

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461616

研究課題名(和文) リポ蛋白糸球体症の疫学および病態解明

研究課題名(英文) Epidemiology and pathology of lipoprotein glomerulopathy

研究代表者

橋本 多恵子(hashimoto, taeko)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30507629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：9家系13例のリポ蛋白糸球体症(LPG)患者のハプロタイプを決定したところ APOE-Sendai アリルのハプロタイプがすべて一致し、創始者変異であることがわかった。山形県の新生児2023人と、透析患者418例を対象としてAPOE-Sendaiの遺伝子頻度を検索したが、変異を有する児は検出できず、一般集団や慢性不全症例におけるAPOE Sendai の頻度は極めて稀であることが分かった。APOE-Sendai変異によるLPGと診断された9家系13例の患者で中性脂肪代謝との関連が報告されているSNPs21個について検討したが、発症に共通するSNPsは検出されず、他の発症因子は判明しなかった。

研究成果の概要(英文)：We determined the haplotype structure of APOE-Sendai in 13 patients from 9 unrelated families with LPG, and found that the haplotype of all APOE-Sendai mutations was identical, suggesting that APOE-Sendai mutation is common in Japanese patients probably through a founder effect. We also studied the gene frequency of APOE-Sendai in 2023 control subjects and 418 patients receiving hemodialysis in Yamagata prefecture using the TaqMan method, but did not identify any subjects carrying the mutation, indicating that it is very rare in the general population even in the eastern part of Japan. We examined 21 SNPs reported to be associated with triglyceride metabolism in 13 patients from 9 unrelated families with LPG, but SNPs common to onset were not detected. The second factor of LPG did not turn out.

研究分野：小児腎臓疾患

キーワード：リポ蛋白糸球体症 ApoE-Sendai 創始者効果

1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白系球体症は、主にアポE蛋白異常により系球体障害を呈する疾患で、腎系球体毛細血管に特異的にリポ蛋白を含む血栓様物質が認められる特徴的な病理像を示す。臨床的には蛋白尿で発症し、ネフローゼ症候群を経て慢性腎不全に至る予後不良な疾患である。

1989年、斎藤らにより報告されて以来、日本と東アジアを中心に現在まで100例以上が報告されている。本症の原因として、約10種のAPOE蛋白遺伝子変異が報告されているが、なかでもAPOE-Sendaiが最も多い。この変異は、東日本に多く検出され、特に山形県に由来している症例(出身者)が多い。我々は9家系、13人の患者を対象としAPOEのハプロタイプを解析し、APOE-Sendaiのハプロタイプが一致することから、創始者効果によるものであることを明らかにしている。

本疾患には、従来、効果的な治療法がなく、腎移植を施行しても移植腎における再発が報告されている。しかし、近年、強力な抗高脂血症治療法が有効であることが判明し、早期発見、早期治療が求められている。一方で、遺伝子変異を有しながらも発症しない患者家族も存在し、発症していない保因者が存在する可能性と、発症にはAPOE-Sendai以外の因子が関与する可能性が高い。その基礎的資料として、正確な疫学データが必要であるため、我々は、APOE-Sendai変異が高頻度であると考えられる山形県において一般人口として新生児コホートを対象として遺伝子を用いた疫学的調査を平成23年から開始している。また同時に、本疾患は他腎炎との合併の報告があること、また原因不明のまま腎不全に陥っている患者が存在する可能性等も考慮し、山形県内の血液透析患者に関するAPOE-Sendai変異保有率検索を開始している。

また本来ならば腎生検後に本疾患が診断されるが、早期発見早期治療が有効であることから、さらなる母集団として、学校検尿や検診等での尿検査での異常所見者におけるAPOE-Sendai変異スクリーニングも施行する準備に着手している。今回の研究から一般人口、腎不全(血液透析患者)患者人口、尿所見異常者の疫学データが得られると同時に、APOE-Sendai変異を有する発症者および未発症者の検出が期待される。

本症の病因として、APOE蛋白遺伝子変異が明らかにされているが、浸透率の低さから、他の因子(genetic or epigenetic factor)の発症への関与が明らかである。病態を明らかにするためには、この因子の解明が必要である。本疾患ではその患者の多くに高脂血症、なかでも型高脂血症の特徴を備えた、トリグリセリド優位の高脂血症を認めており、またその治療に高脂血症改善薬の有効性が示されていることから、その発症要因として高トリグリセリド血症に関連する因子の関与

が強く示唆される。以上より、他の発症要因の検索として、高トリグリセリド血症と関連ある遺伝子群から日本人に多いとされるものを候補とし、その多型解析を行い本疾患発症に関わるsecond factorの解明を試みる。国内外の研究では、疫学および他の因子の解明試みの報告は認められないことから、本研究の意義は大きい。

2. 研究の目的

【疫学研究として】

(1) 山形県におけるAPOE-Sendai変異の遺伝子頻度の検索

山形県内の基幹病院にて出生し、保護者より書面にて研究協力の承諾を得た新生児から採取した先天代謝異常マス・スクリーニング検査に用いた残りの濾紙血を用い疫学調査を行う。既に4つの代表的な基幹病院の倫理委員会の承認を得ており検体回収と解析はすでに一部始まっている。これにより一般人口における遺伝子変異の頻度を明らかに出来、また早期発見、早期治療への介入を可能とすることができる。

(2) 山形県内の透析患者におけるAPOE-Sendai変異の遺伝子頻度の検索

山形県内における全透析患者のうち文書により承諾をえた患者を対象として、APOE-Sendaiの保有率を調査する。山形県腎不全研究会から支援を得、すでに検体回収は開始している。これにより血液透析腎不全における遺伝子変異の頻度を明らかにでき、また他腎炎との関連性を明らかにでき、原因不明の腎不全者の確定診断につながる可能性がある。

(3) 山形県内の学校検尿や検診異常者におけるAPOE-Sendai変異の遺伝子頻度の検索

3歳児検診や学校検尿、その他病院受診時に尿所見異常を認めた患者で、山形県内基幹病院を受診し、同意を得られた患者を対象として、APOE-Sendaiの保有率を調査する。すでに一部基幹病院の倫理委員会から承諾を得て、検体回収を始めている。これにより尿異常所見患者による変異保有率を明らかにでき、また、早期発見早期治療につなげられる。

なお、(1)~(3)に関して解析は、すでに確立してある簡便なTaqMan SNP Genotyping Assays (TaqManプローブとリアルタイムPCRシステムを利用したSNPタイピング法)により変異の保有者を検出する。

APOE-Sendai変異を確認した症例では、遺伝カウンセリングを施行し、家族および血縁者におけるリポ蛋白系球体症の発症の危険性を説明し、それらの検索を勧める。協力が得られれば、臨床所見、一般尿検査や血漿脂質分析を行い、注意深くフォローアップし、発症が確認された場合には早期に治療を勧める。

【リポ蛋白系球体症の病態解明の研究とし

て】

(4) 発症に関与する APOE 遺伝子変異以外の因子解明の試み

APOE-Sendai 変異を有する症例の家族検索では、APOE-Sendai 変異を有していても発症していない家族が度々検出される。私達の2家系にも、複数の未発症例が存在する。ごく稀な症例として、APOE 遺伝子変異を有していないリポ蛋白系球体症の中国からの報告があるが、この例外を除き、全ての症例には APOE 遺伝子変異が検出される。APOE 遺伝子変異は必要条件であるが、発症には他の因子の関与が推察される。

本疾患ではその患者の多くに高脂血症、なかでも型高脂血症の特徴を備えた、トリグリセリド優位の高脂血症を認め、またその治療に高脂血症改善薬の有効性が示されている。これらの症例に対してスタチンなどのコレステロール降下作用が中心である薬剤の有効性が明らかでない一方、フィブラート、ニセトリル、イコサペント酸塩酸などトリグリセリド低下作用の強力な薬剤投与での軽快例、寛解例が認められることは、その発症要因として高トリグリセリド血症に関連する因子の関与が強く示唆される。

高トリグリセリド血症に関連する遺伝因子に関しては、全ゲノム関連解析 (GWAS) を含め、モデル動物による実験など多数の方法からその候補遺伝子やその多型が報告されており、その中でも日本人に多いとされる多型の解析から着手する。

3. 研究の方法

(1) 山形県における APOE-Sendai 変異の遺伝子頻度

山形県内の基幹病院にて出生し、保護者より書面にて研究協力の承諾を得た新生児を対象とする。山形県は大きく4つの地方に区分され、既に4つの代表的な基幹病院の協力を得て、それぞれの倫理委員会の承諾を得ている。検査標本としては、先天代謝異常マス・スクリーニングの検査に用いた残りの濾紙血を用いる。濾紙血からゲノム DNA を抽出し、TaqMan SNP Genotyping Assays (TaqMan プローブとリアルタイム PCR システムを利用した SNP タイピング法) により遺伝子変異をスクリーニングし、変異の保有者を検出する。

スクリーニングで検出された新生児では、APOE 遺伝子に関して塩基配列を決定し、遺伝子変異を確認する。変異の保有者に対しては、面会し説明することも事前に承諾を得ることにしており、遺伝専門医が面接し情報を提供し、早期発見・治療を可能とする。得られた情報をもとに疫学の論文を作成する。

(2) 山形県内の透析患者における APOE-Sendai 変異の遺伝子頻度

山形腎不全研究会に登録している透析施設は、36 施設存在し、透析患者は 2124 名存在する。同意を得られた患者さんから血液を採取し、DNA を抽出し、TaqMan SNP Genotyping

Assays により遺伝子変異をスクリーニングする。変異を検出された症例は、ApoE 遺伝子の翻訳領域を PCR で増幅し塩基配列を確認し、腎不全におけるリポ蛋白系球体症の占める割合を算出する。

APOE-Sendai 変異を確認した症例では、遺伝カウンセリングを施行し、家族および血縁者におけるリポ蛋白系球体症の発症の危険性を説明し、それらの検索を勧める。協力が得られれば、臨床所見、一般尿検査や血漿脂質分析を行い、注意深くフォローアップし、発症が確認された場合には早期に治療介入する。

(3) 山形県の3歳児・学校検尿等での尿所見異常者における APOE-Sendai 変異の遺伝子頻度

3歳児検診や学校検尿、その他病院受診時に尿所見異常を認めた患者で、山形県内基幹病院を受診し、同意を得られた患者さんから血液を採取し、DNA を抽出し、TaqMan SNP Genotyping Assays により遺伝子変異をスクリーニングする。検出された症例は、塩基配列を確認し、APOE-Sendai 保有者の場合、早期の組織診断、治療開始への手順を進める。また、尿検査異常所見者における変異保有率を確認する。

APOE-Sendai 変異を確認した症例では、遺伝カウンセリングを施行し、家族および血縁者におけるリポ蛋白系球体症の発症の危険性を説明し、それらの検索を勧める。協力が得られれば、臨床所見、一般尿検査や血漿脂質分析を行い、注意深くフォローアップし、発症が確認された場合には早期に治療介入する。

(4) 発症に関与する APOE 遺伝子変異以外の因子解明の試み

APOE 蛋白遺伝子異常を有していても、必ずしも発症せず、その発症要因の第二の候補として、本疾患患者の生化学プロフィールや、本疾患の効果を受けている高脂血症治療薬の報告などからも、高トリグリセリド血症に関連する因子の関与が強く示唆される。

高トリグリセリド血症に関連する遺伝因子に関しては、全ゲノム関連解析 (GWAS) を含め、モデル動物による実験など多数の方法からその候補遺伝子やその多型が報告されており、その中でも日本人に多いとされる多型の解析から着手する。

具体的な Candidate genes としては、Johansen CT ら (J Lipid Res 52:189-206, 2011) が高トリグリセリド血症の原因とされるトリグリセリド関連遺伝子として報告している遺伝子群 (APOA5, GCKR, LPL, APOB, ANGPTL3, MLXIPL, TRIB1, NCAN, GALNT2, LIPC, APOC2, GPIHBP1, LMF1, USF1) が挙げられるが、その中でも日本人に多く高トリグリセリド血症と関与する遺伝子多型が検出されている LPL, APO5, また、LPL の regulator として知られる ANGPTL3, APOE との関連分子としての USF1 を最初の Candidate genes とし

て多型解析を行う
これらのデータを下に、多数の家系解析を行い、連鎖を確認する。

4. 研究成果

(1) 創始者変異の確認

血縁関係を認めないリポ蛋白系球体症の9家系13症例に対しFullertonらの方法に従い、ハプロタイプを決定したところ、APOE-Sendaiは全て同一であり、APOEの主要なアイソフォーム2, 3, 4のうち3に属していた。APOE-Sendaiは3グループに分類されるサブタイプ1に由来していた。LPG家系13症例のAPOE Sendai アリルのハプロタイプが一致し、創始者変異であることが明らかになった。

(2) 山形県における遺伝子頻度の検索

一般集団として県内で出生した新生児のうち保護者から書面で同意を得た2023人を対象とした。次に県内で慢性腎不全の為に、透析を受けている患者418例を対象として、遺伝子頻度を検索した。

一般集団におけるAPOE Sendaiの遺伝子頻度の検索では、新生児2023人中変異を有する児は検出できず、一般集団におけるAPOE Sendaiの頻度は極めて稀であることが明らかになった。慢性腎不全の418症例でも変異を有する症例は1例も検出されなかった。このことからLPGは慢性腎不全症例、特に原因が不明な症例においても非常に稀な疾患であることがわかった。学校検尿や検診で尿所見異常者98人に対してもAPOE-Sendai変異の遺伝子頻度を検索したが、変異を有する児は検出できなかった。APOE Sendaiが極めてまれな変異であることが明らかになった。

(3) 発症に関するAPOE遺伝子変異以外の因子解明の試み

APOE-Sendaiをはじめとしていくつかの変異では、健康な保因者が確認されており、その浸透率の低さから発症に関与する他の遺伝的因子あるいは環境因子の関与が示唆されている。今回われわれはLPGの患者において高トリグリセリド(TG)血症を認めることが多く、治療ではTGを低下する抗高脂血症薬が有効であることから、高TG血症と関連するSNPsの関与を推測し、発症との関連を解析した。APOE-Sendai変異によるLPGと診断された非血縁の9家系13例の患者(男6例, 女7例, 7~79歳)から抽出したゲノムDNAを用いた。Genome-Wide Association StudyでTG代謝との関連が報告された39SNPsのうち日本人で頻度の高いSNPs(allele frequency: 0.116~0.917)21個について、直接塩基配列を決定した。患者と保因者を含む2家系では、発症に共通するSNPsは検出されなかった。すべての患者に共通するSNPsを4個(*MLX1PL*, *CETP*, *ANGPTL3*, *GALNT2*)検出した。しかし、ノンパラメトリック連鎖後のパラメトリック連鎖解析では、有意な

LOD scoreの上昇は認められなかった。

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) 豊田 健太郎 橋本 多恵子, 荻野 大助, 伊東 稔, 政金 生人, 佐藤 博, 斉藤 喬雄, 田宮 元, 早坂 清 査読有りリポ蛋白系球体症における発症因子の検討 Therapeutic Research 35 巻 11 号 Page984-986 2014.11

2) Toyota K, Hashimoto T, Ogino D, Matsunaga A, Ito M, Masakane I, Degawa N, Sato H, Shirai S, Umetsu K, Tamiya G, Saito T, Hayasaka K. A founder haplotype of APOE-Sendai mutation associated with lipoprotein glomerulopathy. J Hum Genet. 2013 May;58(5):254-8. 査読有

[学会発表](計5件)

1) 豊田健太郎: 第45回 山形腎不全研究会 山形市・霞城セントラル APOE-Sendai によるリポ蛋白系球体症の山形県における高集積性の機構と疫学について 2014年10月26日

2) 豊田健太郎: APOE-Sendai によるリポ蛋白系球体症の山形県における高集積性の機構と疫学について 第96回 日本小児科学会山形地方会(山形市・山形大学医学部) 2014年5月18日

3) 豊田健太郎: リポ蛋白系球体症における発症因子の検討 第26回 腎と脂質研究会 名古屋市・ウインクあいち 2014年3月8日

4) 豊田健太郎: APOE-Sendai によるリポ蛋白系球体症について 第48回小児腎臓病学会 徳島市・あわぎんホール 2013年6月28日

5) Toyota K: A Founder Haplotype of APOE-Sendai Mutation Associated with Lipoprotein Glomerulopathy WCN 2013 Satellite symposium Kidney and Lipids 福岡市・ヒルトン福岡シーホーク 2013年6月7日

[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

橋本 多恵子 (HASHIMOTO, Taeko)
山形大学・医学部・助教
研究者番号：30507629

(2) 研究分担者

早坂 清 (HAYASAKA, Kiyoshi)
山形大学・医学部・名誉教授
研究者番号： 20142961

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()