

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09246

研究課題名(和文) Whole exomeを用いた非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝子診断方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of whole exome sequencing for the diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome

研究代表者

加藤 秀樹 (Kato, Hideki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90625237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)は補体関連因子の遺伝的・後天的要因により発症する疾患である。2016年9月末までに集積した臨床的aHUS患者は118例であり、本邦aHUS患者の臨床的特徴を報告した。本疾患は候補遺伝子も多く、新規遺伝子も報告されつつあり、本研究でwhole exomeでの解析方法を樹立した。MLPA法による遺伝子コピー数解析方法も樹立し、CFH、CFHR遺伝子領域のrearrangementの変異と関連した患者がいることを見出した。本研究成果により、既知遺伝子変異の検出、新規遺伝子変異の検証、新規遺伝子変異の探索が可能なexome解析を樹立し、本邦での研究に大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：Atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) is a disease that develops by complement-related genetic or acquired factors. We collected 118 clinically-diagnosed aHUS patients by the end of 2016 and reported the clinical features of aHUS patients in Japan. Many candidate genes are reported in this disease, and novel genes are also being reported. In this study, we established an analysis method by using whole exome sequencing. We also established a method for analyzing the copy number of genes by the MLPA method and found a novel rearrangement in the CFH and CFHR gene regions.

Based on the results of this research, we established an exome analysis capable of detecting known gene variants, verifying new gene variants, and exploring for new gene mutations, and contributed greatly in this disease.

研究分野：腎臓内科

キーワード：血栓性微小血管障害症 非典型溶血性尿毒症症候群

1. 研究開始当初の背景

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS)は、血栓性微小血管障害症 (TMA) のなかで、志賀毒素による溶血性尿毒症症候群 (HUS) や ADAMTS13 の異常による血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) などの疾患を除き、さらに二次性 TMA となる疾患を除外した、補体系遺伝子異常を主な原因とする症候群である。これまで、aHUS の原因として報告されている6個の既知の遺伝子 (H 因子、MCP、I 因子、B 因子、C3、thrombomodulin) の全エクソンをサンガー法で解析し、変異を同定してきた (Miyata T, Fujimura Y. Mol Immunol. 2013)。また近年でも、諸外国から DGKE(Lemaire M. Nat Genet. 2013)、plasminogen (Bu F. J Am Soc Nephrol. 2014)などの新規原因遺伝子や、複数の遺伝子の変異 (Bresin E. Am Soc Nephrol. 2013) が報告されており、従来のダイレクトシーケンシングでは対応が困難になってきている。

また遺伝子診断による aHUS の確定診断がなされないまま漫然とエクシゾムが使用されているケースも多く、高額な医療費がかかる治療であり、遺伝子検査による診断法の確立が急務であった。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) 全国からの診断依頼のあった aHUS 疑いの患者に対して、次世代シーケンサーを使用した whole exome による全既知遺伝子の診断法を樹立する。既知の遺伝子検査のみならず、近年報告されている新規遺伝子も含めた本邦での遺伝子異常背景を明らかにする。また本邦での aHUS 患者の臨床的特徴について明らかにする。

(2) これまで抗 H 因子抗体が陽性となる H 因子関連蛋白の遺伝子異常は、CFHR 領域の大きな遺伝子座 nonallelic homologous recombination (NAHR) の欠損との関連が知られているが、whole exome や multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法による同定を目指す。

(3) 既知の遺伝子検索を行い、それでも異常の見つからない患者が存在する。これらの患者と家族を含めた遺伝子解析をすることで、日本人における未知の原因遺伝子の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 申請者らは、厚生労働省の難治性疾患政策研究事業において「非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の全国調査研究」の疫学調査の研究課題で採択されたことから、平成26年度から当科のホームページでの aHUS 患者診断受け入れの案内、また奈良県立医科大学輸血部ホームページでも aHUS 研究の東大への移管の案内の掲載、日本腎臓学会誌、各種総説、各種学会、研究会等での案内を行

ってきた。全国から依頼を受けた aHUS 疑い症例に対して、患者血球から抽出したゲノムで次世代シーケンサーによる whole exome sequencing を行い、既知の変異部位との比較を行う事で迅速遺伝子診断方法を樹立し、本邦における aHUS の遺伝的背景を明らかにする。またサンガー法でも解析を実施し、結果を照合する。

Whole exome sequencing は linux という OS 上での解析を樹立する。これは多彩な free の解析ソフトが使用でき、汎用性があることによる。この後のデータ処理は様々な linux 上のソフトが公開されており、解析方法は様々であるが、基本的には Broad Institute の GATK に沿って行っている。まずは FastQC というソフトを用いて、シーケンシングデータの quality チェックを行う。次に BWA というマッピングソフトを用いて、FASTQ ファイルをヒトのゲノム上に張り付ける作業を行い、染色体上の位置情報も含んだ BAM ファイルができる。次に GATK を用い SNV/INDEL の検出を行い、それぞれの変異が VCF ファイルという形式で保存される。次にこれらの抽出された変異に Annovar というプログラムを用いてアノテーションを付加する。具体的には遺伝子名、エクソン番号、アミノ酸置換を生じるか否か、などの基本情報の他に、Ensembl、dbSNP、1000Genome project、ExAC、ESP6500、日本人のデータベースである HGVD などを用いて、健常人での変異検出頻度などの情報を注釈として加える。その他に、変異を起こしたアミノ酸置換が、どの程度機能障害を起こすと考えられるかを、蛋白の構造などを指標に予測する PolyPhen-2、SIFT などの注釈を加える。これらの経過を経て、aHUS 候補遺伝子の変異を抽出し、病的変異、または稀な変異か、病的意義は少ない変異かの判定を行う。

(2) aHUS 疑い患者の抗 CFH 抗体は ELISA 法にて検出する。抗 CFH 抗体陽性例では、CFH 関連蛋白質は同一アレルで遺伝子の欠損、融合を起こしていることが多いため、通常のシーケンサーでは変異を検出できないが、本研究では exome sequencing のリード数、MLPA 法による copy number 推定も行う。

(3) さらにこれまでに aHUS と診断された患者、新規患者を含めて、既知の遺伝子異常が見つからない患者に対して、新規原因遺伝子の探索を行う。

4. 研究成果

(1) 1998 年から 2016 年の間に、奈良県立医科大学と東京大学医学部附属病院で臨床的に aHUS と診断した症例について解析を実施した。aHUS の診断は、aHUS 診療ガイド 2015 (Kato H, et al. Clin Exp Nephrol 20, 536-543, 2016) に沿って行った。

118 例について初診時の臨床データを解析し

た結果、65%は小児期(<18歳)発症であり、75%が何らかのトリガーを契機に aHUS を発症しており、感染性胃腸炎(21%)や上気道感染(20%)の頻度が高かった。TMAの3徴を全ては満たさない症例は25%存在した。48%の症例で腎代替療法による治療を必要とした。

従来のサンガー法でのシーケンス以外に whole exome sequencing の pipeline を樹立した。

104例の遺伝子解析の結果、本邦ではC3変異の割合が高く(31%)、CFH変異の割合は低い(10%)ことが判明した。今回のように100例を超えるコホートでも、C3変異が多いという傾向が得られたことから、本邦と欧米諸国や米国とでは遺伝的背景が異なることが示唆された。

再発はC3変異例の77%、MCP変異例の50%、CFH変異例の38%でみられた。腎死の割合に関してはCFHや原因未同定例で有意に高かった(図1)。

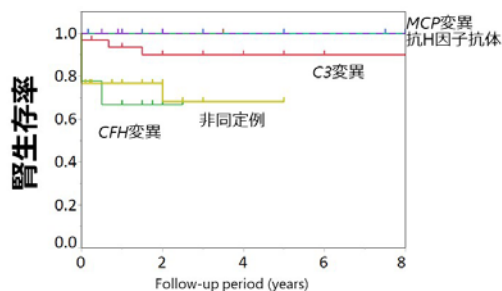


図1 aHUS患者における、原因遺伝子変異別腎生存率

また日本人に多いC3 I1157T変異は腎予後が良いことが判明した(図2)。

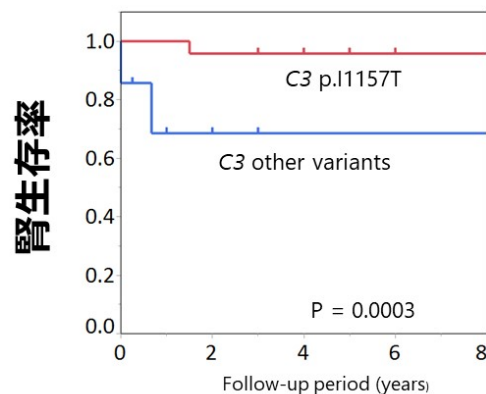


図2 C3遺伝子変異を持つaHUS患者において、C3 I1157T変異と、それ以外のC3変異の腎予後の比較

また凝固線溶系データをDICの診断基準を参考に評価を行ったところ、FDPの増加(>10 mg/dl)は72%の症例で認められたが、PT-INR延長(>1.25)を示した症例は13%、Fibrinogenの軽度低下(100-150 mg/dl)は8%、著明な低下(<100 mg/dl)は2%のみであった。これら

の結果は Clin Exp Nephrol 誌に報告した(Fujisawa M. et al)。

(2) aHUSの先天性の原因として、補体関連の遺伝子変異が知られているが、後天的な要因として、抗CFH抗体がaHUSを引き起こすことが知られている。aHUSが疑われる例は、ELISAによる抗CFH抗体スクリーニングを実施し、本邦において20名の抗CFH抗体陽性例を同定した。

抗CFH抗体が出現するメカニズムは明らかにはなっていないが、欧米では抗体陽性例の約7割がCFHR1遺伝子欠損であることが判明している。本邦では抗CFH抗体陽性患者において、欧米と比較してCFHR1欠損の割合が低い可能性が示唆された。

(3) 羊赤血球溶結試験陽性で、サンガー法による既知遺伝子のシーケンスでは原因変異が判明しない家系を見出した。MLPA法でCFHR遺伝子領域のDNA copy数の異常を見出し、新規CFHR領域のrearrangement変異を探索中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. Clin Exp Nephrol 2017. doi: 10.1007/s10157-017-1524-4. (in press)
2. Yoshida Y, Kato H, Nangaku M. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. Renal Replacement Therapy 3:5, 2017 doi.org/10.1186/s41100-016-0088-1
3. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Uchida Y, Miyata T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic background of atypical HUS in Japanese patients. Clin Exp Nephrol 2018. doi: 10.1007/s10157-018-1549-3 (in press)
4. Yamamura T, Nozu K, Ueda H, Fujimaru R, Hisatomi R, Yoshida Y, Kato H, Nangaku M, Miyata T, Sawai T, Minamikawa S, Kaito H, Matsuo M, Iijima K, Functional splicing analysis in an infantile case of atypical hemolytic uremic syndrome caused by digenic mutations in C3 and MCP genes, J Hum Genet, 2018, doi: 10.1038/s10038-018-0436-9. (in press)
5. 加藤秀樹、菅原有佳、南学正臣. 次世代シーケンサーを用いた非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝子診断. 血栓止血会誌. 28 (1), 33-40, 2017

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 加藤秀樹, 南学正臣 aHUS と C3 腎症の検査と診断 (口頭発表、シンポジウム) パシフィコ横浜 横浜 2017 年 10 月 29 日 第 47 回日本腎臓学会東部学術大会
2. 加藤秀樹, 吉田瑤子, 藤澤まどか, 菅原有佳, 南学正臣 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 診療ガイド 2015 (口頭発表、教育講演) 岡山コンベンションセンター 岡山 2017 年 10 月 13 日 第 47 回日本腎臓学会西部学術大会、国内
3. 加藤秀樹, 南学正臣 補体系腎疾患における診断プロセスと最終診断. 第 60 回日本腎臓学会学術総会, シンポジウム, 2017 年 5 月 28 日, 仙台国際センター, 仙台
4. 加藤秀樹, 藤澤まどか, 吉田瑤子, 宮田敏行, 香美祥二, 南学正臣 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の診断・全国調査研究. 第 60 回日本腎臓学会学術総会 公的研究報告-5. 2017 年 5 月 26 日, 仙台国際センター, 仙台、国内
5. 菅原有佳, 加藤秀樹, 藤澤まどか, 吉田瑤子, 内田裕美子, 小亀浩市, 宮田敏行, 秋岡祐子, 三浦健一郎, 服部元史, 南学正臣 全ゲノム解析により CFHR 領域の新規融合遺伝子を認めた C3 腎症例. 第 54 回日本補体学会学術集会, 2017 年 9 月, コラッセふくしま, 福島
6. 加藤秀樹, 吉田瑤子, 藤澤まどか, 菅原有佳, 宮田敏行, 南学正臣 「非典型溶血性尿毒症症候群診療ガイド 2015」の解説と今後の課題
第 11 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 2017 年 1 月 21 日 野村コンファランスプラザ日本橋、東京
7. 藤澤まどか, 加藤秀樹, 吉田瑤子, 碓井知子, 内田裕美子, 宮田敏行, 南学正臣 当施設における非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の解析
第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 06 月 17 日 パシフィコ横浜、神奈川
8. 南学正臣, 加藤秀樹, 吉田瑤子, 宮田敏行, 丸山彰一, 香美祥二 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の診断・全国調査研究
第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 06 月 17 日 パシフィコ横浜、神奈川
9. 吉田瑤子, 加藤秀樹, 藤澤まどか, 内田裕美子, 松本雅則, 宮田敏行, 藤村吉博, 南学正臣 非典型溶血性尿毒症症候群における原因遺伝子別の定量的羊赤血球溶血試験の検討
第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 06 月 17 日 パシフィコ横浜、神奈川
10. 吉田瑤子, 加藤秀樹, 藤澤まどか, 菅原有佳, 内田裕美子, 芦田明, 松本雅則, 伊藤秀一, 服部元史, 香美祥二, 宮田敏行, 藤村吉博, 南学正臣 本邦における非典型溶血性尿毒症症候群の解析状況
第 51 回 日本小児腎臓病学会学術集会 2016 年 7 月 7 日 あいち小児保健医療総合

センター、愛知

11. 加藤秀樹, 吉田瑤子, 藤澤まどか, 菅原有佳, 南学正臣 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の現状と今後
第 46 回日本腎臓学会東部学術大会 2016 年 10 月 8 日 京王プラザホテル、東京
12. 加藤秀樹, 吉田瑤子, 藤澤まどか, 菅原有佳, 南学正臣 atypical HUS の診断と治療の update
第 37 回日本アフェレシス学会学術大会 2016 年 11 月 26 日 パシフィコ横浜、神奈川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤秀樹 (KATO Hideki)
東京大学・医学部付属病院・講師
研究者番号：90625237

(2) 研究分担者

南学正臣 (NANGAKU Masaomi)
東京大学・医学部付属病院・教授
研究者番号：90311620

吉田瑤子 (YOSHIDA Yoko)
東京大学・医学部付属病院・研究員
研究者番号：90649443

和田健彦 (WADA Takehiko)
東海大学・医学部付属病院・研究員

研究者番号： 90649443

(3)連携研究者

該当なし

()

研究者番号：

(4)研究協力者

該当なし

()