

# 遺伝性腎疾患

Inherited kidney diseases

野津寛大\*<sup>1</sup> 飯島一誠\*<sup>2</sup>

Kandai NOZU and Kazumoto IJIMA

## はじめに

近年、遺伝学的手法の発達により、腎臓学のみならずすべての分野において遺伝性疾患の研究が急速に進んだ腎臓病研究においても、その遺伝学的研究の恩恵で腎臓の詳細な分子機構が解明されてきた。この1年の進歩として、ネフローゼ症候群/巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)の疾患原因遺伝子が多数同定された点があげられる。特に、東北大学小児科グループが中心となり、ステロイド感受性ネフローゼ症候群の原因遺伝子が同定された<sup>1)</sup>。またわれわれは、Genome-wide association study(GWAS)により、小児ステロイド感受性ネフローゼ症候群における疾患感受性遺伝子の同定を行った<sup>2)</sup>。一方で、代表的遺伝性腎疾患であるAlport症候群における更なる遺伝型臨床像の新たな相関関係を明らかにすることにも成功した<sup>3)</sup>。最近の解析ツールの進歩により次世代シーケンサー解析データを用い、通常のシーケンスでは同定できない copy number variation (CNV)も効率良く検出することが可能であることについても報告を行った<sup>4)</sup>。一方、X染色体連鎖型遺伝性腎疾患において、女性の重症度を決定する因子はX染色体不活化の偏りであることが示されてきたが、われわれはX染色体不活化の偏りを検出する新たな方法である ultra deep RNA sequence 法を開発した<sup>5)</sup>。

本総説においては、この1年に遺伝性腎疾患関連で明らかとなった国内外の知見につき紹介する。

## ネフローゼ症候群/FSGS における新規原因遺伝子の同定

現在まで、すでに60を超えるネフローゼ症候群/FSGS疾患原因遺伝子が同定されてきた。ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群(SRNS)患者においてこれらの遺伝子を網羅的に解析された研究では、25~30%の患者において何らかの遺伝子に変異が同定されると報告されている<sup>6~8)</sup>。しかしこの1年においても、更なる遺伝子の同定が相次いだ。

### 1. 核膜孔複合体(nuclear pore complex : NPC)構成蛋白をコードする遺伝子異常

すべての細胞には核が存在し、核内ではゲノムDNAから転写の過程を経てmRNAが産生される。mRNAは細胞質に放出され、翻訳の過程を経て遺伝子特異的蛋白が産生される。この過程においてmRNAはNPCを通過して細胞質に放出される。その他、NPCは蛋白の核-細胞質輸送を担っている。NPCは100種類以上ものヌクレオポリン(nucleoporin)と呼ばれる蛋白質が集まって構成されている巨大な分子複合体である。

2015年にMiyakeらは、日本人SRNS/FSGS患者5家系9例においてnucleoporin 107kDa(NUP107)をコードする遺伝子(NUP107)の異常を同定した<sup>9)</sup>。その後、Braunらは同じくSRNS/FSGS家系でnucleoporin 85kDa(NUP85)、93kDa(NUP93)、133kDa(NUP133)、160kDa(NUP160)、205kDa(NUP205)をコードする遺伝子の異常を同定した<sup>10,11)</sup>。さらに最近、Fujita, Tsukaguchiらにより、ステロイド抵抗性ネフローゼを呈し、臨床的にGalloway-Mowat症候群と診断された1家系において133kDa(NUP133)をコードする遺伝子の異常が同定されている<sup>12)</sup>。今後、更なる別のnucleoporinの異常がSRNS/FSGSの原因となることが報告される可能性が強く予想されている。

\*<sup>1</sup> 神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野こども急性疾患学講座、\*<sup>2</sup> 同小児科学分野

## 2. ステロイド感受性ネフローゼ症候群における RhoA ネットワーク関連遺伝子異常

細胞骨格の制御に携わる低分子G蛋白質である Rho ファミリー G 蛋白質の代表的な蛋白が RhoA である。Ashraf, Kudo らにより, RhoA にかかわる蛋白をコードする遺伝子, *MAGI2*, *TNS2*, *DLC1*, *CDK20*, *ITSN1*, *ITSN2* の異常で, 部分的あるいは完全にステロイド感受性のネフローゼ症候群を発症することが報告された<sup>1)</sup>。これらの遺伝子の変異が直接的または間接的に RhoA の活性に関与することが示され, また *in vitro* の実験系においてこれらの変異を有する細胞はステロイド投与により RhoA 活性が回復することが示された。

### GWAS による日本人小児ステロイド感受性ネフローゼ症候群における疾患感受性遺伝子の同定

われわれは小児腎臓病専門施設の先生方の多大なる協力の下, これまで約 1,300 例の小児期発症特発性ネフローゼ症候群(うち約 1,000 例がステロイド感受性ネフローゼ症候群)の患者検体を収集した。現在, 更なる感受性遺伝子探索のための研究を継続中であるが, まずは約 500 検体を用いた GWAS を行い, 日本人小児特発性ネフローゼ症候群発症と HLA-DR/DQ 領域の一塩基多型(SNP)に非常に強い相関関係を認めることを見出した<sup>2)</sup>。以下, GWAS の原理と今回の発見の意義, 今後の発展の可能性につき解説する。

#### 1. GWAS の原理

GWAS は病気の発症や臨床症状に影響するゲノム上の座位を網羅的に検索する手法であり, それにより疾患発症や臨床的特徴に関連する座位を決定できるだけでなく, 治療薬の同定などにも有用である可能性がある。適応は, 単一遺伝子疾患以外の複数の遺伝子に少しずつ影響され発症する多因子疾患である。それらの疾患が遺伝と関連している場合は, その原因遺伝子は家系が異なっても共通のものが多いと予想される。

ヒトゲノム全域には 1,000 万カ所を超える SNP が存在するが, そのうち 50~100 万カ所の遺伝子 SNP を決定し, 特定の疾患の患者群で有意に高い変異頻度を有する SNP を検出し, その近傍に存在する感受性遺伝子の可能性の高いものをリスト化する。それらの複数の遺伝子の作用が累積し疾患発症のリスクが高まると考えられる。

#### 2. 具体的方法

患者群および正常コントロール群においてゲノム全体で SNP のスクリーニングを行う(Phase 1: Discovery stage)。

それにより患者群で有意に発症頻度の高い SNP を抽出する。さらに Phase 1 と異なる患者群の検体において, Phase 1 で検出した SNP に関して検索を行う(Phase 2: Replication stage)。以上の作業により, 疾患と関連する SNP および, その近傍にある疾患感受性遺伝子の同定を行う。

#### 3. 今回の報告における臨床的意義

小児期のステロイド感受性ネフローゼ症候群発症において, HLA 領域と非常に強い相関が示された。本疾患が改めて免疫学的機序により発症する疾患であることが示された。

#### 4. 今後の小児特発性ネフローゼ症候群における GWAS 研究発展の可能性

今回の報告では約 500 例の検体を用いて GWAS を行ったが, 現在, 1,300 検体の収集に成功しており, さらに検体数を増やすことで HLA 以外の疾患感受性遺伝子の同定を試みている。今後, 更なる疾患発症機序の解明が強く期待できる。

### Alport 症候群における genotype-phenotype 相関研究に関する新たな展開

#### 1. Alport 症候群に関してこれまでわかっていたこと

Alport 症候群のなかでも最も頻度の高い遺伝形式である X 染色体連鎖型 Alport 症候群の男性患者においては, 中央値 25 歳で末期腎不全へと進行することが報告された<sup>13)</sup>。さらに, 同疾患は genotype-phenotype に強い相関を認め, 原因遺伝子 *COL4A5* にミスセンス変異を有する場合, ナンセンス変異を有する場合より 10 歳以上末期腎不全進行年齢が遅延することも同論文で報告されている。さらにわれわれは, 3 の倍数の塩基数の欠失(in-frame 変異)や体細胞モザイク変異を有する場合も軽症の臨床像を呈することを明らかにしてきた<sup>14,15)</sup>。

#### 2. 新たな genotype-phenotype 相関の発見

今回われわれは, *COL4A5* 遺伝子のスプライスサイトに変異がある患者に注目し検討を行った。スプライスサイトの異常では, mRNA において当該エクソンのスキッピングなどにより mRNA レベルでの塩基の欠失を認める。今回, このスプライスサイト変異に伴う mRNA レベルでの欠失した塩基数が 3 の倍数である場合と 3 の倍数でない場合の 2 群に分けて検討を行った結果, 3 の倍数でなかった場合は中央値 20 歳で腎不全へと進行していたのに対し, 3 の倍数の場合 29 歳と, 9 歳の差を認めた。このように mRNA レベルでの genotype-phenotype の相関を調べた研究はこれまで存在せず, 世界で初めて明らかにした<sup>3)</sup>。

### 3. 今後の治療法の開発

現在われわれは、Alport 症候群に対するエクソンスキッピング療法を開発中である (AMED 難治性疾患実用化研究事業・研究代表者: 野津寛大)。その原理は、COL4A5 遺伝子にナンセンス変異を有する重症の Alport 症候群患者に対し、アンチセンス治療薬を用い、該当エクソンをスキッピングさせる方法である。COL4A5 遺伝子は幸いほとんどのエクソンが3の倍数の塩基数で構成されているため、エクソンスキッピングにより軽症化を誘導するという理論に基づいた治療法である。現在まで良好な成績を得ており、今後、実用化を目指す。

#### Copy number variation (CNV) の検出

次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的遺伝子解析の全盛期にあっても、NGS 解析ではある程度以上の広範囲欠失、いわゆる CNV の検出はできないという弱点があった。これまでは CNV の検出のために array CGH や MLPA 法などの新たな解析方法を追加することで対応する必要があった。しかし、近年の NGS データ解析ソフトの進化により、患者解析データと健常者解析データのシーケンシングデータを比較する Pair analysis の進歩により、これらの CNV も高頻度に検出できるようになった<sup>4)</sup>。それにより NGS を用いた網羅的解析への比重がさらに高まった。

#### X 染色体不活化の偏り (skewed X) と女性 Dent 病

##### 1. X 染色体の不活化とは

X 染色体連鎖型腎疾患の女性患者においては、一般的に臨床症状は軽症である。しかし、Alport 症候群や Dent 病などの遺伝性腎疾患においては、非典型的な重症例も存在する。その重症度を規定する因子は X 染色体の不活化の偏り (いわゆる skewed X) によるものと信じられてきた。女性の細胞においては X 染色体は2本あるが、X 染色体の不活化により、どちらか一方が完全に不活化される。父由来か母由来のどちらの X 染色体が不活化されるかはランダムであるが、そのプログラムは胎生期にすでに細胞に組み込まれているとされている。理論的には父由来と母由来がそれぞれ 50% ずつ活性が保たれているはずではあるが、実際は大きく偏りを認める場合がある。X 染色体上の遺伝子に変異を有さない場合は問題は生じないが、変異を有する場合において、変異を有する染色体に偏って活性を有する場合 (skewed X) は男性と同じく重症の臨床症状を呈する。

##### 2. これまでの解析方法と新たな解析方法

しかし、この skewed X が実際にどの程度重症女性患者の発症機序として説明できるかは明らかにされてこなかった。また、X 染色体の不活化を測定する方法もゲノム DNA でのアンドロゲン遺伝子のメチル化の有無を調べる (HUMARA 法) ものであり、その信憑性にも確固たるものがなかった。そこでわれわれは Ultra-deep RNA sequence 法を開発した<sup>5)</sup>。本法では、目標とする遺伝子 RNA をターゲットとし RNA シークエンスを行うことで、正常配列と変異配列の比を求めるものである。

##### 3. 結果

本法により女性 Dent 患者4例で解析を行ったところ、明らかな skewed X を呈したのは2例のみで、残り2例には skewed X の関与を認めなかった。また、その解析結果は HUMARA 法と完全に一致した。この結果から、一部の女性 Dent 病患者の発症機序は skewed X 以外にあることが強く疑われた。その重症化機序の解明により、女性 X 染色体連鎖型疾患重症例の治療法開発の可能性につながり、今後の研究成果が強く期待される。

#### おわりに

近年、遺伝性腎疾患研究は長足の進歩を遂げており、本総説で示すことができたのはこの1年の進歩のほんの一部にすぎない。解析機器やツールが次々と開発されているため、それらを利用したさまざまなアイデアにより、更なる研究の進展と疾患の分子生物学的発症機序の解明および治療法の開発へとつながることが強く期待できる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

#### 文献

1. Ashraf S, Kudo H, Rao J, Kikuchi A, Widmeier E, Lawson JA, Tan W, Hermle T, Warejko JK, Shril S, Airik M, Jobst-Schwan T, Lovric S, Braun DA, Gee HY, Schapiro D, Majmundar AJ, Sadowski CE, Pabst WL, Daga A, van der Ven AT, Schmidt JM, Low BC, Gupta AB, Tripathi BK, Wong J, Campbell K, Metcalfe K, Schanze D, Niihori T, Kaito H, Nozu K, Tsukaguchi H, Tanaka R, Hamahira K, Kobayashi Y, Takizawa T, Funayama R, Nakayama K, Aoki Y, Kumagai N, Iijima K, Fehrenbach H, Kari JA, El Desoky S, Jalalah S, Bogdanovic R, Stajic N, Zappel H, Rakhmetova A, Wassmer SR, Jungraithmayr T, Strehlau J, Kumar AS, Bagga A, Soliman NA, Mane SM, Kaufman L, Lowy DR, Jairajpuri MA, Lifton RP, Pei Y, Zenker M, Kure S, Hildeb-

- randt F. Mutations in six nephrosis genes delineate a pathogenic pathway amenable to treatment. *Nat Commun* 2018 ; 9 : 1960.
2. Jia X, Horinouchi T, Hitomi Y, Shono A, Khor SS, Omae Y, Kojima K, Kawai Y, Nagasaki M, Kaku Y, Okamoto T, Ohwada Y, Ohta K, Okuda Y, Fujimaru R, Hatae K, Kumagai N, Sawanobori E, Nakazato H, Ohtsuka Y, Nakanishi K, Shima Y, Tanaka R, Ashida A, Kamei K, Ishikura K, Nozu K, Tokunaga K, Iijima K, Research Consortium on Genetics of Childhood Idiopathic Nephrotic Syndrome in J. Strong association of the HLA-DR/DQ locus with childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome in the Japanese population. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 : 2189-2199.
  3. Horinouchi T, Nozu K, Yamamura T, Minamikawa S, Omori T, Nakanishi K, Fujimura J, Ashida A, Kitamura M, Kawano M, Shimabukuro W, Kitabayashi C, Imafuku A, Tamagaki K, Kamei K, Okamoto K, Fujinaga S, Oka M, Igarashi T, Miyazono A, Sawanobori E, Fujimaru R, Nakanishi K, Shima Y, Matsuo M, Ye MJ, Nozu Y, Morisada N, Kaito H, Iijima K. Detection of splicing abnormalities and genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 : 2244-2254.
  4. Nagano C, Nozu K, Morisada N, Yazawa M, Ichikawa D, Numasawa K, Kourakata H, Matsumura C, Tazoe S, Tanaka R, Yamamura T, Minamikawa S, Horinouchi T, Nakanishi K, Fujimura J, Sakakibara N, Nozu Y, Ye MJ, Kaito H, Iijima K. Detection of copy number variations by pair analysis using next-generation sequencing data in inherited kidney diseases. *Clin Exp Nephrol* 2018 ; 22 : 881-888.
  5. Minamikawa S, Nozu K, Nozu Y, Yamamura T, Taniguchi-Ikeda M, Nakanishi K, Fujimura J, Horinouchi T, Shima Y, Nakanishi K, Hattori M, Kanda K, Tanaka R, Morisada N, Nagano C, Sakakibara N, Nagase H, Morioka I, Kaito H, Iijima K. Development of ultra-deep targeted RNA sequencing for analyzing X-chromosome inactivation in female Dent disease. *J Hum Genet* 2018 ; 63 : 589-595.
  6. Bierzynska A, McCarthy HJ, Soderquest K, Sen ES, Colby E, Ding WY, Nabhan MM, Kerecuk L, Hegde S, Hughes D, Marks S, Feather S, Jones C, Webb NJ, Ognjanovic M, Christian M, Gilbert RD, Sinha MD, Lord GM, Simpson M, Koziell AB, Welsh GI, Saleem MA. Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management. *Kidney Int* 2017 ; 91 : 937-947.
  7. Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S, Pabst WL, Gee HY, Kohl S, Engelmann S, Vega-Warner V, Fang H, Halbritter J, Somers MJ, Tan W, Shril S, Fessi I, Lifton RP, Bockenhauer D, El-Desoky S, Kari JA, Zenker M, Kemper MJ, Mueller D, Fathy HM, Soliman NA, Group SS, Hildebrandt F. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2015 ; 26 : 1279-1289.
  8. Warejko JK, Tan W, Daga A, Schapiro D, Lawson JA, Shril S, Lovric S, Ashraf S, Rao J, Hermle T, Jobst-Schwan T, Widmeier E, Majmundar AJ, Schneider R, Gee HY, Schmidt JM, Vivante A, van der Ven AT, Ityel H, Chen J, Sadowski CE, Kohl S, Pabst WL, Nakayama M, Somers MJG, Rodig NM, Daouk G, Baum M, Stein DR, Ferguson MA, Traum AZ, Soliman NA, Kari JA, El-Desoky S, Fathy H, Zenker M, Bakkaloglu SA, Muller D, Noyan A, Ozaltin F, Cadnapaphornchai MA, Hashmi S, Hopcian J, Kopp JB, Benador N, Bockenhauer D, Bogdanovic R, Stajic N, Chernin G, Ettenger R, Fehrenbach H, Kemper M, Munarriz RL, Podracka L, Buscher R, Serdaroglu E, Tasic V, Mane S, Lifton RP, Braun DA, Hildebrandt F. Whole exome sequencing of patients with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018 ; 13 : 53-62.
  9. Miyake N, Tsukaguchi H, Koshimizu E, Shono A, Matsunaga S, Shiina M, Mimura Y, Imamura S, Hirose T, Okudela K, Nozu K, Akioka Y, Hattori M, Yoshikawa N, Kitamura A, Cheong HI, Kagami S, Yamashita M, Fujita A, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saito H, Ohashi K, Imamoto N, Ryo A, Ogata K, Iijima K, Matsumoto N. Biallelic mutations in nuclear pore complex subunit NUP107 cause early-childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet* 2015 ; 97 : 555-566.
  10. Braun DA, Lovric S, Schapiro D, Schneider R, Marquez J, Asif M, Hussain MS, Daga A, Widmeier E, Rao J, Ashraf S, Tan W, Lusk CP, Kolb A, Jobst-Schwan T, Schmidt JM, Hoogstraten CA, Eddy K, Kitzler TM, Shril S, Moawia A, Schrage K, Khayyat AIA, Lawson JA, Gee HY, Warejko JK, Hermle T, Majmundar AJ, Hugo H, Budde B, Motameny S, Altmuller J, Noegel AA, Fathy HM, Gale DP, Waseem SS, Khan A, Kerecuk L, Hashmi S, Mohebbi N, Ettenger R, Serdaroglu E, Alhasan KA, Hashem M, Goncalves S, Ariceta G, Ubetagoyena M, Antonin W, Baig SM, Alkuraya FS, Shen Q, Xu H, Antignac C, Lifton RP, Mane S, Nurnberg P, Khokha MK, Hildebrandt F. Mutations in multiple components of the nuclear pore complex cause nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 2018 ; 128 : 4313-4328.
  11. Braun DA, Sadowski CE, Kohl S, Lovric S, Astrinidis SA, Pabst WL, Gee HY, Ashraf S, Lawson JA, Shril S, Airik M, Tan W, Schapiro D, Rao J, Choi WI, Hermle T, Kemper MJ, Pohl M, Ozaltin F, Konrad M, Bogdanovic R, Buscher R, Helmchen U, Serdaroglu E, Lifton RP, Antonin W, Hildebrandt F. Mutations in nuclear pore genes NUP93, NUP205 and XPO5 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2016 ; 48 : 457-465.
  12. Fujita A, Tsukaguchi H, Koshimizu E, Nakazato H, Itoh K, Kuraoka S, Komohara Y, Shiina M, Nakamura S, Kitajima M, Tsurusaki Y, Miyatake S, Ogata K, Iijima K, Matsumoto N, Miyake N. Homozygous splicing mutation in NUP133 causes Galloway-Mowat syndrome. *Ann Neurol* 2018 Nov 14. doi: 10.1002/ana.25370. [Epub ahead of print]
  13. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schroder C, Sanak M, Krejcova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC. X-linked Alport syndrome : natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11 : 649-657.

14. Fu XJ, Nozu K, Kaito H, Ninchoji T, Morisada N, Nakanishi K, Yoshikawa N, Ohtsubo H, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Matsumura C, Takagi N, Maekawa K, Taniguchi-Ikeda M, Iijima K. Somatic mosaicism and variant frequency detected by next-generation sequencing in X-linked Alport syndrome. *Eur J Hum Genet* 2016 ; 24 : 387-391.
15. Hashimura Y, Nozu K, Kaito H, Nakanishi K, Fu XJ, Ohtsubo H, Hashimoto F, Oka M, Ninchoji T, Ishimori S, Morisada N, Matsunoshita N, Kamiyoshi N, Yoshikawa N, Iijima K. Milder clinical aspects of X-linked Alport syndrome in men positive for the collagen IV alpha5 chain. *Kidney Int* 2014 ; 85 : 1208-1213.