

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710223

研究課題名(和文) 家族性IgA腎症で例示されるエクソーム解析による原因遺伝子同定プロトコルの確立

研究課題名(英文) Protocol for exome sequencing analysis to identify a causal gene of familial IgA nephropathy

研究代表者

細道 一善 (Hosomichi, Kazuyoshi)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教

研究者番号：50420948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、家族性IgA腎症を対象とし、エクソームシーケンスによる疾患原因変異の同定、疾患発症機序の解明、ならびにこれら一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコルを確立することを目指している。家族性IgA腎症1家系のエクソームシーケンスによってIgAのトランスサイトーシスに関わり、腎臓で発現するEEA1に原因候補となる変異を同定した。さらに、家族性IgA腎症の発端者24名のうち5名に位置の異なる3つのEEA1の変異が認められた。これらの変異の集団内頻度は1%以下であるが、発端者24名中5名と高頻度に認められ、EEA1の変異は家族性IgA腎症の20%を説明しうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：A genetic predisposition of IgA nephropathy (IgAN) has been suggested by the familial clustering of the disease. To identify the genetic cause of familial IgAN, we applied exome sequencing to a family comprising four biopsy-proven IgAN. Exome sequencing of four affected, two carriers, and two non-affected individuals were captured, followed by Next-generation sequencing. After several-step filtering including annotation and functional expectation, a novel missense variant F161Y in EEA1 was found to be candidates for familial IgAN. Furthermore, we identified additional 3 rare mutations in 5 affected individuals of 24 familial IgAN probands by exome sequencing. In conclusion, mutations in EEA1 could be causality for 20% of familial IgAN.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：エクソームシーケンス IgA腎症 疾患関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

我々がヒト表現型を理解する上でゲノム多様性を知ることが極めて重要である。個人ゲノムが数日で決定できる技術が確立した現在、ヒトゲノム多様性をより深く理解するための膨大なシーケンシング情報が日々産出されている。表現型との関連を明らかにするために多数の個人全ゲノム配列を決定するアプローチは、シーケンシングにかかるコストに加え、その情報解析負荷が大きな壁となっている。近年、“Exome sequencing”という手法により家族性希少疾患の原因遺伝子同定の論文が数多く報告されている。“Exome”とはヒトゲノムにおける全てのエクソン領域を示す言葉であり、エクソンは短いDNA配列ながらタンパク質に翻訳される領域であることから、機能的に最も重要なDNA配列である。ヒトゲノムには約180,000のエクソンが存在し、長さとしてはヒトゲノムの約1%にあたる30Mb程度であるが、エクソン配列に含まれる変異が疾患原因の約85%を説明すると推定されている(Choi et al. 2009, PNAS)。よって、エクソンのみをシーケンシングすることは形質に關与する多様性(多型)を網羅的に解析する手法のなかでは最も効率的である。

原発性糸球体腎炎の発症機序は、腎臓内科学分野において主要な研究課題の一つである。なかでも糸球体メサンギウム領域への免疫グロブリンA (IgA) 沈着を特徴とするIgA腎症は、最も頻度の高い原発性糸球体腎炎であり、末期腎不全の主要な原疾患でもある。その発症には、環境因子とともに何らかの遺伝的背景の關与が想定されており、我々を含む多くの研究によりIgA腎症の疾患感受性遺伝子(Narita I, et al. J Hum Genet, 2001、Takei T, et al. Am J Hum Genet, 2002、Akiyama F, et al. J Hum Genet, 2002、Otsubo S, et al. J Hum Genet, 2004 他) ならびに進行にかかわる遺伝的背景(Narita I, et al. Kidney Int, 2005、Narita I, et al. J Med Genet, 2003、Goto S, et al. Kidney Int, 2002,他)は明らかになってきた。しかし、未だ発症責任遺伝子の特定には至らず、現在のところ特異的な予防法・治療法はない。これまで報告された疾患感受性遺伝子はIgA腎症のごく一部を説明するにすぎないことから、最新のゲノム情報、アルゴリズムを用いた高度な情報解析技術が必要となることが予測される。

2. 研究の目的

本研究課題は、家族性IgA腎症を対象とし、ヒトゲノムのエクソーム配列に解析対象を絞り、家系の罹患者および非罹患者を対象としたシーケンシングをおこない、これまでSNPアレイでは検出できなかった希な変異を検出すること、検出された変異から疾患の原因となる変異を同定し、変異が位置する遺伝子機能から疾患発症機序の解明、ならびにこれら一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコルを確立することを目指す。原因遺伝子の同定のみならず、その機能に關与する分子の網羅的な相互作用とそれらが形成するネットワークをも視野に入れた疾患原因分子からの発症へと至る機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) エクソームシーケンスによる変異検出および疾患原因変異候補の絞り込み

IgA腎症罹患者を含む1家系4世代17名に含まれる罹患者および非罹患者のDNAを超音波切断により断片化し、断片の末端にアダプターを付加し、DNAライブラリーを調整する。このDNAライブラリーよりエクソン配列のDNA断片のみを濃縮する。エクソンのDNA断片濃縮はSureSelect Human All Exon Kit (Agilent)を用い、シーケンシングはHiSeq2000 (Illumina)にて行う。得られたシーケンスデータ(read)はUCSC hg19を標準ゲノム配列としてBWAによりマッピングしたのち、Samtools および GenomeAnalysisTKにより、信頼性も評価した多型・変異リストをアリル頻度とともに出力させる。この多型・変異リストを機能的、集団遺伝学的特徴に基づきフィルタリングすることで、候補となる変異を絞り込む。

(2) 集団遺伝学的手法およびタンパク質機能予測に基づく疾患原因変異候補の絞り込み

疾患原因候補変異について1000 genome projectにより算出された各集団内SNV頻度情報をコントロールに罹患者の頻度差から統計学的に疾患原因候補となりうる遺伝子を検索する。疾患候補遺伝子の順位付けにはVAASTを用いる。また、アミノ酸置換についてはSIFT、PolyPhen2による機能的な変化の推定、PhyloPによる保存性の評価から疾患原因としての可

能性を数値的に予測する。

(3) 疾患原因変異候補タイピングによる原因変異の同定

変異リストより絞り込まれた、疾患原因変異候補について非罹患者も含めた家系全検体のタイピングをおこない、疾患原因変異の検証をする。タイピングはPCR増幅およびダイレクトシーケンスによりおこなう。また、非血縁サンプル960検体をコントロールとして、一般集団中における疾患候補変異の頻度を算出する。

(4) 疾患原因遺伝子の機能および関連遺伝子パスウェイに基づく疾患の包括的な理解

疾患原因変異を含む遺伝子がコードする分子の機能、立体構造より、変異が表現型に与える影響、分子のパスウェイより疾患の発症機序を考察する。実際の機能解析は疾患原因と予測される遺伝子により、進めていく方針が異なる為、状況に応じて遺伝子導入細胞や酵母ツーハイブリッド法を駆使して解析する。KEGG PATHWAY、IPA および HGMD データベースを元に腎臓におけるタンパク質・パスウェイ・転写調節情報のキュレーションデータベースを構築し、原因遺伝子のパスウェイ、コンプレックス、分子間相互作用、反応ネットワークについて、遺伝子変異情報を関連付けることで、IgA 腎症の包括的な理解を目指す。マイクロアレイなどの発現プロファイルデータを統計学的に処理し、未知の遺伝子ネットワークの推定も試みると共に、新しいアプローチとしての疾患の治療法や創薬開発へ応用を検討する。

4. 研究成果

本研究課題は、家族性 IgA 腎症を対象とし、エクソームシーケンスによる疾患原因変異の同定、疾患発症機序の解明、ならびにこれら一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコルを確立することを目指した。

(1) エクソーム解析による解析パイプライン構築

まず、家族性 IgA 腎症罹患者 4 名を含む 1 家系のエクソームシーケンスを実施した。この 1 家系の一連の解析を通して、原因候補変異同定法のパイプラインを構築した。アライ

メントは bwa にておこない、samtools および GATK にて変異検出した。変異検出のパラメーター決定については、サンガーシーケンスによる確認により、偽陽性をおさえつつ、偽陰性による変異の見落としを防ぐことを重視した。samtools および GATK で検出された SNV における偽陽性および偽陰性率を評価したところ、偽陽性率は samtools では 15.1% で、GATK では 5.8% であった。一方で GATK では samtools で検出され、サンガーでも確認された変異のうち、15.1% を検出していなかった。この傾向は各パラメーターを再検討しても認められたため、偽陰性による変異の見落としを防ぐために samtools により、偽陽性を許容した変異検出をおこない、家系内の co-segregation を確認することで、候補変異における偽陽性を除去することとした。また、偽陽性はマルチマップした Read の SNV、Read の末端のみで示される SNV であった。すなわち、Mapping Quality や Segmental Duplication の情報を使った再評価で偽陽性を減らすことが可能である。そこで、変異検出後、まず、ゲノム上で重複する断片配列に位置する変異は偽陽性率が高いため候補より除外した。これにより、偽陽性率、偽陰性率共の軽減を可能とした。変異検出後、アミノ酸の変化を伴う非同義置換、dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)、1000 ゲノム計画 (<http://www.1000genomes.org/>)、日本人のゲノム情報データベース Human Genetic Variation Database (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/index.html>) により頻度の極めて低い、または全く認められない変異を選択した。さらに、遺伝様式に基づき、優性遺伝の原因となりうる条件として、罹患者のみが変異をヘテロ接合として持ち、非罹患者に認められない変異を選択した。その後、アミノ酸置換による機能予測 (SIFT, PolyPhen2)、進化的な保存性 (PhyloP, GERP) のスコアを参照すると共に、各原因候補遺伝子の機能、各疾患との関連、原因候補遺伝子群と既報の原因遺伝子とのパスウェイ検索によりシステム生物学的な関連性を評価した。

(2) IgA 腎症家系のエクソーム解析

構築したパイプラインを用いて家族性 IgA 腎症罹患者 4 名を含む 1 家系のエクソームシーケンスをした結果、1000 ゲノムで頻度が 1% 以下である非同義置換、終止コドン、スプラ

イスサイトにおける変異および挿入欠失は罹患者でそれぞれ 144 カ所から 161 カ所認められた。このうち、罹患者に共通してヘテロ接合として認められ、非罹患者に認められない変異は 13 カ所であった。このうち、IgA のトランスサイトーシスに関わり、腎臓で発現する *EEAI* が原因候補となる変異として最も有力と判断した。16 カ所の候補のうち、頻度は 5 番目に高かったものの、PhyloP および GERP での保存性スコアはいずれも最も高く、SIFT および PolyPhen2 から推定されるアミノ酸置換に伴う機能的な影響を評価するスコアも最も高値であった。この変異(rs144833802)は 1000 ゲノムプロジェクトで日本人 2 名のみ認められ、我々がこれまでエクソームシーケンスした 118 名に 1 名のみ認められた。

(3) 孤発例における原因候補遺伝子の変異頻度

IgA 腎症家系の解析結果から同定された原因遺伝子候補 *EEAI* の変異について、IgA 腎症の孤発例 228 名における頻度を調査したが、この変異は全く認められなかった。さらに *EEAI* のエクソームのシーケンスにより、遺伝子内の全変異を検索したが、アミノ酸置換を伴う変異を認めなかった。よって家系で同定した変異はごく一部の IgA 腎症のみを説明することが予測された。

これまでの報告同様、IgA 腎症は家系によりその原因遺伝子が異なる可能性が高いことが示唆されたが、このような事例は今後、別の疾患におけるエクソームシーケンスでも起こりうることであり、本研究課題の目的である、“一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコルを確立する”という内容の遂行の為に、家系ごとに原因遺伝子が異なる、すなわち Locus Heterogeneity の問題を解決する必要がある。

(4) 家族性 IgA 腎症発端者のエクソーム解析

上述の問題を検証する戦略の一つとして 24 家系由来の家族性 IgA 腎症発端者 24 サンプルのエクソームシーケンスを追加で実施した。エクソームシーケンスの結果、孤発例の結果とは異なり、24 名の発端者のうち 5 名に *EEAI* の変異が認められた。5 名において計 3 カ所 (p.R1262W、p.N1072K および p.E1010G) の変異が認められたが、これらの変異は前述の家系で認められた変異 p.F161Y と異なるもので

あり、p.R1262W は 3 名、p.N1072K および p.E1010G はそれぞれ 1 名に認められた。いずれの変異も 1000 ゲノムプロジェクトで 1%以下の頻度であるにもかかわらず 24 名中 5 名と高頻度に認められたことから、*EEAI* の変異は家族性 IgA 腎症の 20%を説明しうると考えられた。

(5) 結論

これまでエクソームシーケンスにより原因遺伝子が同定された疾患はそのほとんどが希少疾患であり、特に劣性遺伝における成功例が多かった。これは IgA 腎症などのありふれた疾患における原因変異としての頻度がそれほど低くないこと、優性遺伝様式をとるものが多く、ヘテロ接合での原因候補変異の絞り込みとなること、家系内における浸透率が 100%とは限らないことから、変異選択におけるそれぞれの検体の取り扱いに曖昧さが残ること、などにより原因候補変異の絞り込みが困難であったことが予測される。加えて、本研究では同一の疾患であっても家族歴を有するか否かを考慮して解析することの重要性が明らかとなった。疾患は遺伝要因のみならず、環境要因との兼ね合いで発症することが定説であるが、ありふれた疾患ほど生活習慣等の環境要因による影響が大きく、遺伝要因も複数の弱い効果が想定される。ありふれた疾患の中でもその一部において家族歴が認められるケースがあるが、これは環境要因よりも遺伝要因が強く、さらにその中でも効果の高い変異が原因となっていることによると予測された。

ありふれた疾患の原因遺伝子検索としてはより多くの家系をエクソームシーケンスすることが理想的であるが、本結果から家系を用いない研究デザインも可能であることが示唆された。すなわち、罹患者それぞれについて、家族歴の有無から疾患の遺伝要因の寄与を評価し、遺伝要因の高い罹患者群とコントロール群における頻度差から統計学的に疾患原因候補となりうる遺伝子を検索することも可能と考えられる。また、原因候補変異同定後は個々のアミノ酸置換を SIFT、PolyPhen2 による機能的な変化の推定、PhyloP による保存性の評価から疾患原因としての可能性を数値的に予測するシステム、疾患原因変異を含む遺伝子がコードする分子の機能、立体構造より、変異が表現型に与える影響、分子のパスウェイ

イより疾患の発症機序を評価するシステムならびにパスウェイ、コンプレックス、分子間相互作用、反応ネットワークについて、遺伝子変異情報を関連付けることが効果的である。さらに、今後も発現プロファイルデータを統計学的に処理し、未知の遺伝子ネットワークを推定するなど、新しいアプローチの開発も検討する必要がある。

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)

Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Exome sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the BTNL2. J Hum Genet. 58:210-5, 2013.

査読有

細道 一善、光永 滋樹、井ノ上 逸朗、エクソーム解析による新規関節リウマチ感受性遺伝子の検索。医学のあゆみ、439-443, 2013. 査読無し

細道 一善、井ノ上 逸朗、次世代シーケンサーのデータ処理について、分子精神医学,101-107, 2013. 査読無

後藤 眞、細道 一善、成田 一衛、次世代シーケンサー、Annual Review 腎臓、13: 995-1001, 2013. 査読無

[学会発表](計 1 件)

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年10月30日～2012年11月4日・San Diego, 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 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

細道一善 (Hosomichi, Kazuyoshi)
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教
研究者番号：50420948

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：