

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461246

研究課題名(和文)ゲノム情報に基づく腎尿細管間質性障害の新しい系統的診断フローの構築

研究課題名(英文)Systematic Differential Diagnosis for Tubulointerstitial Diseases Based on the Genome Information

研究代表者

塚口 裕康 (TSUKAGUCHI, Hiroyasu)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60335792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：【背景】腎尿細管間質病変は腎予後と密接に相関し、その進行・抑止が重要課題である。

【目的】原因分子を軸とした間質障害を系統的診断のための、基礎技術、情報基盤を構築する。【方法】次世代技術・疾患マーカーを用いて、家族性間質腎炎の疾患遺伝子を効率的に探索する。【目標】(1)原因遺伝子の系統的鑑別アルゴリズムの作成、(2)より簡便な原因探査を可能にする疾患マーカーや技術の開発、(3)次世代シーケンスによる未知疾患遺伝子の同定【効果】腎疾患の間質障害進展(CKD)に共通する分子機序解明に貢献し、腎不全進展抑止を通じて国民健康の増進に広く貢献する。

研究成果の概要(英文)：Tubulo-interstitial diseases play a key role in the pathogenesis of many chronic kidney diseases. These disorders are usually caused by complex interplay between genetic environmental factors, while some are ascribed to monogenic defects. Such Mendelian examples are autosomal-recessive nephronophthisis and autosomal-dominant medullary cystic kidney diseases. Both diseases share a common pathologic feature consisting of tubular atrophy, basement membrane irregularity, and cystic formation, and interstitial fibrosis. This study is aimed to elucidate the molecular causes of adult-onset autosomal dominant tubulointerstitial kidney diseases (ADTKD) and to generate a systematic differential diagnosis schema. Our data indicated that some ADTKD(10-20%) are caused by UMOD mutations. The relevance of MUC1 remains unknown because of the technical difficulty to identify the mutations in the variable number, tandem-repeat region (VNTR).

研究分野：腎臓内科学

キーワード：尿細管 遺伝子変異 腎不全 ネフロン シークエンス

### 1. 研究開始当初の背景

尿細管間質障害の程度は腎予後と相関しており、尿細管腔構造の恒常性の維持が、ネフロン機能を保つうえで必須と考えられる。尿細管間質炎は、遺伝子異常、自己免疫、薬剤性等と様々な原因で起こる多因子疾患で、ほとんどが孤発性である。しかし一部の症例は、家族性があり遺伝的要因で発症することが知られている。

若年性の尿細管間質障害は、ネフロン瘦 (Nephronophthisis) と呼ばれ、劣性遺伝を示す。現在まで 90 種を超える遺伝子が報告されており、ほとんどが繊毛(Cilia) 機能に関与しており、Ciliopathy と呼ばれている。多くが 15 歳までに腎不全になり、欧州では 30 歳までの腎不全の原因として最も頻度が高い。一方成人例は、常染色体優性遺伝に従い、30-50 歳で発症、50-60 歳で腎不全となる。約半数の髄質に小嚢胞形成を認める。その臨床的特徴から、髄質嚢胞腎 (Medullary Cystic Kidney Disease; MCKD, type 1 OMIM 174000 1q21, type 2 OMIM 603860, 16p12.3)、あるいは、家族性高尿酸血症性腎症 (Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy; FJHN, OMIM 162000, 16p12.3) と呼ばれてきた。あるいは欧米で報告されている主要原因遺伝子は、Uromodulin (*UMOD*), Mucin1 (*MUC1*) の 2 つである。どちらもヘンレループ上行脚~遠位尿細管の部分において、管腔側へと大量に分泌される蛋白である。

### 2. 研究の目的

尿細管間質性腎炎の中でも、優性遺伝形式に従う、成人型単一遺伝型家系を収集して、次世代シーケンス解析法により、原因遺伝子を同定し、その背景にある分子病態を明らかにする。わが国の成人優性遺伝型間質性腎炎における原因遺伝の分子疫学については、大部分は不明である。1-2 割程度の症例で、*UMOD* 変異の報告が散見されるのみである。原因分子の情報を基に、より簡便な診断法の開発や、実地で役立つ、系統的な鑑別診断フローチャートの構築に役立てる。

### 3. 研究の方法

ゲノム研究倫理委員会承認済みの計画書 (関医倫第 0805-1) に準拠し、同意書を取得した後、患者末梢白血球からゲノム DNA を抽出する。全エクソン 50Mb のライブラリー (Sureselect version 5) を作成した後、HiSeq 2000 で塩基配列を決定する。150-250bp 前後のライブラリーを、75bp ペアエンドでシーケンスし、リファレンスゲノム ht19 (GRCh37) にマッピングした。検出した変異体は、発現ベクターに組み込み、培養細胞 (HEK293T, HeLa 細胞) に発現し、その細胞局在や蛋白機能の評価を行った。

健常日本人のアレル頻度は、HGVD ( $n=1,286$ )、IJGVD ( $n=2,049$ ) を参考にした。アミノ酸置換の病原性の評価には、SIFT, Polyphen-II, Mutation Taster program を用いた。既知変異は、Clin Var, HGMD を参考にした。

重要性と意義: 尿細管障害の初期段階では、一般血液・尿所見における所見が乏しく、感度のよい疾患マーカーの開発が待たれている。家族性症例で得られる疾患情報を基に、尿細管間質障害の発症や進展の鍵を握る分子群を明らかにし、実地診療に役立つ迅速・簡便な診断法や標的治療薬の開発の基盤をつくる。

### 系統的鑑別と変異スクリーニング

臨床情報を基にフローチャート (図 1) に従い、鑑別を進めた。腎の画像形態、遺伝様式、合併症 (網膜症、貧血、神経・筋症状、尿路奇形の有無など) を参考にして最も可能性のある遺伝子を見当をつけた。MCKD/FJHN の範疇に属する症例について、まず *UMOD* を調べ、変異の無いものは、*MUC1* 変異を検討すると同時に、全エクソーム解析を行った。

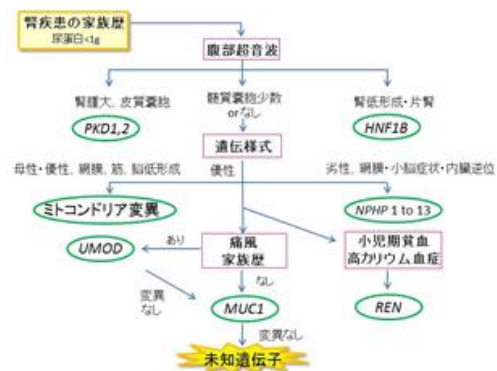


図 1 尿細管間質障害鑑別診断のフローチャート 腎マクロ形態や腎外合併症の情報を基に、原因となる疾患遺伝子の鑑別を行う。

家族性尿細管間質性腎炎 (優性遺伝) の臨床情報と検体 (血液・尿・唾液) サンプルの収集を行った。収集する診断基準とは、(1) 家系内の少なくとも 1 人 (発端者) が腎生検で尿細管間質性腎炎と診断されている、(2) 家族内の成員に、末期腎不全 (透析療法、あるいは CKD stage 3~5 (eGFR<60ml/分以下、蛋白尿陽性) がいる、の 2 項目を満たすものとした。軽症間質性障害の見逃しを防ぐために、血清尿酸値、尿酸クリアランス、高血圧の有無を調査した。腹部超音波で、髄質エコー輝度や嚢胞形成の確認、腎の大きさ、左右差を調べた。また症候性の可能性を考え、眼底、頭部 CT、心エコーなどの検査所見についても情報を収集した。家族サンプルの収集の完了した症例から、シーケンス解析を実施した。

#### 4. 研究成果

ADTKD の診断基準を満たす、優性 3 家系について、候補遺伝子ターゲットシーケンシング、エキソーム解析を行った。各候補遺伝子 20 リード以上のカバー率は、*MUC1* 82.0-89.7%, *UMOD* 95.3-97.5%, *SEC61A1* 94.1-100% であった。1 家系において *MUC1* の coding region 内にある Variable Number Tandem Repeat (VNTR) に C single base insertion がコールされた。一方、この挿入変異は、健常 582 chromosomes には検出されなかった。

しかし家系内の segregation をみると、罹患者 2 名以外に、尿所見のない家系内成員にも検出されており、(1) 浸透率は不完全、あるいは (2) 疾患の原因ではない、と考えられる。家系内にいるもう一人の罹患者の検体を収集中で、segregation の確認を行う予定である。一方、他の 2 例には、*UMOD*, *REN*, *HNF1b*, *MUC1*, *Sec61A1* のいずれの候補遺伝子にも、病的と断定できる塩基変化を検出できなかった。

このうち 1 家系は、連鎖解析マッピングで疾患遺伝子は 1q21 (*MCKDI*, OMIM 174000) にマップされていたが、今回のエキソーム解析では、*MUC1* 変異を検出できなかった。その理由としては、① *MUC1* 変異はあるが、技術的な問題があり、検出できなかった、あるいは、② *MUC1* 変異はない(すなわち、別の原因が潜在する)、の可能性を考え、解析を継続している。

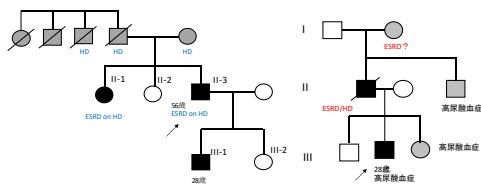


図 2 今回検討した優性型尿細管間質障害家系の例

#### 1) 病型分類

優性遺伝家族性尿細管間質腎炎は、一般に慢性の経過で尿細管変性・萎縮線維化が進行するものが多い。発症年齢、症状(尿蛋白、高尿酸血症)に幅があり、病理や生化学所見のみで診断することは難しい。また代表的な遺伝性尿細管性疾患である多発性嚢胞腎と違い、家族性尿細管間質腎炎では嚢胞形成は、軽微である。したがって超音波や画像診断を用いても、診断や病変の進行度を評価は難しい。このような背景から国際的にも、優性遺伝の間質障害を、Autosomal dominant tubulo-interstitial disorder ADTKD という新名称で総括し、原因遺伝子を基軸に疾患診断基準や亜型分類を改変しよう、という動向が見られる(KDIGO consensus report 2015)。本研究成果を基に、今後わが国の間質病変のリスク分子の実体の解明に貢献したい。

#### 2) 分子診断法の改善点

海外 ADTKD における、*MUC1* (NM\_001204285) 遺伝子変異の検出率は 10-40%、さらに厳選すると 80%に検出された、と報告されている。*MUC1* 変異は、その翻訳領域に 60bp からなる VNTR unit (20-125 反復する、GC content >80%) の中で、cytosine homopolymer 7C → 8C を生じる。挿入変異は症例ごとに異なるが、それぞれ特異的な部分に起こる、という特徴を有している。以上のことから厳密な意味では、VNTR 全域を解読しないと、どの位置に塩基挿入を生じたのか、確定しない (Brendan Blumenstiel, *J Mol Diagn* 18:1-6, 2016, Broad Institutes, MIT)。海外では、C 挿入を認識できる制限酵素 MwoI 処理後の断片多型を、MALDI-TOF で同定するという試みも行われている。一般の研究室では検出難しいリピート内 1 塩基挿入もあり、どのように迅速簡便に診断するか、その診断法やマーカーの考案が今後の課題である。現在、全ゲノム解析で、VNTR 変異を同定できるか、検討しているところである。

#### 3) 病態機序の解明と治療法開発にむけた基盤構築

*UMOD* と *MUC1* が、実際にどのように、尿細管障害を来すのか、詳しくはわかっていない。*UMOD* と *MUC1* は、ともにヘンレループ上行脚～遠位尿細管の管腔側へと分泌される蛋白で、本来は、粘膜面の保護に働くと考えられている。したがって、変異を有する患者では、尿細管上皮傷害を受けやすい状態となると、推測できる。

もう一つの可能性は、神経変性疾患をはじめとする、さまざまな疾患で見られる、変性 misfolding 蛋白の小胞体蓄積 (ER-Storage disease) である。*UMOD* 変異はミスセンス変異がほとんどで、Exon 3, 4 に集中しており、分子の折りたたみ、この部分が相互作用に重要な役割を演じると考えられる。一方 *MUC1* 変異は、フレームシフトを起こして、蛋白 truncation を起こすと考えられており、変異ムチンを尿中で検出可能か、今後検討を行う予定である。

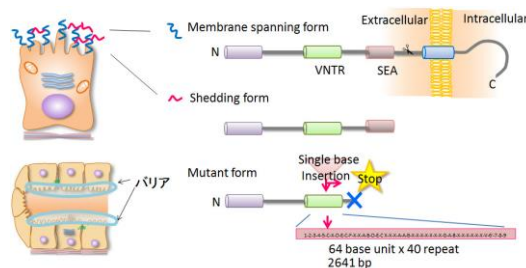


図 3 *MUC1* の局在と遺伝子変異 *MUC1* ヘンレループ～遠位にかけての尿細管に発現して粘膜面保護に働く。患者では *MUC1* 遺伝子翻訳領域内にある VNTR に一塩基挿入が起こり、フレームシフト→早期翻訳終止を来すと考えられている。

## 今後の方向性について：

これまで尿細管間質障害は、その臨床所見を指標として、高尿酸血症性腎症 (Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy; FJHN OMIM 162000) あるいは髄質嚢胞腎 (Medullary Cystic Kidney Disease; MCKD, type 1 OMIM 174000, type 2 OMIM 603860) と言われてきた。最近では、分子を軸にした疾患概念と再分類法、Autosomal dominant Tubulo-interstitial disorders (ADTKD) が提唱されている (KDIGO consensus report, *Kidney International* 2015)。今後は臨床の現場において遺伝子情報の活用が、重要になると予想される。

今回は、優性遺伝型多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease, *PKD1*, *PKD2* 変異による) に関しては、解析は行っていない。*PKD1* 遺伝子の前半 2/3 は、もともと 6 つの Pseudogene があり、解読が難しいことで知られている。最近は、次世代シーケンス法で変異をスクリーニングする試みが行われており、日本人の disease variant の実体も明らかになりつつある。今後の研究の発展に努力したい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Nakahigashi M, Tsukaguchi H\*, Morimoto S, Nakano C, Ueda, Someya K, Kusabe M, Kikuchi S, Takanobu Imada, Shiojima I. Determinants of the Change in Arterial Stiffness in Peritoneal Dialysis Patients: A Cross-sectional and Longitudinal Study After Initiation of Therapy *Int Heart Journal in press* 査読有
- 2) Yanishi M, Kimura Y, Tsukaguchi H, Koito Y, Taniguchi H, Mishima T, Fukushima Y, Sugi M, Kinoshita H, Matsuda T\*. Factors Associated With the Development of Sarcopenia in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 49(2):288-292, 2017. 査読有
- 3) Park E, Ahn YH, Kang HG, Miyake N, Tsukaguchi H, Cheong HI\*. *NUP107* mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2016 May 17. pii: gfw103. [Epub ahead of print] PMID: 27190346
- 4) Yoshida T, Nakamoto T, Yoshida K, Yanishi M, Inoue T, Murota T, Kinoshita H, Tsukaguchi H, Matsuda T\*. Comparison of Nephroscope-Assisted "Pulling-Thread" Technique and Conventional Open Placement of Peritoneal Dialysis Catheters in Patients with End-Stage Renal Disease. *Urology.* 2016 Jul 7.

pii: S0090-4295(16)30307-7. doi:

10.1016/j.urology.2016.06.019. 査読有

- 5) Miyake N, Tsukaguchi H\*, Koshimizu E, Shono A, Matsunaga S, Shiina M, Mimura Y, Imamura S, Hirose T, Okudela K, Nozu K, Akioka Y, Hattori M, Yoshikawa N, Kitamura A, Cheong HI, Kagami S, Yamashita M, Fujita A, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Ohashi K, Imamoto N, Ryo A, Ogata K, Iijima K, Matsumoto N. Biallelic Mutations in Nuclear Pore Complex Subunit *NUP107* Cause Early-Childhood-Onset Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Am J Hum Genet.*;97(4):555-66, 2015. 査読有
- 6) Yanishi M, Kinoshita H, Yoshida T, Takayasu K, Yoshida K, Mishima T, Sugi M, Tsukaguchi H, Kawa G, Matsuda T\*. Comparison of live donor pretransplant and recipient posttransplant renal volumes. *Clin Transplant.* 2016 Mar 1. doi: 10.1111/ctr.12727. [Epub ahead of print] 査読有
- 7) Yanishi M\*, Tsukaguchi H, Nguyen TH, Koito Y, Taniguchi H, Yoshida K, Mishima T, Sugi M, Kinoshita H, Matsuda T. Correlation of whole kidney hypertrophy with glomerular over-filtration in live, gender-mismatched renal transplant allografts. *Nephrology (Carlton).* Aug 30, 2016. doi: 10.1111/nep.12915. 査読有
- 8) Yanishi M\*, Tsukaguchi H, Yoshida T, Taniguchi H, Yoshida K, Mishima T, Komai Y, Yasuda K, Watanabe M, Sugi M, Kinoshita H, Matsuda T. A Case Report; Short-term Outcome and Quality of Life in Kidney Transplant Recipient with Monoclonal Gammopathy. *CEN Case Reports*,5:168-172, 2016. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 塚口裕康 わかるシリーズ 遺伝性腎疾患 (成人) 第 60 回日本腎臓学会学術総会 仙台国際会議場 2017 年 5 月 25 日-5 月 28 日
- 2) Tsukaguchi H, Genetic epidemiology of Steroid-Resistance Nephrotic Syndrome in Japanese Children, The 37th Annual Meeting of the Korean Society of Nephrology May 19, 2017, Seoul, Korea
- 3) Tsukaguchi H, International Symposium of Chonnam National University Children's Hospital 2016. Clinical and Genetic Aspects of Japanese Children with Familial Early-onset Steroid Resistant Nephrotic Syndrome, November 3, 2016
- 4) Miyake N, Tsukaguchi H, Koshimizu E, Shono A, Matsumoto N. Program # 2323: Biallelic *NUP107* mutations in early childhood-onset steroid resistant nephrotic syndrome. American Society of Human Genetics 2016 Annual Meeting, Vancouver October 19, 2016
- 5) 塚口裕康 ネフローゼ症候群 遺伝的要因 教育講演 第 46 回日本腎臓学会東部学術

大会 2016年10月7日、京王プラザホテル 抄録 日本腎臓学会誌 58巻6号 Page 747, 2016.

- 6) 木全貴久、塚口裕康、辻章志、三宅紀子、松本直通、金子一成 腎発生にかかわる遺伝子の異常と新たな腎外病変 Expanding Clinical Spectrum in congenital kidney disease 眼・耳・神経・筋の異常 Pierson 症候群の経験から 第59回日本腎臓学会学術総会 ワークショップ W-2-2, パシフィコ横浜 2016年6月17日-19日
- 7) Miyake N, Tsukaguchi H, Koshimizu E, Shono A, Matsunaga S, Shiina M, Mimura Y, Imamura S, Hirose T, Okudela K, Cheong HI, Ohashi K, Imamoto N, Ryo A, Ogata K, Iijima K, Matsumoto N. Biallelic *NUP107* Mutations Cause Early Childhood-Onset Steroid Resistant Nephrotic Syndrome. The 13th International Congress of Human Genetics 2016, April 3-7, Kyoto 第13回国際人類遺伝学会, 4月3-7日京都

[図書] (計 5 件)

- 1) 塚口裕康 『腎と透析』 82巻3号特集「腎臓医が知っておきたい分子遺伝学の進歩」 「3. 巣状分節性糸球体硬化症」p. 389-401, 2017 東京医学社
- 2) 塚口裕康 第5章-9 遺伝性ネフローゼ 腎と透析 80巻増刊号 「診療指針 2016」 212-232頁, 2016 東京医学社
- 3) 塚口裕康 特集 蛋白尿:病態と治療 巣状分節性糸球体硬化症と遺伝子 腎と透析 81巻1号, 77-90頁, 2016 東京医学社
- 4) 上田 啓子, 塚口裕康 【ネフローゼ症候群: 病因・病態と治療に関する最新の知見】
- 5) ネフローゼ症候群の病因 遺伝子異常(解説/特集) 腎と透析 76巻6号 801-810, 2014

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
塚口裕康 (TSUKAGUCHI, Hiroaysu)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 60335792

(2) 研究分担者  
該当なし ( )  
研究者番号:

(3) 連携研究者  
後藤真 (GOTO, Shin)  
新潟大学・歯学系・准教授  
研究者番号: 00463969

市田公美 (ICHIDA, Kimiyoshi)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80183169

井ノ上逸朗 (INOUE, Itsuro)  
国立遺伝学研究所, 総合遺伝研究系, 教授  
研究者番号: 00192500

(4) 研究協力者  
該当なし ( )