

常染色体優性多発性嚢胞腎のシーケンス解析による疾患原因の解明

大阪医科大学 泌尿生殖・発達医学講座 泌尿器科学教室

小村 和正

1.緒言

両側の腎臓に嚢胞が無数に生じる遺伝性疾患である多発性嚢胞腎 (Polycystic Kidney) には、常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease : ADPKD) と常染色体劣性多発性嚢胞腎 (Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease : ARPKD) とがある。

このうち、指定難病 67 に登録されている常染色体優性多発性嚢胞腎 (Autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) は Polycystic Kidney Disease Type 1, Type2 (PKD1, PKD2) の Germline Mutation に起因するとされ、PKD1 は第 16 番染色体短腕の p13.3, PKD2 は第 4 番染色体長腕 q21-23 に位置している。自覚症状として、肉眼的血尿 (31%)、側腹部・背部痛 (30%)、易疲労感 (9%)、腹部腫瘤 (8%)、発熱 (7%)、浮腫 (6%)、頭痛 (5%)、嘔気 (5%)、腹部膨満 (4%) がある。無症状でも家族に多発性嚢胞腎患者がいるから (11%) との理由や、最近では健診でのエコーや人間ドックで早期に診断されることも多くなっている。

治療法として Driver となる遺伝子は特定されているが、根本的な治療法は存在せず、現在もバソプレシン V2-受容体拮抗薬であるトルバプタンの他に、有効性を示す薬剤は存在していない。トルバプタンは、嚢胞増大を助長するとされるバソプレシンの作用を抑制するものであり、世界的な臨床試験において腎嚢胞の増大と腎機能の低下をプラセボと比較し有意に抑制することが報告されている。また、多くの患者で高血圧を合併しており、降圧治療が腎機能保護作用については現在までに、明らかな有効性は示されていないが、合併頻度の高い脳動脈瘤破裂など頭蓋内出血の危険因子を低下させることや心血管合併症の予防には有効と考えられている。透析に至った患者の腹部膨満を緩和する方法として、両側腎動脈塞栓術が行われ、一定の効果が得られている。

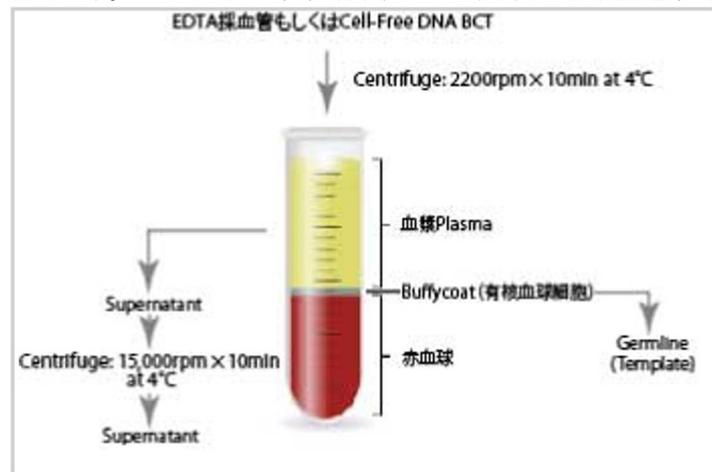
本研究では、ADPKD 症例より Germline mutation と、疾病部位検体の全トランスクリプトーム解析により、ADPKD の発症時期が個人により違うことなどの理由について、また、新たな治療ターゲットの発見を目指しておこなっている。また細胞株実験によって、そのフェノタイプの validation を行う。

2.方法

PKD1 と PKD2 の遺伝子産物である蛋白 PC1 (Polycystin 1) と PC2 (Polycystin 2) は TRPP (Transient Receptor Potential Channel for Polycystin) subfamily に属する Ca チャンネルであり、TRPP は外界の物理的刺激 (光、熱、触覚、味覚など) を生物が感知するためのチャンネルとして位置づけられている。PC1 と PC2 は腎臓、肝臓、膵臓、乳腺の管上皮細胞、平滑筋と血管内皮細胞、脳の星状細胞に存在するが、これらの遺伝子変異による機能異常により嚢胞性腎疾患を発症し、最終的には腎不全に至る。

分子生物学的には、PKD 細胞では PC 機能異常により、尿細管上皮細胞内の Ca 濃度は低値となり、サイクリック AMP (cAMP) を分解する酵素 (ホスホディエステラーゼ、PDE) 活性が低下し、細胞内 cAMP 濃度が上昇する。その結果、cAMP 依存性 PKA (Protein Kinase A) 機能が高まり、種々の下流シグナル経路 (EGF/EGFR, Wnt, Raf/MEK/ERK, JAK/STAT, mTOR など) が活性化されることにより細胞増殖が引き起こされる。PC の存在する繊毛は細胞極性 (尿細管構造形成) を保つ機能に関与しており、繊毛の機能異常によって細胞極性機能が障害を受け、細胞はチューブ状に整列せず、平面的に広がる結果、嚢胞が形成されると考えられている。

申請者らは、PKD 細胞内で発生している増殖シグナルを網羅的に解析することにより、細胞が依存している pathway を明らかにし、その増殖シグナル自体を選択的に阻害することにより、病状の進行と嚢胞増大による腎機能廃絶を予防することが可能である、との仮説をもとに実験系を構築した。また、ADPKD は個体間での発病時期に違いがあることがよく知られており、血圧等の環境因子の他に、遺伝学的な素因が見られるかを Germline の全エクソーム解析によって解析した (下図参照)。これにより、個体間での遺伝学的な素因と、増殖シグナルの関係性を明らかにすることにより、ADPKD の更なる疾患の分子生物学的な解明と治療ターゲットを解明した。本研究はバイオバンク事業からの臨床検体を用いるトランスレーショナルリサーチとして本学倫理委員会の承認を得ている (IRB 承認番号: 臨 433)。



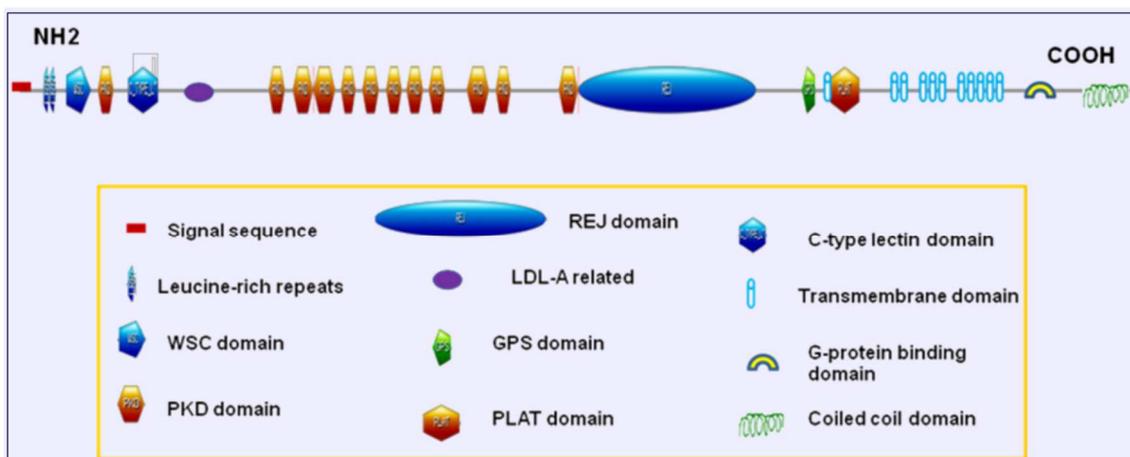
3.結果

手術、生検による ADPKD の組織検体は検体体積の 10 倍量の -70°C の RNA later-ICE に入れ -20°C で保管したうえで、順次、NucleoSpin TriPrep (TaKaRa) を用いて DNA、RNA を回収した。現在までに 11 例にて、組織検体または採血検体を採集できた。本研究では、トラン

スクリプトーム解析の際に long noncoding RNA, micro RNA についての検討も予定していたため、得られた RNA は Qbit、Bioanalyzer を用いて input としての Quality Check を行い、polyA purification ではなく、NEBNext rRNA Depletion Kit を用いて rRNA 除去を行った。その後 NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina でライブラリー作成を行った。

Germline mutation 解析には、採血での Buffycoat から DNA 抽出を行い、NEBNext Ultra II FS DNA Library prep Kit for Illumina を用いてライブラリーを作成した。また、研究結果より新規のバイオマーカーとなりうるターゲット候補の validation に使用する目的で血漿成分を順次バイオバンクに保管しており、シーケンス解析後に、これらを利用する予定である。本学研究部門内に購入した Ion S5 XL Next-Generation Sequencing Systems (Thermo Fisher Scientific) を用いて、PKD1, PKD2 を含んだターゲットシーケンスパネルを作製したうえで、その解析を現在行っている。また、同領域の特定の spot を詳細に解析する目的で QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad) により、変異数の絶対定量を施行し、現在解析中である。

細胞株実験系として、マウス腎臓有足細胞（ポドサイト）細胞株（E11）に CRISPR/Cas9 にて PKD1-REJ domain をターゲットにノックアウトの細胞株を樹立した。



これを ddPCR にてすでに確認済みであり、シーケンスで得られた情報での Validation を進めて行く予定である。

4.考察

ADPKD における責任遺伝子である PKD1 と PKD2 では、PKD1 変異が OKD2 変異より一般に臨床症状が重い、同じ家系でも個人差が大きいが知られている。腎容積が増大する患者では、徐々に腎機能が低下していき、腎不全となり、透析療法が必要となる。60 歳までに約 50% の人が腎不全になる。また脳動脈瘤によるくも膜下出血の危険性が高いことも知られており、全身性の疾患とみることも重要である。

5.結語

本研究により ADPKD の分子細胞学的な解析が、本疾患の患者様に貢献できることを願い、さらに研究を進めたいと考えている。