

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22926

研究課題名(和文)成人の慢性腎臓病患者に潜在するネフロン癆の実態解明

研究課題名(英文)Clarification of genetic background of adult patients with chronic kidney disease

研究代表者

藤丸 拓也(Fujimaru, Takuya)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40880547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、成人末期腎不全患者の遺伝学的背景を明らかにするために、複数の透析病院と共同研究を立ち上げ、100名以上の説明同意を得て血液検体の採取を行った。その後、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析の準備を進めた。また、腎臓の組織学的検査により、小児期に末期腎不全に至るとされるネフロン癆が疑われた成人患者の血液検体を日本全国から集めて網羅的遺伝子解析を行い、ネフロン癆の遺伝子変異を認める成人患者の臨床および病理学的特徴を明らかにした。この研究結果は国際腎臓学会が発行している国際科学誌であるKidney International Reportsに発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、本邦でも成人慢性腎臓病患者の中に小児期に末期腎不全に至ると考えられていたネフロン癆患者が潜在していることが明らかとなった。さらに、遺伝学的にネフロン癆と診断された症例は、腎生検時の年齢が若い傾向があることを明らかにした。また、ネフロン癆の遺伝子変異を認める患者には、組織学的に尿細管の基底膜に厚い二重化が認められることを明らかにした。これらの結果は、本邦において、成人でも原因不明の腎機能障害患者に対してネフロン癆を疑う重要性を明らかにすると同時に、その臨床像は成人におけるネフロン癆の診断の一助となるものであり、今後の慢性腎臓病診療に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, to clarify the genetic background of patients with end-stage kidney disease (ESKD), we set up a joint study with multiple dialysis hospitals and collected blood samples with the consent of more than 100 people with ESKD. We proceeded with preparations for comprehensive genetic analysis using the next-generation sequencing. Additionally, by histological examination of the kidney, blood samples were collected from all over the country of adult patients suspected of having nephronophthisis, which is thought to lead to ESKD in children, and comprehensive genetic analysis was performed. The results revealed the clinical and pathological characteristics of adult patients genetically diagnosed nephronophthisis. The results of this study were published in Kidney International Reports, an international scientific journal published by the International Society of Nephrology.

研究分野：腎臓病学

キーワード：末期腎不全 ネフロン癆 次世代シーケンサー 遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において、末期腎不全により慢性透析療法を受けている患者総数は 33 万人であり、多額の医療費を必要としている。これまで成人末期腎不全患者においては、糖尿病や高血圧、慢性糸球体腎炎など後天的因子によって発症する腎不全が中心とされてきた。しかし、近年の遺伝子解析技術の進歩により成人の慢性腎臓病患者においても、小児期に末期腎不全に至ると考えられていた遺伝性腎疾患が含まれていることが分かってきた。成人期に腎不全となった患者 5606 人を対象としたオランダの研究では、小児期に末期腎不全になるとされるネフロン癆の原因遺伝子である *NPHP1* の完全欠損を有する成人患者がいることが明らかとなった (J Am Soc Nephrol. 2018)。さらに興味深いことに、これらの患者において臨床的にネフロン癆と診断されていた患者はわずか 10%であり、残りの患者は別の誤った腎疾患と診断されていた。ネフロン癆は現在、20 個以上の原因遺伝子が同定されており、*NPHP1* の完全欠損以外の遺伝子変異を有している成人の慢性腎臓病患者も数多く存在することが予想され、正確な疫学の把握やその特異的治療法の開発が急務である。しかしながら、日本における成人患者の遺伝学的背景については全く知見がない。

また臨床的観点から見ると、成人においてネフロン癆の診断が困難な原因として、ネフロン癆を示唆する真の腎生検所見の欠如が挙げられる。小児ネフロン癆は特徴的な腎外合併症があるが、成人症例では認めないため腎生検にて初めて疑われることが多い。しかし、ネフロン癆の病理所見である尿細管拡張や間質の線維化は非遺伝性腎疾患でも認められるため、現在の知見では腎生検組織だけでその鑑別は難しい。確定診断のためには遺伝子解析が必要となるが、全例に行うことも現時点では容易でなく、成人におけるネフロン癆の臨床・病理学的特徴を明確にすることが求められている。

## 2. 研究の目的

本研究は次世代シーケンサー (NGS) による網羅的遺伝子解析手法を用いて、本邦の成人の末期腎不全患者において、ネフロン癆を含めた遺伝性腎疾患が占める割合を明確にすることを目的としている。さらに、腎生検にてネフロン癆が疑われた成人患者を対象に、遺伝学的にネフロン癆と診断された患者にどのような臨床・病理学的特徴があるのかを明らかにすることを目的としている。さらに *NPHP1* 完全欠損した iPS 細胞とマウス樹立から病態生理も明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 成人の末期腎不全患者における遺伝性腎疾患の割合を明らかにする

ネフロン癆の原因遺伝子は現在 25 種類報告されているため、従来のサンガー法でのシーケンスは不可能であり、NGS を用いたネフロン癆関連遺伝子の網羅的遺伝子解析が必須である。我々は RNA プローブ法を用いた、ネフロン癆関連疾患・嚢胞性腎疾患の NGS パネルの実用化と運用を行い、臨床研究を進めてきた (Fujimaru T, et al. Clin Genet. 2018, Sekine A, Fujimaru T, et al. Am J Nephrol. 2019)。この技術を用いて、維持血液透析を受けている成人末期腎不全患者から血液検体を採取し、遺伝学的背景を明らかにする。また、ネフロン癆の 1/4 を占めると考えられる *NPHP1* 欠損の簡易 PCR スクリーニング法も開発する。

### 2) 遺伝学的にネフロン癆と診断された成人患者の臨床・病理学的特徴を明らかにする

臨床・病理学的にネフロン癆が疑われた症例を日本全国から集め、遺伝子解析を実施する。さらに、それらの症例の臨床所見だけでなく、病理所見について病理専門医とともに評価を進め、遺伝学的にネフロン癆と診断された成人症例に特徴的な臨床・病理学的所見を明らかにする。

### 3) *NPHP1* 完全欠損 iPS 細胞樹立とマウスモデル作成によるネフロン癆病態解明

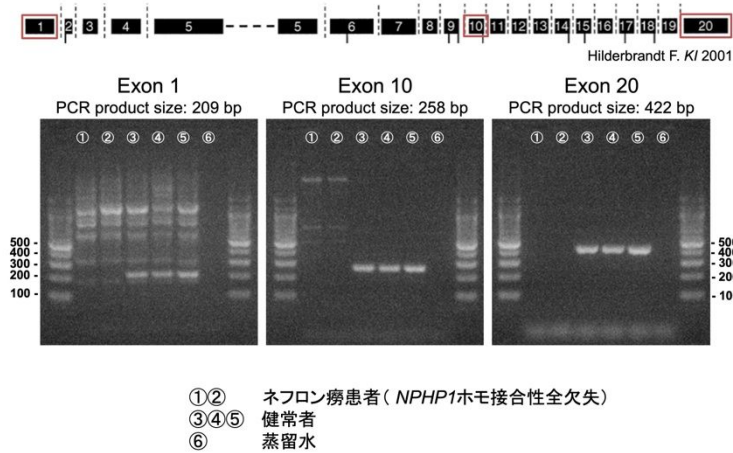
ネフロン癆の遺伝子異常として最多である *NPHP1* 変異の良好なマウスモデルや腎臓オルガノイドの報告は未だない。*NPHP1* の完全欠損患者にアクセスできる優位性を生かし、ネフロン癆患者からの iPS 細胞と腎臓オルガノイドと *NPHP1* 遺伝子改変マウスを作成する。これらを駆使して、ネフロン癆の新規病態解明やネフロン癆と診断された成人症例の遺伝子解析から得られた所見の病態生理的意義、さらには新規治療法開発につなげる。

## 4. 研究成果

### 1) 成人の末期腎不全患者における遺伝性腎疾患の割合を明らかにする

複数の透析病院と共同研究を立ち上げた。1000 人以上の外来維持血液透析患者の診療録を元に、20 歳～49 歳の間で血液透析が導入され、原疾患が明らかでない 100 人以上の患者を抽出し、説明同意を得て、遺伝子解析用の血液検体の採取を行った。ネフロン癆の 4 分の 1 を占めると考えられる *NPHP1* 欠損の簡易 PCR スクリーニング法を開発 (図 1) しスクリーニング検査を実施。その後、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析の準備を進めた。今後、研究を進め、成

図1. NPHP1欠損の簡易PCRスクリーニング法



人の末期腎不全患者における遺伝性腎疾患の割合やその原因遺伝子を明らかにしたい。

2) 遺伝学的にネフロン癆と診断された成人患者の臨床・病理学的特徴を明らかにする

臨床・病理学的にネフロン癆が疑われた症例を日本全国から集め、30例の遺伝子解析を実施し、12例(40%)が遺伝学的にネフロン癆であることを示した。さらに全国の様々な施設の協力のもと、研究参加に同意が得られた18名の患者を対象に遺伝型と臨床および病理学的所見の関連を調べた。その結果、遺伝学的にネフロン癆と確認・診断された症例は、腎生検時の年齢が若い傾向があることを明らかにした。また、ネフロン癆の遺伝子変異を認める患者には、組織学的に尿細管の基底膜に厚い二重化が認められることを明らかにした(図2、3)。これらの研究結果は国際腎臓学会が発行している国際科学誌であるKidney International Reportsに発表された。これらの結果は、本邦において、成人でも原因不明の腎機能障害患者に対してネフロン癆を疑う重要性を明らかにすると同時に、その臨床像は成人におけるネフロン癆の診断の一助となるものであり、今後の慢性腎臓病診療に繋がることを期待される。



図2. 遺伝学的にネフロン癆と診断された成人患者の臨床・病理学的特徴

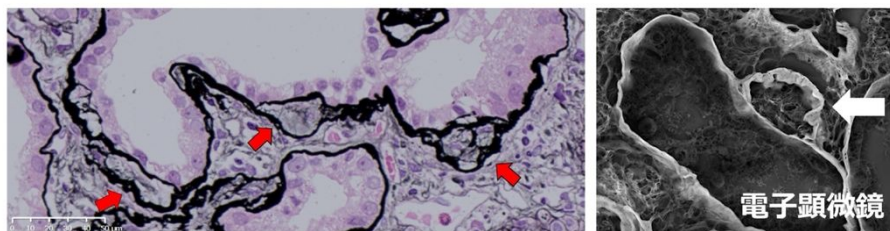


図3. 成人ネフロン癆患者に特徴的な尿細管基底膜の厚い二重化

3) NPHP1完全欠損 iPS細胞樹立とマウスモデル作成によるネフロン癆病態解明

遺伝子改変マウスとiPS細胞のネフロン癆モデル作成に成功した。今後、ネフロン癆の新規病態解明やネフロン癆と診断された成人症例の遺伝子解析から得られた所見の病態生理的意義を探索したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujimaru Takuya, Kawanishi Kunio, Mori Takayasu, et al.	4. 巻 6
2. 論文標題 Genetic Background and Clinicopathologic Features of Adult-onset Nephronophthisis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2021.02.005	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 Morimoto Nobuhisa, Nagahama Kiyotaka, Mori Takayasu, Fujimaru Takuya, Tsuura Yukio, Terai Ayumi, Tanabe Madoka, Otani Megumi, Shioji Shingo, Hirasawa Suguru, Aki Shota, Aoyagi Makoto, Sohara Eisei, Uchida Shinichi, Tanaka Hiroyuki	4. 巻 145
2. 論文標題 novel LMX1B variant identified in a patient presenting with severe renal involvement and thin glomerular basement membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nephron	6. 最初と最後の頁 776 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000518423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Ryohei, Sekine Akinari, Fujimaru Takuya, Suwabe Tatsuya, Mizuno Hiroki, Hasegawa Eiko, Yamanouchi Masayuki, Chiga Motoko, Mori Takayasu, Sohara Eisei, Uchida Shinichi, Sawa Naoki, Ubara Yoshifumi, Hoshino Junichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Echocardiographic Findings and Genotypes in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Kidney Diseases	6. 最初と最後の頁 246 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520300	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 Fujimaru Takuya, Sohara Eisei	4. 巻 5
2. 論文標題 Copy Number Variation: A New Genetic Form of Polycystic Kidney and Liver Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 575 ~ 576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2020.03.007	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 Mori Takayasu, Chiga Motoko, Fujimaru Takuya, Kawamoto Ryosuke, Mandai Shintaro, Nanamatsu Azuma, Nomura Naohiro, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Sohara Eisei, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi	4. 巻 42
2. 論文標題 Phenotypic differences of mutation negative cases in Gitelman syndrome clinically diagnosed in adulthood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 300 ~ 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.24159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sekine Akinari, Hoshino Junichi, Fujimaru Takuya, Suwabe Tatsuya, Mizuno Hiroki, Kawada Masahiro, Hiramatsu Rikako, Hasegawa Eiko, Yamanouchi Masayuki, Hayami Noriko, Mandai Shintaro, Chiga Motoko, Kikuchi Hiroaki, Ando Fumiaki, Mori Takayasu, Sohara Eisei, Uchida Shinichi, Sawa Naoki, Takaichi Kenmei, Ubara Yoshifumi	4. 巻 51
2. 論文標題 Genetics May Predict Effectiveness of Tolvaptan in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 745 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000509817	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 Takahashi Naohiro, Kikuchi Hiroaki, Usui Ayaka, Furusho Taisuke, Fujimaru Takuya, Fujiki Tamami, Yanagi Tomoki, Matsuura Yoshiaki, Asano Kenichi, Yamamoto Kouhei, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Arita Makoto, Sohara Eisei	4. 巻 25
2. 論文標題 Deletion of Alox15 improves kidney dysfunction and inhibits fibrosis by increased PGD2 in the kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02021-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷口洋平, 三浦健一郎, 白井陽子, 安藤太郎, 石和翔, 金子直人, 石塚喜世伸, 秋岡祐子, 堀田茂, 原聡, 藤丸拓也, 森崇寧, 蘇原映誠, 内田信一, 山口裕, 服部元史
2. 発表標題 PKD1遺伝子の複合ヘテロ接合性変異により胎児期発症多発性嚢胞腎を呈した症例における一次線毛の観察
3. 学会等名 第56回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤丸拓也, 蘇原映誠, 川西邦夫, 森崇寧, 千賀宗子, 萬代新太郎, 安藤史顕, 須佐紘一郎, 飯盛聡一郎, 内藤省太郎, 頼建光, 長田道夫, 内田信一
2. 発表標題 尿細管基底膜の厚い二重化は、成人ネフロン癆の遺伝学的診断根拠となり得る
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蘇原映誠, 藤丸拓也, 森崇寧, 内田信一
2. 発表標題 ADTKD 的確な診断と最善の治療を目指して
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関根章成, 藤丸拓也, 諏訪部達也, 大庭悠貴, 水野裕基, 川田真宏, 長谷川詠子, 山内真之, 早見典子, 田中希穂, 森崇寧, 蘇原映誠, 内田信一, 澤直樹, 乳原善文, 星野純一
2. 発表標題 ADPKD患者における遺伝子変異と心臓弁膜症の関係性
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱野直人, 和田健彦, 藤丸拓也, 森崇寧, 蘇原映誠, 内田信一, 深川雅史
2. 発表標題 PKD2遺伝子異常に関連した常染色体優性多発性嚢胞腎に完全内臓逆位を合併した一例
3. 学会等名 第51回日本腎臓学会東部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大庭悠貴, 関根章成, 水野裕基, 川田真宏, 平松里佳子, 早見典子, 山内真之, 長谷川詠子, 諏訪部達也, 澤直樹, 藤丸拓也, 蘇原映誠, 森崇寧, 内田信一, 星野純一, 乳原善文
2. 発表標題 腎長径と腎嚢胞径は多発性嚢胞腎患者においてPKD1/2 遺伝子変異の有無を予測する因子となりうる
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 関根章成, 星野純一, 藤丸拓也, 水野裕基, 川田真宏, 平松里佳子, 長谷川詠子, 早見典子, 山内真之, 諏訪部達也, 澤直樹, 森崇寧, 蘇原映誠, 内田信一, 高市憲明, 乳原善文
2. 発表標題 ADPKD患者における、遺伝子変異型とトルバプタン治療有効性の関係
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 藤丸拓也, 蘇原映誠, 森崇寧, 萬代新太郎, 千賀宗子, 菊池寛昭, 安藤史顕, 森雄太郎, 岡戸丈和, 頼建光, 川西邦夫, 長田道夫, 内田信一
2. 発表標題 腎生検にてネフロン瘻が疑われた成人症例における臨床・病理所見と遺伝的背景の関係
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 森崇寧, 千賀宗子, 藤丸拓也, 萬代新太郎, 蘇原映誠, 頼建光, 内田信一
2. 発表標題 Gitelman 症候群と臨床診断された成人患者の遺伝的背景と変異陰性例における表現系の検討
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 大木 悠太郎, 勝馬 愛, 岡部 匡裕, 嵯峨崎 誠, 渡邊 真央, 高橋 大輔, 木村 愛, 加藤 順一郎, 上田 裕之, 藤丸 拓也, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一, 宮崎 陽一, 横尾 隆
2. 発表標題 共にNPHP1のホモ接合性全欠失を呈するも経過が大きく異なった二卵性双生児のネフロン癆症例
3. 学会等名 第50回日本腎臓学会東部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井藤 奈央子, 藤丸 拓也
2. 発表標題 ワークショップ3「水電解質領域および尿細管機能の基礎研究：最近の進歩と臨床へのつながり」常染色体優性尿細管間質性腎疾患 (ADTKD) の最新知見
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 南学正臣 編著	4. 発行年 2020年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 620
3. 書名 プロフェッショナル腎臓病学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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