

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19642

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析を利用したAlport症候群の診断体系の確立

研究課題名(英文) Establishment of a comprehensive diagnostic method using next generation sequencer for Alport syndrome

研究代表者

山村 智彦 (Yamamura, Tomohiko)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：30770242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、次世代シーケンサー(NGS)を用いたtargeted sequencingにより既知のポドサイト関連45遺伝子を網羅的に解析できる診断体制を確率し、研究期間内にAlport症候群(AS)が疑われた185家系に対して解析を施行、147家系で原因遺伝子変異を同定した。多数の症例の解析を行った結果、X染色体連鎖型ASの女性患者における臨床像と遺伝子型の関係を解析することが可能となり報告を行った。また、AS疑い患者の中に含まれる他の遺伝性腎疾患の患者の診断や、コピー数異常や体細胞モザイクを有するAS患者の診断もNGSを用いて行うことが可能であることを明らかとし、報告を行った。

研究成果の概要(英文)：We established a diagnostic system that comprehensively analyze podocyte-related 45 genes by targeted sequencing using next generation sequencer (NGS). We analyzed 185 families suspected as having Alport syndrome (AS) and causative variants were identified in 147 families. As a result of large-scale analysis, it was possible to analyze the genotype-phenotype correlation of AS and we reported on the details about female patients with X-linked AS. We also clarified that NGS analysis detects other inherited kidney diseases, AS patients with copy number variation or somatic mosaic.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：Alport症候群 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

アルポート症候群(AS)は小児期に発症し、ほぼ全例で末期腎不全に至る進行性の遺伝性腎疾患である。遺伝形式にはX染色体連鎖型(XLAS)、常染色体劣性(ARAS)、常染色体優性(ADAS)が存在し、それぞれ重症度や臨床経過が異なる。責任遺伝子として型コラーゲンをコードするCOL4A3-5の3つが存在する。従来、解析には直接シーケンス法(サンガー法)を用い、更にこの方法で検出できないエクソン単位のコピー数異常(CNV)に対してはMLPA法による解析を施行し診断精度を高めてきたが、多大な時間・労力を要してきた。しかし、これら従来法の組み合わせでもイントロン深部の欠失や体細胞モザイク変異等は診断できず、家族歴や臨床経過よりASが疑われるも確定診断に至らない症例が10%程度存在するため、正確かつ効率的な検査法の確立が望まれる状況であった。

2. 研究の目的

本研究ではASの非侵襲的かつ効率的な診断体系を確立することを主な目的とする。具体的に、次世代シーケンサー(NGS)解析用疾患パネルを作成し、臨床的にASが疑われる症例に対して、腎生検を経ずに網羅的遺伝子解析を行う。また、近年ASの重症化因子として挙げられるポドサイト関連の修飾遺伝子の変異の有無についても同一の疾患パネルを用いて同時に検索を行う。これにより非侵襲的かつ効率的な診断と重症化機序の解明を同時に目指す画期的研究である。

3. 研究の方法

研究は以下の手順で行った。

(1) ASの遺伝子解析に用いるNGS解析用疾患パネルを作成する。

(2) 全国の腎臓内科及び小児腎臓内科からAS疑い症例の検体提供を受け遺伝子解析を行う。

(3) 末梢血検体からgDNAを抽出後、NGS疾患パネルを用いた網羅的遺伝子解析を行い診断確定するとともに、修飾遺伝子を検索する。

(4) 上記3から疑われる重症化の修飾遺伝子について、過去に当研究室で遺伝子診断を行ったAS症例と同じNGS疾患パネルを用いた解析を行い、真の修飾遺伝子であることを確認する。

4. 研究成果

(1) AS解析用NGS疾患パネルの作成

今回の研究では、まずASの解析に用いるNGSの疾患パネルを作成した。作成にあつ

ては、ASの原因遺伝子だけでなく、ASに類似した臨床経過や病理学的所見を呈する可能性のある既知のポドサイト関連45遺伝子を網羅的に解析できるように設計を行った。結果としてこれらの全ての遺伝子のエクソンとエクソン・イントロン境界部をスクリーニング可能な疾患パネルを作成することができた。

(2) AS疑い患者の検体の収集及びNGSを用いた網羅的遺伝子解析

研究開始以前、当研究室においては全国の腎臓内科医や小児科医より依頼を受けて、年間約50例程度のAS疑い患者に対する遺伝子解析を行ってきた。今回、解析症例数を増やすために関連学会や研究会で遺伝子解析を行っていることを周知した結果、研究期間内に185例(家系)の遺伝子解析依頼を受け、年間100例という目標をほぼ達成することが可能であった。提供いただいた末梢血検体からgDNAを抽出し、NGSを用いて網羅的遺伝子解析を施行した。

(3) 過去の解析方法との比較

今回得られた結果を元に、過去に当施設でサンガー法による解析を行っていた時代の変異検出率と比較を行った。

研究期間内の解析症例のうち、特にASの疑いが強い147例と過去に当施設で解析を行った294例の解析結果を比較した。今回のNGS解析を中心とした網羅的診断では147例中131例(89%)がASの診断に至り、過去にサンガー法、MLPA法、mRNA解析を組み合わせ解析を行っていた時代の診断率(294例中267例:91%)と遜色のない診断率であった。

今回のNGS解析で同定した変異遺伝子の中では、XLASの原因遺伝子であるCOL4A5遺伝子の変異が最も多く同定された(図1)。

図1. 遺伝子解析結果一覧

	4 系数
NGS7 析で%の診断9 0	131
COL4A5変異	84
COL4A3変異	22
COL4A4変異	25
NGS7 析で他疾A の診断9 0	2
変異同0 できず	14
計	147

更に、今回作成したNGS疾患パネルを用いて過去に従来法で診断ができなかった13症例の遺伝子解析を新たに施行した結果、3例が新たにASの確定診断に至った他、2例が他の遺伝性腎疾患と診断された。

以上より、NGSを使用した網羅的解析は従来行われていたサンガー法による解析と比較し遜色のない診断率を誇るばかりか、以前は見落としていたAS症例の診断が可能であ

ることを明らかとした。

(4) 解析結果を利用した遺伝子型と臨床像の相関関係の解明

遺伝性腎疾患の診療にあたっては、遺伝子型と臨床像の相関の有無を正しく理解することが非常に重要である。今回の研究によって、非常に多くの AS 症例の臨床データと変異遺伝子の情報が蓄積され、遺伝子型と臨床像の相関を含め多くの新たな知見を得ることが可能となった。

XLAS の男性患者においては遺伝子型と臨床像に非常に強い相関が認められることがすでに知られていた。一方で女性患者については臨床像が非常に軽症例から重症例まで多彩であり、遺伝子型と臨床像の相関も明らかになっていなかった。今回我々は、これまでに当施設で診断した 336 名の XLAS 女性患者の情報を解析し、遺伝子型と臨床像の相関関係が認められないことを明らかにした。更に、世界で初めて蛋白尿の出現年齢中央値が 7 歳であることを明らかにした (Kidney Int Rep. 2017 May 4;2(5):850-855.)。

(5) 他の遺伝性腎疾患の診断

今回行った NGS による網羅的解析によって、臨床的もしくは病理学的に AS が強く疑われる患者の中に計 4 例の他の遺伝性腎疾患の患者が存在することが明らかとなった。従来のサンガー法による解析では、AS の原因遺伝子しか解析していなかったため、これら他の遺伝性腎疾患の患者は見落とされていたものと考えられた。適切な遺伝カウンセリングや腎予後の推定、治療方針の選択のためにも AS と他の遺伝性腎疾患を正確に区別することは重要であり、NGS を用いた網羅的解析の有用性が示された。

(6) コピー数異常の同定

従来のサンガー法による遺伝子解析ではエクソン単位の欠失や重複といったコピー数異常 (CNV) は同定することができないため、サンガー法で変異が同定できない症例に対しては MLPA 法による CNV のスクリーニングを別途施行する必要があった。今回我々は、NGS の解析データを用いたペア解析によってこれら CNV をスクリーニングする手段を確立した。今回 NGS 解析で AS の診断に至った症例のうち 3 例が COL4A5 遺伝子の CNV によるものであったが、これら全ての症例はペア解析で CNV を検出することが可能であった。MLPA 法はコストや手間の面から変異が同定できない症例の全てに対して施行することは困難であったが、NGS 解析データを利用することで CNV を十分にスクリーニングすることが可能であることが明らかとなり、その有用性が示された (Clin Exp Nephrol. 2018 Jan 25.)。

(7) 体細胞モザイク症例の同定

AS 発端者における体細胞モザイク症例は、変異遺伝子の発現量の少なさや症状が軽度であることから従来法による診断が困難であった。しかし、NGS による解析では変異遺伝子の割合が僅かであっても検出し可視化することが可能であり、今回の NGS 解析でも複数症例が体細胞モザイク変異を有することが同定された (Clin Exp Nephrol. 2017 Oct;21(5):877-883.)。

(8) 解析コストの削減及び効率化

従来のサンガー法による COL4A3/4A4/4A5 遺伝子の解析は、そのエクソンの多さ (1 遺伝子あたりおよそ 50 エクソン) と変異のホットスポットがないことから非常に多くの労力と費用を要した。従来法では 1 検体あたりの解析費用は 3-9 万円程度要していたが、今回 NGS 疾患パネルによる解析では 45 遺伝子を全てスクリーニングしても 2 万 5 千円と最大で従来の 1/3 程度まで解析費用を削減することが可能であった。更に、従来は 1 検体の解析に 2 週間程度の期間を要していたところ、NGS パネル解析ではおよそ 20 検体の処理が 2 週間程度で可能となり、労力も大幅に軽減することが可能であった。

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 3 件)

China Nagano, Kandai Nozu, Naoya Morisada, Masahiko Yazawa, Daisuke Ichikawa, Keita Numasawa, Hiroyo Kourakata, Chieko Matsumura, Satoshi Tazoe, Ryojiro Tanaka, Tomohiko Yamamura, Shogo Minamikawa, Tomoko Horinouchi, Keita Nakanishi, Junya Fujimura, et al. "Detection of copy number variations by pair analysis using next-generation sequencing data in inherited kidney diseases" Clin Exp Nephrol. 2018 Jan 25.
DOI: 10.1007/s10157-018-1534-x.

Tomohiko Yamamura, Kandai Nozu, Xue Jun Fu, Yoshimi Nozu, Ming Juan Ye, Akemi Shono, Satoko Yamanouchi, Shogo Minamikawa, Naoya Morisada, Koichi Nakanishi, Yuko Shima, Norishige Yoshikawa, Takeshi Ninchoji, Ichiro Morioka, Hiroshi Kaito, Kazumoto Iijima "Natural History and Genotype-Phenotype Correlation in Female X-Linked Alport Syndrome."

Kidney Int Rep. 2017 May
4;2(5):850-855.
DOI: 10.1016/j.ekir.2017.04.011.

Kana Yokota, Kandai Nozu, Shogo Minamikawa, Tomohiko Yamamura, Keita Nakanishi, Hisashi Kaneda, Riku Hamada, Yoshimi Nozu, Akemi Shono, Takeshi Ninchoji, Naoya Morisada, Shingo Ishimori, Junya Fujimura, Tomoko Horinouchi, Hiroshi Kaito, Koichi Nakanishi, Ichiro Morioka, Mariko Taniguchi-Ikeda, Kazumoto Iijima “Female X-linked Alport syndrome with somatic mosaicism” Clin Exp Nephrol. 2017 Oct;21(5):877-883.
DOI: 10.1007/s10157-016-1352-y.

〔学会発表〕(計4件)

山村智彦、次世代シーケンサーを用いた Alport 症候群の網羅的診断法の確立、第 121 回日本小児科学会学術集会、2018.4.20、福岡国際会議場(福岡県)

山村智彦、Establishment of a comprehensive diagnostic method using next generation sequencer for Alport syndrome、13th Asian Congress of Pediatric Nephrology、2017.10.7、クアラルンプール(マレーシア)

山村智彦、Establishment of a comprehensive diagnostic method using next generation sequencer for Alport syndrome、第 52 回日本小児腎臓病学会学術集会、2017.6.2、京王プラザホテル(東京都)

山村智彦、次世代シーケンサーを用いた Alport 症候群の網羅的診断法の確立、第 60 回日本腎臓学会学術集会、2017.5.26、仙台国際会議場(宮城県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 智彦 (YAMAMURA Tomohiko)
神戸大学大学院医学部附属病院 助教
研究者番号: 30770242

(2) 研究協力者

飯島 一誠 (IIJIMA Kazumoto)
神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児
化学分野 教授
研究者番号: 00240854

野津 寛大 (NOZU Kandai)
神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児
化学分野 准教授
研究者番号: 70362796

南川 将吾 (MINAMIKAWA Shogo)
神戸大学医学部附属病院 特定助教
研究者番号: 10772634