研究成果報告書 科学研究費助成事業

今和 元 年 5 月 3 1 日現在

機関番号: 14501 研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2017~2018

課題番号: 17K16086

研究課題名(和文)次世代シークエンサーを用いたADPKDのTwo-hit theoryの検証。

研究課題名(英文)Verification of ADPKD's Two-hit theory using next-generation sequencer

研究代表者

藤村 順也 (Fujimura, Junya)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号:10793713

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):常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の病態の解明を目的として、患者の血液検体および摘出腎などを用いて、two-hit theoryの検討および解明を行い、最終的にはその知見から新たな治療法の可能性を探る目的で研究を行った。同意が得られた症例のNGSでの解析およびSanger法での直接での確認を行った。スクリーニングの検索効率向上

のために、疾患パネルの作成を試みている。 患者血液由来のDNAと同時に患者から摘出した腎臓の嚢胞上皮細胞から抽出したDNAについても検査を行う予定で あり、摘出腎臓からの組織片を用いた培養細胞の確立の手技を過去の文献を参考に確立し、手技の統一化を行っ

研究成果の学術的意義や社会的意義 常染色体優性多嚢胞腎(ADPKD)は最も発症頻度の高い遺伝性腎疾患で60歳までに約半数が末期腎不全に至る。 その発症仮説として先天性のPKD遺伝子異常に加え、生後の対立遺伝子への変異挿入やその他の刺激により発症する"Two-hit theory"が有力と考えられている。Two-hit theoryにおけるSecond hitの本体を解明することを目的として解析をおこなった。現在2つの変異が数例の血液検体から見つかっている。この病態理論の解明をすることで新たな治療の知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文):We investigated and elucidated two-hit theory using blood samples and isolated kidneys of patients for the purpose of elucidation of the pathophysiology of autosomal dominant poly cystic kidney disease (ADPKD), and finally from the findings The research was conducted in order to find out the possibility of new treatment. Analysis with NGS of the case where consent was obtained and direct confirmation with Sanger method were performed. In order to improve the search efficiency of screening, we are trying to create a disease panel specialized for PKD1 and PKD2 genes.

We did examining DNA extracted from patient's blood-derived DNA as well as DNA extracted from cystic epithelial cells of the kidney, which were isolated from the patient, and refer to the past literature for techniques for establishing cultured cells using tissue fragments from the isolated kidney established and standardized the procedure.

研究分野: 腎臓

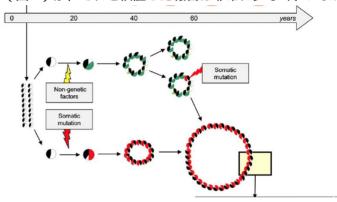
キーワード: ADPKD 次世代シークエンサー two-hit theory

1.研究開始当初の背景

(1)常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は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最も頻度の高い遺伝性腎疾患である。1994年の本邦の調査でも 15000 人の患者が病院を受診していると推定された。また、60 歳代までに、約半数が末期腎不全に至り、透析患者の 3%程度、約 1000 人の患者が ADPKD に伴う末期腎不全のため透析医療を受けている。

(2)病因遺伝子としては、1.polycystin-1遺伝子(PKD1)異常: 85%および、2.polycystin-2遺伝子(PKD2)異常: 15%であることがすでに明らかとされている。発症に際しては、親から由来の PKD1 もしくは PKD2 遺伝子のヘテロ接合体変異に加え、生後にその対立遺伝子に変異(somatic mutation) もしくは何らかの強烈な刺激が加わることにより発症するとされる Two-hit theory が唱えられている(図1)が、それを検証した報告は非常に少なく、いまだ

その本体は解明されていない。 (3) 尿細管上皮細胞においては、 polycystin-1 が尿流の情報を polycystin-2 に 伝 達 し、 polycystin-2 が Ca2+の細胞内へ の取り込みを調整している。 PKD 細胞では、この細胞内への Ca2+の取り込み機能が喪失する ため、細胞内 Ca 濃度が低下する 結果、cyclic-AMP により活性化 される Protein Kinase A が細胞 増殖の刺激伝達系を刺激し、同時 に apical 側にある CFTR を刺激



して、嚢胞形成および嚢胞内への液体貯留を促すとされている。しかし、その発症は成人期以降で小児期には嚢胞はほとんど観察されない。そのため、何らかの二次的要因(Second-hit)により突如細胞増殖能を獲得し、嚢胞形成が急激に進行するとされている。

今日、次世代シークエンサー(NGS)の登場により遺伝子の網羅的検索が容易になっている。 私達の研究室でも、次世代シークエンサーを用いた遺伝性腎疾患の網羅的解析を行い、Alport 症候群、ネフロン癆、尿細管疾患などに関し、新しい知見を報告してきた。さらに ultra-deep sequence を用いた手法により、頻度の低い体細胞モザイクの検出にも成功している (Fu et al, Eur J Hum Genet. 2016)。

2.研究の目的

(1)ADPKD 患者で腎臓摘出術を行った患者の検体を用いて、嚢胞上皮細胞の DNA を抽出し、 NGS を用いた ultra-deep sequence による解析を行い、対立アレルへの変異挿入 による Second-hit の有無を確認する。

(2)同検体から totalRNA を抽出し、RNA-seq により miRNA の発現量を網羅的に解析する。 (3)同じく尿細管上皮において PKD 関連遺伝子、細胞増殖に関与する mRNA および上記検討 で病態に関与する可能性のある miRNA の下流に存在する mRNA の発現量を網羅的に解析す

(4)ADPKD 嚢胞上皮培養細胞を用いて、RNAi や miRNA の inhibitor による治療を行い、細胞増殖能の抑制の有無に関して検討を行う。

(5)上記(1)~(4)を行うことで、ADPKD における尿細管上皮細胞が細胞増殖能を獲得するための Two-hit theory の本体が、対立アレルへの遺伝子変異の挿入なのか、二次的要因に伴う PKD 遺伝子の mRNA の発現量の低下によるものかを明らかとする。さらに、細胞増殖の獲得の分子生物学的メカニズムの解明およびその治療の可能性を検討する。

3.研究の方法

(1)ADPKD 患者の摘出腎臓検体を用いて、嚢胞上皮細胞の DNA をそれぞれ抽出し、NGS を用いた ultra-deep sequence による解析を行い、対立アレルへの変異挿入による Second-hit の有無を確認する。

ADPKD 患者で移植術の際に摘出した腫大した腎臓の提供を受けて複数の嚢胞病変部の組織から DNA を抽出し、NGS を用いた配列のエラーの影響を最小限にするために ultra-deep sequenc による解析を行い、対立アレルの変異挿入を確認する。

(2)同検体から totalRNA を抽出し、主に RNA-seq により microRNA の発現量を網羅的に解析する。腎嚢胞部病変の組織から total RNA を抽出し、RNA-seq により miRNA の発現量を網羅的に解析する。RNA-seq では、マイクロアレイ解析と同様の解析が行える上に、配列決定装置でありながら、配列の数の計測も行え、また、解析対象の範囲に限界がないことが利点として挙げられ網羅的解析においては非常に有用である。

(3)尿細管上皮において PKD 関連遺伝子、細胞増殖に関与する mRNA および上記検討で病態 に関与する可能性のある miRNA の下流に存在する mRNA の発現量を網羅的に解析する。 ADPKD 患者の尿中落下細胞を培養して嚢胞上皮細胞の細胞株を作成し、それにおいて PKD 関連遺伝子、細胞増殖に関与する mRNA、上記検討で病態に関与する可能性のある miRNA の下流に存在する mRNA の発現量を RNA-seq を用いて網羅的に解析を行う。それにより mRNA 発現レベルと細胞増殖能との相関を検討する。

4.研究成果

(1)当初の1年間では同意が得られ、血液および摘出腎の検体を収集できた ADPKD 患者は他施設からの協力例も含めて6例であった。これらの ADPKD 患者6例について、第一に血液検体を用いて、NGS での解析を行い、two-hit theory の前提となる1つ目の遺伝子異常の検索を行った。すでに3例で1つ目の遺伝子異常を同定している。そこで、2つ目の遺伝子変異をNGSで再度、

検索するために、PKD1 遺伝子、PKD2 遺伝子に特化した疾患パネルを作成し、それを用いて NSG で検索を行う予定である。しかし、pseudo gene などの問題もあり、NGS ではスクリーニングとしての解析困難な部分が多々見つかった。NGS で read できていないエクソンが複数個発見されたのである。(右図参照)それらの部位については直接、sanger法で確認を行って解析を行ったところ、さらに 2例で遺伝子変異を見つけることができた。NGS でのスクリーニングでの感度を上げるために、疾患パネルの作成について検討および協議を行っているが、現時点ではまだ完成には至っていない。



(2)また、患者血液由来の DNA と同時に腎臓摘出術や移植術を施行した患者から摘出した腎臓の嚢胞上皮細胞から抽出した DNA についても検索を行う予定である。これにより腎臓の嚢胞上皮細胞で生じているであろう second-hit の有無の検討を行っていくことが可能となる。そのために嚢胞上皮細胞から組織片を用いて、嚢胞上皮細胞の培養を行う手技を過去の文献をもとに確立し、その手技・手法についても統一化を図った。これにより腎由来細胞での mRNA 解析なども行うことが可能になったと考える。

(3)しかし、当初の想定よりもNGSでの検索頻度が低かったことなどが影響し、研究の成果としてのtwo-hit theoryの検証は実現できなかった。しかし、検証に向けての土台作りとしての疾患パネルの作成などは非常に意義があると考える。このパネル作成ができれば時間・労力ともに大きく改善し、進展が見込めると考える。また血液由来での遺伝子変異と嚢胞上皮細胞での遺伝子変異との検討を行うことがtwo-hit theoryの解明に向けて大きく役立つことが想定される。そのためにも数少ない摘出腎から嚢胞上皮細胞の培養・樹立ができれば研究としての安定化を図ることができる。簡便かつ確実な培養方法の樹立が望まれるが、組織片を用いた培養細胞の分離も今回の解析の中で可能なことがわかった。検体数をある程度確保し、なおかつ疾患パネルができた段階で次世代シークエンサーなどを用いて解析を行うことを予定していた。摘出腎臓自体は想定よりも多くの検体が集まっている。今後も摘出腎からの細胞分離を行い、来るべき解析に備えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

[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: 種号: 番号: 番願外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者: 権利者: 種類: 番号: 取得年: 国内外の別:

〔その他〕 ホームページ等

6.研究組織

(1)研究分担者 研究分担者氏名: ローマ字氏名: 所属研究機関名: 部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:飯島一誠

ローマ字氏名: lijima Kadumoto

研究協力者氏名:野津寛大 ローマ字氏名:Nozu Kandai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。