

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18622

研究課題名(和文) 遺伝性腎疾患における遺伝子変異と病態の解析

研究課題名(英文) Analysis of genetic mutations and pathophysiology in hereditary kidney disease

研究代表者

河野 春奈 (Kawano, Haruna)

順天堂大学・医学部・特任准教授

研究者番号：90445528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性疾患である常染色体優性多嚢性嚢胞腎(ADPKD)と結節性硬化症(TSC)について、遺伝子解析を450例に対して行った。臨床診断でADPKDと診断されていたが、原因遺伝子が異なる症例が複数みとめられた。またPKD変異の症例において、PKD2変異が全体の26.7%を占め、約15%とするこれまでの報告に比べ割合が高かった。PKD1,2のExon欠失は4.7%にのぼった。TSC、ADPKDの隣接遺伝子症候群は4家系6例にみとめられ、全てがTSC症状が優位であり、従来の腎機能低下が著しいという報告とは異なる結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、日本人のADPKD、TSCを対象とした遺伝子解析の研究として最も大規模なものである。ADPKDにおいては、典型的な経過をたどらない症例の中に、異なる遺伝子変異を持つ症例があることや、従来指摘されていた遺伝子変異型の割合が異なる可能性が示唆された。このことはADPKDの臨床において非常に重要で、遺伝子検査の必要性を強く後押しする結果となった。またTSCにおいては、特にPKDとの隣接遺伝子症候群において、これまでの報告と異なりTSC症状が優位であった。このことから、TSCの腎嚢胞が多い症例の中に、隣接遺伝子症候群を見落とされているケースがあると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genetic analysis was performed on 450 cases of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) and nodular sclerosis (TSC), which are hereditary diseases. Though it was diagnosed as ADPKD in the clinical diagnosis, several cases with different causative genes were recognized. In addition, in the case of the PKD mutation, the PKD2 mutation occupied 26.7% of the total, and the ratio was higher than the previous report of about 15%. The Exon deletion of PKD1,2 amounted to 4.7%. The adjacent gene syndrome of TSC and ADPKD was observed in 6 cases of 4 families, and all of them had the upper hand in TSC symptoms, and the result was different from the report that the renal dysfunction was remarkable.

研究分野：遺伝性腎疾患

キーワード：ADPKD TSC 遺伝子解析 パネル遺伝子検査 隣接遺伝子症候群 遺伝性腎疾患

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、国の指定する難病で、最も頻度の高い遺伝性腎疾患であり、本邦では約 30,000 人の患者数が推定されている。年齢と共に腎嚢胞が増加、増大することで腎機能が徐々に低下をきたし、60 代で半数の患者が末期腎不全に至る。ADPKD の原因遺伝子として、*PKD1* 遺伝子(16p13.3)と *PKD2* 遺伝子(4q21)が同定されており、85%は *PKD1* 遺伝子異常と考えられ、*PKD1* 遺伝子変異群の方が *PKD2* 遺伝子変異群よりも腎機能低下速度が速く、予後不良であることが知られている。*PKD1* 遺伝子は、ゲノムのサイズ(47.2kb)が大きく、またエクソン数(46 エクソン)に加えて、90%以上の相同性を持つ偽遺伝子が近傍に6つ存在することから、*PKD1* 遺伝子の変異診は困難であったが、近年開発された次世代シーケンス(Next-generation sequencing: NGS)により、遺伝子変異診断の精度が向上し、*PKD1* 遺伝子変異のうち、truncating 型の方が、non-truncating 型より腎不全の進行が速いことが明らかにされた。

このように ADPKD において遺伝子変異型は病状進行のリスク予測因子として重要であるが、本邦において実臨床はおろか、研究として遺伝子検査がわずかに行われているのみであり、日本人における遺伝子型とその病態は明らかでない。

そこで我々は先行研究として、日本人 ADPKD 患者において、嚢胞腎関連の 110 遺伝子について WGS を行い、複数の遺伝子に *PKD1*, *PKD2* 以外に変異があり、これらの患者は重症度が高いことを見出した。しかしながら、その臨床像と遺伝子変異の関連についてはより大規模な解析が必要との結論に至った。

臨床像と遺伝子変異型について、治療薬に対する効果予測因子としての期待がある。PKD の唯一の治療薬であるバゾプレシン V2 受容体拮抗薬トルバプタンは、嚢胞上皮細胞内の cAMP を減少させ、嚢胞腎の増大と進行性腎障害を抑制する効果があり、指定難病として治療費は補助されている。しかしトルバプタンの適切な治療開始時期、および治療効果を予測する因子はいまだ明らかではなく、医療経済学的な見地からも、遺伝子変異による解析が待たれていた。

結節性硬化症(Tuberous sclerosis: TSC)は、ADPKD と同じく国の指定難病で、様々な臓器に過誤腫を生じる全身性の疾患である。中でも腎臓に生じる腎血管筋脂肪腫(Angiomyolipoma:AML)は、TSC 患者の 60-80%に生じ、TSC において生命予後を左右する合併症である。TSC の原因遺伝子として *TSC1* 遺伝子(9q34)、*TSC2* 遺伝子(16p13.3)が同定されており、後者の方が病状は重い。さらに、*TSC2* 遺伝子と *PKD1* 遺伝子は隣接しており、両方の遺伝子に異常が起きると、隣接遺伝子症候群を発症することが知られている。TSC 患者の症状は患者により違いが大きく、てんかん、知的障害などを生じる重症患者や、他の合併症は軽症だが治療適応のある AML を有する患者などが存在する。TSC の診断基準に遺伝子診断が含まれるが、本邦において遺伝子検査は普及しておらず、通常は臨床所見診断基準のみで確定診断を行っている。また、現状のサンガー法による遺伝子解析検査や、マルチジーンパネル検査では診断がつかないケースも多く、NGS による日本人 TSC 患者の解析が待たれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、日本人 ADPKD、TSC 患者の遺伝子変異の実態を明らかにし、遺伝子変異による薬剤の治療効果等の病態の違いを解析し、さらに新規遺伝子異常を発見することである。

また以下に示す我々の遺伝子パネル診断法により、従来多くの手間と時間がかかっていた PKD、TSC 遺伝子解析の精度と速度を上げ、さらに省コストでより多くの症例の解析を可能にする。

現在、ADPKD におけるトルバプタン治療は、両腎容積 750ml 以上、年間腎容積増大率 5%以上の、腎機能低下が予想される症例に適応がある。しかし対象となる患者の幅は広く、どのような患者がトルバプタンによる治療を受けるべきか確立されていないため、主治医の判断や、患者本人の希望により治療が行われている。トルバプタン治療患者に対して遺伝子解析を行い、その臨床データと照らし合わせることで、どのような遺伝子変異に、薬物療法がより効果があるを検討する。治療メリットの高い患者のみならず、治療効果が薄い患者が判定できれば、過剰な医療への抑止となり、医療経済的にも大きなメリットとなる。

さらに TSC においては、臨床的診断基準のみでは確定診断できないケースが存在し、遺伝子診断を必要とするが、本邦においては遺伝子検査が確立されておらず、研究レベルで施行されているのが現状である。臨床的診断基準を満たさないが、治療を要する AML を抱える患者が存在し、薬物治療であるエベロリムスは TSC に合併する AML のみに適応があるため、TSC の確定診断がないために使用できない。より正確で簡便な遺伝子検査を確立し、これらの患者の治療につなげる。

3. 研究の方法

臨床的に ADPKD と診断された患者に対し同意の上、末梢血より患者由来の genomic DNA を抽出しロングレンジ PCR を行い、解析領域のエンリッチメントを行う。生殖細胞系列変異のパネル遺伝子検査（対象遺伝子：*PKD 1*, *PKD 2*, *PKHD1*, *TSC1*, *TSC2*, *PRKCSH*, *SEC63*, *LRP5*, *VHL*, *HNF1B*, *MUC1*, *UMOD*, *OFD1*, *GANAB*）を用いて NGS により解析を行い、ターゲットリシーケンスでカバーできない *PKD1* 遺伝子の Exon1 領域について、遺伝子特異的 Long PCR を行い、これを鋳型としたダイレクトシーケンスを行なう。この際、様々なデータベースの情報を用いることで、病原変異の抽出を簡便にする。データベースは、日本人の健常者を集めて新たに構築された、日本人における遺伝子多型データや、メイヨークリニックの ADPKD 変異データベース PKDB (<http://pkdb.mayo.edu>)、米国生物学情報センターの多型データベース dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)、ロンドン大学の TSC 変異データベース Tuberous sclerosis database

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/submitters/500075/>) 等を参照する。

得られた遺伝子変異結果を患者の臨床情報と照らし合わせ、統計学的解析を行う。

本研究は、順天堂大学医学部倫理委員会の承諾を得て行った（第 2019107 号）。

4. 研究成果

本研究は、日本人の ADPKD, TSC を対象とした遺伝子解析の研究として最も大規模なものである。

ADPKD 患者全 339 例について解析を行った。291 例 (85.8%) が、パネル検査のみで診断確定に至った。また同一家系内では、遺伝子変異型は一致していた。

男性 134 例女性 157 例、平均年齢 47 歳 (4 ~ 76 歳) 家族歴はあり 241 例、なし 23 例、不明 27 例。平均 htTKV877.7ml (141.2 ~ 5584.3ml) 平均 eGFR/年-3.694 mL/min/1.73m² (-15.6 ~ 6.6 mL/min/1.73m²)。Mayo 分類はそれぞれ A12, B93, C105, D57, E13 例で、ADPKD に対する治療はトルバプタン治療 142 例、治験 12 例であった。

遺伝子変異型の結果は *PKD1* Truncated mutation 142 例 (48.8%), *PKD1* Non-truncated mutation 76 例 (26.1%), *PKD2* Truncated mutation 60 例 (19.6%), *PKD2* Non-truncated mutation 10 例 (3.4%), *PKD1/2* 以外の遺伝子変異が 3 例だった (SEC63_Non-Truncated, GANAB non-truncated, OFD1-truncated)

PKD1 変異は *PKD2* 変異に比べ eGFR/年は優位に低く、進行が速いことが示された (-3.86, -1.92 mL/min/1.73m²/年, P<0.005) (図 1)。さらに腎容積 750ml 以下の患者群において *PKD1*truncated 変異は non-truncated 変異より eGFR/年は優位に低く、進行が速いことが示された (-4.36, -1.84 mL/min/1.73m², p<0.05)。一方、トルバプタン投与前後の eGFR の差は遺伝子型による有意差は認めず (2.205, 2.665 mL/min/1.73m²/年, P=0.783)、治療効果に差がないことが示唆された (図 2)。

図 1

ΔeGFR/年と遺伝子変異型

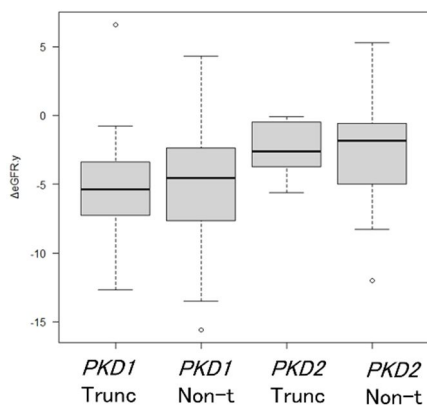
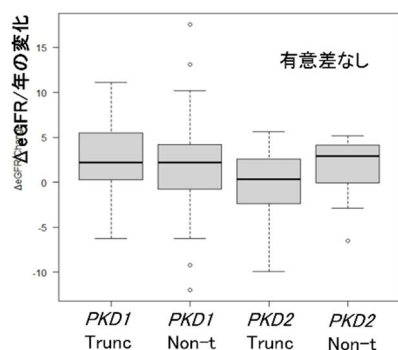


図 2

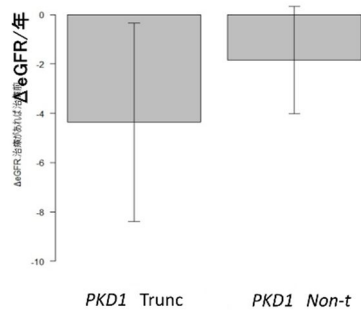
トルバプタン前後 ΔeGFR/年
遺伝子変異型別



さらに、腎容積 750ml 以下の患者は *PKD1* truncated 変異で優位に腎機能低下の速度が速いことが示された (図 3)。トルバプタンはより早期に開始することで恩恵があることが知られており、遺伝子パネルを用いた遺伝子検査から、より支援が必要な患者を見出すことができる。現在本邦での難病受給者資格やトルバプタンの適応条件には、腎容積が 750ml 以上であることが必須条件になっているが、遺伝子検査の結果を踏まえた内容へ変更することが望まれる。

図 3

両腎容積750ml以下の*PKD1*変異型における検討



結節性硬化症については、PKD/TSC 隣接遺伝子症候群の 4 家系 6 症例を遺伝子検査にて診断し得た。これまでに報告されている隣接遺伝子は、ADPKD の症状が優位であり、腎機能低下が主症状であるとされてきたが、我々の症例はすべて TSC 優位であった。このことから、結節性硬化症のみとして診療されている患者の中に、PKD を合併している率が一定数あることが予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Higashihara Eiji, Horie Shigeo, Muto Satoru, Kawano Haruna, Tambo Mitsuhiro, Yamaguchi Tsuyoshi, Taguchi Satoru, Kaname Shinya, Yokoyama Kenich, Yoshioka Tatsuya, Furukawa Toshihito, Fukuhara Hiroshi	4. 巻 51
2. 論文標題 Imaging Identification of Rapidly Progressing Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Simple Eligibility Criterion for Tolvaptan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 881 ~ 890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000511797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horie Shigeo, Muto Satoru, Kawano Haruna, Okada Tadashi, Shibasaki Yoshiyuki, Nakajima Koji, Ibuki Tatsuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Preservation of kidney function irrelevant of total kidney volume growth rate with tolvaptan treatment in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 467 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-020-02009-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野春奈、武藤智、堀江重郎
2. 発表標題 ADPKDにおけるトルバプタン治療の長期成績
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野春奈、武藤智、堀江重郎
2. 発表標題 ADPKDにおける性ホルモンの影響
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 河野春奈、武藤智、堀江重郎
2. 発表標題 当院におけるPKD/TSC隣接遺伝子症候群の経験
3. 学会等名 第49回日本腎臓学会東部学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 河野春奈、武藤智、堀江重郎
2. 発表標題 同一家系内ADPKD患者における遺伝子変異型の検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 河野春奈、武藤智、堀江重郎
2. 発表標題 Predict renal prognosis by gene mutations of ADPKD patients in the same family
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 河野春奈、堀江重郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 534
3. 書名 生体の科学 第71巻5号 増大号 難病研究の進歩	

1. 著者名 河野春奈、他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学評論社	5. 総ページ数 588
3. 書名 腎臓内科・泌尿器科10巻6号 腎泌尿器疾患のゲノム医療の進歩	

1. 著者名 河野春奈、他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 化学評論社	5. 総ページ数 526
3. 書名 腎臓内科・泌尿器科9巻5号 特集 腎泌尿器の遺伝性疾患・難病医療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>順天堂大学泌尿器科ホームページ https://juntendo-urology.jp/</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関