

特集：嚢胞性腎疾患

嚢胞性腎疾患の遺伝子解析

Genetic analysis for renal cystic disease

藤丸拓也 森 崇寧 蘇原映誠

Takuya FUJIMARU, Takayasu MORI, and Eisei SOHARA

はじめに

近年、腎疾患に対する遺伝子解析は、小児科領域だけではなく成人の慢性腎臓病患者も対象として行われており^{1,2)}、新規診断や治療方針の決定に加え、単一遺伝子疾患の病態生理解明にも貢献している³⁾。このように遺伝子解析が幅広く行われるようになった背景として、次世代シーケンサー(NGS)の台頭があげられる。本稿では現在の遺伝子解析の要であるNGSについて概説し、嚢胞性腎疾患に対する遺伝子解析の最近の知見を述べる。

次世代シーケンサーとは

NGSとは膨大な数の断片化されたDNAを同時並行で解析する遺伝子解析方法である⁴⁾。電気泳動を必要とする従来のキャピラリー型シーケンサー(サンガー法)とは異なる“次世代”の遺伝子解析方法として2005年頃より発表され始めた。100～800塩基程度の遺伝子解析を行うサンガー法とは異なり、NGSはショートリードと呼ばれる100～150塩基程度の短い塩基配列情報を高速で大量に処理することができる。得られた膨大なショートリード情報は高機能コンピュータを用いてヒトゲノム配列(リファレンス配列)に沿って並べ換えられ(マッピング)、長い塩基配列情報を再構成する。これにより一度の解析で膨大な量の遺伝子配列を明らかにすることができるようになった。

NGSを用いた遺伝子解析の種類

NGSを用いた遺伝子解析は、対象とする遺伝子領域によ

り全ゲノムシーケンセス(WGS)、全エクソームシーケンセス(WES)、特定の領域のみを解析するターゲット遺伝子パネルシーケンセス(TGPS)の3つに分類される⁵⁾。ヒトの全ゲノム領域はおよそ 3.3×10^9 塩基数(3.3 Gb)とされ、この領域すべてを解析するWGSは他の解析よりも高コストとはなるものの、非翻訳領域の変異が疾患に与える影響などを調査するうえでは重要となる。一方、蛋白質の翻訳にかかわるエクソン領域は全ゲノム領域の1.5～2.0%(30 Mb)であり、遺伝性疾患の85%はエクソン領域の遺伝子変異に起因している。そのため、WGSより低コストであるWESが多く用いられている。一方、TGPSは遺伝子パネルを用いて、特定の遺伝子のみ(一般的に10～200遺伝子)を解析する方法である。TGPSは各塩基にマッピングされるショートリードの数(カバレッジ)がWGSやWESよりも多いため、感度の高い解析をより低コストで行うことができる。

嚢胞性腎疾患におけるNGSを用いた遺伝子解析

嚢胞性腎疾患の一つであるネフロン癆の原因遺伝子は20種類以上が報告されている^{6,7)}。また、髄質嚢胞性腎疾患(MCKD)は、近年、常染色体優性尿管間質性腎疾患(ADTKD)という変異遺伝子別に病型を分類する疾患概念が提唱されている⁸⁾。このように、嚢胞性腎疾患の遺伝子解析では解析すべき遺伝子数が多く、従来のサンガー法では多大な労力を要する。そのため、高効率に既知の責任遺伝子変異をスクリーニングできるNGSを用いた遺伝子解析が有用となる^{9,10)}。われわれの教室では、遺伝性嚢胞性腎疾患に関連する69個の遺伝子を対象とした嚢胞性腎疾患パネルを作成しTGPSを行っている¹¹⁾。家族歴のない成人の多発性嚢胞腎や画像上非典型的な多発性嚢胞腎、また病

理学的に MCKD が疑われた成人例などを主な対象とし、2019 年 8 月現在までに、220 家系の遺伝子解析を行っている。非典型例や成人例を中心としたわれわれの遺伝子解析においても、多発性嚢胞腎は 179 家系中 123 家系に、ネフロン癆や MCKD は 34 家系中 19 家系に病的変異が認められている。

遺伝子解析研究の功績

遺伝子解析は病的変異の同定にとどまらず、得られた遺伝子型と表現型の関連を調べることで臨床診断に貢献できる。本邦における常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) の診断は、家族歴がない場合、多発性腎嚢胞を認めるだけでなく、ネフロン癆や常染色体劣性多発性嚢胞腎 (ARPKD) の除外が必要となる¹²⁾。しかしながら、成人においては臨床所見のみでこれらの疾患を除外することは難しい。そこでわれわれは、家族歴がなく臨床的に ADPKD と診断された成人患者 53 例において、前述の嚢胞性腎疾患パネルを用いて TGPS を行った。その結果、ADPKD の原因遺伝子である *PKD1/2* に変異を認めたのはわずか 32 例 (60%) のみであった。さらに、*PKD1/2* に変異のある患者とない患者を比較すると、変異のある患者では腎腫大を認め (中央値, 1,580.7 mL vs 791.0 mL, $p = 0.027$), 多発性肝嚢胞が存在する (71.9% vs 33.3%, $p = 0.006$) という臨床的特徴があることが明らかになった¹¹⁾。従来、家族歴のない ADPKD の臨床所見として、腎腫大¹³⁾や肝嚢胞の存在¹⁴⁾が示唆されていたが明確な根拠が示されておらず、今回のわれわれの研究結果により、腎腫大および多発性肝嚢胞の存在が診断の一助になることが初めて明らかになった。

また、遺伝子解析研究により既存の疾患概念が再構築されることがある。Snoek らは、国際的なコホートを用いて成人腎移植患者 5,606 例におけるゲノムワイド関連解析 (GWAS: 一塩基多型の解析) データを解析したところ、26 例 (0.5%) に若年性ネフロン癆の原因遺伝子である *NPHP1* のホモ接合性全欠失を認めたと報告している¹⁵⁾。興味深いことに、*NPHP1* の全欠失を認めた 26 例のうち臨床的にネフロン癆と診断されていた患者は 3 例しかおらず、11 例 (42%) は原疾患不明とされていた。われわれも病理学的にネフロン癆や MCKD が疑われた成人患者 20 例に TGPS を行ったところ、6 例にネフロン癆関連繊維毛病の遺伝子変異を認めている (第 62 回日本腎臓学会学術総会)。このように NGS による網羅的な遺伝子解析により同一の遺伝子変異であるにもかかわらず、従来考えられていた表現型とは異

なる臨床像を呈していたり、臨床診断では同一疾患と考えられていた疾患が異なる疾患として診断されたりすることが報告されている。

嚢胞性腎疾患における新規責任遺伝子

既知の責任遺伝子のみを解析する TGPS と異なり、WGS や WES は新規責任遺伝子の同定にも貢献している。Porath らは、既知の遺伝子変異を認めなかった ADPKD の 6 家系を対象に WES を行い、1 家系に *GANAB* の遺伝子変異を認めた¹⁶⁾。*GANAB* は糖たんぱく質の小胞体品質管理にかかわるグルコシダーゼ II のサブユニットを形成する遺伝子であり、サブユニットを形成するもう一つの *PRKCSH* 遺伝子は、常染色体優性多発性肝嚢胞 (ADPLD) の責任遺伝子として知られている^{17,18)}。Porath らはさらに、既知の遺伝子変異を認めない 321 家系を対象にサンガー法を用いて *GANAB* の遺伝子解析を行ったところ、ADPKD の 7 家系および ADPLD の 2 家系に *GANAB* 変異を認めており¹⁶⁾、現時点で *GANAB* は ADPKD および ADPLD の責任遺伝子と考えられている^{19~21)}。従来、ADPLD は多発性腎嚢胞を認めない多発性肝嚢胞とされていたが^{22,23)}、近年、ADPKD と ADPLD は表現型も遺伝子型もオーバーラップすることが示唆されてきている²⁴⁾。われわれの教室においても、ADPLD の責任遺伝子や後述する嚢胞性腎疾患の新規責任遺伝子を加えた 92 遺伝子をターゲットとした嚢胞性腎疾患パネルを作成している (表)。

その他の嚢胞性腎疾患における新規責任遺伝子としては、ADPKD では *DNAJB11*²⁵⁾、ARPKD では *DZIP1L*²⁶⁾、ネフロン癆関連繊維毛病では *MAPKBPI*²⁷⁾ や *PIBF1*²⁸⁾、ADTKD では *SEC61A1*²⁹⁾ が近年報告されている。

NGS により同定された変異の解釈の難しさ

解析する遺伝子を限定した TGPS においても、1 人当たり膨大な数のバリエーション (リファレンス配列と異なる塩基配列) が同定される。米国臨床遺伝・ゲノム学会 (ACMG) は、バリエーションの解釈のガイドラインを作成し、“Pathogenic”, “Likely pathogenic”, “Benign”, “Likely benign”, “Uncertain significance” の 5 つに分類するように提案している³⁰⁾。確かに、機能喪失が疾患の原因となることが明らかな遺伝子において、ナンセンス変異やフレームシフト変異などのトランケーション変異を認めた場合は、“Pathogenic” や “Likely pathogenic” と判定することは容易である。しか

表 嚢胞性腎疾患パネルに含まれる疾患と原因遺伝子(92 遺伝子)

Disease family	Targeted gene
ADPKD	<i>PKD1, PKD2, GANAB</i>
ARPKD	<i>PKHD1, DZIP1L</i>
NPHP	<i>NPHP1, INVS, NPHP3, NPHP4, IQCB1, CEP290, GLIS2, RPGRIP1L, NEK8, SDCCAG8, TMEM67, TTC21B, WDR19, ZNF423, CEP164, ANKS6, IFT172, CEP83, DCDC2, XPNPEP3, SLC41A1, MAPKBPI</i>
JBS	<i>NPHP1, CEP290, RPGRIP1L, TMEM67, TTC21B, ZNF423, CEP164, IFT172, INPP5E, TMEM216, AH11, ARL13B, CC2D2A, OFD1, KIF7, TCTN1, TMEM237, CEP41, TMEM138, C5orf42, TCTN3, TMEM231, CSPP1, PDE6D, MKS1, TCTN2, B9D1, ARMC9, CEP104, CEP120, KIAA0556, KIAA0586, PIBF1, SUFU, TMEM107</i>
MKS	<i>NPHP3, CEP290, RPGRIP1L, TMEM67, TMEM216, CC2D2A, TMEM231, MKS1, TCTN2, B9D1, B9D2, KIF14, TMEM107</i>
SLS	<i>NPHP1, INVS, NPHP3, NPHP4, IQCB1, CEP290, GLIS2, SDCCAG8, WDR19, CEP164, TRAF3IP1</i>
BBS	<i>CEP290, SDCCAG8, TMEM67, TTC21B, WDR19, IFT172, MKS1, BBS1, BBS2, ARL6, BBS4, BBS5, MKKS, BBS7, TTC8, BBS9, BBS10, TRIM32, BBS12, WDPCP, BBIP1, IFT27, CCDC28B, C8orf37, IFT74</i>
Skeletal ciliopathy	<i>TTC21B, WDR19, IFT172, WDR35, IFT122, IFT140, IFT43</i>
ADTKD	<i>MUC1, UMOD, HNF1B, REN, SEC61A1</i>
ADPLD	<i>PRKCSH, SEC63, ALG8, LRP5, SEC61B, GANAB</i>
Others	<i>ASS1, NOTCH2, TSC2</i>

ADPKD: autosomal dominant polycystic kidney disease, ARPKD: autosomal recessive polycystic kidney disease, NPHP: nephronophthisis, JBS: Joubert syndrome, MKS: Meckel syndrome, SLS: Senior-Løken syndrome, BBS: Bardet-Biedl syndrome, ADTKD: autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease, ADPLD: autosomal dominant polycystic liver disease

し多くの場合、責任遺伝子以外の他の遺伝子にも膨大な変異が検出され、これらは分子細胞生物学レベルでの機能解析がなされていない病的意義が不明(Uncertain significance)なバリエーションであることが多い³¹⁾。

バリエーションの病的意義を予測する in-silico 解析ツールとして、SIFT³²⁾、PolyPhen2³³⁾、CADD³⁴⁾、M-CAP³⁵⁾などの各種の病的意義予測スコアが利用されているが、健常者に認められるバリエーションにおいても、“Pathogenic”と検出されることも多く、確実なものとはいえない。一方で、頻度の高いバリエーションである遺伝子多型(Polymorphism)を除外するために、コントロール集団の遺伝子データベースが用いられる。大規模なデータベースとして、世界約6万5,000人のデータから成る ExAC データベース³⁶⁾が用いられるが、その解釈には人種差を考慮する必要がある。例えば、*PKD1* 遺伝子に p.Val3008Met のバリエーションが検出された場合、前述の in-silico 解析では、多くのスコアで“Pathogenic”

と判定され、ExAC データベースにおけるアレル頻度が0.5%と低く、一見病的変異であると解釈してしまう。しかし、日本人1,208人のデータベースである HGVD³⁷⁾では1.9%の変異アレル保有率と、非常に高頻度のバリエーションであり、ADPKDの罹患率を鑑みると責任変異としての可能性は乏しいことがわかる。病的意義が不明なバリエーションに関しては、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、その解釈は慎重になされるべきである。

NGS を用いた遺伝子解析の限界

NGS はショートリードを解析するため、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の同定は困難となる。われわれ

れは CONTRA³⁸⁾ というソフトウェアを用いて、対象サンプルの平均カバレッジを、複数のコントロール検体におけるそれと比較し、CNVs の検出を試みている。しかしながら、TGPS ではシーケンス情報を持つ遺伝子自体が偏在して存在しているため解像度が低く、CNVs の開始・終止点の同定はなお困難である。NGS のみに頼らず、CNV アレイや MLPA 法の併用が有用とされている。

嚢胞性腎疾患に特異的な課題としては、ADPKD の責任遺伝子の一つである *PKDI* があげられる。*PKDI* は 46 個のエクソンから成る遺伝子であるが、エクソン 1~33 と 98% 近い相同性を有する偽遺伝子 (pseudogene) が 6 個存在することが知られている³⁹⁾。偽遺伝子を *PKDI* 遺伝子として解析しないために、*PKDI* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて数 kbp の領域をロング PCR にて増幅した後にサンガー法^{40~42)} や NGS を用いた解析^{43~45)} をする手法が従来とられていた。しかしわれわれの研究を含め、TGPS を用いても偽遺伝子は回避できることが近年、確認されてきている^{9, 11, 46, 47)}。一方で、*PKDI* のエクソン 1 は GC 含有率が高いため NGS では解析できない⁴⁸⁾。そのため、NGS を用いた遺伝子解析にて *PKDI* に病的変異を認めなかった場合は、*PKDI* のエクソン 1 領域を対象にサンガー法を用いた遺伝子解析を行うことが望ましい⁴⁹⁾。

また、ADTKD の責任遺伝子の一つである *MUC1* の病的変異は糖鎖修飾を担う領域である variable number of tandem repeats (VNTRs) 内のフレームシフト変異が主とされている⁵⁰⁾。VNTRs は 60 塩基から成るリピート配列であり、そのコピー数は 20~125 と個人差が大きい。そのため、NGS やサンガー法を用いた遺伝子解析では同定できず、SNaPshot 法⁵¹⁾ などの特殊な解析が必要とされている。しかしながらわが国においては、われわれを含めて TGPS にてこの VNTRs のフレームシフト変異が検出されており⁵²⁾ (第 62 回日本腎臓学会学術総会)、今後、NGS を用いた遺伝子解析が有用な症例の特徴が明らかになることが期待される。

NGS を用いた遺伝子解析における二次的所見

NGS を用いた網羅的遺伝子解析では、診断目的とされた症候とは別の病的遺伝子変異 (二次的所見) が見出されることがある。われわれの扱う嚢胞性腎疾患パネルのように、1 つの症候の責任遺伝子のみを解析対象とした TGPS では問題になることはなく、この点はパネル診断の強みである。一方で、がん関連遺伝子などを含んだ広範囲の遺伝子を対象とした TGPS や、すべての遺伝子を解析対象とする

WES や WGS などでは考慮する必要がある。ACMG は、*BRCA1/2* や *WT1* 遺伝子のような生命への重篤性や治療・予防の可能性のある 59 の遺伝子 (ACMG 59) は少なくとも患者本人に開示すべきとしている^{53, 54)}。わが国では 2017 年に日本人類遺伝学会が二次的所見に関する提言を公表し、国立研究開発法人日本医療研究開発機構のゲノム創薬基盤推進研究事業において、臨床の現場でゲノム医療を実施する際の患者・家族への説明事項や留意事項を二次的所見への対応を含めてまとめた「ゲノム医療における情報伝達プロセスに関する提言」が公表されている。しかしながら、認められた変異の病的妥当性の評価や開示の方法は各施設に委ねられており、このような網羅的遺伝子解析を行う場合には、遺伝カウンセリング体制も含めた遺伝子医療部門との連携が不可欠である。

おわりに

NGS を用いた遺伝子解析は、現在も圧倒的なスピードで技術が進歩している。嚢胞性腎疾患においても、診断の最初的手段として遺伝子解析を行う “genome first” の時代が訪れるかもしれない。しかし、ゲノムデータの解釈は容易ではなく、疾患原因となる新たな責任遺伝子の発見や、新たな変異の解釈のためには、詳細な臨床情報の把握がいまなお重要であると思われる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文献

1. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, Petrovski S, Aggarwal VS, Milo-Rasouly H, et al. Diagnostic utility of exome sequencing for kidney disease. *N Engl J Med* 2019 ; 380 : 142–151.
2. Connaughton DM, Kennedy C, Shril S, Mann N, Murray SL, Williams PA, et al. Monogenic causes of chronic kidney disease in adults. *Kidney Int* 2019 ; 95 : 914–928.
3. Nestor JG, Groopman EE, Gharavi AG. Towards precision nephrology : the opportunities and challenges of genomic medicine. *J Nephrol* 2018 ; 31 : 47–60.
4. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012 ; 5 : 887–900.
5. Schwarze K, Buchanan J, Taylor JC, Wordsworth S. Are whole-exome and whole-genome sequencing approaches cost-effective? A systematic review of the literature. *Genet Med* 2018 ; 20 : 1122–1130.
6. Wolf MTF. Nephronophthisis and related syndromes. *Curr Opin*

- Pediatr* 2015 ; 27 : 201–211.
7. Kang HG, Lee HK, Ahn YH, Joung J-G, Nam J, Kim NKD, et al. Targeted exome sequencing resolves allelic and the genetic heterogeneity in the genetic diagnosis of nephronophthisis-related ciliopathy. *Exp Mol Med* 2016 ; 48 : e251.
 8. Eckardt KU, Alper SL, Antignac C, Bleyer AJ, Chauveau D, Dahan K, et al. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease : diagnosis, classification, and management--A KDIGO consensus report. *Kidney Int* 2015 ; 88 : 676–683.
 9. Eisenberger T, Decker C, Hiersche M, Hamann RC, Decker E, Neuber S, et al. An efficient and comprehensive strategy for genetic diagnostics of polycystic kidney disease. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0116680.
 10. Bullich G, Domingo-Gallego A, Vargas I, Ruiz P, Lorente-Grandoso L, Furlano M, et al. A kidney-disease gene panel allows a comprehensive genetic diagnosis of cystic and glomerular inherited kidney diseases. *Kidney Int* 2018 ; 94 : 363–371.
 11. Fujimaru T, Mori T, Sekine A, Mandai S, Chiga M, Kikuchi H, et al. Kidney enlargement and multiple liver cyst formation implicate mutations in PKD1/2 in adult sporadic polycystic kidney disease. *Clin Genet* 2018 ; 94 : 125–131.
 12. Horie S, Mochizuki T, Muto S, Hanaoka K, Fukushima Y, Narita I, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for polycystic kidney disease 2014. *Clin Exp Nephrol* 2016 ; 20 : 493–509.
 13. Chapman AB, Devuyt O, Eckardt KU, Gansevoort RT, Harris T, Horie S, et al. Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD) : Executive summary from a Kidney Disease : Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2015 ; 88 : 17–27.
 14. Rangan GK, Alexander SI, Campbell KL, Dexter MAJ, Lee VW, Lopez-Vargas P, et al. KHA-CARI guideline recommendations for the diagnosis and management of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrology* 2016 ; 21 : 705–716.
 15. Snoek R, van Setten J, Keating BJ, Israni AK, Jacobson PA, Oetting WS, et al. NPHP1 (Nephrocystin-1) gene deletions cause adult-onset ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 : 1772–1779.
 16. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, Dillinger EK, Heyer CM, Hopp K, et al. Mutations in GANAB, encoding the glucosidase ii α subunit, cause autosomal-dominant polycystic kidney and liver disease. *Am J Hum Genet* 2016 ; 98 : 1193–1207.
 17. Drenth JPH, te Morsche RHM, Smink R, Bonifacino JS, Jansen JBMJ. Germline mutations in PRKCSH are associated with autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet* 2003 ; 33 : 345–347.
 18. Li A, Davila S, Furu L, Qian Q, Tian X, Kamath PS, et al. Mutations in PRKCSH cause isolated autosomal dominant polycystic liver disease. *Am J Hum Genet* 2003 ; 72 : 691–703.
 19. Iliuta IA, Kalatharan V, Wang K, Cornec-Le Gall E, Conklin J, Pourafkari M, et al. Polycystic kidney disease without an apparent family history. *J Am Soc Nephrol* 2017 ; 28 : 2768–2776.
 20. Besse W, Choi J, Ahram D, Mane S, Sanna-Cherchi S, Torres V, et al. A noncoding variant in GANAB explains isolated polycystic liver disease (PCLD) in a large family. *Hum Mutat* 2018 ; 39 : 378–382.
 21. Reddy B V, Chapman AB. A patient with a novel gene mutation leading to autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017 ; 12 : 1695–1698.
 22. Gevers TJG, Drenth JPH. Diagnosis and management of polycystic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013 ; 10 : 101–108.
 23. Savige J, Mallett A, Tunnicliffe DJ, Rangan GK. KHA-CARI autosomal dominant polycystic kidney disease guideline : management of polycystic liver disease. *Semin Nephrol* 2015 ; 35 : 618–622.e5.
 24. Cornec-Le Gall E, Torres VE, Harris PC. Genetic complexity of autosomal dominant polycystic kidney and liver diseases. *J Am Soc Nephrol* 2018 ; 29 : 13–23.
 25. Cornec-Le Gall E, Olson RJ, Besse W, Heyer CM, Gainullin VG, Smith JM, et al. Monoallelic mutations to DNAJB11 cause atypical autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 2018 ; 102 : 832–844.
 26. Lu H, Galeano MCR, Ott E, Kaeslin G, Kausalya PJ, Kramer C, et al. Mutations in DZIP1L, which encodes a ciliary-transition-zone protein, cause autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2017 ; 49 : 1025–1034.
 27. Macia MS, Halbritter J, Delous M, Bredrup C, Gutter A, Filhol E, et al. Mutations in MAPKBP1 cause juvenile or late-onset cilia-independent nephronophthisis. *Am J Hum Genet* 2017 ; 100 : 323–333.
 28. Wheway G, Schmidts M, Mans DA, Szymanska K, Nguyen T-MT, Racher H, et al. An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. *Nat Cell Biol* 2015 ; 17 : 1074–1087.
 29. Bolar NA, Golzio C, Živná M, Hayot G, Van Hemelrijk C, Schepers D, et al. Heterozygous loss-of-function SEC61A1 mutations cause autosomal-dominant tubulo-interstitial and glomerulocystic kidney disease with anemia. *Am J Hum Genet* 2016 ; 99 : 174–187.
 30. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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.
 31. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, Bunyan DJ, Seaby EG, Graham N, et al. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2016 ; 31 : 961–970.
 32. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009 ; 4 : 1073–1082.
 33. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010 ; 7 : 248–249.
 34. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’roak BJ, Cooper GM, Shendure

- J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 2014 ; 46 : 310–315.
35. Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, et al. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet* 2016 ; 48 : 1581–1586.
36. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016 ; 536 : 285–291.
37. Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saitsu H, et al. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet* 2016 ; 61 : 547–553.
38. Li J, Lupat R, Amarasinghe KC, Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, et al. CONTRA : Copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics* 2012 ; 28 : 1307–1313.
39. Bogdanova N, Markoff A, Gerke V, McCluskey M, Horst J, Dworniczak B. Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* 2001 ; 74 : 333–341.
40. Watnick TJ, Piontek KB, Cordai TM, Weber H, Gandolph MA, Qian F, et al. An unusual pattern of mutation in the duplicated portion of PKD1 is revealed by use of a novel strategy for mutation detection. *Hum Mol Genet* 1997 ; 6 : 1473–1481.
41. Watnick T, Phakdeekitcharoen B, Johnson A, Gandolph M, Wang M, Briefel G, et al. Mutation detection of PKD1 identifies a novel mutation common to three families with aneurysms and/or very-early-onset disease. *Am J Hum Genet* 1999 ; 65 : 1561–1571.
42. Phakdeekitcharoen B, Watnick TJ, Germino GG. Mutation analysis of the entire replicated portion of PKD1 using genomic DNA samples. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 955–963.
43. Rossetti S, Hopp K, Sikkink RA, Sundsbak JL, Lee YK, Kubly V, et al. Identification of gene mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease through targeted resequencing. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 915–933.
44. Tan AY, Michael A, Liu G, Elemento O, Blumenfeld J, Donahue S, et al. Molecular diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease using next-generation sequencing. *J Mol Diagnostics* 2014 ; 16 : 216–228.
45. Kinoshita M, Higashihara E, Kawano H, Higashiyama R, Koga D, Fukui T, et al. Technical evaluation : Identification of pathogenic mutations in PKD1 and PKD2 in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease by next-generation sequencing and use of a comprehensive new classification system. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0166288.
46. Trujillano D, Bullich G, Ossowski S, Ballarín J, Torra R, Estivill X, et al. Diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease using efficient *PKD1* and *PKD2* targeted next-generation sequencing. *Mol Genet Genomic Med* 2014 ; 2 : 412–421.
47. Mori T, Hosomichi K, Chiga M, Mandai S, Nakaoka H, Sahara E, 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.
48. Mallawaarachchi AC, Hort Y, Cowley MJ, McCabe MJ, Minoche A, Dinger ME, et al. Whole-genome sequencing overcomes pseudogene homology to diagnose autosomal dominant polycystic kidney disease. *Eur J Hum Genet* 2016 ; 24 : 1584–1590.
49. Mochizuki T, Teraoka A, Akagawa H, Makabe S, Akihisa T, Sato M, et al. Mutation analyses by next-generation sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification in Japanese autosomal dominant polycystic kidney disease patients. *Clin Exp Nephrol* 2019 ; 23 : 1022–1030.
50. Kirby A, Gnirke A, Jaffe DB, Barešová V, Pochet N, Blumenstiel B, et al. Mutations causing medullary cystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1 missed by massively parallel sequencing. *Nat Genet* 2013 ; 45 : 299–303.
51. Ekici AB, Hackenbeck T, Morinière V, Pannes A, Buettner M, Uebe S, et al. Renal fibrosis is the common feature of autosomal dominant tubulointerstitial kidney diseases caused by mutations in mucin 1 or uromodulin. *Kidney Int* 2014 ; 86 : 589–599.
52. 北村博司. 腎臓の構造と機能異常 髄質嚢胞性腎疾患の遺伝子異常と形態変化. *日腎会誌* 2018 ; 60 : 1239–1243.
53. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 2013 ; 15 : 565–574.
54. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0) : a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2017 ; 19 : 249–255.