

平成30年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15467

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる新しい多発性嚢胞腎診療

研究課題名(英文) Novel medical approach of polycystic kidney disease by the next generation sequencer

研究代表者

蘇原 映誠 (SOHARA, Eisei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：90510355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：多発性嚢胞腎の成人例は常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)というPKD1/PKD2遺伝子の変異による疾患と考えられているが、家族内発症がない患者の遺伝学的背景については十分に解明されていなかった。我々は様々な嚢胞性腎疾患を網羅的に解析できる遺伝子診断パネルを作成し、家族歴のない成人多発性嚢胞腎患者を検討したところ、一部の患者がADPKD以外の疾患であると診断された、遺伝背景による臨床的特徴も明らかになった。この結果は遺伝子診断パネルによる遺伝学的診断の有用性を示しており、今後、治療適応の決定や遺伝子カウンセリングなどへのさらなる臨床的な活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Distinguishing autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) from other inherited renal cystic diseases in patients with adult polycystic kidney disease and no family history is critical for correct treatment and appropriate genetic counseling. We analyzed 53 adult polycystic kidney disease patients with no family history. Comprehensive genetic testing was performed using capture based next generation sequencing for 69 genes currently known to cause hereditary renal cystic diseases including ADPKD. Through our analysis, 32 patients had PKD1 or PKD2 mutations. Additionally, 3 patients with disease causing mutations in NPHP4, PKHD1, and OFD1 were diagnosed with an inherited renal cystic disease other than ADPKD. The genetic screening approach and clinical features described here are potentially beneficial for optimal management of adult sporadic polycystic kidney disease patients.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：多発性嚢胞腎 次世代シーケンサー 網羅的遺伝子解析

### 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) は世界で最も高頻度な遺伝性疾患の1つであり、日本では透析療法を行う患者全体の2.5%を本疾患が占めている。PKD1 (Polycystin1) と PKD2 (Polycystin2) の2つの原因遺伝子があり、近年、国の難病に指定されると共に、トルバプタンによる治療が保険適応となり注目を浴びている。家族にADPKD患者がいる場合は画像検査で腎臓の嚢胞の数を調べるだけで診断できる。一方、家族内発症がない場合、臨床の現場ではADPKDとして診療されることが多いものの、その他の嚢胞性腎疾患の可能性も否定できず、正確な遺伝学的背景は十分に明らかになっていなかった。

申請者蘇原は Brigham Women's Hospital 腎臓部門/Harvard Medical School 遺伝学教室に留学し、NPHPの原因遺伝子であるNPHP9 (Nek8) の報告を行った上に (JASN 2008, First author)、現在も多発性嚢胞腎研究を続けている (JASN 2014, Corresponding author)。さらに、多くの遺伝子改変マウス作成の実績もあり (JASN 2014, Hum Mol Genet 2014 などをはじめ10報)、嚢胞性腎疾患の遺伝情報を基礎研究へ持ち込むためのマテリアルと経験も有している。

### 2. 研究の目的

近年、遺伝学分野において革命とも言える技術である次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing: NGS) が登場し、膨大な遺伝子配列情報を短時間で入手する事が可能になった。我々は国立遺伝学研究所との連携によりNGS解析技術を導入し、最近、約100種類の既知の腎臓病原因遺伝子を網羅的に診断できる遺伝性腎疾患カスタム診断パネルを作成した。現在、すでに53家系についてパネルを使用して遺伝学的にも正確な診断を行っている。この診断パネルは、嚢胞性腎疾患においてはPKD1/PKD2というADPKDの原因遺伝子だけではなく、若年性ネフロン癆 (nephronophthisis: NPHP) など、様々な嚢胞性腎疾患の原因遺伝子も同時に解析される。ADPKD症例にこのパネルを使用したところ、従来の画像による診断ではADPKDとされながら、PKD1/PKD2に変異がなく、NPHPの原因遺伝子に変異があるNPHP症例が複数確認された。これはPKD1/PKD2と同時にNPHP原因遺伝子を検査できる我々しか成し得ない遺伝学的検討である。

本研究では、多発性嚢胞腎孤発例の遺伝子診断を集めて、画像的にADPKDと診断された症例の新しい原因遺伝子プロファイル作成を目指す。さらに、NGS診断パネルによるPKD1/PKD2の網羅的解析が可能である優位性を生かし、血中に循環する嚢胞由来DNA (セルフリーDNA: cfDNA) をNGS診断パネルにかけ、PKD1/2の体細胞変異を検出するというリキ

ッドバイオプシーを行い、ADPKDの新たなバイオマーカー作成と嚢胞進展の遺伝学的メカニズム解明を目指すものである。

### 3. 研究の方法

(1) NGS 遺伝性腎疾患カスタム診断パネルのブラッシュアップ: 右図のように、我々は100種類以上の遺伝子をターゲットとしたNGSを用いた遺伝性腎疾患カスタム診断パネルを作成し、稼働させている。NPHPの新規原因遺伝子は1年毎に相当数報告されており、カスタム診断パネルに最新のNPHP原因遺伝子を組み込むためのDNAプローブ作成と条件設定を行う。また、本申請は嚢胞性腎疾患に特に注目しているが、表を見て明らかのように、様々な腎疾患についての検討を可能としており、他の遺伝性腎疾患についても必要に応じて新規遺伝子についての診断が可能になるように条件検討する。

(2) ADPKD 孤発例/非典型例のNGS診断パネルによる解析: 従来ADPKDとされてきた症例の中にNPHP変異などによるものがどのくらい混在しているかを明らかにするため、特に孤発例や非典型例に注目してADPKDの遺伝性腎疾患カスタム診断パネルを用いた遺伝子診断を重ね、遺伝子プロファイル作成を明らかにする。症例については東京医科歯科大学だけではなく、現在、関連施設を含めて、日本全国からの依頼を受けている状況であり、蓄積を図っていく。

(3) 嚢胞由来セルフリーDNA (cfDNA) のリキッドバイオプシーによるバイオマーカー作成とADPKD発症メカニズム探求: ADPKDの腎嚢胞はヘテロの生殖細胞変異の対側アレルにセカンドヒットとして体細胞変異を有することから、嚢胞から脱落し血中を循環するセルフリーDNA (cfDNA) のPKD1/PKD2体細胞変異をNGS診断パネルで検出し、バイオマーカーとしての価値を探る研究である。癌領域研究からcfDNA抽出法は確立されている。質だけでなく量も評価したいことから、血清ではなくコンタミネーションのない血漿からcfDNAを磁気ビーズによって抽出する。cfDNAが1ng得られれば、我々のNGS診断パネルにかけられるようになり、実現可能である。Genomic DNA と cfDNA を同時にNGS診断パネルにかけ、genomic DNA から生殖細胞変異、cfDNA から体細胞変異情報を得る。これらを比較・定量することにより、生殖細胞変異と異なる体細胞変異を検出し、cfDNA内の体細胞変異の量と種類がより豊富である方が、より病態が進展しやすい/進展しているといった事項などのバイオマーカーになることを期待し、臨床情報との比較検討を行う。また、経時的变化を追うことによって、ADPKDがどのように体細胞変異を起こして病気が進行していくかというメカニズムを明らかにすることができ、非常に興味深い。もし、

体細胞変異検討に際して NGS の Read 数が十分に得られないようであれば、本研究のために PKD1/PKD2 のみのカスタムパネルを作成し、PKD1/PKD2 遺伝子情報を増やす。

(4)ADPKD 以外の診断パネルによる遺伝子診断、エクソーム解析：下図のように、遺伝性腎疾患カスタム診断パネルは嚢胞性腎疾患のみを診断するものではなく、腎臓に関わる主たる遺伝性疾患ほぼ全てを網羅していた別のパネルも作成している。既知の遺伝子に変異が認められない患者群のゲノムを蓄積しており、同じ遺伝性疾患の既知遺伝子に変異のない患者とその家族のゲノムと情報が蓄積されれば、全ての遺伝子の遺伝子翻訳部位をシークエンスするエクソーム解析を行い、全く新しい原因遺伝子を同定していく。

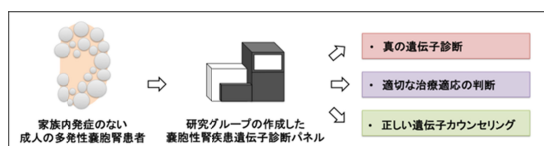
次世代シーケンサー(NGS)による遺伝性腎疾患診断パネル

腎臓関連	腎臓関連	ADPKD, AQP2, その他 4 遺伝子
遺伝性アルドステロン産生	遺伝性アルドステロン産生	WNKA, WNKL, CUL3, KHL3, その他 2 遺伝子
Gitelman 症候群	Gitelman 症候群	SLC12A1
Bartter 症候群	Bartter 症候群	SLC12A1, KCNJ1, CLCNKB, BSND, CLCNKA, CASB
遺伝性アルドステロン産生 1 型	遺伝性アルドステロン産生 1 型	SCN11A, NR3C2
Liddle 症候群	Liddle 症候群	SCN5B, SCN5BG
電解質異常	電解質異常	遺伝子
高血圧/その他	高血圧/その他	NR3C1, SCN5B
腎臓病関連	腎臓病関連	REN1B1
Apparent mineralocorticoid excess	Apparent mineralocorticoid excess	CYP11B1, CYP11B2, CACNA1D
家族性高アルドステロン産生	家族性高アルドステロン産生	UGT2, DMP1, ENPPL1, PHEX
家族性低血圧性低カルシウム血症	家族性低血圧性低カルシウム血症	PTH2, CLDN18, FGF, CLDN18P
腎性低カルシウム血症	腎性低カルシウム血症	SLC4A1, ATP9B1, ATP9B4, SLC4A4, SLC4A1, CA2
原腸管性アジドーシス	原腸管性アジドーシス	SLC22A1, SLC22A7
腎性低尿酸血症	腎性低尿酸血症	ASS1, NOTCH2, PKD1, PKD2, PKHD1, HNF1B, UMOD, MUC1
遺伝性腎臓病	遺伝性腎臓病	NPH1, NPH2, NPH3, NPH4, NPH5, NPH6, など
(ADPKD, ARPKD, 髄質嚢胞腎, 若年性ネフローゼ)	(ADPKD, ARPKD, 髄質嚢胞腎, 若年性ネフローゼ)	COL4A3, COL4A3, COL4A3, COL4A3, MYH9
アルポート症候群/基底膜障害症	アルポート症候群/基底膜障害症	NPH1, NPH2, PLEKHA7, WILMS1
遺伝性ネフローゼ	遺伝性ネフローゼ	ACTN4, TRPC6, C3DAP, APOL1, INF2, MYO1E
遺伝性尿石症/尿結石症	遺伝性尿石症/尿結石症	GLA
その他	その他	PN1
Glomerulopathy with fibrocellular deposits	Glomerulopathy with fibrocellular deposits	VHL
von Hippel Lindau 病	von Hippel Lindau 病	CLCN5, OR1L1
Deaf 病	Deaf 病	SLC4A1, SLC4A2
腎性骨軟化症	腎性骨軟化症	CFH, CFI, CD46
atypical HUS	atypical HUS	ATP7B
Wilson 病	Wilson 病	PN2, KAL1
Kallmann syndrome	Kallmann syndrome	

約130種類の腎臓病関連遺伝子を網羅し、遺伝子診断可能である

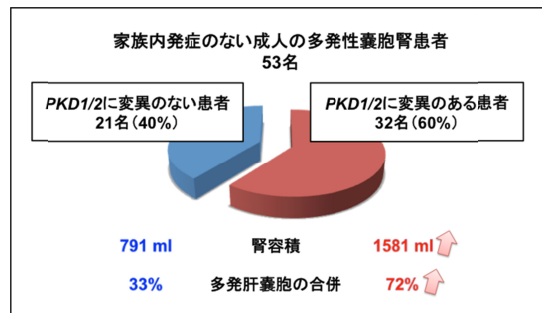
#### 4. 研究成果

多発性嚢胞腎は腎臓に嚢胞が多発することで腎機能が低下する遺伝性の腎臓疾患であり、ほとんどが成人になって発見されて病気が進行する常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) は PKD1 および PKD2 という遺伝子の異常が原因とされており、家族内発症がない場合、臨床の現場では ADPKD として診療されることが多いものの、その他の嚢胞性腎疾患の可能性も否定できず、正確な遺伝学的背景は十分に明らかになっていなかった。しかし、嚢胞性腎疾患のすべての原因遺伝子を一度に検査することは、従来の手法では大変な労力を要した。そこで、申請者蘇原らは次世代シーケンサーを用いて嚢胞性腎疾患の原因となる 69 個の遺伝子を網羅的に解析できる全く新規の嚢胞性腎疾患の網羅的遺伝子診断パネルを下図のように作成した。



家族内発症がない成人の多発性嚢胞腎患者 53 名を対象に、遺伝学的背景と臨床所見の関係を調査した。その結果、53 名中 32 名には PKD1 または PKD2 遺伝子の変異を認め、3

名の患者は、ADPKD 以外の嚢胞性腎疾患と遺伝学的に診断された。さらに、PKD1/2 に変異のある患者とない患者を比較すると、下図のように変異のある患者の腎臓が大きく、肝嚢胞が多発し、血圧が高いという臨床的特徴があることが明らかになった。



本研究は、嚢胞性腎疾患網羅的遺伝子診断パネルを用いることで、家族内発症のない多発性嚢胞腎患者群における ADPKD 以外の遺伝性嚢胞性腎疾患を正確に診断した。さらに、その中で PKD1/2 に変異のある患者の臨床的特徴を初めて明らかにした。これらの結果は、研究グループが作成した嚢胞性腎疾患診断パネルによる遺伝学的診断の有用性を示しており、今後、家族歴のない多発性嚢胞腎の診断だけでなく、薬剤治療適応の決定や遺伝子カウンセリングなどへのさらなる臨床的な活用が期待される。

リキッドバイオプシーについては検討を行ったものの次世代シーケンサーで検討可能なだけの PKD1/2 の変異が得られず、さらに他の種類の検体なども用いた検討を進めることとした。

また他の遺伝性腎疾患の新規原因遺伝子同定も進めており、遺伝子改変マウスの検討にまで進んでいる。

#### 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 9 件)

Takuya Fujimaru, Takayasu Mori, Akihiro Sekine, Shintaro Mandai, Motoko Chiga, Hiroaki Kikuchi, Fumiaki Ando, Yutaro Mori, Naohiro Nomura, Soichiro Jimori, Shotaro Naito, Tomokazu Okado, Tatemitsu Rai, Junichi Hoshino, Yoshifumi Ubara, Shinichi Uchida, Eisei Sohara, Kidney enlargement and multiple liver cyst formation implicate mutations in PKD1/2 in adult sporadic polycystic kidney disease, Clin Genet., 査読有, 2018. 印刷中  
DOI: 10.1111/cge.13249

Emi Sasaki, Koichiro Susa, Takayasu Mori, Kiyoshi Isobe, Yuya Araki, Yuichi Inoue, Yuki Yoshizaki, Fu-miaki Ando, Yutaro Mori, Shintaro Mandai, Moko Zeniya, Daiei Takahashi, Naohiro Nomura, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, Eisei Sohara, KLHL3 Knockout Mice Reveal the Physiological Role of KLHL3 and the Pathophysiology of Pseudohypoaldosteronism Type II Caused by Mutant KLHL3, Mol. Cell. Biol., 査読有, 37 巻, 2017, 7  
DOI: 10.1128/MCB.00508-16

Yohei Arai, Daiei Takahashi, Kenichi Asano, Masato Tanaka, Mayumi Oda, Shigeru B H Ko, Minoru S H Ko, Shintaro Mandai, Naohiro Nomura, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, Eisei Sohara, Salt suppresses IFN inducible chemokines through the IFN -JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells, Sci Rep., 査読有, 2017, 7 巻, 46580  
DOI: 10.1038/srep46580

Daiei Takahashi, Takayasu Mori, Eisei Sohara, Miyako Tanaka, Motoko Chiga, Yuichi Inoue, Naohiro Nomura, Moko Zeniya, Hiroki Ochi, Shu Takeda, Takayoshi Suganami, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, WNK4 is an Adipogenic Factor and Its Deletion Reduces Diet-Induced Obesity in Mice, EBioMedicine, 査読有, 18 巻, 2017, 118-127  
DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.03.011

Yuki Yoshizaki, Takayasu Mori, Mari Ishigami-Yuasa, Eriko Kikuchi, Daiei Takahashi, Moko Zeniya, Naohiro Nomura, Yutaro Mori, Yuya Araki, Fumiaki Ando, Shintaro Mandai, Yuri Kasagi, Yohei Arai, Emi Sasaki, Sayaka Yoshida, Hiroyuki Kagechika, Tatemitsu Rai, Shinichi Uchida, Eisei Sohara, Drug-Repositioning Screening for Keap1-Nrf2 Binding Inhibitors using Fluorescence Correlation Spectroscopy, Sci Rep., 査読有, 7 巻, 2017, 3945  
DOI: 10.1038/s41598-017-04233-3

萬代 新太郎, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 【腎泌尿器科領域におけるゲノム医療】トランスポーター、チャネルと遺伝子異常(解説/特集)、腎臓内科・泌尿器科、査読無、5 巻、2017、55-62

Ando Fumiaki, Sohara Eisei, Morimoto Tetsuji, Yui Naofumi, Nomura Naohiro, Kikuchi Eriko, Taka-hashida Daiei, Mori Takayasu, Vandewalle Alain, Rai Tatemitsu, Sasaki Sei, Kondo Yoshiaki, Uchida Shinichi, Wnt5a induces renal AQP2 expression by activating calcineurin signalling pathway, Nat Commun., 査読有, 7 巻, 2016, 13636  
DOI: 10.1038/ncomms13636

井上 佑一、蘇原 映誠、AQP11 ノックアウトマウスにおいて PC-1 の糖鎖と細胞内局在の異常が多発性嚢胞腎を引き起こす、医学のあゆみ、査読無、256 巻、2016 年、972-973

安藤 史顕、井上 佑一、蘇原 映誠、【多発性嚢胞腎-基礎と臨床のトピックス】基礎 アクアポリンと嚢胞腎、腎と透析、査読無、80 巻、2016 年、809-812

[学会発表](計6件)

蘇原 映誠 他、次世代シーケンサーを用いた遺伝性腎疾患の解析. 第 60 回日本腎臓学会学術総会、シンポジウム 2017

藤丸 拓也、蘇原 映誠、他、次世代シーケンサーにおける嚢胞性腎疾患遺伝子診断パネルの構築. 第 60 回日本腎臓学会学術総会 2017

Takuya Fujimaru, Eisei Sohara, et al., Genomic background of adult polycystic kidney disease patients without a family history. Kidney Week 2017, 2017

蘇原 映誠 他、WNK シグナルを介した新しい塩分感受性調節機構の解明 なぜ、塩分摂取で血圧が上がるのか?、九州腎フォーラム、2016

蘇原 映誠 他、次世代シーケンサー時代の高血圧研究の実際、第 39 回日本高血圧学会総会、2016

Takuya Fujimaru, Eisei Sohara, et al. Development of a Customized Diagnostic Panel for Targeted Exome Sequencing of Polycystic Kidney Diseases, Kidney Week 2016, 2016

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

蘇原 映誠 (SOHARA, Eisei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・准教授  
研究者番号：90510355