

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17275

研究課題名（和文）糖尿病性腎臓病の全ゲノムシーケンスデータによるゲノム構造多型解析および機能解析

研究課題名（英文）Genomic structural variation analysis of diabetic kidney disease using whole genome sequencing data accompanied with functional analysis

研究代表者

菅原 有佳（Sugawara, Yuka）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70841881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎臓病の79例の全ゲノムシーケンスデータを臨床情報とともに解析し、疾患発症や臨床病型に関連する1塩基多型およびshort In/Del、さらに構造多型の検出を行った。1塩基多型およびshort In/DelについてはACMGガイドラインでpathogenic/likely pathogenicのものを抽出し、その頻度を既報と比較したところ、既報よりも多いとの結果を得た。構造多型については糖尿病性腎臓病の表現型に関連するものを12検出することができた。これらの頻度調査を大規模コホートに依頼中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生活習慣病とされる本邦糖尿病性腎臓病症例において、腎疾患・糖尿病・炎症等に関係のあるpathogenic/likely pathogenicな多型が相当数発見され、本疾患の治療においては生活習慣の是正に加え、遺伝学的背景からのアプローチも今後必要とされることが示唆された。また、疾患原性のある多型を保持する症例を見分けることは臨床病型からは難しいことも示唆された。さらに、これまで本疾患に対する構造多型の関与は明らかではなかったが、疾患の表現型に相関する構造多型が検出されたことから、構造多型の疾患への寄与も示唆される結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Whole genome sequencing data of 79 cases of diabetic kidney disease were analyzed with clinical information to detect single nucleotide polymorphisms, short In/Del, and structural variations associated with disease onset and/or clinical phenotype. The frequency of single nucleotide polymorphisms and short In/Del classified as pathogenic/likely pathogenic by the ACMG criteria was compared with that of previously reported cases, and the frequency was found to be higher than past reports. For structural variations, 12 variations related to the phenotype of diabetic kidney disease were identified. These frequency studies are being requested for a large cohort.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：whole genome sequence 糖尿病性腎臓病 構造多型

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は“生活習慣病”として知られ、特に糖尿病による腎障害は長期の糖尿病罹患を経て発症することが多いことから、糖尿病性腎臓病は患者の“身から出た錆”かのように考えられている節がある。しかし申請者は「糖尿病性腎臓病は本当に“生活習慣病”なのか」「遺伝的背景がまだ十分解明されていないのではないか」という問いを抱いていた。糖尿病性腎臓病の遺伝要因としては、GWAS等を用いてSNVやshort In/Delが検討されてきているが(Salem RM, *J Am Soc Nephrol*, 2019, van Zuydam NR, *Diabetes*, 2018)、ゲノムの構造多型の検討はまだなされていない。ここから、糖尿病性腎臓病においてもゲノムの構造多型が遺伝要因に関わっており、その解明が、糖尿病性腎臓病の診療を個別医療の点で将来的に大きく転換させる可能性を秘めていると考えていた。

その中で、特に補体関連因子に着目する。申請者はこれまで補体関連疾患の遺伝子解析に携わり、C3腎症における稀な疾患原性構造多型の存在を報告した(Sugawara Y, *Kidney Int Rep*, 2019)。その研究活動の中で糖尿病と補体に関しての研究が昨今複数報告されていること(Flyvbjerg A, *Nat Rev Nephrol*, 2017, Rasmussen KL, *Clin Chem*, 2018, Li XQ, *Diabetes Metab*, 2019)に着目した。また、ゲノム上には構造多型が起こりやすいとされる“hotspot”が存在するが(Lin YL, *Genome Biol Evol*, 2019)、補体関連遺伝子の一部(CFH, CFHR1等)は“hotspot”上に存在し、実際に補体関連遺伝子の構造多型(CFHR3/CFHR1欠損)と他腎疾患との関連が報告されていることから(A.G. Gharavi, *Nat Genet*, 2011, J Zhao, *PLoS Genet*, 2011)、糖尿病性腎臓病においても補体関連遺伝子の構造多型の探索が必要と考えた。

さらに、糖尿病性腎臓病において疾患感受性SNVが報告されている炎症・代謝関連遺伝子等についても構造多型の関与を探索する必要があった。炎症・代謝関連遺伝子等の既に糖尿病との関連がSNVやshort In/Delの検討にて報告されている遺伝子のうち“hotspot”上に存在するものは、構造多型の検討において重要なターゲットだと考えた。

また、昨今の次世代シーケンス技術の発達に伴い大量の変異・多型が報告されている中で、変異・多型はby-standerではなく本当に病的であるのか?という点は慎重に検討すべきであると考えた。よって、今回探索を行う構造多型についても、その病態への寄与を明らかにするために変異タンパクの作成及びそれを用いた細胞実験による機能解析を行うことを目的とした。

この研究により新規遺伝子変異・多型を発見し病態解明に寄与することで、糖尿病性腎臓病患者が不当な自責の念を抱かない助けになると同時に、創薬など治療のターゲットとなりうるものを発見したいと考えた。

この患者さんはこんなに食事改善・運動など取り組んでいるのに悪化していく…どうしてだろうか?



糖尿病は『生活習慣病』? 遺伝的背景をより明らかにしたい

<糖尿病性腎症 50 例の全ゲノムシーケンスデータ解析>

- ① single nucleotide variant, short insertion/deletion
- ② 重複、欠失、転座、融合遺伝子といったゲノムにおける構造多型

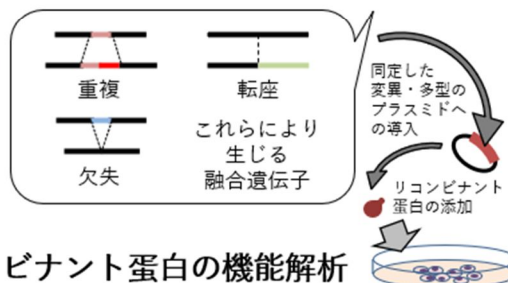
これまでゲノムの構造多型の解析はほぼ行われていない!

着目する遺伝子群

a. 補体関連遺伝子

最近になり糖尿病と補体は注目されている  
IgA腎症やループス腎炎で関連の報告あり

b. 炎症・代謝関連遺伝子



## 2. 研究の目的

糖尿病性腎臓病患者の全ゲノムシーケンスデータを解析し、糖尿病性腎臓病の発症や表現型(蛋白尿の出現)に関わる遺伝子変異・多型、特にゲノムの構造多型の解析を行う。第一に補体関連遺伝子群、第二に炎症・代謝関連遺伝子群などのこれまで糖尿病と関連があると報告された遺伝子を主たるターゲットとし、特に構造多型が起こりやすいとされる“hotspot”上に存在するものは重点的に解析を行うことを目的とする。また、検出された変異・多型についてリコ

ピナント変異蛋白を用いた機能解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 補体・炎症・代謝・糖尿病・先天性腎尿路異常 (CAKUT) 関連遺伝子における SNV, short In/Del の抽出

申請者の所属施設には既に糖尿病性腎臓病コホートが存在し、全ゲノムシーケンズデータ (短鎖リード、Illumina HiSeq X ten) を有していた (倫理申請番号 G10132)。まず、既報を参照し、補体・炎症・代謝・糖尿病・先天性腎尿路異常 (CAKUT) 関連遺伝子 790 個のリストアップを行った。次に、全ゲノムシーケンズデータを Trimmomatic-0.39, bwa 0.7.17-r1188, samtools:1.12 + htlib 1.12, gatk-4.2.61 で処理した vcf ファイルから、790 遺伝子における SNV や short In/Del を抽出した。さらに、ACMG criteria で pathogenic likely pathogenic に分類される SNV, short In/Del のみを抽出した。これを有する症例の頻度を算出するとともに、有する症例と有さない症例の臨床情報の比較検討を行った。抽出した変異・多型については、健常人における大規模データとの頻度の比較も実施した。健常人データとしては、国際的な the Genome Aggregation Database (gnomAD)、日本人データとして ToMMo 54KJPN-SNV/INDEL Allele Frequency Panel を参照した。

抽出された SNV, short In/Del については、全ゲノムシーケンズデータの深度が浅い場合には Sanger 法による存在確認も実施した。

#### (2) 補体・炎症・代謝・糖尿病・CAKUT 関連遺伝子における構造多型の探索

補体・炎症・代謝・糖尿病・CAKUT 遺伝子群におけるゲノム構造多型の解析を行った。bam ファイルをインプットファイルとし、構造多型検出ソフトウェア Manta を用いて、上記遺伝子群における構造多型の探索を行った。ゲノム解析のためのソフトウェアは日々新規に開発が行われており、研究遂行期間中に新規構造多型ソフトウェア GRIDSS も導入し、これを用いた探索も行った。GRIDSS での解析においては、Manta からのアウトプットファイルをもとに探索領域の指定を行った。

解析に用いた糖尿病性腎臓病コホートには蛋白尿陽性症例と陰性症例が含まれ、この 2 群で有意に保持頻度が異なる 12 の構造多型を抽出した。この中のいくつかは long PCR 法を用いての存在確認を実施した。さらに、外部コホートにおける validation を行うため、東北メディカルメガバンクとの共同研究を開始し、同バンク内の糖尿病合併の有無および蛋白尿の有無の 2 条件で 4 群に分類し、これらの症例における上記 12 構造多型の頻度調査を依頼した。

#### (3) 糖尿病性腎臓病に関連する多型の機能解析

1), 2) で検出された多型について、機能解析を行うことを検討した。血漿中に分泌される因子の場合は、リコンビナントタンパク質を発現・精製し、腎臓培養細胞 (足細胞、血管内皮細胞、メサングウム細胞等) の上清に添加することで、糖尿病条件下 (高グルコース培地) での細胞死、形態異常等を解析し、細胞への病態生理学的活性を評価し、血漿中に分泌される因子でない場合は、動物腎臓検体での免疫染色等により同定した当該の補体因子が発現の強い細胞に相当する培養細胞に変異を導入し、同様に糖尿病条件下での病態生理学的活性の評価を行うこととした。

### 4. 研究成果

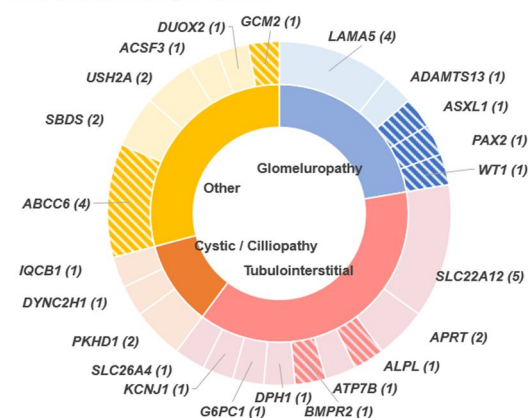
#### (1) 補体・炎症・代謝・糖尿病・先天性腎尿路異常 (CAKUT) 関連遺伝子における SNV, short In/Del の抽出

##### 結果

糖尿病性腎臓病患者 79 例の全ゲノムシーケンズデータより vcf ファイルが得られた。これらの症例には臨床情報が付随していた。なお、糖尿病性腎臓病の診断は臨床的になされたものであり、腎生検が行われたのは一部の症例のみである。79 例の臨床背景としては、平均 70.3 歳、糖尿病性網膜症を有しているのは 25 例 (31.6%)、腎疾患の家族歴があるのは 9 例 (12.3%) であった。シーケンズの深度は平均で 16 程度であった。

79 例のうち、27 例 (34.2%) が補体・炎症・代謝・糖尿病・CAKUT 関連遺伝子群 (790 遺伝子) における pathogenic あるいは likely pathogenic な SNV, short In/Del (以降、“Target variant” と呼ぶ) を保持していた。Target variant のシーケンズ深度が浅い場合など validation が必要と考えられる際には Sanger 法を実施した。Target variant は 24 遺伝子 (29 箇所) に分布していた (図 1)。全て

図1. 発見されたtarget variant



の target variant は heterozygous であった。

Target variant 保持群と非保持群の臨床情報の比較を実施した。ベースラインの臨床情報については、腎機能 (eGFR) や尿蛋白量 (尿中アルブミン/クレアチニン比) には差はなかった。保持群では非保持群に比べ、腎疾患の家族歴がある症例が多かった (保持群 6 例 (24.0%) vs. 非保持群 3 例 (6.3%))。

また、target variant のうち常染色体顕性遺伝形式と登録されているものは、10 例 (2.7%) に認められた。この 10 例のうち、3 例は糖尿病性網膜症を合併しており糖尿病性腎臓病が強く疑われる症例であった。また、腎疾患の家族歴があるのは 2 例のみであった。

## 考察

臨床的に診断された糖尿病性腎臓病 79 例において、腎疾患・糖尿病等関連 790 遺伝子群における pathogenic/likely pathogenic な多型は 34.2% と多くに認められた。Target variant の保持割合は、類似の既報 (慢性腎臓病全体の 9%、糖尿病性腎臓病の 2% [EE Groupman, *N Engl J Med*, 2019], 糖尿病性腎臓病の 22% [Lazaro-Guevara J, *Am J Nephrol*. 2021], 慢性腎臓病の 21% [Bleyer AJ, *Am J Nephrol*. 2022]) よりも多かった。これは、以前よりもデータベースがアップデートされ pathogenic/likely pathogenic として登録された多型が増えたことや、既報との対象集団の違い (対象疾患の違い (糖尿病性腎臓病の定義)、人種差など) などが理由として考慮される。今回の結果から、臨床的に糖尿病性腎臓病と診断される場合でも、完全に生活習慣からくるわけではなく、背景に補体・炎症・代謝・糖尿病・CAKUT 関連遺伝子多型がある可能性が示唆された。

さらに、本研究を遂行する中で「どの糖尿病性腎臓病症例に遺伝子検査を行うべきかの優先順位付けを臨床所見からできないか」というクリニカルクエスチョンが芽生え、pathogenic/likely pathogenic の variant がある症例とない症例で臨床所見の比較を行った。我々の結果では、検査値等において有意差があるものは残念ながら見つからなかった。しかしながら、遺伝性疾患の性質からは当然のことではあるが、腎疾患の家族歴については target variant で多い傾向にあった ( $p=0.055$ )。腎疾患の家族歴があることは糖尿病性腎臓病において遺伝子検査を考慮する際の一つの指標になる可能性が示唆された。

さらに、常染色体顕性遺伝形式と登録されている target variant を持った 10 例のみに限った場合 (すなわち、今回検出された 1 つの多型だけで発症する可能性が高い症例の場合) においても、糖尿病網膜症を合併している症例が 3 名含まれていた。すなわち、糖尿病網膜症という糖尿病性腎臓病の存在が強く示唆される状況であっても、遺伝素因が関わっている可能性があることが示唆された。また、先述の内容と反対に、腎臓病の家族歴があったのは 10 名中 2 名のみであることから腎臓病の家族歴がなくても遺伝素因が関わっている可能性があることがわかる。なお、家族歴がない場合、上の世代が variant を持っていなくともその症例が De novo で variant を保持し始めた可能性や、浸透率が低い variant であり上の世代も持っていたが発症していない可能性などが考慮される。

## (2) 補体・炎症・代謝・糖尿病・CAKUT 関連遺伝子における構造多型の探索

### 結果

糖尿病性腎臓病患者 79 例のうち、蛋白尿陽性群 36 例 / 蛋白尿陰性群 43 例に分け、糖尿病性腎臓病において蛋白尿出現に関連する構造多型の検出をまず試みた。なお、(1)と同様、糖尿病性腎臓病の診断は臨床的になされたものであり、腎生検が行われたのは一部の症例のみである。79 例の臨床背景としては、平均 70.3 歳、糖尿病性網膜症を有しているのは 25 例 (31.6%)、腎疾患の家族歴があるのは 9 例 (12.3%) であった。シークエンスの深度は平均で 16 程度であった。

全ゲノムシークエンスデータより得られた bam ファイルをインプットファイルとして、構造多型検出ソフトウェア Manta での処理を行った。さらに、Manta で処理済みのファイルから BED ファイルを作成し、その領域における構造多型を新規構造多型検出ソフトウェアである GRIDSS を用いて検出した。Manta では 213 遺伝子、GRIDSS では 110 遺伝子における構造多型が検出された。なお、申請者は、複数の非典型溶血性尿毒症症候群の症例において構造多型を発見し、その際に構造多型の存在確認を long PCR 法で実施した (Sugawara Y, *J Hum Genet*, 2022)。今回の糖尿病性腎臓病症例に発見された構造多型のうちいくつかにつき、同様の手法を用いて、構造多型の存在確認実施をした。

蛋白尿の有無による 2 群で、遺伝子毎の SV 保持率を比較 ( $p<0.05$  を discovery threshold として設定) したところ、12 候補遺伝子が抽出された。このうち、蛋白尿陽性群で構造多型保持頻度が多かったのは 5 遺伝子、蛋白尿陰性群で構造多型保持頻度が多かった遺伝子は 7 遺伝子であった。これらについて、大規模コホートである東北メディカル・メガバンク機構にて、糖尿病合併の有無および蛋白尿の有無による 4 群における保持率の調査を依頼中である。

さらに、蛋白尿の有無を従属変数とし、年齢・性別・ベースラインでの腎機能・各多型の有無等を独立変数としてモデルを作成した場合、どの多型が蛋白尿の有無に有意に関連しているかの調査も現在実施中である。

## **考察**

糖尿病性腎臓病において蛋白尿の出現に有意に関連する構造多型が検出された。これまで本疾患において構造多型が発症や表現型に関連するという報告はなかったが、本研究から関連する可能性が示唆された。これについては大規模コホートでの検証結果を待ち、あわせて論文報告する予定である。

### **(3) 糖尿病性腎臓病に関連する多型の機能解析**

(1)・(2)で同定された糖尿病性腎臓病に関連する多型の機能解析を速やかに実施すべく、予備実験を実施し準備済みであった。しかしながら、当初想定したよりも多くの構造多型が検出されたことから、現時点で機能解析を実施するよりも更なる絞り込みを実施することの優先度の方が高いと考えられ、研究期間内に本項目の実施には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugawara Yuka, Kato Hideki, Nagasaki Masao, Yoshida Yoko, Fujisawa Madoka, Minegishi Naoko, Yamamoto Masayuki, Nangaku Masaomi	4. 巻 68
2. 論文標題 CFH-CFHR1 hybrid genes in two cases of atypical hemolytic uremic syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 427 ~ 430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-023-01129-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toyohiro Hashiba, Yuka Sugawara, Yosuke Hirakawa, Dai Sato, Reiko Inagi, Masaomi Nangaku
2. 発表標題 Frequency of Diagnostic Variants of Kidney Disease in Patients with Diabetic Kidney Disease: A Single-Center Investigation
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuka Sugawara
2. 発表標題 ESTABLISHMENT OF J-KIDNEY-BIOBANK, CONSISTING OF JAPANESE CKD CASES WITH MULTI-OMICS DATA.
3. 学会等名 66th annual meeting of the Japanese society of nephrology (Japanese society of nephrology/America society of nephrology Joint Symposium)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------