

特集：最新の腎臓領域の基礎研究

遺伝子ビッグデータが切り開く次世代の腎臓病学

Genome big data will open the way of the future in nephrology

森 崇寧 内田 信一

Takayasu MORI and Shinichi UCHIDA

遺伝子解析は新しい時代へ

1. ヒトゲノム解析の変遷

30億塩基対にも及ぶヒト全ゲノム配列の解明に向け、1990年より米国を主導としたヒトゲノムプロジェクトが始動した。従来のサンガーシーケンス法を用い、膨大な労力と投資のもと実に13年という年月をかけてヒトの全ゲノム配列が明らかにされた。その後、2006年前後よりゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study : GWAS)が盛んに実施されるようになり、ゲノム全体を巨視的に捉えられるようになった。病気や症状と関連性のある一塩基多型(single nucleotide polymorphism : SNP)が次々と同定され、これに伴って疾患感受性遺伝子の同定も相次いだ。ほぼ同時期には次世代シーケンス(Next Generation Sequencing : NGS)法が開発され、その原型が姿を現わした。2010年前後より広く一般の研究機関や企業に普及し始め¹⁾、現在は大学を含めた多くの教育研究施設に導入されるに至っている。表に示すように、従来のサンガーシーケン

ス法と比較した場合、そのシーケンス速度やデータ量の違いは歴然であり、13年かけて解析されたヒトの全ゲノム配列は、わずか数日で解析可能なレベルに到達した。2014年頃、1人当たりの全遺伝子配列決定コストがわずか\$1,000という\$1,000ゲノム時代到来が宣言されて間もなく、昨年2017年にイルミナ社より発表されたNovaSeq™システムを用いれば\$100ゲノムも目指せるというのは驚きである。まさに、個々人の全遺伝子配列が明らかにされるパーソナルゲノム時代が到来したといえる。

2. 失われた遺伝力(missing heritability)の問題

NGSによる遺伝子配列解析技術の進歩とほぼ時を同じくして、GWASも盛んに行われてきた。この結果、多くの疾患感受性遺伝子が同定され、高インパクトファクター誌への掲載論文が量産された一方で、ゲノム医療のターゲットとして実用化されたものはほとんど存在しない。この理由の一つに、「失われた遺伝力(missing heritability)」の問題があると考えられている。GWASによって同定されたSNPは、統計的に有意である(疾患との相関性がある)と判定さ

表 サンガーシーケンス法と次世代シーケンス(NGS)法の比較

テクノロジー	ラン当たりの時間	リード長	ラン当たりのリード数	ラン当たりのデータ量(byte)
サンガーシーケンス法 (例 ライフテクノロジーズ社 3730xl DNA Analyzer)	1時間	約100 ~800塩基	1~96本	~67 kilo
次世代シーケンス法 [§] (例 イルミナ HiSeq X)	3日	150塩基 x2	60億本(デュアルフローセルの場合)	~1.8 tera ^{**}

** tera : 10⁹ kilo

§ スペックデータはイルミナ社の公開する情報に基づく理想値

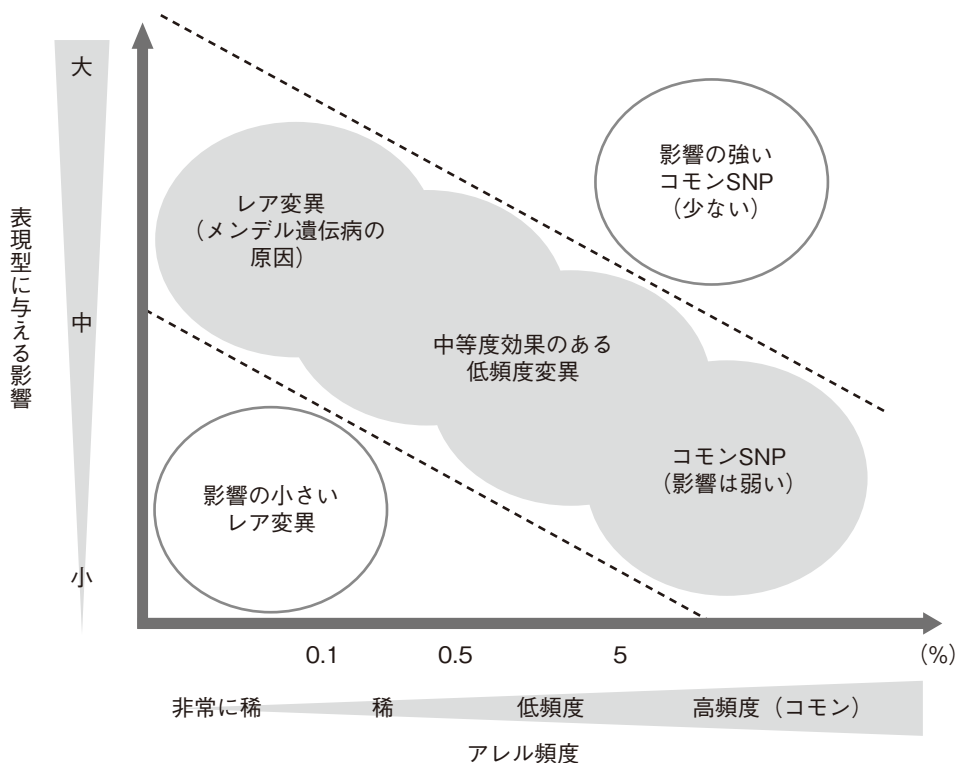


図1 遺伝子多型におけるアレル頻度とその効果の関係

GWAS で同定されるものはアレル頻度 5% 以上の多型で、一般的に疾患表現型に与える影響は小さい。(文献 2 より引用, 一部改変)

れた場合でも各々のオッズ比が小さい場合が多く、すべてを統合しても多くの場合疾病形質に影響するゲノム要因のわずかし説明できない²⁾。GWAS で採用されている SNP マーカーは一般的に頻度の高い(アレル頻度 5% 以上)ものがほとんどであり、頻度が低い影響力の強い多型をそもそも検出できていない可能性を考えなければならない(図 1)。一方で、全ゲノムデータを疾病関連解析に用いた場合、その遺伝子多様性がある場所は 4,500 万カ所以上にわたり、疾患との関連性を統計学的に見出すことは非常に効率が悪くも指摘されている³⁾。高頻度 SNP マーカーを用いた GWAS でも、全ゲノム配列を使用した全ゲノムワイド関連解析でも、治療や診断ターゲットに即結びつくような有望遺伝子(遺伝子多様性)を見出すには、まだ時間を要すると推察される。

希少疾患 (rare disease) の重要性

図 1 に示した通り、頻度の低い遺伝子変異が疾患発症に強く影響を及ぼすものがあり、これらは希少疾患原因遺伝子として知られているものである。大規模家系や同一表現

型家系の集積による連鎖解析などから同定された希少疾患原因遺伝子(変異)は、疾患発症への影響力が強い。例えば腎臓病領域でいえば、バソプレシン V2 受容体 (AVPR2 遺伝子) の X 連鎖性変異では腎性尿崩症をほぼ必発する。われわれは稀な遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型 (pseudohypoaldosteronism type 2 : PHA2) の原因遺伝子である WNK キナーゼ, KLHL3, CUL3 などの解析を通じて、PHA2 の病態解明にとどまらず、ヒトにおける生理的な体液恒常性維持機構を明らかにした⁴⁾。また、予想外の臓器連関メカニズムの発見につながり⁵⁾、さらに創薬における新規治療ターゲットの発見に至った⁶⁾。希少疾患の責任遺伝子は、それだけ生体内で重要な役割を担っている場合が多く、生理学的にも重要な意味合いを持つ可能性が高い。それらの分子自身、また周辺シグナルの解明を行うことは、より効率良くさまざまな病態での治療標的の同定につながる可能性が高い。希少疾患を基としてコモン病へ目を向けることは、効率の良いアプローチといえるかもしれない。

Simple, sPEedy and Efficient Diagnosis of Inherited Kidney Diseases
(SPEEDI-KID)

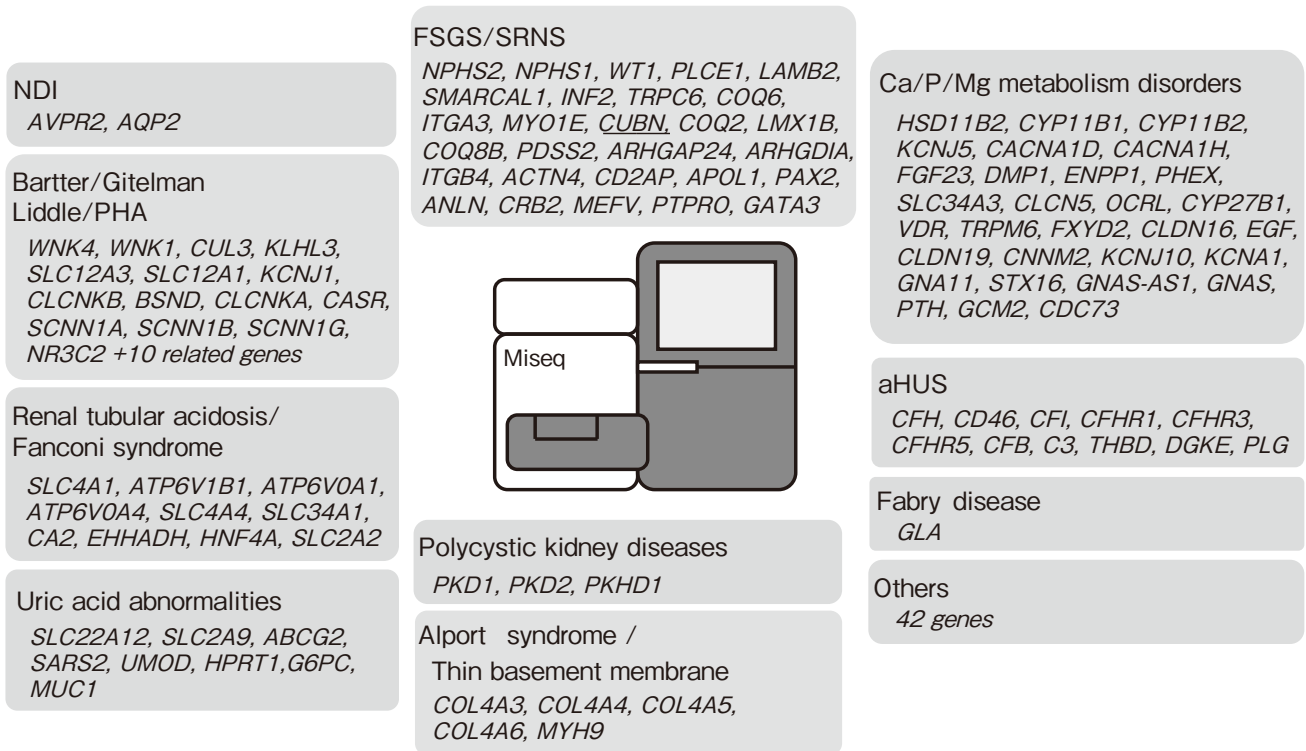


図2 網羅的パネル診断がカバーする遺伝子群
遺伝性腎疾患の原因として知られる 166 遺伝子を網羅している。

網羅的腎臓病診断パネル

高効率に既知の責任遺伝子変異をスクリーニングする方法として、NGS の特性を生かした網羅的診断パネルを構築した。

1. パネルのデザイン

遺伝性腎疾患に限っても原因遺伝子の新規報告は増加の一途にある。例えば、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群 (SRNS) の原因遺伝子は、この 20 年で 45 種類以上が報告された⁷⁾。つまり、1 つの臨床診断でも評価すべき遺伝子数は増加しつつあり、従来のサンガーシークエンス法による検証では予算的にも労力的にも厳しい状況に陥りつつあるといえる。われわれは直近の Pubmed レビュー文献や OMIM (<https://www.omim.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) などの Web リソース、専門家の意見などを踏まえ、腎性尿崩症、Bartter 症候群、Gitelman 症候群などの遺伝性尿細管疾患、多発性嚢胞腎、Alport 症候群、Fabry 病などの原因と

なる総計 160 種以上の遺伝子群を 1 つのパネルに組み込み、1 回の検査でこれらを網羅的にスクリーニングする系を確立し、世界にも先駆けて報告した (Simple, sPEedy and Efficient Diagnosis of Inherited Kidney Diseases : SPEEDI-KID)⁸⁾。図 2 には、パネルで網羅された疾患別遺伝子群を示した。本パネルでは主にエクソン+プライス領域をカバーしている。

2. パネル診断の実際

1) パネル診断の実績

2014 年度の運用開始以後、2018 年 3 月現在までに 300 家系以上に対してパネル診断を実施し、約半数の家系で遺伝学的確定診断が得られた。

興味深い例として、① 0 歳女児：多尿があり腎性尿崩症の臨床診断でありながら、*ATPVI1B1* のみにミスセンス変異を認め、尿細管性アシドーシスに伴う多尿と判明した例、② 5 歳男児：てんかんと頭蓋内腫瘍および多発嚢胞腎の合併があり、*TSC2-PKD1* 隣接遺伝子症候群が疑われたが、接合部の欠失変異は認めず、*TSC2* および *PKD1* にそれぞれ独

立して2つのミスセンス変異を認めた症例、など、網羅的遺伝子診断の有用性が確認されている。

また、Gitelman 症候群(GS)の臨床診断のもとに網羅的遺伝子解析を実施した53例については、約半数の23例で責任遺伝子である *SLC12A3* (NCC)ないし *CLCNKB* にホモ/複合ヘテロ変異を認めた一方で、一部の症例ではこれらのGS 責任遺伝子に変異がなく、Bartter 症候群(BS)の責任遺伝子である *SLC12A1* (NKCC2)や *BSND*(Barttin)に、BS の責任変異としてすでに報告のある病的変異がヘテロ接合性のみで検出される例が含まれていた。GS, BS いずれにせよ通常は常染色体劣性遺伝形式であるため、ホモ接合性ないし複合ヘテロ接合性変異をとるべきで、ヘテロ接合性変異のみではBS の診断に至らない。これらの症例はすべて成人発症例であり、新生児期に診断され重症の塩喪失症状をとる一般的なBS とは明らかに異なる表現型と捉えられる。成人における塩喪失性疾患の新たな疾患概念として提唱できる可能性があり、報告準備中である。

また、患者表現型と同定された遺伝子変異のデータベースを構築し、蓄積した表現型-遺伝型データの再解析により、われわれは、従来、ホモ接合性変異のみ(常染色体劣性遺伝)で発症すると理解されていた *ATP6V0A4* 変異による遠位尿管性アシドーシスは、実は単一ヘテロ接合性変異(常染色体優性遺伝)でもその原因となりうることを見出し、報告している(第60回日本腎臓学会学術集会総会)。

2)パネル診断の利点

従来、多くのエクソンを有する遺伝子や有病率の低い疾患に関しては遺伝子検査を実施できる施設自体が限られていた。国内に受け入れ先が存在しない場合には、海外の研究室に依頼せざるをえない場合もあった。NGSを用いたパネル診断は迅速かつ簡便に、一施設で多くの遺伝子をスクリーニングできることにある。遺伝性尿管疾患を例にとれば、表現型のオーバーラップがあり、また、近縁疾患の原因遺伝子も多岐にわたる。このため、臨床検査所見や負荷試験のみから必ずしも臨床診断を確定できない、もしくは異なる疾患群を明確に区別できない場合もある。前項で実例をあげたように、このようなケースでは特にパネル診断の有用性が期待される。また、既知の責任遺伝子に変異が同定されなかった例については、全エクソンシーケンス(whole exome sequencing : WES)や全ゲノムシーケンス(whole genome sequencing : WGS)を行うことで、全く新しい責任遺伝子の同定を試みることができる。

3)NGS パネル診断の問題点

NGS では一般的に大きな挿入欠失変異(large indels)、コ

ピー数異常(copy number variations : CNVs)を含めた高次構造異常(large genomic rearrangement)の検出精度が高くなく、開発当初からの大きな課題である。解析ソフトウェアの改善に伴い、従来に比してその精度は確実に改善傾向にあるといえるが⁹⁾、いまだ不完全である。適宜実績のあるCNV アレイやMLPA 法を組み合わせることで診断を行うことが推奨される。また、パネル診断のように解析遺伝子数が限られている場合でも、1人当たり膨大な数の多様性塩基が同定される。現状では、共通した表現型を持つ複数以上の家系で同一の(遺伝子)変異が同定されるか、実験的検証により病的意義が確認されるまで、新規変異の解釈は慎重になされるべきであると考えられる。また、このような網羅的診断パネルに含まれる遺伝子種は多岐にわたり、一施設がすべての疾患・表現型と変異の関係性について精通しているという状況はありえない。したがって、同定された変異の意義解釈には、積極的に専門家の意見を伺う姿勢も重要と考えられる。

網羅的遺伝子診断では、原疾患と関連性はないが臨床的に重要な遺伝子変異が同定されるという、二次的所見(secondary findings)を伴うケースがある。本邦では昨年2017年に日本人類遺伝学会が二次的所見の取り扱い指針を早急に整備する必要があるという内容の声明を公表しているが、現状ではこれらの取り扱いについては検査機関サイドに委ねられている部分が大きく、定まったガイドラインはいまだ存在しない。当院では倫理委員会の定めに基づき、前述したように同定された変異の意義解釈の困難さから、すべての変異結果を公表はしていないが、*VHL*, *TSC1*, *TSC2*, *WT1*, *GLA* などの生命予後に重要な影響を及ぼす可能性がある、または治療介入により予後改善が期待されるような疾患の原因遺伝子変異については、ACMG ガイドライン¹⁰⁾に準じて適宜倫理委員会の承認を得たうえで、患者に情報還元できるように準備が整っている。

腎臓病学における Precision medicine の展望

Precision medicine(精密医療)とは、臨床データやゲノムデータを含めた各種オミックスデータを駆使して患者を層別化し、各グループに最適な治療法や予防法を適用しようとする考え方で、2015年のアメリカ合衆国大統領オバマ演説においてこの表現が使用されたのが発端である。実際に最も進んでいるといえる腫瘍領域では、がんの遺伝子変異データを基に治療効果が高くかつ副作用が少ない、適切な抗がん薬を選択する医療が、すでに米国では進んで実践さ

れ効果をあげている¹¹⁾。

はたして Precision medicine を腎臓病領域に適用させることは可能であろうか。米国ではすでに NIH が主導して Kidney Precision Medicine Project (KPMP) を立ち上げ、具体的には急性腎障害 (acute kidney injury : AKI) や慢性腎臓病 (chronic kidney disease : CKD) の患者の腎生検組織と臨床情報の大規模集積を開始している (<https://www.niddk.nih.gov>)。ただし、腎機能障害の原因はまさに多彩であり、さらに腎不全に対する治療薬、治療選択肢がそもそもほとんどないことにも課題があるといえる。例えば *UMOD* は GWAS でも CKD リスク遺伝子として報告され¹²⁾、その病的希少変異は家族性高尿酸血症の原因となるような影響力の強い遺伝子と言えるが、最適な治療や食事生活指導の対応は、引き続き検討される必要がある。

Bierzynska らは英国のレジストリを用いて、187 例の小児 SRNS 患者に WES を行い、SRNS に関する遺伝子変異を認めた患者には、二次性の SRNS は 1 例もおらず、腎移植後にネフローゼ症候群が再発した症例も 1 例も認めなかったという報告¹³⁾をしている。また、補体の制御因子に関連する遺伝子異常にて生じる非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) においては、*MCP* および *DGKE* 遺伝子変異によるものは、他の遺伝子変異を原因とする aHUS と比較して腎移植後の再発率が低いと報告された¹⁴⁾。このように移植後の腎予後判定や、免疫抑制薬の適応をより精細に検討できることや、患者グループごとの予後予測ができる可能性があり期待される。この視点では、Precision medicine を遂行するうえで NGS による遺伝子ビッグデータは必要不可欠であるといえる。

おわりに

シーケンスクオーストの低下から、個人レベルでの全ゲノムデータは現実的なものになりつつあるが、30 億塩基対存在するヒト全ゲノムの意義解釈はやはり容易ではない。倫理面への配慮、膨大なデータの保存管理の問題、解析用ハードウェアの問題、バイオインフォマティクスの人員不足など、解決していくべき課題は多いが、従来の医療にはなかった新しい視点が生まれる可能性が高く、期待される。

利益相反自己申告：

奨学(奨励)寄付金；アステラス製薬(平成 27～29 年度)、武

田薬品工業(平成 27～29 年度)、バクスター(平成 27 年度)、東京医科歯科大学腎臓内科(平成 28 年度)、協和発酵キリン(平成 28, 29 年度)、中外製薬(平成 28, 29 年度)

文 献

- Zhang J, Chiodini R, Badr A, et al. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics* 2011 ; 38 : 95-109.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009 ; 8 ; 461 : 747-753.
- Yang J, Bakshi A, Zhu Z, et al. Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index. *Nat Genet* 2015 ; 47 : 1114-1120.
- Nishida H, Sohara E, Nomura N, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension* 2012 ; 60 : 981-990.
- Takahashi D, Mori T, Sohara E, et al. WNK4 is an adipogenic factor and its deletion reduces diet-induced obesity in mice. *EBio-Medicine* 2017 ; 18 : 118-127.
- Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, et al. Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK kinase signaling to cation chloride transporters. *J Am Soc Nephrol* 2015 ; 26 : 1525-1536.
- Ha TS. Genetics of hereditary nephrotic syndrome : a clinical review. *Korean J Pediatr* 2017 ; 60 : 55-63.
- Mori T, Hosomichi K, Chiga M, et al. Comprehensive genetic testing approach for major inherited kidney diseases, using next-generation sequencing with a custom panel. *Clin Exp Nephrol* 2017 ; 21 : 63-75.
- Abel HJ, Duncavage EJ. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data : a review of informatic approaches. *Cancer Genet* 2013 ; 206 : 432-440.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015 ; 17 : 405-424.
- Katz SJ, Jagsi R, Morrow M, et al. Reducing overtreatment of cancer with precision medicine : Just what the doctor ordered. *JAMA* 2018 ; [Epub ahead of print]
- Okada Y, Sim X, Go MJ, et al. Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations. *Nat Genet* 2012 ; 15 ; 44 : 904-909.
- Bierzynska A, McCarthy HJ, Soderquest K, et al. Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management. *Kidney Int* 2017 ; 91 : 937-947.
- Noris M, Caprioli J, Bresin E et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010 ; 5 : 1844-1859.