

令和元年6月6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：2017～2018

課題番号：17H06657

研究課題名(和文) 網羅的腎臓病診断パネルを生かした新しい疾患原因遺伝子の探索とデータベースの構築

研究課題名(英文) Search for novel disease causative genes and development of a phenotype-genotype database utilizing the comprehensive kidney disease diagnosis panel

研究代表者

森 崇寧 (Mori, Takayasu)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00735813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓病領域に先駆的に導入した次世代シーケンサーによる腎臓病遺伝子診断パネルを用いて、2018年までに約700例に対して網羅的遺伝子検査を適用し、多くの遺伝子診断をなし得た。未診断例を集積し共通する遺伝子変異を同定することで新たな疾患原因遺伝子の発見や、蓄積した遺伝型-表現型のデータから遺伝子変異-表現系相関を見出すことを目指した。結果、塩喪失性腎疾患の新しい原因遺伝子候補としてCACNA1HやSQSTM1が同定され、現在検証を続けている。新しい候補遺伝子探索は希少疾患の病態解明に止まらず、塩分感受性高血圧や臓器障害などのコモン病治療方策への展開も期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は次世代高速シーケンサーという機器を用いた網羅的遺伝子検査を、世界にも先駆けて腎臓病領域に導入し、これまでに700例を超える症例に対して検査を行い、多くの遺伝子診断をしてきました。一方で原因が特定できない未診断例を集積し、それらの症例に共通する遺伝子変異を同定することで新たな疾患原因遺伝子の発見を目指しています。結果、塩喪失性腎臓病の新しい原因遺伝子候補としてCACNA1HやSQSTM1といった遺伝子が同定され、現在そのメカニズムを検証しています。最終的には希少疾患にとどまらずより一般的な疾患治療への応用を目指しています。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive genetic testing using the next-generation sequencing (NGS) panel for diagnosis of inherited kidney diseases, which we introduced to nephrology field first, was applied to about 700 cases by 2018. At this moment, many definitive genetic diagnoses could be obtained. By accumulating undiagnosed cases and identifying common gene mutations among them, we aimed to discover novel disease causative genes and to find genotype-phenotype correlations from accumulated data. As a result, CACNA1H and SQSTM1 have been identified as new responsible gene candidates for salt-losing kidney diseases, and further investigation is currently ongoing. To discover novel responsible genes is not limited to only elucidation of the pathophysiology of rare diseases, but is also useful for development of treatment strategies for common diseases such as salt-sensitive hypertension and organ damages.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：遺伝性腎疾患 塩喪失性腎症 次世代シーケンサー パネル診断

1. 研究開始当初の背景

遺伝子診断は確定診断の意義のみならず治療効果予測や予後予測といった重要な側面をもつ。次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing: NGS) 技術は 2005 年前後よりその原型を表し、2010 年前後より広く一般に普及し始めた遺伝子配列解析における革新的技術 (Zhang J, J Genet Genomics, 2011) であり、従来のサンガー法に比してより高速に、膨大なシーケンシングデータを取得する事が可能になった。申請者らは NGS をいち早く腎臓領域に導入し、160 種以上の既報疾患原因遺伝子を同時にスクリーニングする網羅的遺伝子診断パネルを構築 (SPEedy and Efficient Diagnosis of Inherited Kidney Diseases [SPEEDI-KID]) (Mori T, Clin Exp Nephrol, 2016) (図 1) 学会発表や症例報告を含め数々の業績をあげている。この診断システムを用いる事で、疾患カテゴリーに捉われる事なくあらゆる遺伝性腎疾患の既報遺伝子を網羅的にスクリーニングする事が可能となった。しかしながら明確な臨床診断のもとに遺伝子解析を実施した例においても、原因遺伝子群に責任変異が同定されない例も少なからず存在し、これは別の新しい原因遺伝子の存在を示唆するものである。

2. 研究の目的

(1) 遺伝性腎疾患における新たな原因遺伝子の発見

既報遺伝子に変異が同定されなかった例に対して新たな腎臓病原因遺伝子同定を目指す。パネル内遺伝子の検討後、必要に応じて全エクソン (エクソーム) シーケンシングを実施する。

(2) 網羅的遺伝子解析データベースの構築による表現形-遺伝子型相関関係の解明

160 種類以上に及び既知の原因遺伝子群を全患者同時に解析する事で、アミノ酸変異を伴わないものまで含めると膨大な変異が同定される。このデータを蓄積する事で表現形と遺伝子型相関関係の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性腎疾患における新たな原因遺伝子の発見 (遺伝性塩喪失性腎疾患)

既報遺伝子に変異が同定されない例は少なからず存在し、同一表現形もしくは同じ臨床診断が複数家系以上ある場合に、背景に共通する遺伝子変異が存在すれば新しい疾患原因である可能性が推察される。例えば Gitelman 症候群は日本人で比較的頻度が高いと考えられている塩喪失性腎症であり、低カリウム血症、脱力、倦怠感等を主とする臨床的にも重要な疾患であるが、2018 年時点で過去 59 例の解析のうち類縁疾患の責任遺伝子を含めてもわずか 24 例 (40.7%) でしか責任変異が同定されなかった (図 1)。未診断群に共通する遺伝子変異の有無を、まずはパネル遺伝子内で検討した。これは例えば MYH9 遺伝子のように単一の遺伝子であってもその変異の型により、May-Hegglin 異常、Sebastian 症候群、Fechtner 症候群、Alport 症候群など多彩な表現型を示すものが知られておらず、始めており、これまでの遺伝子-表現型の一対一対応という概念を払拭し、既存の原因遺伝子でも別の疾患原因となる可能性を検証するためである。

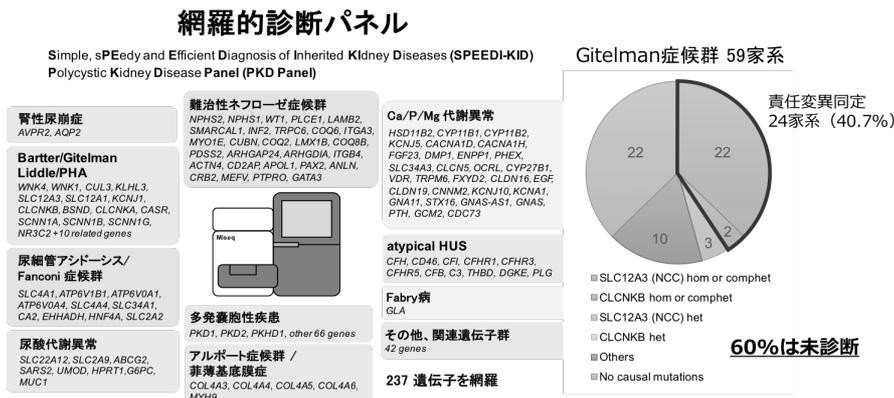


図 1 網羅的診断パネルとGitelman症候群の遺伝子診断率

(2) 網羅的遺伝子解析データベースの構築による表現形-遺伝子型相関関係の解明

申請時に約 150 名の網羅的シーケンシングが完了し、その遺伝子変異データは解析サーバー内に蓄積されている。これらの変異情報と臨床症状との相関関係を検討すべく、データベース (データサーバー) の構築を目指す。具体的には疾患ごとに各患者の有するメジャーな症状、代表的検査値、投薬内容、治療予後等の要素を個人情報と切り離した状態で登録しておき、随時検証できるようにしておく。これにより、遺伝子型による重症度判定、病的意義予測、及び適切な治療選択ができるようになる可能性がある。研究機関を通して随時シーケンシングデータ、臨床データの蓄積を行い、得られた表現形-遺伝子型相関関係はより多くのサンプルサイズでさらに検証を行うことを目指した。

#### 4. 研究成果

2018年度までに網羅的遺伝子解析を実施した患者数は約700名に達し、パネル解析により得られた知見に関して、学会研究会での発表は2018年以降のみで23件、原著論文は8本に及び、数多くの遺伝子変異-表現系相関を見出す事に成功したことに加え、多くの患者で遺伝子診断を確定させることで社会貢献的要素も大きかった。また例えば、塩喪失性腎症の一つであるGitelman症候群の遺伝子解析は84例に至り、既知の責任遺伝子に変異を認めない例を47例(56%)認めた。

##### (1) 遺伝性腎疾患における新たな原因遺伝子の発見 (遺伝性塩喪失性腎疾患)

未診断のGitelman症候群家系の再解析により、健常者ではみられないまたは極めて保有頻度の少ないアミノ酸変異を伴う希少遺伝子変異が複数の塩喪失性腎症患者に特異的に同定され、新規責任遺伝子候補としてCACNA1H, SQSTM1の2つに帰着した。以降の図に示す通り、CACNA1H変異は5家系(図2)で、SQSTM1変異は全く同一の希少変異が独立した2家系(図3)で認められた。

CACNA1Hは電位依存性T型Caチャンネルの鎖で、原発性アルドステロン症(PA)の原因遺伝子として知られている。しかし我々の患者群では高血圧や血漿レニン活性の抑制はなく、PAの既報変異部位と異なって膜貫通ドメイン外に配置していることから(図2)PAとは異なる病態が疑われた。マウス腎臓ならびに培養遠位尿管(DCT)細胞で本遺伝子が発現していることをmRNAレベルで確認済みである。我々は最近細胞内Caにより活性化されるカルシニューリン(CaN)がDCTのNa-Cl共輸送体(NCC)の脱リン酸化に関与することを見出し(Kidney Int. 2017)、本遺伝子変異により細胞内Ca流入が促進されれば、CaN活性化からNCCの恒常的脱リン酸化・機能抑制を招き、尿管で塩喪失が起こる可能性は大きい(図2)。In vivo検証として米国アイオワ大学キャンベルラボより、仮説とは逆のフェノタイプが想起されるがCACNA1Hノックアウト(KO)マウスの譲渡を受け、現在解析を進めている。期待される表現系が観察された場合には、培養細胞系を併用し、その病態メカニズムについて細胞内CaバランスやCaNの塩輸送体群への影響を検証する。

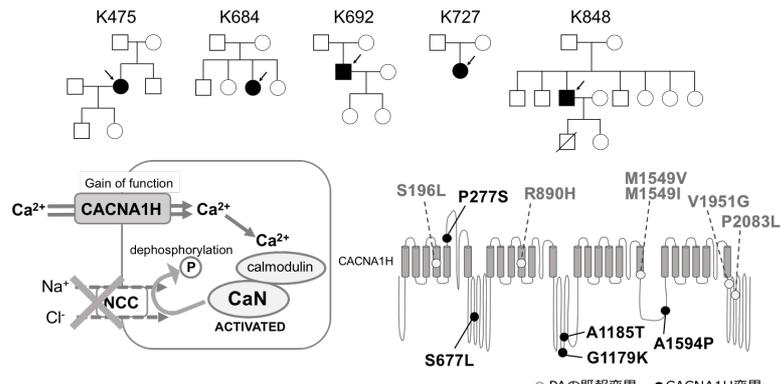


図2 CACNA1H変異と病態生理仮説

図2 CACNA1H変異と病態生理仮説

SQSTM1は選択的オートファジーのアダプター蛋白として有名な遺伝子であり、本遺伝子の変異は古典的には筋萎縮性側索硬化症(ALS)やPaget病の原因となることが報告されている。図3に示す通り、独立した2家系において、SQSTM1 p.C289Yヘテロ変異が同定された。ALSの責任変異は250番目のアミノ酸よりもN末端側、NF- $\kappa$ B活性化に関連するドメイン上にあり、一方でPaget病の変異は350番目のアミノ酸よりもC末端側の選択的オートファジー関連ドメインに位置している。興味深いことにC289Yはちょうどそれらのドメインの中央に位置し、核内外の移動に関わるNLS/NESドメインの近傍に位置している。先行研究で我々はSQSTM1がKLHL3というユビキチンリガーアダプター蛋白と結合し、その基質であるWNK4をオートファジーにより分解制御することを報告している(Mori Y, Mori T, et al. Biochem J. 2015)。WNK4はDCTに発現するNa-Cl共輸送体(NCC)を正に制御しており、SQSTM1変異によるWNK4過剰分解が、NCC機能低下を招く可能性は十分ある。野生型・変異型SQSTM1発現ベクターの作成は完了し、加えてWNK4安定発現HEK細胞株や関連シグナルノックイン(KI)/KOマウスなどの豊富なNCC制御系解析ツールを駆使して、変異体の影響を検証している。上記検討中にも引き続き他の患者にパネルスクリーニングを継続し、同一遺伝子変異を持つ患者を引き続き探索、蓄積することで遺伝学的根拠を強める。

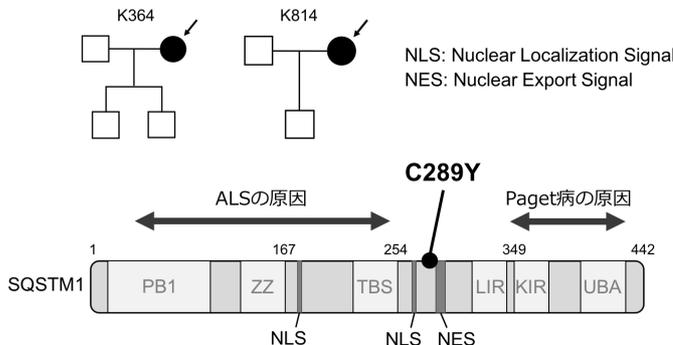


図3 SQSTM1変異家系と変異の位置

## (2) 網羅的遺伝子解析データベースの構築による表現形-遺伝子型相関関係の解明

前述した通り多くの患者に網羅的遺伝子診断を実施した結果、新規責任変異の同定や遺伝型表現形相関の発見など、数々の学会発表や原著論文の創出に貢献した。新規責任変異同定については、偽性低アルドステロン症 II 型の原因として WNK4 D564N 変異の報告 (Sakh T, Mori T, et al., Mol Genet Genomic Med. 2019)、偽性低アルドステロン症 I 型の原因として NR3C2 S98X 変異の報告 (Tanaka T, Mori T, et al., Nephrology(Carlton). 2019)、Dent 病の原因として CLCN5 新規スプライス変異 (1348-1G>A) の報告 (Matsumoto A, Mori T, et al., Intern Med. 2019)、Cockayne syndrome の新規複合ヘテロ接合性変異の報告 (Mori T, et al., Hum Mutat. 2018)、PKD1 複合ヘテロ接合性変異が新たな疾患原因と考えられた多発嚢胞腎の報告 (亀井宏一, 森崇寧ら, 日本小児腎不全学会雑誌, 2018) などが挙げられる。また遺伝型-表現型相関解析からは、家族例を有さない多発嚢胞腎患者では、PKD1 ないし PKD2 遺伝子の truncation 変異が腎予後と強く関わることを見出した (Sekine A, Mori T, et al., Am J Nephrol. 2019)。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計 8 件)

Sakoh T, Sekine A, Mori T, Mizuno H, Kawada M, Hiramatsu R, Hasegawa E, Hayami N, Yamanouchi M, Suwabe T, Sawa N, Ubara Y, Fujimaru T, Sohara E, Shinichi U, Hoshino J, Takaichi K. A familial case of pseudohypoaldosteronism type II (PHA2) with a novel mutation (D564N) in the acidic motif in WNK4. Mol Genet Genomic Med. 1:e705,2019. 査読あり。

DOI: 10.1002/mgg3.705

Tanaka T, Oki E, Mori T, Tsuruga K, Sohara E, Uchida S, Tanaka H. Complete clinical resolution of a Japanese family with renal pseudohypoaldosteronism type 1 due to a novel NR3C2 mutation. Nephrology (Carlton). 24(4):489-490, 2019. 査読あり。

DOI: 10.1111/nep.13391

Watanabe S, Ino J, Fujimaru T, Taneda S, Akihisa T, Makabe S, Kataoka H, Mori T, Sohara E, Uchida S, Nitta K, Mochizuki T. PKD1 mutation may epistatically ameliorate nephronophthisis progression in patients with NPHP1 deletion. Clin Case Rep. 9;7(2):336-339, 2019. 査読あり。

DOI: 10.1002/ccr3.1947

Sekine A, Fujimaru T, Hoshino J, Suwabe T, Oguro M, Mizuno H, Kawada M, Sumida K, Hiramatsu R, Hasegawa E, Yamanouchi M, Hayami N, Mandai S, Chiga M, Kikuchi H, Ando F, Mori T, Sohara E, Uchida S, Sawa N, Takaichi K, Ubara Y. Genotype-Clinical Correlations in Polycystic Kidney Disease with No Apparent Family History. Am J Nephrol. 49(3):233-240, 2019. 査読あり。

DOI: 10.1159/000497444

Matsumoto A, Matsui I, Mori T, Sakaguchi Y, Mizui M, Ueda Y, Takahashi A, Doi Y, Shimada K, Yamaguchi S, Kubota K, Hashimoto N, Oka T, Takabatake Y, Sohara E, Hamano T, Uchida S, Isaka Y. Severe Osteomalacia with Dent Disease Caused by a Novel Intronic Mutation of the CLCN5 gene. Intern Med. 15;57(24):3603-3610, 2018. 査読あり。

DOI: 10.2169/internalmedicine.1272-18

Takada D, Sekine A, Yabuuchi J, Kogure Y, Ueno T, Yamanouchi M, Sumida K, Suwabe T, Hayami N, Hoshino J, Takaichi K, Kinowaki K, Fujii T, Ohashi K, Mori T, Sohara E, Uchida S, Ubara Y. Renal histology and MRI in a 25-year-old Japanese man with nephronophthisis 4. Clin Nephrol. 89(3):223-228, 2018. 査読あり。

DOI: 10.5414/CN109175

Mori T, Yousefzadeh MJ, Faridounnia M, Chong JX, Hisama FM, Hudgins L, Mercado G, Wade EA, Barghouthy AS, Lee L, Martin GM, Nickerson DA, Bamshad MJ; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Niedernhofer LJ, Oshima J. ERCC4 variants identified in a cohort of patients with segmental progeroid syndromes. Hum Mutat. 39(2):255-265, 2018. 査読あり。

DOI: 10.1002/humu.23367

亀井 宏一, 稲垣 秀人, 森 崇寧, 藤丸 拓也, 蘇原 映誠, 濱崎 祐子, 宍戸 清一郎, 義岡 孝子, 緒方 謙太郎, 岡田 麻理, 小椋 雅夫, 佐藤 舞, 倉橋 浩樹, 石倉 健司. PKD1 の複合ヘテロ接合体変異を示し ARPKD と類似した臨床像を呈した男児例. 日本小児腎不全学会雑誌, 38:152-155, 2018. 査読あり。

DOI なし

#### [学会発表](計 23 件うち 20 件)

知念 崇, 佐伯 英二, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一, 秋元 哲. 離島診療所の外来診療で診断した Gitelman 症候群の一例. 第 116 回日本内科学会総会, 2019 年.

加藤 雅弘, 伊藤 貴美子, 児玉 由布子, 吉川 祥子, 稲川 明良, 沼田 侑也, 小島 大英, 鹿野 博明, 藤井 秀比古, 中嶋 義記, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一. 先天性腎性尿崩症と診断された女児の外来経過. 第 122 回日本小児科学会学術集会, 2019 年.

尾崎 健太郎, 高木 大輔, 森 崇寧, 具嶋 泰弘, 前原 潤一. TRPM6 遺伝子変異を有する低 Mg 血症の一例. 第 46 回日本集中治療医学会学術集会, 2019 年.

Mori T. Genome big data will open the way of the future in nephrology. 第 5 回次世代腎研究アカデミー, 2018 年.

Fujimaru T, Mori T, Mandai S, Chiga M, Kikuchi H, Ando F, Mori Y, Susa K, Isobe K, Iimori S, Nomura N, Naito S, Okado T, Rai T, Nagatsuji K, Nagahama K, Mishima E, Mochizuki T, Sekine A, Hoshino J, Ubara Y, Uchida S, Sohara E. Genomic Background of Adults with Suspected Ciliopathy on Renal Biopsy. ASN Kidney Week 2018, 2018 年.

Fujimaru T, Mori T, Sekine A, Mandai S, Chiga M, Kikuchi H, Ando F, Nomura N, Iimori S, Naito S, Okado T, Rai T, Hoshino J, Ubara Y, Uchida S, Sohara E. Genomic diagnosis of adult polycystic kidney disease with no family history. ISN Frontiers Meetings 2018, 2018 年.

Sohara E, Mori T, Uchida S. Development and application of comprehensive genetic testing system for major inherited kidney diseases, using next-generation sequencing with custom panels. 20th Nephrology Symposium, 2018 年.

藤丸 拓也, 蘇原 映誠, 森 崇寧, 関根 章成, 萬代 新太郎, 千賀 宗子, 菊池 寛昭, 安藤 史顕, 森 雄太郎, 野村 尚弘, 飯盛 聡一郎, 内藤 省太郎, 岡戸 丈和, 頼 建光, 星野 純一, 乳原 善文, 内田 信一. 家族歴のない成人多発性腎嚢胞患者における網羅的遺伝子解析を用いた遺伝子診断と臨床所見の検討. 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 2018 年.

関根 章成, 星野 純一, 藤丸 拓也, 小黒 昌彦, 水野 裕基, 川田 真宏, 住田 圭一, 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. 多発性嚢胞腎弧発例における遺伝子変異と臨床経過の関係性. 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 2018 年.

蘇原 映誠, 森 崇寧, 藤丸 拓也, 内田 信一. ゲノムから解く ADPKD 嚢胞性腎疾患の網羅的遺伝子解析システムの開発と応用. 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 2018 年.

森 崇寧, 藤丸 拓也, 安藤 史顕, 蘇原 映誠, 頼 建光, 内田 信一. Precision Medicine in Nephrology 腎臓病学の精密医療 次世代シーケンサーが変えた遺伝性腎疾患診療 網羅的遺伝子解析から精密医療を目指して. 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 2018 年.

岩崎 沙理, 島本 真実子, 藤丸 拓也, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 石津 明洋, 今本 鉄平, 石立 尚路, 辻 隆裕, 深澤 雄一郎. PKD1 変異を認めた Medullary cystic kidney disease(MCKD)の一例. 第 107 回日本病理学会総会, 2018 年.

中野 雄太, 村木 直弘, 石原 早織, 杉田 行平, 大橋 敦希, 山室 めぐみ, 熊谷 二郎, 長濱 清隆, 森 崇寧, 藤澤 一. 腎機能障害は軽度であり高カルシウム尿症を認めなかったが Dent 病と診断し得た成人男性の 1 例. 第 647 回日本内科学会関東地方会, 2018 年.

水野 裕基, 小黒 昌彦, 関根 章成, 川田 真宏, 平松 里佳子, 住田 圭一, 長谷川 詠子, 山内 真之, 早見 典子, 澤 直樹, 星野 純一, 乳原 善文, 高市 憲明, 原 茂子, 藤井 丈士, 大橋 健一, 小野江 為人, 川野 充弘, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一, 本田 一穂, 尾田 高志. 腎生検所見から何を学ぶか(No.62) 東京腎生検カンファレンス 常染色体優性遺伝形式の間質性腎炎の家族歴を有し遺伝子検査で ADTKD-UMOD と診断された男性の 1 例. 第 94 回東京腎生検カンファレンス, 2018 年.

財津 亜友子, 田中 征治, 江崎 拓也, 藤丸 拓也, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一, 山下 裕史朗. ADPKD と Liddle 症候群様所見を伴う PKD2 の large deletion 変異の 1 例. 第 53 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2018 年.

安澤 由香利, 中山 良朗, 本間 健一郎, 屋比久 賢光, 國場 司, 照屋 太輝, 仲村 武裕, 與 那嶺 正人, 上原 盛幸, 竹本 のぞみ, 仲村 英昭, 難波 豊隆, 河本 絵里子, 砂川 澄人, 植田 玲, 池間 朋己, 島尻 佳典, 森 崇寧, 内田 信一, 益崎 裕章. 若年発症で濃厚な家族歴より家族性高アルドステロン症 2 型が疑われた一家系. 第 91 回日本内分泌学会学術総会, 2018 年.

松村 一騎, 梅根 隆介, 中村 祐太, 黒部 由佳, 新井 英之, 村谷 良昭, 前田 兼徳, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一, 西野 友哉. 二つの Bartter 症候群責任遺伝子に複合ヘテロ接合体変異を認めた塩喪失腎症の 1 例. 第 48 回日本腎臓学会西部学術大会, 2018 年.

桑原 加奈子, 秋久 太良, 若山 慈恵, 真壁 志帆, 佐藤 尚代, 新田 孝作, 望月 俊雄, 種田 積子, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一. COL4A4 遺伝子新規ヘテロ接合体ナンセンス変異を認めた常染色体優性アルポート症候群の一例. 第 48 回日本腎臓学会東部学術大会, 2018 年.

酒匂 崇史, 関根 章成, 水野 裕基, 川田 真宏, 住田 圭一, 平松 里佳子, 長谷川 詠子, 山内 真之, 早見 典子, 諏訪部 達也, 森 崇寧, 蘇原 映誠, 内田 信一, 星野 純一, 澤 直樹, 乳原 善文, 高市 憲明. 偽性低アルドステロン症 2 型が強く疑われる一家系. 第 48 回日本

腎臓学会東部学術大会, 2018 年.

青木 雄平, 森戸 卓, 岩崎 千尋, 角田 幸雄, 本田 一穂, 森 崇寧, 藤丸 拓也, 蘇原 映誠,  
内田 信一, 波多野 道康. ARB により尿蛋白が著減した Bartter 症候群 3 型の一例. 第 48  
回日本腎臓学会東部学術大会, 2018 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学腎臓内科学 <https://tmd-kid.jp>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

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。