

平成30年6月14日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09250

研究課題名(和文) 新規遺伝子変異によるIgA腎症病態モデル解析

研究課題名(英文) Model analysis focusing on the mechanisms of rare variants in IgA nephropathy

研究代表者

後藤 真 (Goto, Shin)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00463969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：IgA腎症は慢性糸球体腎炎の中で最も多い疾患であり、家族集積性があることから発症には遺伝要因の関与が推定されている。私たちは家族性IgA腎症を約30家系収集し、エクソーム解析や連鎖解析による網羅的ゲノム解析を行った。複数の家系において、IgA腎症患者にのみ認められ、頻度が低い遺伝子変異に着目すると、IgA腎症の遺伝要因が粘膜免疫に関連することが示唆された。口蓋扁桃における粘膜免疫に着目し、扁桃における糖鎖不全IgA1およびIgA分子レパトリを検討した。扁桃に含まれる糖鎖不全IgA1は糸球体に沈着している糖鎖不全IgA1と相関した。扁桃のIgAレパトリは、V遺伝子多様性について検討している。

研究成果の概要(英文)：IgA nephropathy (IgAN) is the most prevalent glomerulonephritis among worldwide. Because familial aggregation is observed, genetic factors could be involved in the development of IgAN. We have collected 30 familial IgAN samples, and have carried out comprehensive genomic analysis. Among variants detected by next generation sequencer, multiple rare variants related to immune cells or mucosal immunity are co-segregated with patients in multiplex families. Next, we have conducted the quantitative analysis of galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1), APRIL, and IgA repertoire in palatine tonsils removed to treat IgAN. The levels of Gd-IgA1 were correlated with the degree of deposition of Gd-IgA1 in glomerulus, and usage of some V gene in IgA were different from that of controls, and this analysis is still ongoing.

研究分野：腎臓内科

キーワード：IgA腎症 エクソーム解析 口蓋扁桃

1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は慢性糸球体腎炎の中で最も多い疾患であり、家族集積性があることから発症には遺伝要因の関与が推定されている。孤発性 IgA 腎症に対する全ゲノム関連解析では 20 以上の疾患関連アレルが同定されたが、関連遺伝子の役割は不明な点が多い。一方、より遺伝背景が強い家族性 IgA 腎症については、ローカス異質性が存在し、責任遺伝子群は明らかでない。私たちは家族性 IgA 腎症を約 30 家系収集し、エクソーム解析による網羅的ゲノム解析を行っており、IgA 腎症の発症に強く関連する遺伝要因を解析している。

2. 研究の目的

家族性 IgA 腎症の網羅的ゲノム解析により、エクソン領域における変異・レアバリエント情報が容易に入手できるようになった。家族内で IgA 腎症罹患者にのみ観察されるバリエントをリスト化し、IgA 腎症の発症に関与する候補遺伝子に注目した。これらの新規遺伝子バリエントの機能に着目し、IgA 腎症の病態を解析しうるモデルシステムの確立を目的とする。

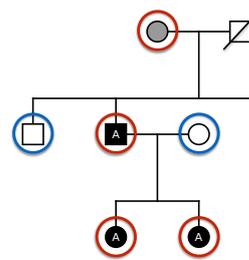
3. 研究の方法

収集した家族性 IgA 腎症の家系群において、比較的規模が大きい家系 (N001) を対象としたエクソーム解析から得られた候補遺伝子群を対象とした。N001 家系の候補遺伝子群の中で、非常に頻度が少ない遺伝子群に着目し、孤発性 IgA 腎症 386 症例を対象として、ターゲット・リシーケンスを行い、日本人コントロールとレアバリエント関連解析を行った。また小規模な 16 家系を対象とし、エクソーム解析および全ゲノム連鎖解析を行った。LOD 値から得られた連鎖領域において、co-segregation を認めるバリエントを選別した。

IgA 腎症の発症には粘膜免疫が重要と考えられるが、まず扁桃における糖鎖不全 IgA1 を測定した。扁桃組織をホモジェネート後に可溶化し、糖鎖不全 IgA1 を ELISA kit で定量化した。また腎生検組織の糸球体に沈着している糖鎖不全 IgA1 を画像ソフトウェアから定量化し、扁桃の糖鎖不全 IgA1 量との相関関係を検討した。さらに、扁桃に存在する IgA 分子のレパートリを解析した。扁桃組織から RNA を抽出し、IgA 分子 V 領域を PCR で増幅し、次世代シーケンサーで決定した。習慣性扁桃炎をコントロールとして比較した。

4. 研究成果

家族性 IgA 腎症 N001 家系のエクソーム解析では、腎生検で診断された IgA 腎症 3 名、持続する腎炎性尿異常 2 名、正常尿所見 2 名で構成され (右上図)、全ての構成者の末梢血から DNA を抽出し、エクソーム解析を行った。得られたバリエントから罹患者のみに認め



られ、ヘテロ接合、アミノ酸置換あり、日本人データベース (HGVD) で 1% 以下の頻度を

有する 13 レアバリエントを選別した。その中で、ToMMo、ExAC にも報告が認められない変異は、SIPA1 変異および STIL 変異であった (下表)。

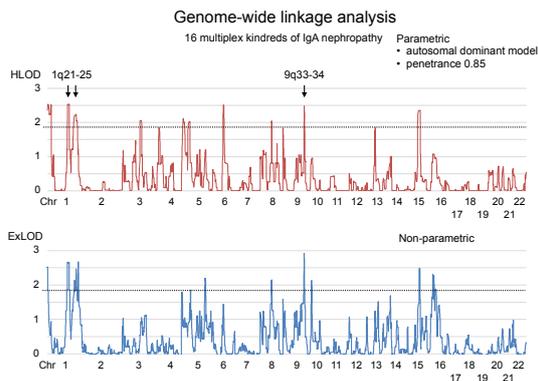
Rare variants / mutations shared only with IgAN patients

Chr	Gene	HGVD	ExAC East Asia	ExAC South Asia	PhyloP	SIFT	PolyPhen2	GERP++
1	KLF17	0.025	0.021	0.009	0.84	0.04	0.93	1.52
1	STIL				0.96	0.01	0.99	3.79
2	ST3G4L5			0.00006	0.97	0.1	0.11	2.18
3	TGM4	0.004	0.0005		0.03	0.05	0.34	-3.73
3	LAMB2	0.0008	0.001	0.0004	0.98	0.72	0.00	4.04
3	BSN	0.002	0.0005	0.0005	1.00	0.01	0.54	3.51
3	COL6A5		0.0002	0.0002				
11	SIPA1				1.00	0.02	0.96	3.74
15	ARID2B	0.017	0.001	0.0001	1.00	0	0.38	5.27
17	SLCSA10	0.006	0.0009		1.00	0.49	0.32	4.43
17	WSB1	0.018	0.003		1.00	0	1.00	5.5
17	TPS31L2	0.004	0.0002		1.00		0.98	3.52
17	TANC2		0.001	0.0003	0.84	0	0.93	1.52

これらの遺伝子におけるバリエントが孤発性 IgA 腎症の発症においても関連するか、孤発性 IgA 腎症 384 例を対象にターゲット・リシーケンスを行った。SIPA1 遺伝子における頻度 1% 以下のレアバリエントを collapse 法を用いて比較すると、IgA 腎症は健常日本人コントロールと比較して、suggestive level の有意差をもって頻度が高く認められた (4.6% vs. 2.6%, $P = 0.059$)。

SIPA1 遺伝子は免疫細胞に多く発現しており、RAP1 シグナルに関与する。SIPA1 欠損マウスでは B 細胞受容体の κ 鎖編集異常による自己免疫異常とループス様腎炎が観察される。家族性 IgA 腎症の他の家系ではこの変異は認められていないが、IgA 腎症の発症に関与する遺伝子変異として有望であると考えられる。

比較的規模が小さい 16 家系については、全ゲノム連鎖解析を行った。家族性 IgA 腎症においては、ローカス異質性から単一のピークに絞り込めない。パラメトリックおよびノンパラメトリック解析で suggestive level LOD 値 1.9 を超える領域を候補とした。中でも、1q21-25 は LOD 2.5 と最も高値を示し、antigen presenting gene cluster として遺伝子が集積する領域である。各家系で IgA 腎症患者に co-segregation し、日本人データベースで頻度 1% 以下のレアバリエント群から、CD1D および CD1E 変異が複数の家系で検出され、頻度 0.01% 以下のバリエントも含まれていた。また粘膜免疫に関与する SLAM 遺伝子群や FCRL 遺伝子群のレアバリエントも検出された。CD1 遺伝子群は細菌由来の脂質抗原



を認識する。IgA 腎症の発症に、粘膜免疫における宿主と細菌叢との相互作用が関係することを示唆する。Cd1d 遺伝子欠損マウスでは、IgA 分子のレパートリ多様性と腸管のマイクロバイオーームの変化が観察される。

N001 家系の解析と 16 家系の解析を通じて、IgA 腎症の病態には、IgA 分子の多様性の変化が生じている可能性が考えられた。

粘膜免疫応答の場として扁桃組織を対象とした。扁桃組織を用いて定量した Gd-IgA1 値は、糸球体に沈着した糖鎖不全 IgA1 と有意に正の相関関係を示し、扁桃における粘膜免疫が IgA 腎症に関与していることが示唆される。さらに扁桃組織中の IgA 分子レパートリを解析した。IgA 腎症と習慣性扁桃炎を比較し、解析症例数は少なく全体としての多様性に明らかな差は認めないが、IgA クラス、V 領域の分布について異なる結果が得られ、症例数を増やして解析を継続している。

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 2 件)

1. Watanabe H, Goto S, Mori H, Higashi K, Hosomichi K, Aizawa N, Takahashi N, Tsuchida M, Suzuki Y, Yamada T, Horii A, Inoue I, Kurokawa K, Narita I: Comprehensive microbiome analysis of tonsillar crypts in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* (査読あり) 2017;32:2072-2079.
2. Watanabe H, Goto S, Kondo D, Takata T, Yamazaki H, Hosojima M, Yamamoto S, Kaneko Y, Aoyagi R, Narita I: Comparison of methods of steroid administration combined with tonsillectomy for IgA nephropathy patients. *Clin Exp Nephrol* (査読あり) 2017;21:257-265.

[学会発表] (計 5 件)

1. 次世代シーケンスを用いた IgA 腎症の疾患遺伝子探索
塚口裕康、後藤眞、細道一善、成田一衛

関西医科大学附属病院・腎臓内科、新潟大学腎膠原病内科、金沢大学革新ゲノム医学情報学

シンポジウム：腎臓病領域における稀少疾患と指定難病

第 61 回日本腎臓学会学術総会、2018 年 6 月 8 日、新潟

2. Galactose-deficient IgA1 expressed in tonsillar crypts is correlated with severity of glomerular injury in patients with IgA nephropathy
Hiroki Yamaguchi, Shin Goto, Masafumi Tsuchida, Hirofumi Watanabe, Suguru Yamamoto, Yoshikatsu Kaneko, Ichiei Narita
Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Kidney Research Center, Niigata University, Niigata, Japan
The 61st annual meeting of the Japanese Society of Nephrology, Niigata, Japan
3. 家族性 IgA 腎症候補遺伝子を対象としたレアバリエント関連解析
後藤眞、塚口裕康、渡辺博文、土田雅史、福田顕弘、藤元昭一、成田一衛
新潟大学腎膠原病内科、関西医科大学第二内科、宮崎大学腎臓内科
第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017 年 5 月 27 日、仙台
4. Proteomics of glomeruli with IgA nephropathy reveals the concomitant abnormalities of cytoskeleton in the podocytes.
Hiroki Yamaguchi, Shin Goto, Yoshitoshi Hirao, Bo Xu, Keiko Yamamoto, Suguru Yamamoto, Yoshikatsu Kaneko, Tadashi Yamamoto, Ichiei Narita
Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Kidney Research Center, Niigata University, Niigata, Japan
American Society of Nephrology Kidney Week 2017. 2017. 11. 04, New Orleans, LA, USA
5. IgA 腎症の口蓋扁桃陰窩のマイクロバイオーーム解析
後藤眞
新潟大学腎膠原病内科
シンポジウム「マイクロバイオーームと腎」
第 59 回日本腎臓学会学術総会 2016 年 6 月 17 日、横浜
6. Comprehensive Microbiome Analysis of Tonsillar Crypts in IgA Nephropathy
Hirofumi Watanabe, Shin Goto, Masafumi Tsuchida, Ichiei Narita
Division of Clinical Nephrology and

Rheumatology, Kidney Research Center,
Niigata University, Niigata, Japan
American Society of Nephrology Kidney
Week 2015. 2015.11.05, San Diego, CA,
USA

〔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・准教授
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：

(4) 研究協力者

()