

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

進行性腎障害に関する調査研究

(H23-難治-一般-033)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松尾 清一

平成 25 (2013) 年 4 月

生体試料活用分科会

責任研究分担者

成田一衛 新潟大学・医歯学系・教授

研究協力者

後藤眞 新潟大学・医歯学系・講師

金子佳賢 新潟大学・医歯学系・助教

塚口裕康 関西医科大学・第二内科・講師

細道一善 国立遺伝学研究所・人類遺伝研究部門・助教

井ノ上逸朗 国立遺伝学研究所・人類遺伝研究部門・教授

研究要旨

IgA腎症の発症機序に関する多くの研究により、IgA1分子のヒンジ部糖鎖不全の関与など、徐々に明らかにされている点はあるが、その詳細は不明である。一方、IgA腎症には家族内集積が認められ、発症には遺伝要因が関与していると考えられる。遺伝要因の関与が強いと考えられる家族性IgA腎症のゲノム解析により、効果サイズの大きいリスク遺伝子が同定され、IgA腎症の疾患パスウェイが明らかになる可能性がある。

腎生検でIgA腎症と確定診断された症例が4名存在する1家系（11名の末梢血からDNAを抽出）を対象とした。ゲノムワイドSNPアレイによりSNPタイピングを行い、SNP HitLinkを用いて全ゲノム領域の連鎖解析を行った。パラメトリック解析では、LODスコア >1.0 を示す複数の領域が検出された。エクソーム解析はIgA腎症4名を含む8名を対象とした。ゲノムから全エクソン領域を濃縮し、次世代シーケンサーを用いて全エクソン領域の塩基配列を決定した。得られた配列情報からフィルタリングを行い、IgA腎症の発症に関連する12のvariantを選別した。中でもEEA1遺伝子における変異は連鎖解析の結果と一致して有力な候補であり、他の家系の症例においてもEEA1遺伝子内に変異が存在するか、また孤発性IgA腎症における同遺伝子内のrare variantについて検討を進めている。

遺伝学的アプローチから家族性IgA腎症の発症に関わる効果サイズの大きいリスク遺伝子が同定され、IgA腎症の発症メカニズムの解明につながると期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、家族性IgA腎症の疾患感受性遺伝子を同定し、それを通して本症の発症機序をより詳細に理解することである。腎生検で確定診断したIgA腎症患者において、一見孤発例と思われる症例でも約10%に尿異常や腎不全の家族歴が観察され、IgA腎症による腎不全で肉親をドナーとする腎移植を行うと、移植直前のドナー腎糸球体に2～3割ほどの頻度でIgAの糸球体沈着が観察される。IgA腎症の発症に遺伝要因が関与していると考えられる根拠である。

家族性IgA腎症の原因を明らかにするために、多数の家系を対象とした連鎖解析が行われてきたが、現在までに責任遺伝子は同定されていない。近年、次世代シーケンサーによる大量の遺伝子配列情報から家族性希少疾患を中心とした疾患遺伝子の解明が進んでいる。今回、家族性IgA腎症にもこの解析方法を試みた。

B. 研究方法

腎生検でIgA腎症と確定診断された症例が4名存在する1家系（11名の末梢血からDNAを抽出）を対象とした。Affymetrix Human Genome-Wide SNP Array 6.0によりSNPタイピングを行い、全ゲノム領域の連鎖解析を行った。エクソーム解析はIgA腎症4名を含む8名を対象とした。SureSelectによりゲノムから全エクソン領域を濃縮し、次世代シーケンサー HiSeq 2000 (illumina)を用いて全エクソン領域の塩基配列を決定した。得られた配列情報からフィルタリング（アミノ酸が非同義置換となる、1000genomesでの頻度が1%以下、観察されたアレル頻度が0.3～0.7）を行い、IgA腎症の発症に関連するvariantを選別した。さらに選別されたvariantについて、アミノ酸機能予測プログラムで評価し、家系内のsegregationを確認した。

(倫理面への配慮)

上記研究計画については新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会で承認された(承認番号 554)。研究の対象となる方へはインフォームドコンセントを行い、同意を得た。検体は匿名化を行い、個人情報 は 厳重に管理されている。

C. 研究結果

全ゲノム連鎖解析では、パラメトリック解析で LOD スコア > 1.0 を示す 9 領域が検出された。エクソーム解析では、全エクソンの配列情報からフィルタリングを行い、IgA 腎症患者にのみ共通して認められた 12 個の variant が選別された。この中で家系内 co-segregation が認められる variant は *PLUNC* と *EEA1* に存在し、さらに *EEA1* p.F161Y は連鎖解析で LOD スコアが最も高い領域内に認められた。機能予測プログラムでも *EEA1* p.F161Y は最も影響力が強い variant であった。現在、他の家系の症例においても変異が存在するか、また孤発性 IgA 腎症において *EEA1* 遺伝子内の rare variant の検討を進めている。

D. 考察

家族性 IgA 腎症を対象とした連鎖解析からいくつかの候補遺伝子座 (2q36、4q26-31、6q22-23、17q12-22) が報告されているが、責任遺伝子は未だ同定されていない。家族性 IgA 腎症には遺伝的異質性が指摘されており、複数の疾患感受性遺伝子が存在することが示唆されている。

近年、全ゲノム関連解析により IgA 腎症の関連遺伝子として HLA 領域を含めたいくつかの遺伝子が報告されているが、家族性 IgA 腎症に関わる遺伝子のリスクはさらに大きいと思われる。

今回の家族性 IgA 腎症 1 家系の解析では候補遺伝子変異の中で *EEA1* p.F161Y が有力であると考えられた。*EEA1* がコードする蛋白は early endosome antigen 1 であり、初期エンドソームに結合するコイルドコイル蛋白である。初期エンドサイトーシス小胞間の融合に必須である。IgA 分子のトランスサイトーシスにも関与しており、粘膜免疫異常から IgA 腎症の発症に関与する可能性がある。他の家族性 IgA 腎症家系と孤発性 IgA 腎症における検証と機能解析を通じて、IgA 腎症の疾患感受性遺伝子として同定されることが期待される。

E. 結論

家族性 IgA 腎症の発症に関与する疾患感受性遺伝子を検出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, Kabasawa H, Yamamoto-Kabasawa K, Kurosawa H, Sato H, Iino N, Takeda T, Suzuki Y, Narita I, Yamagata K, Tomino Y, Gejyo F, Hirayama Y, Sekine S, Saito A. Significance of urinary full-length and ectodomain forms of megalin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012; 35: 1112-1118.
2. Kaneko Y, Otsuka T, Tsuchida Y, Gejyo F, Narita I. Integrin alpha1/beta1 and alpha2/beta1 as a receptor for IgA1 in human glomerular mesangial cells in IgA nephropathy. *Int Immunol* 2012; 24: 219-232.
3. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, Snyder HJ, Choi M, Hou P, Scolari F, Izzi C, Gigante M, Gesualdo L, Savoldi S, Amoroso A, Cusi D, Zamboli P, Julian BA, Novak J, Wyatt RJ, Mucha K, Perola M, Kristiansson K, Viktorin A, Magnusson PK, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Boland A, Metzger M, Thibaudin L, Wanner C, Jager KJ, Goto S, Maixnerova D, Karnib HH, Nagy J, Panzer U, Xie J, Chen N, Tesar V, Narita I, Berthoux F, Floege J, Stengel B, Zhang H, Lifton RP, Gharavi AG (48 名中 42 番目). Geographic Differences in Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy: GWAS Replication Study and Geospatial Risk Analysis. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002765.
4. Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I. A combination of healthy lifestyle factors is associated with a decreased incidence of chronic kidney disease: a population-based cohort study. *Hypertens Res* 2012. in press
5. Takeyama A, Sato H, Soma-Nagae T, Kabasawa H, Suzuki A, Yamamoto-Kabasawa K, Hosojima M, Kaneko R, Higuchi F, Kaseda R, Ogasawara S, Narita I, Saito A. Megalin is downregulated via LPS-TNF-alpha-ERK1/2 signaling pathway in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Com* 2011; 407: 108-112.
6. Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I. Differences in the local and national prevalences of chronic kidney disease based on annual health check program data. *Clin Exp Nephrol* 2012. in press
7. Baba J, Watanabe S, Saida Y, Tanaka T, Miyabayashi T, Koshio J, Ichikawa K, Nozaki K, Koya T, Deguchi K, Tan C, Miura S, Tanaka H, Tanaka J, Kagamu H, Yoshizawa

H, Nakata K, Narita I. Depletion of radio-resistant regulatory T cells enhances antitumor immunity during recovery from lymphopenia. *Blood* 2012. in press

8. Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I. Use of Japanese Society for Dialysis Therapy dialysis tables to compare the local and national incidence of dialysis. *Ther Ape Dial* 2012; 16: 63-67.
9. Yoshita K, Kawano M, Mizushima I, Hara S, Ito Y, Imai N, Ueno M, Nishi S, Nomura H, Narita I, Saeki T. Light-microscopic characteristics of IgG4-related tubulointerstitial nephritis: distinction from non-IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Nephrol Dial Transpl* 2012; 27: 2755-2761.
10. Wang X, Sakatsume M, Sakamaki Y, Inomata S, Yamamoto T, Narita I. Quantitative Histological Analysis of SM22alpha (Transgelin) in an Adriamycin-Induced Focal Segmental Glomerulosclerosis Model. *Nephron Exp Nephrol* 2012; 120: e1-e11.
11. Nozawa Y, Sato A, Piao H, Morioka T, Narita I, Oite T. The effect of renal administration of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor or stable prostaglandin I(2) analog on the progression of sclerotic glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Nephrol* 2012; 16: 221-230.
12. Kuroda T, Tanabe N, Kobayashi D, Sato H, Wada Y, Murakami S, Saeki T, Nakano M, Narita I. Treatment with biologic agents improves the prognosis of patients with rheumatoid arthritis and amyloidosis. *J Rheumatol* 2012; 39: 1348-1354.
13. Wakasugi M, Narita I, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Fujimoto S, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Weight gain after 20 years of age is associated with prevalence of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2012; 16: 259-268.

2. 学会発表

1. Saeki T, Kawano M, Mizushima I, Yamamoto M, Wada Y, Ito T, Yamazaki H, Nakashima H, Saito T, Narita I. Long-Term Outcome of Patients with IgG4-Related Kidney Disease. American Society of Nephrology Kidney Week 2012 (2012.10.30-2012.11.4 San Diego)
2. Goto S, Hosomichi K, Tsukaguchi H, Narita I. Exome Sequencing Identifies a Novel EEA1 Variant in Japanese Familial IgA

Nephropathy. American Society of Nephrology Kidney Week 2012 (2012.10.30-2012.11.4 San Diego)

3. Iino N, Narita I. Tolvaptan Is a New Therapeutic Tool for Patients with Congestive Heart Failure Who Underwent Peritoneal Dialysis. American Society of Nephrology Kidney Week 2012 (2012.10.30-2012.11.4 San Diego)
4. Iguchi A, Yamazaki H, Kazama J J, Narita I. Up-Regulation of Fibroblast Growth Factor 23 in Prostate Cancer and Bone Metastatic Lesions of Prostate Cancer-Induced Oncogenic Hypophosphatemic Osteomalacia. American Society of Nephrology Kidney Week 2012 (2012.10.30-2012.11.4 San Diego)
5. Nakatsue T, Sato H, Wada Y, Murakami S, Kuroda T, Nakano M, Narita I. Alfacalcidol May Lower Systolic Blood Pressure in Systemic Lupus Erythematosus: 8 Year Follow-Up Study. American Society of Nephrology Kidney Week 2012 (2012.10.30-2012.11.4 San Diego)
6. 後藤 眞、細道 一善、塚口 裕康、井ノ上逸朗、成田 一衛：ワークショップ次世代シーケンサーを用いた腎臓病研究 家族性IgA腎症のエクソーム解析 第55回日本腎臓学会学術総会 横浜 2012.6.1-2012.6.3

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 特許第 4502570 号：2010.4.30-2022.9.24
名称：遺伝子多型解析を用いた IgA 腎症診断および IgA 腎症診断用キット
権利者：(株)東洋紡ジーンアナリス、下条文武
発明者：下条文武、成田一衛

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし