

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591185

研究課題名(和文)全ゲノム解析による家族性IgA腎症の原因遺伝子の探索

研究課題名(英文)Whole exome analysis for causative genes of familial IgA nephropathy

研究代表者

後藤 眞(Goto, Shin)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：00463969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性IgA腎症に対して全ゲノム関連解析が行われ、いくつかのリスク遺伝子が明らかとなっているが、家族性IgA腎症の原因遺伝子は不明である。申請者らは、腎生検でIgA腎症と診断された4名を含む家族性IgA腎症1家系に対してエクソーム解析を行った。得られたvariantからアミノ酸置換あり、データベースでの頻度が低く、常染色体優性遺伝モデルに適合するヘテロ接合体の変異を抽出した。さらに4名の罹患者に共通する13変異から、家族内で疾患分離あり、アミノ酸置換の影響が大きいEEA1遺伝子変異を同定した。現在、機能解析を行い、IgA腎症の発症における役割の解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：In sporadic IgA nephropathy (IgAN), GWAS disclosed several risk variants, however, causative genes for familial IgAN remained elusive. We applied exome sequencing analysis in family comprising of four biopsy-proven IgAN. To identify the causative gene variant, several filtering screening were carried out based on non-synonymous, frequency less than one percent of 1000 genome project, and heterozygosity fitted with autosomal dominant inheritance. Finally, 13 variants were selected shared by all affected individuals. Among them, EEA1 variant were completely cosegregated with affection status of the family members, showed significant higher values in sequence conservation and prediction of functional changes of protein by amino-acid substitution. We are now investigating the functional analysis of EEA1 variant, and it is expected that these analyses will lead to the development of innovative therapeutics.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：家族性IgA腎症 エクソーム解析 連鎖解析

1. 研究開始当初の背景

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5-10%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系球体に2~3割ほどの頻度でIgAの系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。

2. 研究の目的

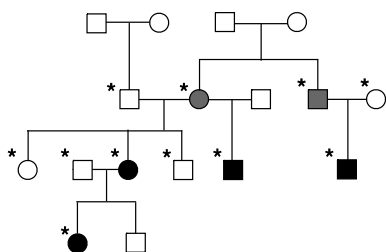
本研究の目的は、家族性IgA腎症の疾患感受性遺伝子を同定し、それを通して本症の発症機序をより詳細に理解することである。家族性IgA腎症の原因を明らかにするために、多数の家系を対象とした連鎖解析が行われてきたが、現在までに責任遺伝子は同定されていない。近年、高速シーケンサによる大量の遺伝子配列情報から家族性希少疾患を中心とした疾患遺伝子の解明が進んでいる。今回、家族性IgA腎症にもこの解析方法を試みた。

3. 研究の方法

最初に腎生検で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 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、1000 genomes project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。

次に他の家系での検証のため、27家系を対象としてEEA1遺伝子の変異スクリーニングを行い、変異を有する家系においてはsegregationを検討した。

・解析の対象とした家系図



4. 研究成果

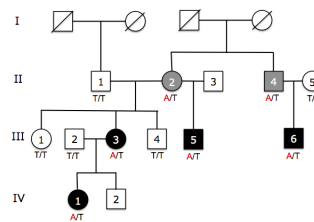
全ゲノム連鎖解析では、パラメトリック解析でLODスコア>1.0を示す9領域が検出された。エクソーム解析では、全エクソンの配列情報からフィルタリングを行い、IgA腎症患者にのみ共通して認められた13個のvariantが選別された。この中でEEA1 p.F161Yは連鎖解析でLODスコアが最も高い領域内に認められた。また家系内の罹患者・非罹患者においてco-segregationが完全に一致した。さらに他の27家系についてEEA1遺伝子変異スクリーニングを行い、F161Yとは異なる変異(R1262W, N1072K, E1010G)を6家系に認め、これらは浸透率を考慮してco-segregationを認めた。日本人エクソームデータベースと比較し、EEA1遺伝子変異は家族性IgA腎症に有意に多く認められた(オッズ比2.9)。

・候補遺伝子リスト

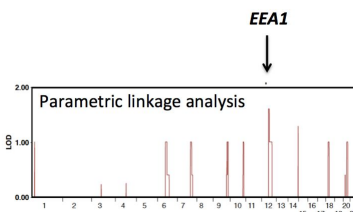
Gene		AAS	AVSIFT	PhyloP	PolyPhen2	LRT	MutationTaster	GERP++
ADH4	c.T1121G	p.V374G	0	0.89	0.55	1.00	0.01	3.11
BAI3	c.A2014G	p.I672V	1	0.99	0.00	1.00	0.00	3.57
C6orf165	c.G1649A	p.R550H	0.25	0.84	0.34	1.00	0.94	1.29
OPN1SW	c.G592A	p.E198K	0	0.98	0.99	1.00	1.00	3.75
TRIM32	c.C770G	p.T257R	0.24	0.97	0.00	0.94	0.07	2.39
FGFR2	c.G17C	p.R6P	0.2	0.90	0.53	0.93	0.00	2.01
EEA1	c.T482A	p.F161Y	0.05	1.00	0.98	1.00	0.97	4.99
ZNF519	c.A1006G	p.T336A	0.16	0.10	0.01	0.60	0.00	-1.42
ESCO1	c.G56C	p.S19T	0.94	0.06	0.95	0.13	0.13	2.61
PLUNC	c.G76A	p.V26M	0.19	0.00	0.00	0.47	0.00	-4.09
CHD6	c.C4961T	p.S1654F	0.02	1.00	0.04	0.99	0.12	4.84
CHD6	c.C181G	p.L61V	0.01	0.90	0.03	0.94	0.58	1.53

・家系内での co-segregation

EEA1
Early Endosome Antigen 1
c.T482A, p.F161Y



・連鎖解析との相関



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、さらに追加 27 家系のうち 6 家系に F161Y とは異なる変異を認めた。*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相互作用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からソーティングに必須である。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。さらに機能解析を通じて、IgA 腎症の疾患感受性遺伝子の役割が明らかになることが期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Watanabe H, Goto S, Miyashita A, Maruyama H, Wakasugi M, Yokoseki A, Kuwano R, Narita I. Role of the p.E66Q variant of GLA in the progression of chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 2014 Apr 10. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Miura T, Goto S, Iguchi S, Shimada H, Ueno M, Nishi S, Narita I: Membranoproliferative pattern of glomerular injury associated with complement component 9 deficiency due to Arg95Stop mutation. Clin Exp Nephrol 15: 86-91, 2011 査読あり
3. Inomata S, Sakatsume M, Sakamaki Y, Wang X, Goto S, Yamamoto T, Gejyo F, Narita I: Expression of SM22 α (transgelin) in glomerular and interstitial renal injury. Nephron Exper Nephrol 117: e104-e113, 2011 査読あり
4. Iguchi A, Kazama J, Komatsu M, Kaneko Y, Iino N, Goto S, Narita I: Three cases of gastric antral vascular ectasia in chronic renal failure. Nephrol and Urol :15-19, 2011 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. Hirofumi Watanabe, Shin Goto, Hiroki Maruyama, Ichiei Narita: p.E66Q variant of *α -galactosidase A* does not affect the progression of chronic kidney disease. Kidney Week. 2013.11.5-11.10, Atlanta, GA, USA
2. Shin Goto, Kazuyoshi Hosomichi, Hiroyasu Tsukaguchi, Ichiei Narita: Exome Sequencing Identifies a Novel *EEA1* Variant in Japanese Familial IgA Nephropathy. American Society of Nephrology Kidney Week 2012. 2012.10.30-11.04, San Diego, USA.
3. Goto S, Tsukaguchi H, Wada M, Narita I: Genome-wide linkagescan of Japanese families with IgA nephropathy. American Society of Nephrology Kidney Week. 2011.11.8-11.13, Philadelphia, USA
4. Narita I: Symposium: Membranoproliferative glomerulonephritis. Advancement in Treatment of Nephrotic Syndrome. 2011.6.14, Yokohama

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

後藤 眞 (GOTO SHIN)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号：00463969

(2)研究分担者

成田 一衛 (NARITA ICHIEI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：20272817

(3)連携研究者

()

研究者番号：