

令和 3 年 4 月 11 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16700

研究課題名(和文)先天性腎尿路疾患における新規原因遺伝子の探求

研究課題名(英文) investigation of the new gene causing congenital anomalies of kidney and urinary tract

研究代表者

大塚 泰史(Ohtsuka, Yasufumi)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：50448479

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)：先天性腎尿路異常CAKUTは小児慢性腎臓病の6割を占める。CAKUTの原因として約20の遺伝子異常が知られているが、患者の10%未満にしかみられるず、90%は原因が不明である。今回重症のCAKUTを多く認めた日本人2家系を対象に、エクソーム解析とジェノタイプング解析を用いてパラメトリック連鎖解析を行い、日本人の新規遺伝子異常を探求する研究を行った。結果、エクソーム解析では病的変異はなく、2家系について遺伝継承様式(優性モデル、相加モデル、劣性モデル)に基づくパラメトリック解析を行ったが、明らかな原因は発見できなかった。今後エピジェネティック機構の異常も踏まえて検討すべき疾患と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性腎尿路異常CAKUTは小児慢性腎臓病の6割を占める。CAKUTの原因として約20の遺伝子異常が知られているが、患者の10%未満にしかみられるず、90%は原因が不明である。CAKUTは出生500人に1人みられる頻度の多い病態のため、その原因探索は重要である。今回、CAKUTを多く認める2家系を対象に、現在可能な網羅的遺伝子解析と、新規遺伝子推定を行ったが、明らかな異常は見いだせなかった。本病態が遺伝子異常ではない可能性もあり、今後さらなる研究が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Congenital anomaly of kidney and urinary tract (CAKUT) accounts for 60% of chronic kidney disease in children. About 20 genomes are known to cause CAKUT, but they occur in less than 10% of patients, and 90% of them have an unknown cause. We explore new gene abnormalities in Japanese by a parametric linkage analysis and genotyping analysis in two Japanese families with many severe CAKUTs. As a result, there were no pathological mutations in the exome analysis. The parametric analysis was performed on the two families based on the inheritance pattern (dominant model, additive model, recessive model), but no clear cause could be found. It is considered to be a disease that should be examined in consideration of abnormalities in the epigenetic mechanism.

研究分野：小児腎泌尿器

キーワード：CAKUT先天性腎尿路異常 エクソーム解析 ジェノタイプング パラメトリック連鎖解析

### 1 . 研究開始当初の背景

CAKUTは進行した小児CKDの約 60%を占め、本邦の小児腎代替療法を施行された患者において約40%の原因である。出生500人に1人の高頻度で生じるため、CAKUTの原因究明は重要である。(日児腎誌26(2): 330 -340 2013)

遺伝学的原因は約20の遺伝子異常(劣性遺伝、優性遺伝、CNV)が知られているが(表1)(CJASN 15: 723-731, 2020.) CAKUTにおいてこれらが検出される頻度は10%未満と低く、多くの症例で遺伝子異常を確認できない)。以前より連鎖解析やハプロタイプ解析による遺伝子同定がなされており、近年では多人数を対象としたゲノムワイド関連解析とは別に、家族例や小規模解析に対するエクソーム解析、Copy number variations(CNVs)といったゲノム構造解析がなされており、新規のCAKUT原因遺伝子が報告されている。

CAKUTの発生は、胎生28～32週の後腎発生における尿管芽の出芽と分岐と後腎間葉の分化機構(間葉-上皮転換; MET)に關与する因子の異常と考えられ、実際、Pax2やWt-1など既知の遺伝子異常の關与がみられる。CAKUTの原因は既知の遺伝子異常を確認するとともに、既知遺伝子異常がない症例については、これら因子に關連した遺伝子を探索することで新規遺伝子異常を探求できる可能性がある。

表1 CAKUT の遺伝的リスク因子 (CJASN 15: 723-731, 2020.)

Single gene polymorphism	HNF1b	PAX2	SIX1	SIX5	EYA1	SALL1
	GATA3	FREM2	FRAS1			
Copy number variants	1q21	4p16.1-16.3	16p11.2	16p13.11	17q12	22q11.2

### 2 . 研究の目的

我々が2019年に診療した患者でCAKUT102名、慢性腎臓病29名があり、その中でCAKUTが原因で腎機能障害を伴う患者は約40名あった。このようにCAKUTは一般的な疾患であるが、上記のようにすべての原因が明らかになっていない。また本邦で多くのCAKUTを対象に、エクソームおよびジェノタイピングを用いた網羅的遺伝子解析を実施した研究は少ない。本研究では、本邦におけるCAKUT原因遺伝子の網羅的解析を行うことを目的とする。

### 3 . 研究の方法

対象(表2): 家系1は、尿道狭窄、馬蹄腎、低形成腎による慢性腎不全の男児であり、父に尿道狭窄(内視尿道切開術)の既往がある。家系2は両側低形成腎、膀胱尿管逆流によるCKDの男児を有し、母、兄に片側の膀胱尿管逆流の手術歴がある。2家系に血族婚はない。

2家系の全員末梢血DNAを用いて、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行う。

2家系全員の末梢血DNAを用いてマイクロアレイによるジェノタイピングを行い、欠失や重複など構造異常を確認するとともに、ハプロタイプ情報を得る。SNPデータは、東芝製ジェノタイプアレイ(座位数659709座位)で解析し、解析ソフトは、品質評価はplink、家系矛盾はPEDSTATS、連鎖解析はMERLINを用いた。解析はSNPデータの品質を評価した後、それらのデータをもとにパラメトリック連鎖解析を行った。パラメトリック連鎖解析は、3つの遺伝継承様式(優性モデル、相加モデル、劣性モデル)に基づく解析を行った。各解析の遺伝継承様式と浸透率は以下の通りとなった。疾患関連座位におけるマイナーアレル頻度は、0.0001に設定し

た。CAKUT に関連する新規遺伝子が抽出できた場合、Sanger 法を用い家系内について遺伝子異常を確認する予定とした。

#### 4. 研究成果

2 家系 8 名のエクソーム解析結果を表 2 に示す。SNV の結果において、Missense variant は各対象で 1200 程度あった。Nonsense variant は 120 程度みられ、すべて確認し、pathogenic variant はなかった。InDel 結果では、Frameshift、Insertion、Deletion、Insertion-Deletion がそれぞれ、約 300、150、200、10 未満見られた。これも全て確認したが、Pathogenic variant は認めなかった。

表2 2家系のエクソーム解析結果

エクソーム結果		家系1				家系2			
		対象1	対象2	対象3	対象4	対象5	対象6	対象7	対象8
		父	母	姉	弟	父	母	兄	弟
		尿道狭窄	なし	なし	尿道狭窄 馬蹄腎 低形成腎 慢性腎臓病 stage5D	なし	膀胱尿管逆流 (片側)	膀胱尿管逆流 (片側)	膀胱尿管逆流 (両側) 低形成腎 慢性腎臓病 stage4
SNV情報	Missense	12642	12960	12861	12531	12666	12778	12634	12685
	Nonsense	128	123	129	117	133	127	127	125
InDel情報	Frameshift	306	302	316	299	318	297	300	299
	Insertion	147	160	153	157	157	166	165	164
	Deletion	199	192	202	213	206	197	199	190
	Insertion-Deletion	3	4	3	2	2	2	2	1

2 つの家系について、それぞれ別形質として解析した。

##### 1. SNP チップの品質評価結果

個体あたりの CR 各個体の CR をチップごとに算出した。遺伝型データがある個体の Call Rate はすべて 99% 以上であり、本解析では除外される個体はなかった。

##### 2. IBD による近親係数

SNP データが観測されている各個体ペアについて、IBD を算出した。NIBD の基準期待値 (PIHAT) が 0.9 以上の 2 個体を同一個体と判断するが、データ内に同一個体の混在は確認されなかった。

##### 3. SNP の品質評価

CallRate 0.75 は 1691 座位、MAF=0 (MMONO SNP 204244 座位あり除外した)。

##### 4. 家系矛盾の評価

家系情報をもとに、SNP データの矛盾を検出した。ジャポニカアレイでは 2517 座位の遺伝型データの矛盾が確認された。これらのデータは解析対象から除外した。

##### 5. パラメトリック連鎖解析

それぞれの解析について 結果を以下のファイルにまとめた。染色体ごとの LOD スコア図(pdf ファイル)と、選択した座位の LOD スコアテーブルを作成した。

家系 1 優性モデル (1~22 番染色体で一部正、負の値を認める)

相加モデル (LOD スコア ほぼ 0)

劣性モデル (LOD スコア ほぼ 0)

家系 2 優性モデル (1~22 番染色体で一部正、負の値を認める)

相加モデル (1~22 番染色体で一部正、負の値を認める)

劣性モデル (LOD スコア ほぼ 0)

本解析では、LOD score の有意水準(3.3 以上)を超える領域はなかった。Family2 で一部みられ

た、LOD score が負の値である領域は、形質との関連性が低い領域と考えられた。

6 . 候補遺伝子が推定できなかったため、Sanger 法による確認は実施しなかった。

考察：CAKUT の既存の遺伝子異常が判明していない 2 家系について新規病因遺伝子を探求するため本研究を行った。2 家系ともに CKD ステージ 4 以上の患者と、類似の CAKUT を家族内に認める家系で、CAKUT の病歴が濃厚な家系であった。エクソーム解析では、候補遺伝子となりうる挿入、欠失、また Frameshift などの病的変異は認めなかった。SNV については、新規異常を疑った variant であっても病的変異とは直ちに言及することは困難のため、パラメトリック連鎖解析の方向から研究を進めた。しかし両家系ともに LOD スコアはほぼ 0 であったことから、遺伝子変異の推定はできなかった。これら結果から、この 2 家系が単一遺伝子疾患とは言及できなかった。

現在 CAKUT の発症機序については、単一遺伝子異常、CNV 異常、Common variant の可能性、エピゲノム機構が提示されている (Clin J Am Soc Nephrol. 2020 Dec 31;16(1):128-137)。本研究の結果から、この 2 家系の研究を進めるには、エピゲノム機構の解析が必要である。現在、全ゲノムもしくは包括的なエピゲノム解析が可能であるため、検討をしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大塚泰史	4. 巻 60
2. 論文標題 Alport症候群の診断と治療	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 小児科	6. 最初と最後の頁 1647-1644
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 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 Konishi KI, Mizuochi T, Yanagi T, Watanabe Y, Ohkubo K, Ohga S, Maruyama H, Takeuchi I, Sekine Y, Masuda K, Kikuchi N, Yotsumoto Y, Ohtsuka Y, Tanaka H, Kudo T, Noguchi A, Fuwa K, Mushiake S, Ida S, Fujishiro J, Yamashita Y, Taguchi T, Yamamoto K.	4. 巻 214
2. 論文標題 Clinical Features, Molecular Genetics, and Long-Term Outcome in Congenital Chloride Diarrhea: A Nationwide Study in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pediatr.	6. 最初と最後の頁 151-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpeds.2019.07.039	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚泰史
2. 発表標題 超音波で腎臓のサイズを確認しよう!
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚泰史
2. 発表標題 アルポート症候群～新たな展開～ アルポート症候群とBardoxolone Methyl
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 造血幹細胞移植後の合併症リスクの検出方法、予測診断薬及びキット	発明者 大塚泰史/岡村浩史/ 中前博久/進藤岳郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-015286	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------