

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659420

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた多発性嚢胞腎の新しい遺伝子診断法の確立

研究課題名(英文)Genetic diagnosis by next generation sequencing in polycystic kidney disease

研究代表者

望月 俊雄(Mochizuki, Toshio)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00277120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ターゲットDNAを用いた次世代シーケンス法にてADPKD患者102人中79人にPKD1あるいはPKD2の遺伝子変異が検出され、その検出率は77.5%であった。67人(85%)のPKD1遺伝子変異の内訳は、ナンセンス変異が18人(27%)、1-3塩基の挿入・欠失が13人(19%)、スプライシング変異が5人(7%)、ミスセンス変異が31人(46%)であった。12人(15%)のPKD2遺伝子変異の内訳は、ナンセンス変異が7人(58%)、1塩基の挿入・欠失が3人(25%)、ミスセンス変異が2人(17%)であった。従来のキャピラリー・シーケンス法と比較して、短時間で結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In seventeen-nine of one hundred and two ADPKD patients, the mutations of PKD1 or PKD2 gene were found by next generation sequencing method using target-enrichment DNA system. The detection rate was 77.5%. In sixty-seven mutations of PKD1 gene, eighteen nonsense mutation (27%), thirteen small deletion or insertion (19%), five splicing mutation (7%), thirty-one missense mutation (46%) were found. In twelve mutations of PKD2 gene, seven nonsense mutation (58%), three small deletion or insertion (25%), no splicing mutation and two missense mutation (17%) were found. PKD mutations by next generation sequencing method using target-enrichment DNA system were detected in a short time in comparison with the conventional capillary sequencing method.

研究分野：腎臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：多発性嚢胞腎 ADPKD PKD1 PKD2 遺伝子変異 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、遺伝性腎疾患の中で最も頻度の高い疾患(3,000~4,000人に1人)である。加齢とともに嚢胞が両腎に増加、進行性に腎機能が低下し、70才までに約半数が末期腎不全に至る。原因遺伝子(PKD1およびPKD2遺伝子)が発見され、その遺伝子機能や発症機序が徐々に解明されてきた。さらに近年、臨床治験(バソプレッシン受容体拮抗薬やmTOR阻害薬など)もすでに国内外で行われていた。一方、シーケンス法は格段の進歩を遂げ、次世代シーケンサーの登場により、ヒト全ゲノムを数日のうちに解析できるようになった。本研究は、根本的治療が確立されつつあるADPKDに対して、その早期診断ならびに除外診断を行うための遺伝子変異解析研究であり、また次世代シーケンサーを用いることで迅速で精度の高いものにしようとする研究と考えた。

上述したように、いくつかの臨床治験がすでに行われており、近い将来根本的治療の確立が期待されている。本疾患は進行性であり、治療法が確立されれば、早期診断・早期治療が望ましい。診断は超音波検査により容易であるが、除外診断は40才までできない(*J Am Soc Nephrol.* 20: 205-12, 2009)。また、そこで、研究者は(1)若年者ならびに腎移植ドナー候補ではむしろ除外診断が重要であると考え、それには精度の高い遺伝子診断が必要になる、(2)従来のキャピラリー・シーケンス法での解析は非常に複雑で、精度も低く、時間も相当かかる、などを考慮し、次世代シーケンサーを利用した新たなADPKD遺伝子診断法を確立する研究を進めることとした。

2. 研究の目的

常染色体多発性嚢胞腎(ADPKD)における早期診断ならびに除外診断を行うため、次世代シーケンサーを用いた、迅速で、精度の高い、新しいADPKD遺

伝子診断法を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ADPKD患者血液からのゲノムDNAの抽出を行い、まずPKD1遺伝子ならびにPKD2遺伝子のエクソン部分のPCR産物をキャピラリー・シーケンス法にて遺伝子変異解析を行う。次にPKD1ならびにPKD2遺伝子領域を含むゲノムの特定領域をターゲットDNA濃縮法により選別し、「次世代シーケンサー」にてシーケンシングを行い、それを既報のヒトゲノム配列と比較することにより、遺伝子変異解析を行う。

(1) 対象患者の選定ならびに同意取得
腹部超音波、CT、MRIなどの画像検査にてADPKDと診断されている患者を対象とし、東京女子医科大学「遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」で承認された「多発性の嚢胞腎における遺伝子解析研究」計画書に基づき、同意説明文書を用いて説明し、同意を得る。

(2) 対象患者の診療情報の収集
同意が得られた患者から診療情報を収集する。年齢、性別、出生地(都道府県)、家族歴、既往歴、画像診断情報(超音波、CT、MRIなど)、尿・血液などの検査データ、合併症の有無(高血圧、肝嚢胞、脳動脈瘤など)などを診療情報として収集し、個人情報保護法に基づき連結可能匿名化を行う。

(3) ゲノムDNAの抽出
同意が得られた患者から末梢血液(ヘパリン採血10ml)を採取し、ゲノムDNAを抽出する。

(4) 次世代シーケンサーによるPKD遺伝子変異解析

ターゲットDNA濃縮法によるPKD1ならびにPKD2遺伝子領域を含むゲノムの特定領域の選別

次世代シーケンシングは全ゲノムのシーケ

ンシングを超高速に解析することができる画期的な新技術だが、特定のゲノム領域にターゲットを絞るのが難しいといわれている。しかし、最近開発され、きわめて効率の高いハイブリッド選択技術をベースとした SureSelect Target Enrichment システム[®] (アジレント・テクノロジー社) を使用し、*PKD1* ならびに *PKD2* 遺伝子領域を含むゲノムの特定領域を選別する。

RNA オリゴヌクレオチド (ベイト) のデザイン

断片化されたゲノム DNA を選別するため、120-mer の RNA プローブ (ベイト) のデザインを行う。エクソン領域をカバーするベイト・グループとイントロンも含むゲノムをカバーするベイト・グループを作製する。*PKD1* の複製領域では 6 個の偽遺伝子のゲノム DNA も選別される可能性があるため、ベイト・グループを通常の 7 倍量にする。ヒトゲノムにおいて認められる「繰り返し配列」は排除する。

特定領域ゲノム DNA の選別 (キャプチャー)

断片化したゲノム DNA 3 μg をピチオン化されたベイトとハイブリダイズさせ、ストレプトアビジンで標識された磁気ビーズでキャプチャーされた RNA-DNA を回収する。さらにビーズを洗浄、RNA を切断し、DNA のみを回収する。

次世代シーケンサーによるシーケンシングならびにその解析

次世代シーケンサーとして Life Technologies SOLiD システムを使用する。従来のキャピラリー・シーケンス法とは異なり、一つの塩基が何であるか (ACGT のいずれか) ではなく、DNA 断片の塩基配列がリードとして読み込まれるため、特に *PKD1* 遺伝子の複製領域では特異的な配列かどうかをコンピュータ解析の段階で判断する。

(5) 従来の方法 (キャピラリー・シーク

エンス法) による *PKD* 遺伝子変異解析
PKD1 遺伝子 (3'側の 3 分の 1 を占める単一コピー領域) ならびに *PKD2* 遺伝子の解析

各エクソンを挟むようなプライマーを設定し、PCR 法にてゲノム DNA を増幅する。PCR 産物をキャピラリー・シーケンス法にて塩基配列を決定する。エクソンの大きさにもよるが、基本的にはエクソン・イントロン境界のスプライシング部位を含むエクソンの塩基配列を決定できるように、100 ~ 600 塩基対 (bp) の PCR 産物が得られるようにプライマーを設定する。*PKD1* 遺伝子 (単一コピー領域) では エクソン 35 からエクソン 46 までを網羅するように 5 対のプライマーを作製 (*Mutat Res* 458:77-84,2001) *PKD2* 遺伝子ではエクソン 1 からエクソン 15 までを網羅するように 18 対のプライマーを作製する (*Genomics* 44:131-136,1997)。

PKD1 遺伝子 (5'側の約 3 分の 2 を占める複製領域) の解析

この領域は第 16 番染色体長腕 (16p13.1) に存在する 6 個の偽遺伝子と 95 ~ 98% の相同性をもつ。真の *PKD1* 遺伝子のみを増幅する (偽遺伝子が増幅されない) ように、*PKD1* 遺伝子に特異的な塩基配列をもつ部位にプライマーを設定しなければならない。しかし、そのような部位は少なく、通常の PCR 法では増幅できるようにプライマーを設定できないため、Long range PCR を行う。その PCR 産物を鋳型として、各エクソンを挟むようなプライマーを設定し、通常の PCR 法にて DNA を増幅し (nest PCR)、キャピラリー・シーケンス法にて塩基配列を決定する (*Kidney Int* 61:1588-99,2002)。具体的には、エクソン 1 (2.3kb)、エクソン 2 ~ 12 (8.7kb)、エクソン 13 ~ 15 (4.4kb)、エクソン 15 ~ 21 (3.4kb)、エクソン 22 ~ 34 (7.5kb) で Long range PCR を行った後、それぞれ 1 対、6 対、2 対、3 対、4 対のプライマー・ペアを作製し、

next PCR を行い、キャピラリー・シーケンス法にて塩基配列を決定する。

4. 研究成果

(1) 対象患者の同意取得ならびにゲノム DNA の抽出

ADPKD 患者 102 人の患者の同意を取得し、ゲノム DNA を抽出した。

(2) ターゲット DNA 濃縮法を用いた次世代シーケンサーによる PKD 遺伝子変異解析

PKD1 ならびに PKD2 遺伝子領域を含むゲノムの特定領域をターゲット DNA 濃縮法により選別し、「次世代シーケンサー」にてシーケンシングを行った。102 人中 79 人に PKD1 あるいは PKD2 の遺伝子変異が検出され、その検出率は 77.5% であり、Long range PCR 法を用いた検出率約 70% (J Am Soc Nephrol 23:915-33, 2012) を上回った。なお、これらの変異は、全てキャピラリー・シーケンス法で確認された。

(3) PKD 遺伝子変異の分析

79 人の変異のうち、PKD1 遺伝子変異が 67 人 (85%)、PKD2 遺伝子変異が 12 人 (15%) に認められており、その割合はこれまでの報告と同様であった。PKD1 遺伝子変異 (67 人) では、短絡型変異が 36 人 (54%) であり、その内訳はナンセンス変異が 18 人 (27%)、1~3 塩基の挿入・欠失が 13 人 (19%)、スプライシング変異が 5 人 (7%) であった。また、非短絡型変異、すなわちミスセンス変異が 31 人 (46%) であった。PKD2 遺伝子変異 (12 人) では、短絡型変異が 10 人 (83%) であり、その内訳はナンセンス変異が 7 人 (58%)、1 塩基の挿入・欠失が 3 人 (25%) であったが、スプライシング変異は認められなかった。また、非短絡型変異、すなわちミスセンス変異が 2 人 (17%) であった。

(4) まとめ

従来のキャピラリー・シーケンス法に比較して、短時間で結果を得ることができた。特に複雑なゲノム領域 (PKD1 遺伝子) を含んでいたが、ターゲット DNA 濃縮法による解析が成功したことが本研究の最も大きな成果であった。今後は、検出されなかった患者 (23 人、22.5%) について、検出感度の低い領域を特定し、キャピラリー・シーケンス法を行うなど、工夫を重ねていきたい。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 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 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

望月 俊雄 (MOCHIZUKI, Toshio)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：00277120

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：