

令和元年5月23日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09279

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた多発性嚢胞腎(ADPKD)の遺伝子診断

研究課題名(英文)Genetic analyses for ADPKD using next-generation sequencer

研究代表者

望月 俊雄(Mochizuki, Toshio)

東京女子医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：00277120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)患者において次世代シーケンス法を用いてPKD1ならびにPKD2遺伝子変異解析を行い、111人の患者のうち96人の患者で遺伝子変異を検出した。さらにPKD1のエクソン1のSanger法で1人のframeshiftを検出した。またMultiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法で5人のdeletionを検出した。その結果、遺伝子変異検出率は91.9%(102/111人)まで向上した。ADPKDにおける遺伝子変異の検出には、このような網羅的な遺伝子解析が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADPKD患者の遺伝子解析を次世代シーケンス法、PKD1遺伝子のエクソン1の直接シーケンスならびにPKD1/PKD2遺伝子のMLPA解析を行うことにより、遺伝子変異検出率が91.9%まで上昇した。検出が難しいとされてきたADPKDの遺伝子診断において、その検出率の向上が確認されたことは学術的意義だけでなく、ADPKD患者の遺伝子解析の需要に応えるという社会的意義もあると思われる。

研究成果の概要(英文)：We performed genetic analyses of 111 ADPKD patients using next-generation sequencing (NGS). The mutations of 96 patients were detected. Additionally, a mutation in exon 1 of PKD1 was identified using Sanger sequencing and five deletions were identified using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). When combined, the total detection rate was 91.9%. This study indicated that comprehensive genetic analyses might be needed for the identification of mutations in ADPKD.

研究分野：腎臓病学

キーワード：多発性嚢胞腎 次世代シーケンス ADPKD PKD1 PKD2 MLPA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、遺伝性腎疾患の中で最も頻度の高い疾患(3,000~4,000人に一人)である。加齢とともに両腎に無数の嚢胞が形成され、腎機能が進行性に低下し、70才までに約半数が末期腎不全に至る。1990年代に原因遺伝子(*PKD1*および*PKD2*遺伝子)が発見され、その遺伝子機能や発症機序が徐々に解明されてきた。最近では、ADPKDの根本的治療薬としてグローバルな臨床試験が行われたバソプレシン受容体拮抗薬の有効性が2012年に報告され(*N Engl J Med* 367:2407-18, 2012)、2014年3月にバソプレシン受容体拮抗薬であるトルバプタンが「常染色体優性多発性嚢胞腎の進行抑制」として適応追加された。その適応基準は、両側総腎容積が750ml以上かつその増大率が概ね5%/年以上である成人患者とされている。

一方、シーケンス法は格段の進歩を遂げ、次世代シーケンサーの登場により、ヒト全ゲノムを数日のうちに解析できるようになった。次世代シーケンサーを用いたPKD遺伝子解析の報告もある。Long range PCR法を用いた次世代シーケンス解析の遺伝子変異検出率は約70%(*J Am Soc Nephrol* 23:915-33, 2012)、全エクソンシーケンスでは約45%(*PKD1*遺伝子複製領域では28%)、ターゲットDNA濃縮法を用いた次世代シーケンス解析では約70%であった(*Gene* 516:93-100, 2013)。本研究では、変異検出率を向上させるため、さらに工夫を凝らしたターゲットDNA濃縮法を使用した次世代シーケンサーを選択する。本研究は、根本的治療が確立されつつあるADPKDに対して、その早期診断ならびに除外診断を行うための遺伝子変異解析研究であり、また次世代シーケンサーを用いることで迅速で精度の高いものにしようとする画期的な研究と位置づけられる。

## 2. 研究の目的

ADPKDにおける早期診断ならびに除外診断ならびにADPKDの新たな治療薬であるバソプレシン受容体拮抗薬(トルバプタン)の適応決定のため、ターゲットDNA濃縮法などを使用した次世代シーケンスにより、迅速で、精度の高い、ADPKD遺伝子診断法を確立することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

- (1) ADPKD患者のゲノムDNAから*PKD1*ならびに*PKD2*遺伝子領域を含むゲノムの特定領域をターゲットDNA濃縮法(Sure Select)ならびにロングレンジPCR(LR-PCR)法を用いて、「次世代シーケンサー(Next Generation sequencing; NGS)」にてシーケンシングを行った。同定された遺伝子変異を従来のキャピラリー・シーケンス法にて確認した。
- (2) 次世代シーケンスで変異検出が難しい*PKD1*遺伝子のエクソン1については、別途キャピラリー・シーケンスを行った。
- (3) 変異未検出患者に対して、大きな欠失や挿入を検出するMultiplex Ligation-dependent Probe Amplification(MLPA解析)を行った。

## 4. 研究成果

- (1) ターゲットDNA濃縮法を用いたNGS解析: 96人の患者のうち、76人に遺伝子変異が同定された(検出率79.2%)。変異型の内訳は、Frameshift 15人、Nonsense 30人、Splicing 5人、Inframe deletion 1人、Substitution 25人であった。遺伝子別では、*PKD1*が63人(82.9%)、*PKD2*が13人(17.1%)であった。遺伝子型では、*PKD1*遺伝子ではSubstitution(36.5%)、Nonsense(34.9%)の順に多く、*PKD2*ではNonsense(61.5%)が多く、Substitution(15.4%)は少なかった。
- (2) LR-PCR法を用いたNGS解析: ターゲットDNA濃縮法を用いたNGSで変異が検出され

なかった 20 人のうち，9 人で遺伝子変異が同定された．変異型の内訳は，*PKD1* 遺伝子で Large deletion 1 人，Frameshift 7 人，*PKD2* 遺伝子で Nonsense 1 人であった．Large deletion については，*PKD1* の Exon22-34 の LR-PCR において 10524bp とともに約 2kb 短いバンドが検出された．そのシーケンスの結果，IVS27-IVS30 の 2152bp の欠失が確認された．また，Frameshift7 人のうち，4 人が 5bp 以上の挿入あるいは欠失であった．*PKD2* の Nonsense は Exon1 のものであった．

- (3) さらに，ターゲット DNA 濃縮法を用いた NGS 解析を行えなかった患者 15 人の解析では，11 人で遺伝子変異が同定された．*PKD1* で Frameshift 2 人，Nonsense 2 人，Splicing 1 人，Inframe deletion 1 人，Substitution 2 人で，*PKD2* では，Frameshift 2 人，Splicing 1 人であった．
- (4) キャピラリー・シーケンス法を用いた *PKD1* 遺伝子のエクソン 1 の遺伝子解析：NGS で変異を検出できなかった 15 人に，NGS の coverage が少ない，すなわち弱点と考えられる *PKD1* のエクソン 1 について，キャピラリー・シーケンス法で直接シーケンスを行った．その結果，エクソン 1 の Frameshift 1 人の変異を検出した．
- (5) MLPA 解析：Large deletion などを検出するために，NGS ならびに *PKD1* エクソン 1 の解析で変異が検出できなかった 14 人に，MLPA 解析を行い，5 人の deletion が検出された．その内訳は，*PKD1* の小さな deletion 2 人（エクソン 3，エクソン 5），*PKD1* の Large deletion 2 人（エクソン 2～21，エクソン 11～46），*PKD2* の Large deletion 1 人（全エクソン）が認められた．
- (6) まとめ：次世代シーケンスだけでなく，*PKD1* の Exon1 の Sanger sequencing，MLPA を用いた網羅的な解析を行うことにより，遺伝子変異検出率は 91.9%まで向上した．今後は，遺伝子変異と臨床的重症度（末期腎不全年齢など）との遺伝子型・表現型の相関性についての解析も行っていきたい．

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mochizuki T, Teraoka A, Akagawa H, Makabe S, Akihisa T, Sato M, Kataoka H, Mitobe M, Furukawa T, Tsuchiya K, Nitta K: Mutation analyses by next-generation sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification in Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clinical and experimental nephrology*, 2019. [Published online : 15 April 2019 (<https://doi.org/10.1007/s10157-019-01736-3>)]

〔学会発表〕(計 1 件)

望月俊雄：ADPKD における次世代シーケンス（NGS）解析の実際．第 61 回日本腎臓学会総会，2018 年 6 月．

〔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：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○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：

ローマ字氏名：

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。