

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461240

研究課題名(和文) IgA腎症自然発症モデルマウスを用いた疾患感受性遺伝子の解明

研究課題名(英文) Clarification of the disease susceptibility gene in IgA nephrology prone mice

研究代表者

堀越 哲 (Horikoshi, Satoshi)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：80260884

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)：IgA腎症の病因は未だ不明な点が多い。既存の報告から、IgAの糖鎖修飾変異には遺伝的な要素が関与していることが示唆される。今回我々は、ddYマウスから樹立された100%早期にIgA腎症を自然発症するgrouped ddY (gddY)マウスおよび発症率がgddYよりも低いHIGAマウスを用いてマイクロサテライトマーカーで解析を行い、糖鎖修飾に密接に関わる遺伝子領域の同定を検討した。D12Mit20周辺領域に責任遺伝子がある可能性が高いことがわかったが、本研究期間内で全てを評価することは困難であった。今後、網羅的に全遺伝子を比較検討できるよう、次世代シーケンスによる評価などの導入も検討していく。

研究成果の概要(英文)：Pathogenesis of IgA nephrology is still unknown. There are some reports which suggest that genetic factors are related to the mutation in genetic region for IgA glycosylation. In this study, we assessed the genetic regions of IgA glucose deficiency by comparing the two mice strains originated from ddY mouse, grouped ddY (gddY) mouse and HIGA mouse. While gddY mouse has early onset of IgAN within a 100% incidence, HIGA mouse has high serum level of IgA but does not always develop IgAN. By studying the genes using the micro-satellite markers, we found out that genetic area around D12Mit20 may be the responsible gene of glucose deficiency in IgAN. Since we need to consider other methods to compare the other genetic regions as also in full detail, we will introduce the next-genetic sequence method and continue the study.

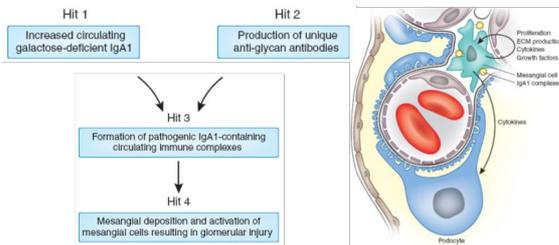
研究分野：腎臓内科

キーワード：IgA腎症 gddYマウス HIGAマウス 糖鎖修飾

### 1. 研究開始当初の背景

IgA 腎症は、原発性糸球体腎炎の約半数を占め、その約 4 割が末期腎不全に至る予後不良の疾患であるが、未だその病因は解明されていない。遺伝子などの先天的な要因と、外来抗原などを含めた後天的な要因が複雑にからみあっていることが病因解明を難しくしている一因である。このように複雑な病態を解析するには適切な動物モデルが必要と考えられる。

病因においては糖鎖不全 IgA (下図 Hit 1) やそれを認識する IgG あるいは IgA (Hit 2)、免疫複合体の形成 (Hit 3) が重要な役割を果たしているといわれている (J Am Soc Nephrol 22: 1795-1803, 2011)。IgA 腎症において、家族内発症は稀であるが、IgA 腎症患者の家族は発症していない場合でも血中の糖鎖不全 IgA が高いことが報告されている (J Am Soc Nephrol 19: 1008-1014, 2008)。つまり、IgA の糖鎖修飾の変異には遺伝的な要素が関与していることが示唆される。



gdY マウスは以前から IgA 腎症を自然発症することが知られていたが、非近交系であるため発症にはばらつきがあり、研究に使用するには不向きであった。そこで我々は ddY マウスの中で IgA 腎症を早期に自然発症するマウスを選択的に交配することによって、ほぼ 100% 早期に IgA 腎症を自然発症する grouped ddY mouse (gdY マウス) を確立した。 (J Am Soc Nephrol. 2005, J Am Soc Nephrol. 2012)。

gdY マウスには重症度の異なる 2 つの系統があるが、近年我々はそれぞれの血清 IgA の糖鎖修飾が異なっていることを報告した (J Am Soc Nephrol. 2012)。つまり、gdY マウスにおける病気の重症度はヒトと同様に IgA の糖鎖修飾と密接に関わっていることが示唆されている。

HIGA マウスは ddY マウスから血清 IgA の高いマウスを選択的に交配して確立された血清 IgA 高値を呈するマウスであるが、自然経過では早期に腎障害を呈することはなく IgA 腎症のモデルマウスとしては不十分であった。HIGA マウスより血清 IgA 値が低い gdY マウスの方がより腎障害を呈するということは、両マウスの IgA では糖鎖修飾など質的な差が存在することが示唆される。つまり、両マウスの遺伝子表現型の違いを解析することにより、きる可能性があると考えられる。実際、マイクロサテライトマーカーを用いた既存の報告において、腎症の重症度と関わる

ことが報告されているいくつかの遺伝子領域において、gdY マウスと HIGA マウスでは表現型が異なることが確認されている (J Am Soc Nephrol. 2012)。

### 2. 研究の目的

同様のバックグラウンドを持ちながら、腎症の発症においては違いがある gdY マウスと HIGA マウスを比較することにより、疾患感受性領域候補遺伝子を同定することを目的とする。

また、同定された候補遺伝子がどの様に疾患と関与しているかを解析する。

具体的には、

- ・ IgA の糖鎖修飾に関わる領域
- ・ 免疫複合体形成に関わる領域
- ・ 疾患の進展に関わる領域

などを解明する。

IgA 腎症は様々な要素が複雑に絡み合って成り立っている疾患である。

今まで IgA 腎症に関係するモデルマウスは複数存在しているが、特定の分子の過剰発現などを用いて腎臓の表現型の一部を再現したに過ぎなかった。しかし、最近我々が確立した IgA 腎症自然発症マウス (gdY マウス) は病的にも遺伝的にもヒト IgA 腎症に極めて類似していることが分かってきている。このマウスを用いて詳細な病因解析が出来るのは我々のグループのみであり、新たな知見の発見につながる可能性がある。

そこで得られた結果により、将来的な病態に応じた分子標的薬剤の開発など特異的な治療の開発につながる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### gdY マウスと HIGA マウスの遺伝子表現型解析

gdY マウスおよび HIGA マウスから DNA を抽出する。具体的にはマウスの尾を数ミリ切り取り、そこから QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出する。

マイクロサテライトマーカーを用いて、両マウスの各遺伝子領域の表現型を網羅的に解析し、表現型が異なっている領域を同定する。

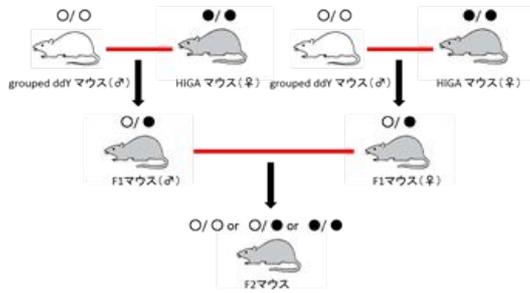
#### マウスの作成

gdY マウスと HIGA マウスを交配し F1 マウスを作成する。

理論上 F1 マウスは、表現型が異なる部分において全てヘテロの表現型となる。

その後、F1 マウス同士を交配する (F2 マウス)。

理論上 F2 マウスは、表現型が異なる部分において全ての表現型 (gdY あるいは HIGA 型のホモ、ヘテロ) を取りうる。



### F2 マウスの解析

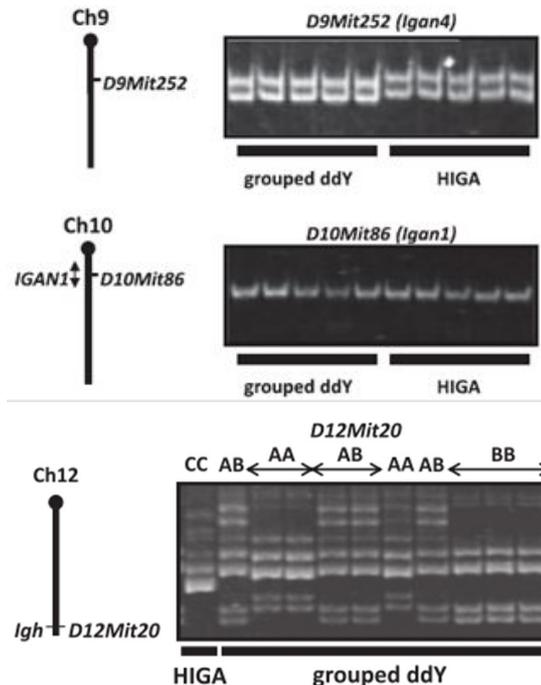
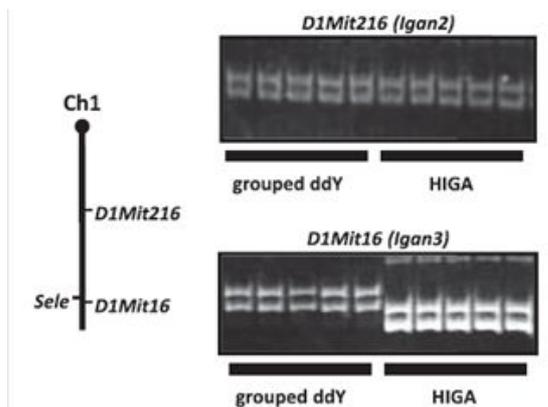
F2 マウスを 200 匹程度作成し、*Sele* で同定された *gddY* マウスと HIGA マウスで異なっていた領域の表現型を網羅的に解析する。同時に、尿蛋白など腎障害の有無や重症度についても確認しておく。それらを元に統計的な解析を行い、*gddY* マウスと HIGA マウスで異なる表現型を示した領域と腎障害の関与を解明する。

### 疾患感受性候補領域から治療ターゲットの同定

で得られた疾患感受性候補領域が、具体的にどのような分子と関与しているかを解析している。それにより、今後の治療ターゲットを同定する。

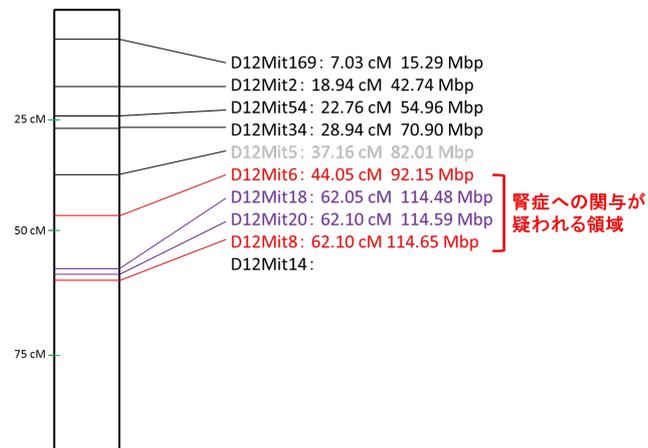
### 4. 研究成果

これまで、マイクロサテライトマーカーによる解析で *gddY* と HIGA で *D1Mit16* および *D12Mit20* で差異を認めた。特に *D12Mit20* においては HIGA のみならず *gddY* A および B の間でも差異を認めた。*gddY*-A と B では腎症発症時期に相違はないものの、B の方が A よりも明らかに死亡率が高いことがわかった。同遺伝子領域は IgA 重鎖のヒンジ部のため、同領域が IgA の糖鎖異常や腎症進展に深く関わっている可能性が高いと考えられる。



その他の領域をマイクロサテライトマーカーで確認したところ、Ch12 では下記領域が腎症への関与が疑われることがわかった。

### Ch 12



これらの領域に着目し、それぞれ HIGA マウスとのかけ合わせを行い F2 までスクリーニングを行った。また、その後それぞれの新たな系統を維持し腎症の発症および進展の評価を試みた。

しかしながら、観察できた範囲では臨床所見において明らかな差異は認めなかった。期間を延長し長期的に観察をすることが可能であれば差異を確認できた可能性があるが、飼育スペースの関係でそれぞれの新たな系統を維持することは困難であった。

また、IgA 腎症の責任領域がこの領域のみでよいのかどうかについても検討する必要があった。その他の染色体領域も多岐にわたりマイクロサテライトマーカーで確認を行った。しかしながら、領域が膨大であり、全体を把握することは困難と考えられた。

今後、次世代シーケンスの手法を用いて、HIGA および gddY の全ゲノム解析および比較を検討する予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

堀越 哲 (HORIKOSHI, Satoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80260884

##### (2)研究分担者

鈴木 祐介 (SUZUKI, Yusuke)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70372935

富野 康日己 (TOMINO, Yasuhiko)

順天堂大学・医学部・名誉教授

研究者番号：60130077

##### (3)連携研究者

無し

##### (4)研究協力者

每熊 政行 (MAIGUMA, Masayuki)

高畑 暁子 (TAKAHATA, Akiko)