

令和元年5月31日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16086

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたADPKDのTwo-hit theoryの検証。

研究課題名(英文)Verification of ADPKD's Two-hit theory using next-generation sequencer

研究代表者

藤村 順也(Fujimura, Junya)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：10793713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の病態の解明を目的として、患者の血液検体および摘出腎などを用いて、two-hit theoryの検討および解明を行い、最終的にはその知見から新たな治療法の可能性を探る目的で研究を行った。同意が得られた症例のNGSでの解析およびSanger法での直接での確認を行った。スクリーニングの検索効率向上のために、疾患パネルの作成を試みている。患者血液由来のDNAと同時に患者から摘出した腎臓の嚢胞上皮細胞から抽出したDNAについても検査を行う予定であり、摘出腎臓からの組織片を用いた培養細胞の確立の手技を過去の文献を参考に確立し、手技の統一化を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

常染色体優性多嚢胞腎(ADPKD)は最も発症頻度の高い遺伝性腎疾患で60歳までに約半数が末期腎不全に至る。その発症仮説として先天性のPKD遺伝子異常に加え、生後の対立遺伝子への変異挿入やその他の刺激により発症する“Two-hit theory”が有力と考えられている。Two-hit theoryにおけるSecond hitの本体を解明することを目的として解析をおこなった。現在2つの変異が数例の血液検体から見つかっている。この病態理論の解明をすることで新たな治療の知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated and elucidated two-hit theory using blood samples and isolated kidneys of patients for the purpose of elucidation of the pathophysiology of autosomal dominant poly cystic kidney disease (ADPKD), and finally from the findings The research was conducted in order to find out the possibility of new treatment. Analysis with NGS of the case where consent was obtained and direct confirmation with Sanger method were performed. In order to improve the search efficiency of screening, we are trying to create a disease panel specialized for PKD1 and PKD2 genes. We did examining DNA extracted from patient's blood-derived DNA as well as DNA extracted from cystic epithelial cells of the kidney, which were isolated from the patient, and refer to the past literature for techniques for establishing cultured cells using tissue fragments from the isolated kidney established and standardized the procedure.

研究分野：腎臓

キーワード：ADPKD 次世代シーケンサー two-hit theory



関連遺伝子、細胞増殖に關与する mRNA、上記検討で病態に關与する可能性のある miRNA の下流に存在する mRNA の発現量を RNA-seq を用いて網羅的に解析を行う。それにより mRNA 発現レベルと細胞増殖能との相関を検討する。

#### 4 . 研究成果

(1)当初の1年間では同意が得られ、血液および摘出腎の検体を収集できた ADPKD 患者は他施設からの協力例も含めて6例であった。これらの ADPKD 患者6例について、第一に血液検体を用いて、NGS での解析を行い、two-hit theory の前提となる1つ目の遺伝子異常の検索を行った。すでに3例で1つ目の遺伝子異常を同定している。そこで、2つ目の遺伝子変異を NGS で再度、検索するために、PKD1 遺伝子、PKD2 遺伝子に特化した疾患パネルを作成し、それを用いて NSG で検索を行う予定である。しかし、pseudo gene などの問題もあり、NGS ではスクリーニングとしての解析困難な部分が多々見つかった。NGS で read できていないエクソンが複数個発見されたのである。(右図参照)それらの部位については直接、sanger 法で確認を行って解析を行ったところ、さらに2例で遺伝子変異を見つけることができた。NGS でのスクリーニングでの感度を上げるために、疾患パネルの作成について検討および協議を行っているが、現時点ではまだ完成には至っていない。



(2)また、患者血液由来の DNA と同時に腎臓摘出術や移植術を施行した患者から摘出した腎臓の嚢胞上皮細胞から抽出した DNA についても検索を行う予定である。これにより腎臓の嚢胞上皮細胞で生じているであろう second-hit の有無の検討を行っていくことが可能となる。そのために嚢胞上皮細胞から組織片を用いて、嚢胞上皮細胞の培養を行う手技を過去の文献をもとに確立し、その手技・手法についても統一化を図った。これにより腎由来細胞での mRNA 解析なども行うことが可能になったと考える。

(3)しかし、当初の想定よりも NGS での検索頻度が低かったことなどが影響し、研究の成果としての two-hit theory の検証は実現できなかった。しかし、検証に向けての土台作りとしての疾患パネルの作成などは非常に意義があると考ええる。このパネル作成ができれば時間・労力ともに大きく改善し、進展が見込めると考える。また血液由来での遺伝子変異と嚢胞上皮細胞での遺伝子変異との検討を行うことが two-hit theory の解明に向けて大きく役立つことが想定される。そのためにも数少ない摘出腎から嚢胞上皮細胞の培養・樹立ができれば研究としての安定化を図ることができる。簡便かつ確実な培養方法の樹立が望まれるが、組織片を用いた培養細胞の分離も今回の解析の中で可能なことがわかった。検体数のある程度確保し、なおかつ疾患パネルができた段階で次世代シーケンサーなどを用いて解析を行うことを予定していた。摘出腎臓自体は想定よりも多くの検体が集まっている。今後も摘出腎からの細胞分離を行い、来るべき解析に備えている。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：飯島一誠  
ローマ字氏名：Iijima Kadumoto

研究協力者氏名：野津寛大  
ローマ字氏名：Nozu Kandai

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。