

平成30年 5月31日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09691

研究課題名(和文) 遺伝性塩類喪失性尿細管機能異常症の発症メカニズムの解明および治療法の開発

研究課題名(英文) The onset mechanisms for inherited salt-losing tubulopathies

研究代表者

野津 寛大 (Nozu, Kandai)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70362796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはTarget sequenceにより、既知の遺伝性尿細管機能異常症の網羅的診断体制の確立を行なった。その結果、3年間でおよそ150例の遺伝子診断を行い、また現在も毎月5-10検体の解析依頼を受けるに至っている。その結果、1. ギッテルマン症候群イントロン内変異の新規同定法の開発およびイントロン内変異の病原性検索方法の確立、2. 新規Copy Number Variation検索法の確立および新規偽性Bartter症候群発症原因遺伝子HNF1B欠失の同定、3. 遺伝性高カルシウム尿性低カルシウム血症における偽性バーター症候群発症機序の解明等を行った。

研究成果の概要(英文)：We established a comprehensive diagnostic system for inherited salt-losing tubulopathies by targeted sequencing. As a result, we have performed genetic diagnosis of approximately 150 cases in three years, and now we have received analysis requests of 5-10 samples monthly. As a result, 1. Established the methodologies for identification of deep intronic mutations in Gitelman syndrome, and for pathogenicity search of intra-intron mutations, 2. Established the novel methodology for detecting Copy Number Variation and identified HNF1B deletion which was causative variant for pseudo-Bartter syndrome. 3. We clarified the mechanism of the development of pseudo - Bartter syndrome in hereditary hypercalcemic hypocalcemia.

研究分野：遺伝性腎疾患

キーワード：塩類喪失性尿細管機能異常症 バーター症候群 ギッテルマン症候群

1. 研究開始当初の背景

国内における遺伝性塩類喪失性尿細管機能異常症の遺伝子診断体制が未整備であり、その全体像が一切明らかとされていなかった。また、そのため、その病態や、遺伝子型と臨床像の相関など一切不明であり、国内における診断体制の確立およびその病態解明が必須であった。

2. 研究の目的

(1) 最新の解析技術を用いた最大規模の患者数における遺伝子型と臨床像の相関関係の解析、(2) 同疾患群における新規の遺伝子の検索を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

日本人全患者において、最新の解析技術を駆使し網羅的遺伝子診断体制を確立し、その病態の解明を行う。Whole exome sequence や array CGH により、新規の遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) 私たちはTarget sequenceにより、既知の遺伝性尿細管機能異常症の網羅的診断体制の確立を行なった。その結果、3年間でおよそ150検体の遺伝子診断を行い、現在も毎月5-10検体の解析依頼を受けるに至っている。このように、日本国内における遺伝性尿細管機能異常症の診断を一手に引き受けるに至っている。

(2) ギッテルマン症候群におけるイントロン内新規遺伝子同定方法の開発を行った。同疾患においては常染色体劣性遺伝性疾患であるにも関わらず、約30%の患者

でヘテロ接合体変異のみしか検出されないことがすでに報告されている。私たちは次世代シーケンサーを用いて、イントロン内のすべての領域のスクリーニングを行い、検出された変異がスプライシングに影響を与えるかにつき、網羅的に解析するシステムの構築を行った (J Hum Genet 2017)。

(3) 遺伝性尿細管機能異常症において、イントロン内の変異を検出し、その pathogenicity が不明であった場合、minigeneを作成し、培養細胞にtransfectし、mRNAを回収することにより、イントロン内変異がsplicingに影響を与えるかどうかを調べる機能解析系を確立した。それにより、検出したイントロン内変異の pathogenicity を検索することが可能となった (BMC Nephrol 2017, Eur J Med Genet. 2017)。

(4) 偽性バーター症候群を呈した遺伝性高カルシウム尿性低カルシウム血症の患者を発見し、その偽性バーター症候群発症機序の解明を行った。(Clin Exp Nephrol, 2016)

(5) 遺伝性尿細管機能異常症において、原因遺伝子にCopy Number Variation (CNV) が存在する場合は、次世代シーケンサーでは検出できないとされていた。私たちは正常者と患者の次世代シーケンサーデータを比較するpair analysisを行うことにより、CNVの検出が可能であることを見だし、報告を行った。また同時にHNF1B遺伝子の欠失により偽性バーター症候群を発症することを初めて報告した (Clin Exp Nephrol, 2018 in press)。

(6) 診断の非常に難しい遺伝性低マグネシウム血症の診断フローチャートを作成し報告を行った (Clin Exp Nephrol, 2017)。

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 18件)

1. Fu XJ, Nozu K, Eguchi A, Nozu Y, Morisada N, Shono A, Taniguchi-Ikeda M, Shima Y, Nakanishi K, Vorechovsky I, Iijima K. X-linked Alport syndrome associated with a synonymous p.Gly292Gly mutation alters the splicing donor site of the type IV collagen alpha chain 5 gene. *Clin Exp Nephrol*, 2016;20:699-702 (査読あり)
2. Fu XJ, Nozu K, Kaito H, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Yoshikawa N, Ohtsubo H, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Matsumura C, Takagi N, Maekawa K, Taniguchi-Ikeda M, Iijima K. Somatic mosaicism and variant frequency detected by next-generation sequencing in X-linked Alport syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2016;24:387-391 (査読あり)
3. Kamiyoshi N, Nozu K, Fu XJ, Morisada N, Nozu Y, Ye MJ, Imafuku A, Miura K, Yamamura T, Minamikawa S, Shono A, Ninchoji T, Morioka I, Nakanishi K, Yoshikawa N, Kaito H, Iijima K. Genetic, Clinical, and Pathologic Backgrounds of Patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2016;11:1441-1449 (査読あり)
4. Kamiyoshi N, Nozu K, Urahama Y, Matsunoshita N, Yamamura T, Minamikawa S, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Kaito H, Iijima K. Pathogenesis of hypokalemia in autosomal dominant hypocalcemia type 1. *Clin Exp Nephrol*, 2016;20:253-257 (査読あり)
5. Matsunoshita N, Nozu K, Shono A, Nozu Y, Fu XJ, Morisada N, Kamiyoshi N, Ohtsubo H, Ninchoji T, Minamikawa S, Yamamura T, Nakanishi K, Yoshikawa N, Shima Y, Kaito H, Iijima K. Differential diagnosis of Bartter syndrome, Gitelman syndrome, and pseudo-Bartter/Gitelman syndrome based on clinical characteristics. *Genet Med*, 2016;18:180-188 (査読あり)
6. Ohtsubo H, Okada T, Nozu K, Takaoka Y, Shono A, Asanuma K, Zhang L, Nakanishi K, Taniguchi-Ikeda M, Kaito H, Iijima K, Nakamura S. Identification of mutations in FN1 leading to glomerulopathy with fibronectin deposits. *Pediatr Nephrol*, 2016;31:1459-1467 (査読あり)
7. 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. Female X-linked Alport syndrome with somatic mosaicism. *Clin Exp Nephrol* 2017;21(5):877-83. (査読あり)
8. Nakanishi K, Nozu K, Hiramoto R, Minamikawa S, Yamamura T, Fujimura J, Horinouchi T, Ninchoji T, Kaito H, Morisada N, Ishimori S, Nakanishi K, Morioka I, Awano H, Matsuo M, Iijima K. A comparison of splicing assays to detect an intronic variant of the OCRL gene in Lowe syndrome. *Eur J Med Genet* 2017;60(12):631-34. (査読あり)
9. Nozu K, Iijima K, Igarashi T, Yamada S, Kralovicova J, Nozu Y, Yamamura T, Minamikawa S, Morioka I, Ninchoji T, Kaito H, Nakanishi K, Vorechovsky I. A birth of bipartite exon by intragenic deletion. *Mol Genet Genomic Med*, 2017;5:287-294 (査読あり)
10. 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. Characterization of contiguous gene deletions in COL4A6 and COL4A5 in Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis. *J Hum Genet*, 2017;62:733-735 (査読あり)

11. Horinouchi T, Nozu K, Kamiyoshi N, Kamei K, Togawa H, Shima Y, Urahama Y, Yamamura T, Minamikawa S, Nakanishi K, Fujimura J, Morioka I, Ninchoji T, Kaito H, Nakanishi K, Iijima K. Diagnostic strategy for inherited hypomagnesemia. *Clin Exp Nephrol* 2017;21(6):1003-10. (査読あり)

12. Yamamura T, Morisada N, Nozu K, Minamikawa S, Ishimori S, Toyoshima D, Ninchoji T, Yasui M, Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Nakanishi K, Nishio H, Iijima K. Rare renal ciliopathies in non-consanguineous families that were identified by targeted resequencing. *Clin Exp Nephrol*, 2017;21:136-142 (査読あり)

13. 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. Natural History and Genotype-Phenotype Correlation in Female X-Linked Alport Syndrome. *Kidney Int Rep* 2017;2(5):850-55 (査読あり)

14. Tsuji Y, Nozu K, Sofue T, Hara S, Nakanishi K, Yamamura T, Minamikawa S, Nozu Y, Kaito H, Fujimura J, Horinouchi T, Morisada N, Morioka I, Taniguchi-Ikeda M, Matsuo M, Iijima K. Detection of a Splice Site Variant in a Patient with Glomerulopathy and Fibronectin Deposits. *Nephron* 2018;138(2):166-71. (査読あり)

15. Yamamura T, Nozu K, Miyoshi Y, Nakanishi K, Fujimura J, Horinouchi T,

Minamikawa S, Mori N, Fujimaru R, Nakanishi K, Ninchoji T, Kaito H, Mariko TI, Morioka I, Matsuo M, Iijima K. An in vitro splicing assay reveals the pathogenicity of a novel intronic variant in ATP6V0A4 for autosomal recessive distal renal tubular acidosis. *BMC Nephrol* 2017;18(1):353. (査読あり)

16. Minamikawa S, Nozu K, Nozu Y, Yamamura T, Taniguchi-Ikeda M, Nakanishi K, Fujimura J, Horinouchi T, Shima Y, Nakanishi K, Hattori M, Kanda K, Tanaka R, Morisada N, Nagano C, Sakakibara N, Nagase H, Morioka I, Kaito H, Iijima K. Development of ultra-deep targeted RNA sequencing for analyzing X-chromosome inactivation in female Dent disease. *J Hum Genet* 2018. Epub ahead of printings (査読あり)

17. 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. Detection of copy number variations by pair analysis using next-generation sequencing data in inherited kidney diseases. *Clin Exp Nephrol* 2018. Epub ahead of printings (査読あり)

18. Yamamura T, Nozu K, Ueda H, Fujimaru R, Hisatomi R, Yoshida Y, Kato H, Nangaku M, Miyata T, Sawai T, Minamikawa S, Kaito H, Matsuo M, Iijima K. Functional splicing analysis in an infantile case of atypical hemolytic uremic syndrome caused by digenic mutations in C3 and MCP genes. *J Hum Genet* 2018. Epub ahead of printings (査読あり)

[学会発表](計 16 件)

1. シンポジウム男女共同参画「genderと腎-遺伝性腎疾患」 野津寛大、飯島一誠 第59回日本腎臓学会 2016年6月18日 パシフィコ横浜(横浜市)
2. シンポジウム 遺伝性腎疾患の研究から学んだ大切なこと-研究の楽しさと臨床へのフィードバック-野津寛大 第120回日本小児科学会学術集会 2017年4月15日 グランドプリンスホテル新高輪(東京)
3. シンポジウム 遺伝性疾患におけるエクソスキッピング療法の現状と腎疾患への応用の可能性 野津寛大、庄野朱美、飯島一誠 第60回日本腎臓学会 2017年5月26日 仙台国際センター(仙台市)
4. シンポジウム ゲノム情報を臨床へ-遺伝性腎疾患へのアプローチ-バイオサイエンスデータベースを使った解析手法 野津寛大 第52回日本小児腎臓病学会学術集会 2017年5月28日 京王プラザホテル(東京)
5. Pathogenesis for hypokalemia in case with autosomal dominant hypokalemia Kamiyoshi N, Nozu K, Minamikawa S, Yamamura T, Matsunoshita N, Otsubo H, Ninchoji T, Shima Y, Nakanishi K, Iijima K, The 13th Korea-China-Japan Pediatric Nephrology Seminar 2015.5.9 Seoul (Korea)
6. Genetic, pathological and clinical backgrounds in autosomal dominant Alport syndrome, Nozu K, Kamiyoshi N, Minamikawa S, Matsunoshita N, Yamamura T, Ninchoji T, Tanaka R, Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K, 48th European Society for Pediatric Nephrology, 2015.9.4 Porto (Portugal)
7. Somatic Mosaicism and Variant Frequency Detected by Next Generation Sequencing in X Linked Alport Syndrome, Kamiyoshi N, Nozu K, Fu X.J, Yamamura T, Minamikawa S, Ninchoji T, Iijima K. The American Society of Nephrology Annual Meeting, 2015.10.6 San Diego (USA)
8. Comprehensive Approach to Understand Human Renal Development Based on the Identification of Responsible Genes for CAKUT, Shono A, Morisada N, Nozu K, Iijima K, The American Society of Nephrology Annual Meeting, 2015.10.6 San Diego (USA)
9. Pathological and genetic aspects of the siblings with congenital/infantile nephrotic syndrome. Minamikawa S, Nozu K, Hara S, Nakanishi K, Fujimura J, Horinouchi T, Yamamura T, kamiyoshi T, Ninchoji T, Iijima K The 14th China-Japan-Korea Pediatric Nephrology Seminar 2016.5.7 Beijing (China)
10. Genetic and clinical characteristics of female X-linked Alport Syndrome:267case study Yamamura T, Nozu K, Nakanishi K, Horinouchi T, Fujimura J, Minamikawa S, Kamiyoshi N, Ninchoji T, Kaito H, Morisada N, Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K 17th Congress of the International Pediatric Nephrology Association 2016.9.22 Iguazu, (Brazil)
11. Characteristics of genetic and biomolecular backgrounds in patients with LAMB2 related nephropathy Minamikawa S, Nozu K, Nakanishi K, Yamamura T, Ninchoji T, Shima Y, Nakanishi K, Iijima K Kidney Week of the American Society of Nephrology 2016.11.18 Chicago (USA)
12. Diagnostic strategy for inherited hypomagnesemia, Horinouchi T, Nozu K, Kamei K, Shima Y, Yamamura T, Minamikawa S, Nakanishi K, Fujimura J, Ninchoji T, Kaito H, Nakanishi K, Iijima K, The 15th Japan-China-Korea Pediatric Nephrology, 2017.4.8, Tokyo (Japan)
13. In vitro splicing assays to detect intronic

pathogenic variants in inherited kidney disease
Nakanishi K, Nozu K, Fujimura J, Horinouchi
T, Minamikawa S, Yamamura T, Ninchoji T,
Kaito H, Yoshikawa N, Iijima K 50th European
Society for Pediatric Nephrology, 2017.9.8
Glasgow (UK)

14. A variety of phenotypes reflected by
genotypes and laminin β 2 expression on
glomerulus in Pierson syndrome. Minamikawa
S, Nozu K, Fujimura J, Nakanishi K,
Horinouchi T, Yamamura T, Ninchoji T, Kaito
H, Yoshikawa N, Iijima K 50th European
Society for Pediatric Nephrology, 2017.9.8
Glasgow (UK)

15. A comprehensive diagnosis by targeted
sequencing for clinically suspected Alport
syndrome patients in Japan Yamamura T, Nozu
K, Fujimura J, Horinouchi T, Nakanishi K,
Minamikawa S, Shono A, Ninchoji T, Kaito H,
Shima Y, Nakanishi K, Iijima K 13th Asian
Congress of Pediatric Nephrology, 2017.10.7,
Kuala Lumpur (Malaysia)

16. The utility of urinary CD80 as a diagnostic
maker in patients with renal diseases
Minamikawa S, Nozu K, Fujimura J,
Nakanishi K, Horinouchi T, Yamamura T,
Kaito H, Iijima K 13th Asian Congress of
Pediatric Nephrology, 2017.10.7, Kuala
Lumpur (Malaysia)

〔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

野津 寛大 (NOZU, Kandai)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70362796

(2) 研究分担者

飯島 一誠 (IIJIMA, Kazumoto)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00240854

(3) 研究分担者

庄野 朱美 (SHONO, Akemi)
関西医科大学・医学部・研究員
研究者番号：00240854