

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04189

研究課題名(和文)アルポート症候群の重症化に關する遺伝子の同定と重症化機序の解明

研究課題名(英文) Identification of Genes Involved in the Severity of Alport Syndrome and Elucidation of the Mechanism of its Severity

研究代表者

飯島 一誠 (Iijima, Kazumoto)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：00240854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：X連鎖性アルポート症候群(XLAS)女性患者では臨床像と遺伝子型に相関は認めないことが確認された。 $\alpha 3, 4, 5(IV)$ 鎖の分子シミュレーション解析では、ストップコドンを含むエクソンをスキップさせた場合に、正常な $\alpha 3, 4, 5(IV)$ 鎖とほぼ同様の立体構造を呈することが明らかになったことから、エクソンスキッピング療法によって、truncating変異をnon-truncating変異に修飾することで、XLASを軽症化する可能性が強く示唆された。また、ミスセンス変異症例の重症度は、 $\alpha 3, 4, 5(IV)$ 鎖の三量体形成能と関連することも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、今回の研究結果をもとに、XLASのエクソンスキッピング療法の開発に着手しており、XLASモデルマウスを用いた治療研究で、エクソンスキッピング療法が非常に有効であることを世界で初めて明らかにしており(Nat Commun. in press)、近々に臨床試験を開始する予定である。

研究成果の概要(英文)：It was confirmed that there was no correlation in clinical feature and genotype in the X-linked Alport syndrome (XLAS) female patients. Furthermore, since no disease-modifying gene mutations were identified in most severely ill patients, the severity of female XLAS patients was considered to be multifactorial. Molecular simulation analysis of the $\alpha 3, 4, 5(IV)$ chain revealed that when the exon with the stop codon was skipped, the $\alpha 3, 4, 5(IV)$ chain with COL4A5 truncating mutations showed three-dimensional structure similar to that of the normal $\alpha 3, 4, 5(IV)$ chain. These results strongly suggest that the modification of the truncating mutation to the non-truncating mutation by exon skipping therapy may attenuate XLAS. We also found that the severity of patients with COL4A5 missense mutations was correlated to the ability of the $\alpha 3, 4, 5(IV)$ chain to form trimers.

研究分野：小児科学、腎臓学

キーワード：アルポート症候群 重症化機序 エクソンスキッピング

1. 研究開始当初の背景

X染色体連鎖性アルポート症候群(XLAS)は小児期に発症する遺伝性進行性腎炎で、男性患者の約90%、女性患者も約20%が40歳までに末期腎不全に進行する予後不良な遺伝性腎疾患である。IV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖蛋白($\alpha 5$ (IV))をコードするCOL4A5の変異が原因であり、5,000人に1人という比較的高頻度で発症するが、現在のところ有効な治療法はない。我々は、これまで約480例のXLAS患者の遺伝子型・表現型解析を行ってきた(J Am Soc Nephrol 6:264-8, 1995; J Am Soc Nephrol 7:938-45, 1996; J Am Soc Nephrol 9:1433-40, 1998; Am J Kidney Dis 34:854-62, 1999; Nephrol Dial Transplant 23:2525-30, 2008; Kidney Int 85:1208-13, 2014)。XLAS男性患者では、ナンセンス変異やフレームシフト変異などの“Truncating変異”に比して、“非Truncating変異”であり、変異全体の約半数を占めるミスセンス変異を持つ症例の腎不全への進行は比較的緩やかであることが知られているが、それでも、その半数以上は40歳までに末期腎不全となる重症例である。しかし、XLAS男性患者ミスセンス変異症例のうち、どのような症例が重症例となるのかは明らかではない。一方、XLAS女性患者では、男性XLAS患者で見られるような遺伝子型と重症度の間には全く関連がないと報告されている(Jais et al. J Am Soc Nephrol 14:2603-10, 2003)。実際、最近、我々が、日本人XLAS女性患者(177家系、273症例)を検討した結果でも、遺伝子型と重症度の間には全く関連がないことが明らかになった。さらに我々は、XLAS女性患者の重症例では、正常のCOL4A5を持つX染色体が選択的に不活化され、変異COL4A5がdominantに機能している可能性を考え、X染色体不活化の偏りを検討したが、重症例でもX染色体不活化の偏りを認める症例はほとんどなかった。すなわち、XLAS女性患者でも重症化を規定する因子は不明のままである。

糸球体疾患が腎不全に進行する際には、多くが巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)の組織型を呈するが、近年、40個以上のFSGS原因遺伝子が明らかにされた。また、ゲノムワイド関連解析により、50個を超える腎機能障害感受性遺伝子の存在も報告されていることから、XLAS男性患者ミスセンス変異症例や女性患者でも、FSGS原因遺伝子や腎機能障害感受性遺伝子が重症化に関与する重要な要因となるのではないかとこの着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、最新の遺伝学的手法によりXLASの重症化に関与する遺伝子を同定するとともに、分子シミュレーション解析法や $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ (IV)鎖の三量体形成能測定法を用いて、重症化の機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、1) XLAS男性患者ミスセンス変異症例や女性患者を対象として、FSGS原因遺伝子変異の有無や腎機能障害感受性遺伝子多型を同定し、腎予後との関連について検討する。さらに、2) XLAS男性患者ミスセンス変異症例については、 $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ (IV)鎖の分子シミュレーション解析や $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ (IV)鎖の三量体形成能を測定し、XLAS男性患者ミスセンス変異症例や女性患者の腎予後規定因子を同定することを目指す。

4. 研究成果

まず、主として当科で遺伝学的に診断したXLAS女性患者の遺伝子型と臨床像(重症度)の相関について検討した。さらに、重症女性患者に対して次世代シーケンサー(NGS)を用いた疾患修飾遺伝子の網羅的解析を行なった。対象は2006年1月から2015年12月までに当科で遺伝学的に診断を行なった250家系のXLASのうち、179家系の275人の女性患者および、遺伝学的診断はなされていないものの、遺伝子変異を有することが予想される61人の有症状患者家族女性の計336人である。遺伝学的診断は、サンガー法によるCOL4A5遺伝子の解析もしくはNGS疾患パネルによるCOL4A5遺伝子を含めた網羅的遺伝子解析を行なったのち、変異が同定できない症例についてはコピー数異常の解析やmRNAの解析を追加した。更に、60歳以前にESRDに至った症例および3歳以前に蛋白尿が出現した症例を重症患者と定義し、これらの患者に対してNGSを用いて疾患修飾遺伝子として重症化に関与し得る既知のポドサイト関連45遺伝子の網羅的解析を施行した。

遺伝子型別に腎生存曲線を作成したが、遺伝子型と臨床像に相関は認めなかった。また、難聴の有無で腎生存曲線を作成したものの、両者に有意な差は認めなかった。更に、重症24例に対するNGSによる疾患修飾遺伝子の解析では1例でCOL4A3遺伝子にナンセンス変異の合併を認められたものの、その他の症例では明らかな変異を認めなかった。

以上より、XLAS女性患者では臨床像と遺伝子型に相関は認めないことが確認された。更に、ほとんどの重症患者で疾患修飾遺伝子の変異は同定されなかったことより、女性XLAS患者の重症度は多因子によって規定されるものと考えられた(Kidney Int Rep. 2017;2:850-855)。

次に、主にXLAS男性患者を対象として、その責任遺伝子であるCOL4A5遺伝子のスプライシング異常が疑われる症例の遺伝子型と臨床的重症度の関連に関して、ミニジーンを用いたスプラ

イシニング動態の解析、スーパーコンピューター「京」を用いた 3, 4, 5(IV)鎖の分子シミュレーション解析及び熊本大学の甲斐らが開発した方法で 3, 4, 5(IV)鎖の三量体形成能の測定を行った。ミニジーン解析によって、non-truncating 変異が生じることが示された症例は、truncating 変異が生じる症例に比して、有意に腎予後がよいことが示された(J Am Soc Nephrol. 2018;29:2244-2254, Sci Rep. 2019;9:12696)。また、3, 4, 5(IV)鎖の分子シミュレーション解析では、ストップコドンを含むエクソンをスキップさせた場合に、正常な 3, 4, 5(IV)鎖とほぼ同様の立体構造を呈することが明らかになった。以上の所見から、エクソンスキッピング療法によって、truncating 変異を non-truncating 変異に修飾することで、XLAS を軽症化する可能性が強く示唆された。また、ミスセンス変異症例の重症度は、3, 4, 5(IV)鎖の三量体形成能とよく関連することも明らかになった(Kidney Int Rep. 2020;5:718-726)

我々は、このような背景をもとに、エクソンスキッピング療法の開発に着手しており、XLAS モデルマウスを用いた治療研究で、エクソンスキッピング療法が非常に有効であることを世界で初めて明らかにした(Nat Commun. in press)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hashikami Kentarou, Asahina Makoto, Nozu Kandai, Iijima Kazumoto, Nagata Michio, Takeyama Michiyasu	4. 巻 17
2. 論文標題 Establishment of X-linked Alport syndrome model mice with a Col4a5 R471X mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 81 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.12.003	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 Nozu K, Nakanishi K, Abe Y, Udagawa T, Okada S, Okamoto T, Kaito H, Kanemoto K, Kobayashi A, Tanaka E, Tanaka K, Hama T, Fujimaru R, Miwa S, Yamamura T, Yamamura N, Horinouchi T, Minamikawa S, Nagata M, Iijima K	4. 巻 23
2. 論文標題 A review of clinical characteristics and genetic backgrounds in Alport syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 158 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-018-1629-4	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 Okamoto Takayuki, Nozu Kandai, Iijima Kazumoto, Ariga Tadashi	4. 巻 32
2. 論文標題 Germline mosaicism is a pitfall in the diagnosis of "sporadic" X-linked Alport syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Nephrology	6. 最初と最後の頁 155 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40620-018-0518-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 -
1. 著者名 Horinouchi T, Nozu K, Yamamura T, Minamikawa S, Omori T, Nakanishi K, Fujimura J, Ashida A, Kitamura M, Kawano M, Shimabukuro W, Kitabayashi C, Imafuku A, Tamagaki K, Kamei K, Okamoto K, Fujinaga S, Oka M, Igarashi T, Miyazono A, Sawanobori E, Fujimaru R, Nakanishi K, Shima Y, Matsuo M, Ye MJ, Nozu Y, Morisada N, Kaito H, Iijima K	4. 巻 29
2. 論文標題 Detection of Splicing Abnormalities and Genotype-Phenotype Correlation in X-linked Alport Syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 2244 ~ 2254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018030228	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 野津 寛大, 飯島 一誠	4. 巻 61巻1号
2. 論文標題 【腎臓学 この一年の進歩】 遺伝性腎疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本腎臓学会誌	6. 最初と最後の頁 18-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Nagano C, Nozu K, Morisada N, Yazawa M, Ichikawa D, Numasawa K, Kourakata H, Matsumura C, Tazoe S, Tanaka R, Yamamura T, Minamikawa S, Horinouchi T, Nakanishi K, Fujimura J, Sakakibara N, Nozu Y, Ye MJ, Kaito H, Iijima K.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Detection of copy number variations by pair analysis using next-generation sequencing data in inherited kidney diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-018-1534-x	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 Yamamura T, Nozu K, Fu XJ, Nozu Y, Ye MJ, Shono A, Yamanouchi S, Minamikawa S, Morisada N, Nakanishi K, Shima Y, Yoshikawa N, Ninchoji T, Morioka I, Kaito H, Iijima K.	4. 巻 2(5)
2. 論文標題 Natural History and Genotype-Phenotype Correlation in Female X-Linked Alport Syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Kidney Int Rep	6. 最初と最後の頁 850-855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2017.04.011	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 Kamijo M, Kitamura M, Muta K, Uramatsu T, Obata Y, Nozu K, Kaito H, Iijima K, Mukae H, Nishino T.	4. 巻 6(2)
2. 論文標題 A case of mild phenotype Alport syndrome caused by COL4A3 mutations.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 CEN Case Rep	6. 最初と最後の頁 189-193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-017-0273-2	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 Imafuku A, Nozu K, Sawa N, Hasegawa E, Hiramatsu R, Kawada M, Hoshino J, Tanaka K, Ishii Y, Takaichi K, Fujii T, Ohashi K, Iijima K, Ubara Y.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Autosomal dominant form of type IV collagen nephropathy exists among patients with hereditary nephritis difficult to diagnose clinicopathologically.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nephrology (Carlton)	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nep.13115	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 Nozu K, Minamikawa S, Yamada S, Oka M, Yanagita M, Morisada N, Fujinaga S, Nagano C, Gotoh Y, Takahashi E, Morishita T, Yamamura T, Ninchoji T, Kaito H, Morioka I, Nakanishi K, Vorechovsky I, Iijima K.	4. 巻 62(7)
2. 論文標題 Characterization of contiguous gene deletions in COL4A6 and COL4A5 in Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 733-735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/jhg.2017.28	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 該当する

1. 著者名 Yokota K, Nozu K, Minamikawa S, Yamamura T, Nakanishi K, Kaneda H, Hamada R, Nozu Y, Shono A, Ninchoji T, Morisada N, Ishimori S, Fujimura J, Horinouchi T, Kaito H, Nakanishi K, Morioka I, Taniguchi-Ikeda M, Iijima K.	4. 巻 21(5)
2. 論文標題 Female X-linked Alport syndrome with somatic mosaicism.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 877-883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-016-1352-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 -

1. 著者名 Kamura M, Yamamura T, Omachi K, Suico MA, Nozu K, Kaseda S, Kuwazuru J, Shuto T, Iijima K, Kai H	4. 巻 5(5)
2. 論文標題 Trimerization and Genotype-Phenotype Correlation of COL4A5 Mutants in Alport Syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney Int Rep	6. 最初と最後の頁 718-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2020.01.008	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Horinouchi T, Nozu K, Yamamura T, Sakakibara N, Nagano C, Nakanishi K, Fujimura J, Minamikawa S, Ninchoji T, Kaito H, Shima Y, Nakanishi K, Iijima K
2. 発表標題 Splicing assay with hybrid minigene: assessing pathogenicities in COL4A5 intronic mutations
3. 学会等名 52st Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamura T, Nozu K, Sakakibara N, Nagano C, Fujimura J, Horinouchi T, Nakanishi K, Minamikawa S, Kaito H, Shima Y, Nakanishi K, Iijima K
2. 発表標題 Factors regulating the severity in male X-linked Alport syndrome: study of 367 cases
3. 学会等名 52st Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山村 智彦、野津 寛大、長野 智那、榊原 菜々、藤村 順也、堀之内 智子、中西 啓太、南川 将吾、貝藤 裕史、飯島 一誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山村 智彦、野津 寛大、榊原 菜々、長野 智那、藤村 順也、堀之内 智子、中西 啓太、南川 将吾、貝藤 裕史、中西 浩一、飯島 一誠
2. 発表標題 X染色体連鎖型Alport症候群男性患者341名の臨床遺伝学的検討
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamura T, Sakakibara N, Nagano C, Nozu K, Fujimura J, Horinouchi T, Nakanishi K, Minamikawa S, Kaito H, Iijima K
2. 発表標題 Genotype-phenotype correlation in male X-linked Alport syndrome: 341 cases study
3. 学会等名 第53回小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯島一誠
2. 発表標題 カレント・トピック4 小児腎疾患における遺伝医学のトピックス
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第63回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamura T, Nozu K, Fujimura J, Horinouchi T, Nakanishi K, Minamikawa S, Shono A, Ninchoji T, Kaito H, Shima Y, Nakanishi K, Iijima K.
2. 発表標題 A comprehensive diagnosis by targeted sequencing for clinically suspected alport syndrome patients in Japan
3. 学会等名 Asian Congress of Pediatric Nephrology 2017 & 39th Malaysian Pediatric Association Annual Congress, Kuala Lumpur, Malaysia (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山村智彦、野津寛大、藤村順也、堀之内智子、中西啓太、南川将吾、庄野朱美、忍頂寺毅史、貝藤裕史、中西浩一、飯島一誠
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会 仙台
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 庄野朱美、野津寛大、小泉 誠、大西朗之、高石巨澄、山村智彦、南川将吾、飯島一誠
2. 発表標題 エクソスキッピング療法によるアルポート症候群特異的療法治療法の開発
3. 学会等名 第52回日本小児腎臓病学会 東京
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamamura T, Nozu K, Fujimura J, Horinouchi T, Nakanishi K, Manamikawa S, Shono A, Ninchoji T, Kaito H, Nakanishi K, Iijima K
2. 発表標題 Establishment of a comprehensive diagnostic method using next generation sequencer for the Alport syndrome
3. 学会等名 第52回日本小児腎臓病学会 東京
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	高岡 裕 (Takaoka Yutaka) (20332281)	神戸大学・医学部附属病院・准教授 (14501)	
研究分担者	野津 寛大 (Nozu Kandai) (70362796)	神戸大学・医学研究科・特命教授 (14501)	