

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10632

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞による多発性嚢胞腎組織発生モデルの開発

研究課題名(英文) The development of the generative model for the renal tissue of ADPKD by human iPS cell

研究代表者

堀江 重郎 (HORIE, SHIGEO)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40190243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD)は最も多い遺伝性腎疾患である。同一家系内でも末期腎不全に至る年齢が異なり、責任遺伝子以外の modifier geneが病勢進行に影響すると考えられている。今回の研究では100例に対して全エクソンシーケンスを行い、modifier gene 114遺伝子の影響を検討した。modifier geneの遺伝子変異群ではトルバプタン投与群がコントロール群よりも有意に腎容積増大率が低く、modifier geneの変異はトルバプタン有効性の代理マーカーと考えられた。

研究成果の概要(英文)：ADPKD (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease) is a most frequent hereditary renal disease. Even within the same family, the age leading to end-stage renal failure is different. So it is believed that modifier genes other than disease genes influence disease progression. In this study, I performed exome sequencing on 100 cases and examined the influence of modifier 114 genes. In the mutation group of modifier genes, the increase rate of total kidney volume was significantly lower than that of the control group. So, the variation of modifier genes were considered to be a surrogate marker of tolvaptan efficacy.

研究分野：腎嚢胞性疾患

キーワード：常染色体優性多発性嚢胞腎 modifier gene エクソンシーケンス トルバプタン 総腎容積

1. 研究開始当初の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: ADPKD) は、約 1,000~3,000 人に 1 人に発症する最も頻度が高い遺伝性腎疾患である。両側腎臓に多数の嚢胞が進行性に発生・増大し、腎臓以外の種々の臓器にも障害が生じる。加齢とともに嚢胞が両腎に増加、進行性に腎機能が低下し、60-70 歳までに約半数が末期腎不全に至る。ADPKD の原因遺伝子として代表的なものが *PKD1* 遺伝子 (16p13.3)、*PKD2* 遺伝子 (4q21) の 2 つであり、各々蛋白として Polycystin-1 と Polycystin-2 をコードしている。polycystin-1 は 4303 個のアミノ酸からなる 500kD の巨大な 11 回膜貫通型蛋白で、polycystin-2 は 968 個のアミノ酸からなる 6 回膜貫通型の 110kD の膜蛋白である。尿流を感知する繊毛 (cilia) に局在する Polycystin-1 と Polycystin-2 は共役してカルシウムイオン (Ca⁺⁺) を細胞内に流入させることにより尿細管径の調節を行っている。従って、*PKD1*、*PKD2* いずれかの異常であっても細胞内のカルシウム濃度制御異常を生じると考えられる。カルシウムが上皮の細胞増殖を制御し、尿細管の形態形成と分化に関与することは良く知られ、嚢胞上皮細胞の特性は、細胞内のカルシウム濃度制御異常による可能性がある。ADPKD 患者の約 85% が *PKD1* の遺伝子変異が原因で、残り約 15% は *PKD2* 遺伝子変異が原因とされている。

ADPKD は最も頻度の高い遺伝性疾患でありながら、遺伝子診断が確立していない。原因遺伝子として *PKD2* は比較的遺伝子診断が容易だが、*PKD1* はいくつかの原因により極めて困難である。*PKD1* は遺伝子変異の位置が不特定で遺伝子領域全般にわたる、遺伝子領域が 47.2kb と広い、mRNA が 14.5kb と大きい、エクソン数が 46 と多い、90% 以上の相同性を持つ 6 個の偽遺伝子が存在するなどの原因による。実際、*PKD1* に対しては遺伝子変異の同定率が約 80% であり、次世代シ

ークエンズの時代になっても改善はわずかである。さらに本邦だけでなく世界各国の ADPKD 診断基準は、画像診断による腎嚢胞個数である。遺伝性疾患であり責任遺伝子も同定されているにも関わらず、診断基準に遺伝子変異が含まれていない。

さらに、ADPKD で病的変異を持つ患者のうち、*PKD1* 遺伝子に変異を有する患者は *PKD2* より一般に臨床症状が重いとされる。末期腎不全発症年齢中央値は *PKD1* 54 歳、*PKD2* 74 歳と、責任遺伝子が *PKD1* の方が腎機能低下が早い。さらに遺伝子型でも truncating mutation の方が non-truncating mutation よりも腎機能低下が早い。しかしながら、まだ ADPKD の遺伝子診断は一般化されておらず、遺伝子変異情報は未だ構築されていない。その要因の一つとして、主たる原因遺伝子である *PKD1* 遺伝子の Exon が 44 個と多数であり、タンパク質をコードされている領域だけでも 14 kbp と非常に長く、また極めて相同性の高い偽遺伝子が 6 個存在するため、長鎖 PCR を行って *PKD1* 遺伝子特異的断片を増幅してから遺伝子解析を行う必要があるなどその操作が煩雑であったことが挙げられる。また、ADPKD では責任遺伝子変異が同じ家系内であっても、末期腎不全に至る年齢が異なる。様々な環境因子による影響も推定されているが、ADPKD では責任遺伝子以外に modifier gene が腎機能低下などの病勢の進行に影響すると考えられている。modifier gene 遺伝子変異情報が ADPKD 患者の将来の増悪の程度を予測できるバイオマーカーとなる可能性が考えられるが、これまで十分な検討はなされていない。

ADPKD の腎機能低下を促進する因子として以下のような症状や所見が指摘されている。

原因遺伝子 (*PKD1* の方が *PKD2* より進行が早い) 高血圧、尿異常 (血尿、蛋白尿)

男性、嚢胞が大きくなる速度、左心肥大、蛋白尿。血液透析療法や腎移植術が通常の医療として日本の多くの病院で行うこ

とができるようになり、末期腎不全が ADPKD の死因となることはなくなった。現在では、嚢胞感染や心血管系の合併症で亡くなることが多いと考えられている。しかし、患者にとっては末期腎不全となり、透析療法を行うことが最も避けたい病勢の進行であることは以前と変わらない。

ADPKD では、嚢胞の増大によって腎実質、ネフロンがある程度減少しても、残っているネフロンの代償によって、通常 40 歳ごろまでは、GFR の値は正常に保たれことが多い。しかし、嚢胞の拡大に伴い腎実質、ネフロンの減少が 50%以上進むと、残っているネフロンだけでは血液をろ過する働きが補えなくなり、GFR が低下し始める。その低下速度は、1 年あたり平均 5mL とされており、他の慢性腎臓病と比較して、低下速度が速いと報告されている。ADPKD 症例では腎嚢胞の増大に伴い総腎容積が増大する。総腎容積が大きい患者ほど腎機能が低いことは様々な報告から明らかになっている。また、ADPKD では腎機能の低下に先行して総腎容積が有意に増大することが示されている。このような結果をふまえて ADPKD の病勢進行の代理マーカーとして総腎容積が用いられるようになった。

従来は、進行を抑制する治療として降圧療法、飲水の励行が推奨されるのみであった。腎動脈効果療法は腎容積を確実に縮小することは可能だが、治療後腎血流が消失するため末期腎不全の腎機能が消失した症例にしか行えない。しかし、バソプレッシン V₂ 受容体拮抗薬であるトルバプタンが世界初の治療薬として登場し、本邦では世界に先駆けて 2014 年 3 月から開始された。ADPKD に対しては、コントロールと比べて腎機能低下速度および腎容積増大速度の有意な抑制が報告されている。ADPKD に対する初めての根本治療薬であり、事実上全く治療のなかった従来の状況と比べて劇的な改善が得られると期待されている。しかし、全ての症例に対して効

果が認められるわけではなく、トルバプタン効果を予測できる代理マーカーの同定が求められている。

2 . 研究の目的

2012 年に、ADPKD 患者に対する第 Ⅲ 相国際臨床試験 (Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of PKD and Outcomes : TEMPO) の結果が報告された 1)。トルバプタン投与群 961 例、コントロールプラセボ投与群 484 例に対する 3 年経過観察期間での RCT である。腎容積はコントロール群が年間 5.5 %の増大に対して、トルバプタン群では 2.8%と約 50%の効果を有意に認めた。腎機能を血清クレアチニンの逆数で評価した場合、コントロール群の低下速度が年間 3.81 に対してトルバプタン投与群では 2.61 であり (p<0.001)、有意にトルバプタン群の方が腎機能低下を抑制していた。しかし、口渇、多尿、頻尿などが水利尿作用による有害事が約 80%の症例に認められ、トルバプタン群がコントロール群より有意に多かった。またトルバプタン群では約 5%の症例に薬剤性肝障害が報告されていて、休薬を余儀なくされる症例も少なくない。ADPKD は遺伝性疾患であり、トルバプタンの服用により全ての症例が治癒するわけではなく、また患者の負担も決して少なくない。したがってトルバプタン効果を予測するマーカーの同定は緊縛の課題だが、残念ながら未だ確立していない。

そこで本研究では、modifier gene 遺伝子変異の、ADPKD に対するトルバプタン効果への影響について検討した。

3 . 研究の方法

(1) 対象

TEMPO 3;4 試験に参加した日本人の ADPKD 100 症例を対象とした。トルバプタン投与群 66 例、コントロール群 34 例である。

(2) 対象遺伝子

ADPKD の modifier gene として過去に報告のある 114 遺伝子を対象遺伝子とした。関連遺伝子カテゴリーとしては慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)、腎嚢胞性疾患、肝嚢胞性疾患、Bardet-Biedl syndrome、レニン・アンギオテンシン系シグナル、アルギニン・バソプレッシン系シグナルなどが含まれる。

- (3) 研究方法：次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンス (Variant detection: NGS HiSeq)
- (4) 対象遺伝子の変異と両側腎容積増大速度との関連を検討した。トルバプタン投与群とコントロール群との比較を行い、特に投与前後の腎容積増大速度への影響を検討した。

4. 研究成果

遺伝子解析の結果を図 1 に示す。従来報告のある責任遺伝子変異は、*PKD1* 74 例、*PKD2* 9 例が確認された。さらに新規のバリエーションは 19 例 (*PKD1* 11 例、*PKD2* 8 例) に認められた。100 人中 60 例 (60%) に modifier gene 114 遺伝子中 48 遺伝子に病的変異を認めた。これらの modifier gene に変異が見られない群ではコントロール群とトルバプタン投与群の腎容積増大率の有意差は認められなかった ($p = 0.1734$)。しかし、遺伝子変異が認められた群ではトルバプタン投与群がコントロール群よりも有意に腎容積増大率が低かった (図 2、 $p = 0.0038$)。そのため、modifier gene の変異はトルバプタン有効性を見る代理マーカーと考えられた。

トルバプタンの目的は ADPKD の腎嚢胞や腎臓全体を小さくすること、腎臓の機能が悪くなるスピードを緩めること、腎臓痛を抑えること、の 3 つである。この薬によって決して嚢胞は消失しないし、末期腎不全を 100% 防ぐ薬でもない。

また、薬の特徴として水利尿作用があり、尿が多量に出て尿の回数も増え、口が渇く、皮膚の乾燥感などの症状が出現する。またそれ以外に薬剤性肝障害が稀に出現する。今回の研究により、トルバプタンの有効性を modifier gene の変異で同定できることが明らかになったことから、今後は本治療の適格な対象を遺伝子診断で選択していく。

図 1

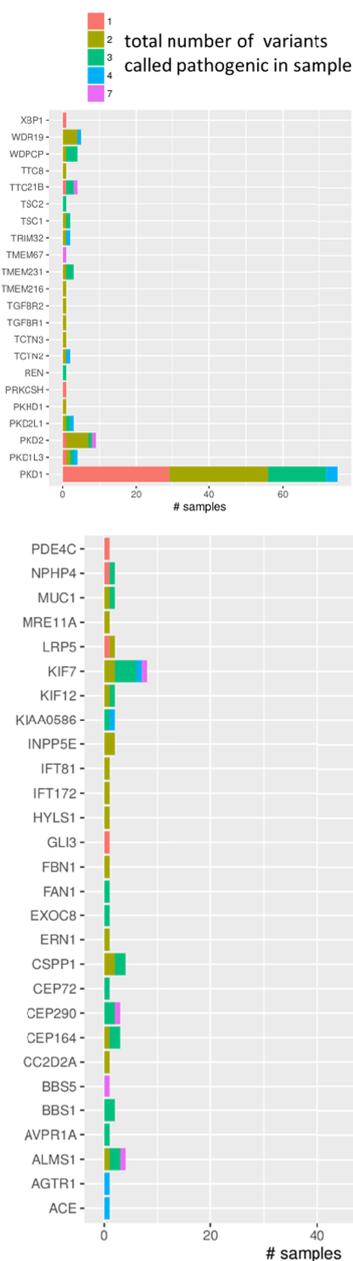
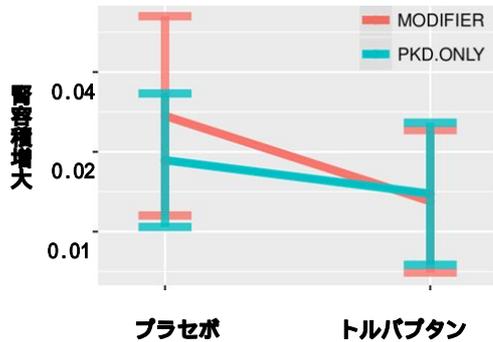


図 2



引用文献

1) Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, et al: Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med 367 : 2407-2418, 2012.

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. Lin CC, Kurashige M, Liu Y, Terabayashi T, Ishimoto Y, Wang T, Choudhary V, Hobbs R, Liu LK, Lee PH, Outeda P, Zhou F, Restifo NP, Watnick T, Kawano H, Horie S, Prinz W, Xu H, Menezes LF, Germino GG. A cleavage product of Polycystin-1 is a mitochondrial matrix protein that affects mitochondria morphology and function when heterologously expressed. Sci Rep. 査読あり Vol. 8, 2018, 2743.

2. Kinoshita M, Higashihara E, Kawano H, Higashiyama R, Koga D, Fukui T, Gondo N, Oka T, Kawahara K, Rigo K, Hague T, Katsuragi K, Sudo K, Takeshi M, Horie S, Nutahara K. Technical Evaluation: Identification of Pathogenic Mutations in PKD1 and PKD2 in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease by Next-Generation Sequencing and Use of a Comprehensive

New Classification System. PLoS One. 査読あり Vol. 11, 2016, e0166288.

3. Horie S, Mochizuki T, Muto S, Hanaoka K, Fukushima Y, Narita I, Nutahara K, Tsuchiya K, Tsuruya K, Kamura K, Nishio S, Suwabe T, Ubara Y, Ishimura E, Nakanishi K, Furukawa K, Kimura K, Matsuo S. Evidence-based clinical practice guidelines for polycystic kidney disease 2014. Clin Exp Nephrol. 査読あり Vol. 20, 2016, 493-509.

4. Chapman AB, Devuyst O, Eckardt KU, Gansevoort RT, Harris T, Horie S, Kasiske BL, Odland D, Pei Y, Perrone RD, Pirson Y, Schrier RW, Torra R, Torres VE, Watnick T, Wheeler DC; Conference Participants. Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): executive summary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. Kidney Int. 査読あり Vol. 88, 2015, 17-27.

5. Horie S. Will introduction of tolvaptan change clinical practice in autosomal dominant polycystic kidney disease? Kidney Int. 査読あり Vol. 88, 2015, 14-6.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Muto S, Mochizuki T, Tsuchiya K, Nishio S, Hanaoka K, Ubara Y, Nutahara K, Tsuruya K, Ishimura E, Narita I, Maruyama S, Horie S. The interim report of data in J-PKD registry. International Society of Nephrology Frontiers meeting. 2018/2/22-25, Tokyo, Japan.

2. Horie S, Masuda M, Neuber S, Muto S, Okada T, Bergmann C. Pharmacogenomics of Tolvaptan's Inhibitory Effect on

Kidney Volume Increase in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Kidney Week 2017, 2017/10/31-11/5, New Orleans.

3. Muto S, Lu Y, Kawano H, Horie S. Urinary copeptin is the surrogate marker of progression in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD). 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2015/11/3-8, San Diego.
4. Kawano H, Muto S, Horie S. The short term effect of tolvaptan for CKD Stage4 autosomal dominant polycystic kidney disease. 48th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2015/11/3-8, San Diego.
5. 武藤 智,河野春奈,堀江重郎.日本人ADPKDにおけるメイヨー分類の有用性の検討.第60回日本腎臓学会学術総会.仙台.2017/5/26-28

〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀江 重郎 (SHIGEO, Horie)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40190243