 結合部位や親和性、2 量体形成能)が変化し、障害臓器、程度が異なることを示しています。

研究の意義

転写因子 MAFB の C 端の p.Leu239Pro ミスセンス変異で、DRS と FSGS が起こることから、MAFB を介する転写ネットワークが、ネフロンや、脳神経核、内耳形成の過程に必須であることがわかりました。特にミスセンス変異の位置で、骨融解、ポドサイト障害、難聴の症状のありなしに差があることは、生体の転写調節が、精密に制御されていることが、示唆されます。

今後、MAFB が転写調節する標的遺伝子群を明らかにする、あるいは MAFB とヘテロ 2 量体を形成

する結合パートナー(*c-Fos* など)の性状と機能調節を調べることで、腎糸球体硬化、眼球運動障害、難聴の発症機序の理解を深め、新たな治療開発に繋がると考えられます(図 5)。本研究チームは、今後も DRS-FSGS の病態解明と、効果的な治療法の開発に取り組みます。

用語解説

1 デュアン眼球後退症候群 Duane Retraction Syndrome

デュアン眼球後退症候群(DRS)は、1905 年米国眼科医 Alexander Duane により最初に記載された、水平眼筋麻痺による斜視症候群。DRS は、1,000 人に 1 人の頻度で発症し、全斜視の原因の約 1-5%を占める。DRS は、臨床的に(1) 眼球外転障害、(2) (内転時)眼裂狭小化、(3) (内転時)眼球陥凹、を加えた 3 徴を満たす場合、診断される。運動制限の性状により 3 つの臨床亜型に分類され、主に外転障害で、一部に内転障害を合併する病態と介される (Ye XC, et al. *Clin Genet* 2014; 86: 103-111, Huber A., *Brit J Ophthal* 1974)。

臨床亜型	頻度	眼球運動	内転時の眼球後退
I	75-80%	主に外転障害	+
II	5-10%	主に内転障害	+
III	10-20%	内転 & 外転障害	+

90%は家族歴がない散発性 isolated DRS (眼球症状のみ)で、10%は家族性で優性遺伝を示す。散発例 DRS の剖検で、外転神経ニューロンの発達異常(低形成・欠如)あるいは、外直筋への神経線維支配異常(misrouted)のあることが示唆されている。DRS のみを示す優性遺伝家系の、唯一の責任遺伝子として、*CHN1* (α 2-chimaerin 1, MIM 118423) が報告されている。一方 DRS の 30% は、眼外症状(腎、難聴、四肢奇形等)を合併する syndromic DRS で、病因の多様性が示唆される。

2. Congenital Cranial Dys-innervation Disorders (CCDDs)

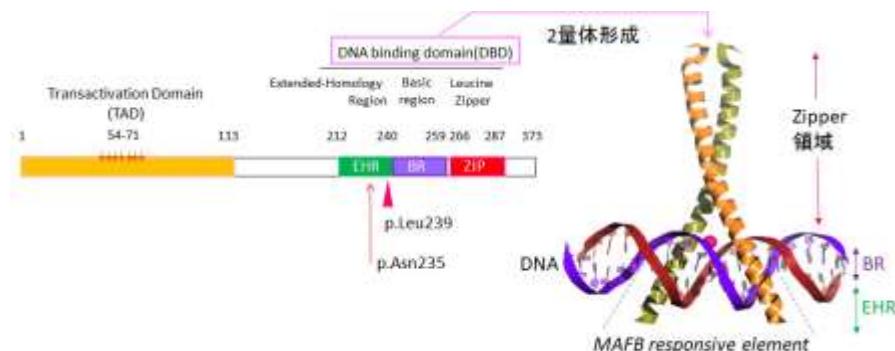
12 脳幹神経が単独あるいは複合的に障害される疾患の総称。眼球運動障害に加えて、嗅覚、嚥下、聴力、平衡感覚調節異常も含まれる(Engle EC. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010)。DRS 以外に Congenital fibrosis of the extraocular muscles (CFEOM)、*HOXA1* 関連症候群、Moebius syndrome (OMIM 157900) Horizontal gaze palsy with progressive scoliosis (OMIM 607313)などが、含まれる。

3 巣状分節性糸球体硬化症 Focal Segmental Glomerulosclerosis

大量の蛋白尿を主徴とするネフローゼ症候群の 1 病型で、血液濾過に機能する腎糸球体に巣状(全ネフロンの中で一部:focal)、かつ分節性(糸球体の中で一部:segmental)に、血管構造の破綻(硬化像)の組織像を認めることが特徴。一般にステロイド治療が効きにくく、臨床的にはステロイド抵抗性ネフローゼとも呼ばれる。小児ネフローゼの 20%, 成人の 40% を占めるが、半数が 5-10 年で腎不全になる。大部分は家族歴のない散発性の多因子疾患であるが、成人例の約 1% は家族歴を示す。25 歳以下の FSGS の 30% は単一遺伝子で発症し、30 種類の遺伝子が報告されている。

4. MAFB V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B

腎系球体ポドサイト、単球、内耳有毛細胞などの分化・器官形成に働く転写因子の一つ。ヒトでは染色体 20q12 に位置し、323 アミノ酸でコードされる。MAFB は、N 端側の転写活性化領域、C 端の DNA 結合領域から構成される。DNA 結合領域は、塩基性アミノ酸(Arg、Lys)に富んでおり、また 2 量体形成に関する Leu が保存されており塩基性ロイシンジッパー(basic leucin zipper)と呼ばれる転写因子群に分類される。

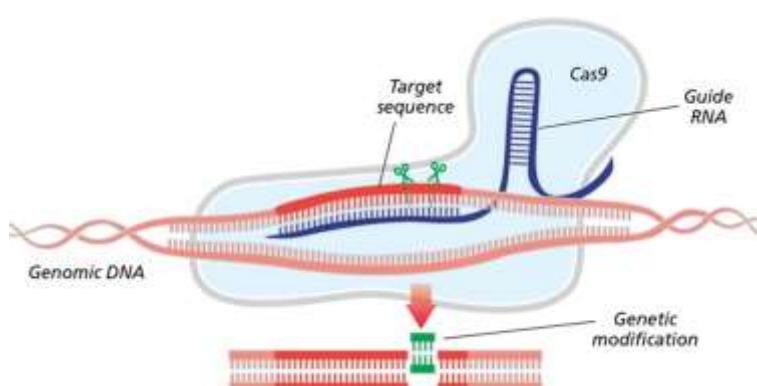


C 端側 DNA 結合領域は、ジッパー モチーフを介して自身あるいは他の転写因子と会合し DNA 上の MAFB 認識配列と呼ばれるパリンドローム型プロモーターに結合して標的遺伝子の転写を調節する。骨融解主体の手根足根骨融解症候群 MCTO を起こす変異(TAD 領域)と、FSGS/DRS 合併を起こす変異(p.Asn235Gln:Kreisler マウス変異、p.Leu239Pro:本例)の位置を示す。

MARE 配列と、3D 立体構造は文献による(Pogenberg V et al Structure 22, 466–477, 2014)

5. CRISPER-CAS9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats CRISPR-Associated Proteins 9)

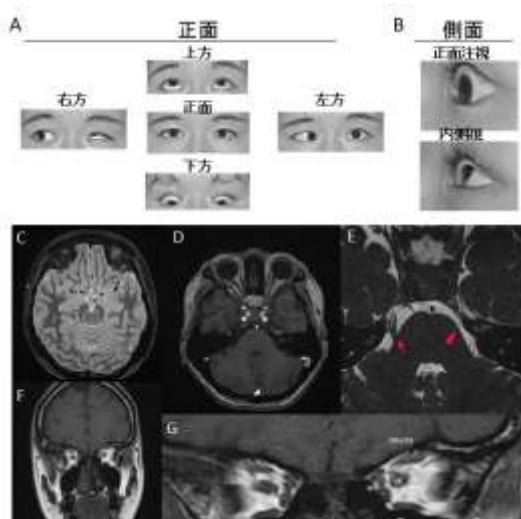
Doudna J, Charpentier E らによって開発されたゲノム編集技術の一つ。CRISPR/Cas-9 システムは、Cas9 タンパク(切断酵素)とガイド RNA(gRNA)の 2 つの構成要素が、標的細胞内で複合体を形成し、標的遺伝子を切断後、2 本鎖の修復過程での塩基変化を利用して、ゲノムの特定の遺伝子部位のみを編集できる。今回のように切断箇所に点変異を挿入することも可能である。



ガイド RNA は「案内役」として Cas9 を標的となる DNA へと導き、Cas9 は DNA を切る「ハサミ」としてはたらく。20 塩基のガイド配列は自由に設計で、Cas9 をゲノム DNA の様々な部位を選択的に編集できる。

添付図

図 1. 眼球障害(DRS)とFSGSを合併する患者の眼球運動の特徴

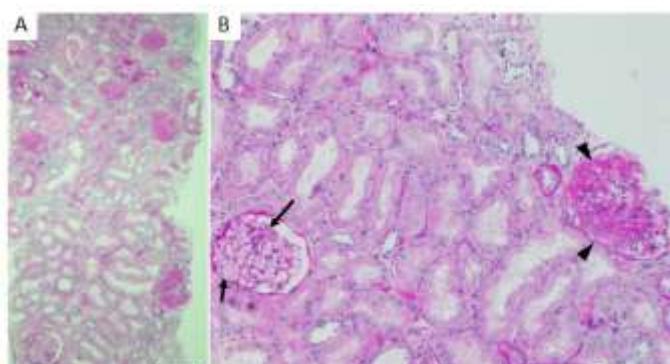


DRS-FSGS 1 症例(家系 Y)患者の眼球運動

A 左眼球の外転障害(左方注視)と、B 内転時(右方注視)の眼裂狭小化、眼球陥凹、上方への overshooting を認める。

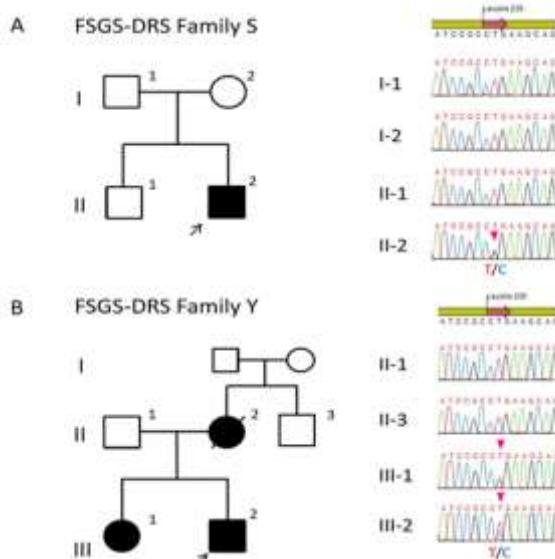
C-G, 頭部 MRI 所見
大脳、小脳、脳幹明らかな異常はないが、左外転神経が欠失している(E,矢頭)。外眼筋の萎縮は見られない。

図 2. 眼球障害(デュアン眼球後退症候群)とFSGSを合併する患者腎病変



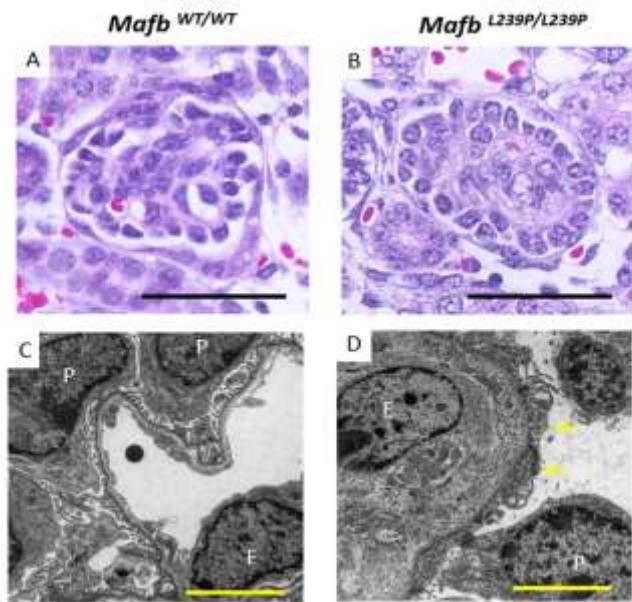
DRS-FSGS 1 症例(家系 Y III-1)の 23 歳時の腎生検所見。巣状分節性に分布する糸球体硬化症と、間質の約 50% に線維化、尿細管萎縮を認める。

3. DRS と FSGS を合併するまれな 2 家系に共通する *MAFB* p.Leu239 Pro 変異



DRS-FSGS 2 症例(家系 S, Y)の家系図(左)とサンガーシーケンスによるシークエンス解析の結果。A は孤発性、B は優性遺伝との家系である。3名全員の患者で同一部位の変異(*MAFB* pLeu239Pro)が認められる。一般健常日本人、ならびに家系内の健常者には変異がなく、A は新生変異(*de novo*)、B は母親(II-2)の変異が、児 2 人に優性様式で遺伝したと推測される。

図 4 CRISPR/Cas 9 ゲノム編集による p.Leu239Pro ホモ接合モデルマウスの腎病変



A 野生型(健常)のマウスの腎臓組織. C 同マウス走査電顕像. B ゲノム編集技術を用い患者と同一の変異 *Mafb* p.Leu239Pro を導入したホモマウス(2つとも変異を持っている)の腎病理像、D 電顕像。*Mafb* p.Leu239Pro により、びまん性に糸球体が硬化している。矢印:足細胞(糸球体係蹄の基底膜を外側から覆い、濾過膜を構成する)の細胞体が膨化し、その末端の足突起は融合している。E:メサンギウム細胞 P:ポドサイト

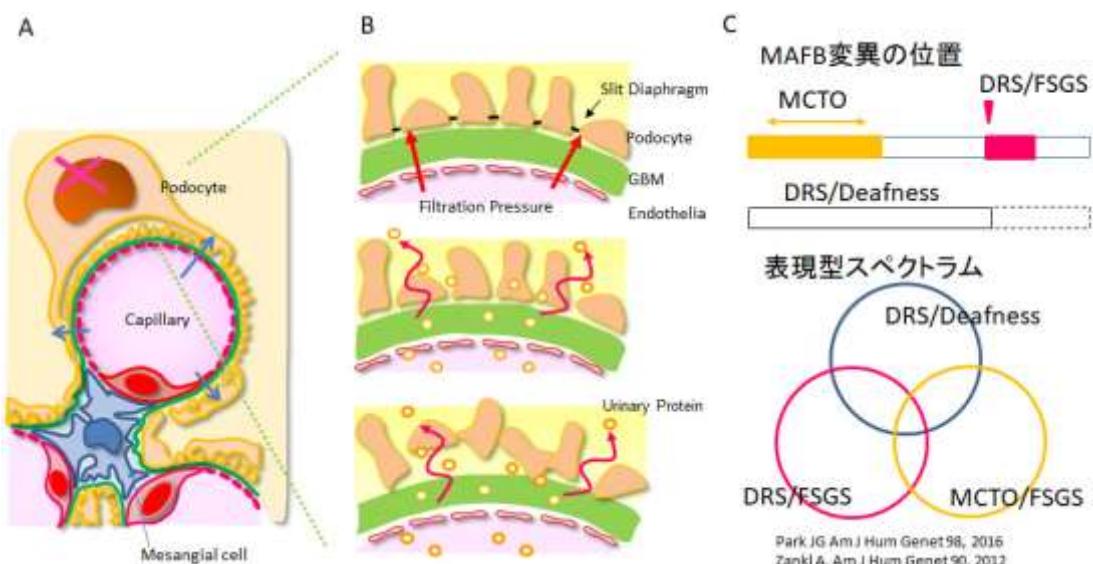
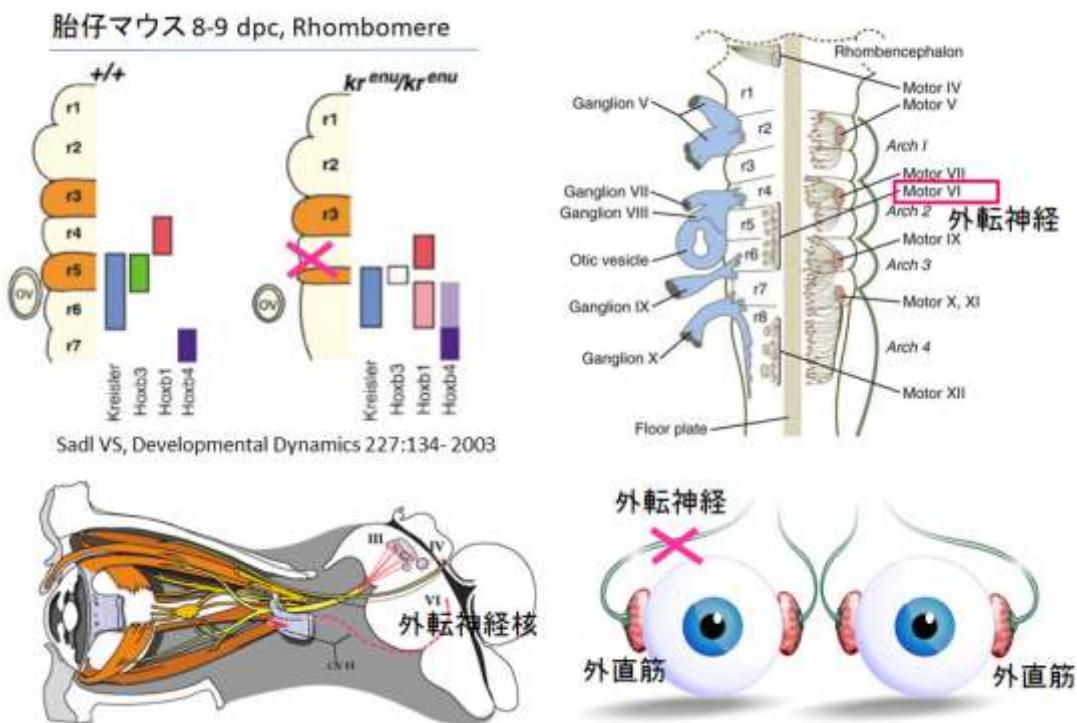


図 5. A,B MAFB 変異による FSGS の発症機序 MAFB は胎生期～成人ポドサイトに発現しており分化、機能維持に必須の役割をしている。MAFB 変異により、ポドサイト発達異常、あるいは、細胞死が起こる結果、ポドサイトが脱落(podocytopenia)して FSGS 病変を来す。

C MAFB 変異部位と疾患スペクトラム (i)MAFB C 端 DNA 結合部位・ミスセンス変異の患者臨床像は、FSGS・眼筋異常(赤色:軽度難聴、骨融解なし)、(ii)既報の N 端側ミスセンス変異表現型である骨融解+FSGS・眼筋異常・難聴なし(黄色:MCTO)、(iii)C 端の大きな欠失では、DRS と難聴を来す(青色:腎と骨の病変なし)、の 3 群の表現型のスペクトラムを示す。



C. MAFB 変異と DRS の発症機序

両眼視に必要な眼球運動は、動眼神経 III、滑車 IV、外転 VI が、6 つの外眼筋を下記の様に支配し、調節している。

神経	支配する眼球筋
動眼 III	内直筋、上/下直筋、下斜筋（上斜筋、外直筋以外）
滑車 IV	上斜筋
外転 VI	外直筋

ヒトでは胎生 4-8 週頃の後脳において、動眼神経 III、その後に外転神経 VI(最も長い脳神経である)の順に形成される(Yuksel D, 2010)。DRS は、遺伝、環境因子により、この神経発達段階が阻害され、外転神経軸索は目的の外直筋へと伸長せず(mis-rooting, defective axon path finding)、代償性に動眼神経により支配された状態と考えられている。



MAFB は、胎生期マウス(8-9 days post coitum: dpc)において、後脳 Hindbrain 部分の菱脳節 Rhombomere 5-6 に発現し、外転神経核と神経線維が形成に関わっている。Kleisler 変異マウスでは、*Mafb* が変異することにより、腎発生異常、脳幹形成異常、難聴、を生じることが知られている (Sadl VS 2002, 2003)。また *Mafb* ノックアウトマウスでも、腎低形成(ホモ接合)や FSGS 病変(ヘテロ接合)を示すことが報告されている (Moriguchi, 2006)。

発表論文

Sato Y*, Tsukaguchi H*, Morita H, Higasa K, Tran MTN, Hamada M, Usui T, Morito N, Horita S, Hayashi T, Takagi J, Yamaguchi I, Nguyen HT, Harada M, Inui K, Maruta Y, Inoue Y, Koiwa F, Sato H, Matsuda F, Ayabe S, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Yoshimura A (*共同第一著者)

Transcriptional Factor *MAFB* Mutation Causes Focal Segmental Glomerulosclerosis with Duane Retraction Syndrome

Kidney International <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.02.025>

共同研究グループ

本研究は、昭和大学医学部腎臓内科学・藤が丘病院腎臓内科(佐藤芳憲、小岩文彦、吉村吾志夫、以下敬称略)、関西医科大学内科学第二講座(塚口裕康)、附属生命医学研究所ゲノム解析部門講座(日笠幸一郎)、筑波大学医学医療系(高橋智、濱田理人、臼井俊明、森戸直紀、杉山文博、水野聖哉)、京都大学ゲノム医学センター(松田文彦、山口泉)、愛知医科大学・内分泌代謝内科(森田博之)、理化学研究所実験動物開発室(綾部信哉)、帝京大学医療技術学部視機能矯正学科(林孝雄)、東北大学大学院・薬学研究科・臨床薬学分野(佐藤博)、東京医科歯科大学・臨床解剖学(原田理代)、京都大学・大学院医学研究科・分子生体制御学講座分子細胞情報学(堀田彰一朗)、との共同研究による成果です。

本件に関する問い合わせ先

学校法人昭和大学医学部内科学講座・腎臓内科学部門・藤が丘病院腎臓内科
〒227-8501 神奈川県横浜市青葉区藤が丘 1-30
助教 佐藤芳憲
Tel; 0459711151
E-mail; a472519983@med.showa-u.ac.jp

学校法人関西医科大学

内科学第二講座
〒573-1010 枚方市新町 2-5-1
講師 塚口裕康
Tel; 072 804 2517
E-mail; tsukaguh@takii.kmu.ac.jp

附属生命医学研究所ゲノム解析部門
〒573-1010 枚方市新町 2-5-1
学長特命教授 日笠幸一郎
Tel; 072 804 2623
E-mail; higasako@hirakata.kmu.ac.jp

国立大学法人筑波大学 医学医療系 解剖学・発生学研究室

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1
教授 高橋智
Tel; 029-853-7516
E-mail; satoruta@md.tsukuba.ac.jp