

家族性および孤発性 IgA 腎症の疾患感受性遺伝子の同定と診療への応用

●成田 一衛¹⁾ ◆後藤 眞¹⁾ ◆坂爪 実²⁾

1) 新潟大学大学院医歯学総合研究科 2) 同 医歯学総合病院

<研究の目的と進め方>

本研究の目的は、第一に家族性 IgA 腎症の疾患感受性遺伝子を同定し、それが孤発性 IgA 腎症においても疾患感受性および進行に関与する遺伝子として作用しているかどうかを検証することである。第二に同定された疾患感受性遺伝子を利用して腎臓病診療に応用することである。

最も多い原発性糸球体腎炎で末期腎不全の主要な原疾患でもある IgA 腎症は、疾患感受性遺伝子の存在が想定され、欧米の多施設共同研究により複数の連鎖領域が報告されているが、責任遺伝子の特定には至っていない。本研究では十分な数の IgA 腎症家系と症例数を単独の施設で収集し、ゲノムワイドな連鎖解析を行い、責任遺伝子とその変異を同定する。さらに以前から収集してきた孤発例のゲノムを使って関連解析を行い、両者の結果を比較することにより、クロスする部分が疾患感受性遺伝子として最も有力なものとして判断される。また、その遺伝子は疾患の進行にも関連する可能性が高いため、腎機能低下をエンドポイントとした生存分析を行う。本研究の成果は、腎臓病学におけるゲノム多型情報の臨床応用にとって必要不可欠な基礎データとなり、方法論は他疾患における解析でも有用となる。申請者らは、単一施設としては国内最大の慢性糸球体腎炎の病理組織 (14,000 例) およびゲノム遺伝子 (1,400 例) のデータベースを構築し、多数の症例を分子遺伝学的、臨床病理学的に解析してきた。その過程で、一見孤発例と見られる症例でも、詳細に調査すると家族性 IgA 腎症の頻度が予想以上に多いことを実感し、本研究を立案した。

<2008 年度の研究の当初計画>

平成 20 年度現在までに、IgA 腎症家系 27 家系 (腎生検で確認した罹患者 58 名、非罹患者 49 名) のゲノム DNA を、文書で同意を取得したうえで収集した。今後、収集した家族性 IgA 腎症家系の罹患者、非罹患者について、Gene chip を用いてゲノムワイド連鎖解析と関連解析を行い、両者の結果を統合して IgA 腎症の疾患感受性遺伝子 (領域) を同定する。その領域にある遺伝子をゲノムデータベースから検索し、それぞれの転写調節領域とエクソンについて、罹患者および健常者数名をダイレクトシーケンシングし、原因となる変異を検索する。

一方今までの研究から、IgA 腎症の発症機序には、血清 IgA1 分子ヒンジ領域の糖鎖不全 (Aberrant glycosylation) が関わっている可能性が指摘されている。すなわちヒト IgA1 分子は、ヒンジ部に糖鎖を有する特殊な構造を持っている。このヒンジ部の糖鎖構造の異常 (糖鎖不全) を持つ IgA 分子は自己凝集、糸球体への高親和性、IgG 抗体との免疫複合体形成、代謝排泄の遅延などの性質を有し、しかも IgA 腎症患者血清中に増加していること分かり、IgA 腎症の根本的な発症機序に関与していると考えられるようになっている。そこで、本研究で収集した家系について、罹患

者と非罹患者で IgA1 糖鎖不全をレクチン ELISA の系を確立し解析することも併行して進め、この糖鎖不全と同定される責任候補遺伝子との関連を解析できるように準備する。

同定された家族性 IgA 腎症の疾患感受性遺伝子について、当該遺伝子の SNPs を検索し、既に申請者らが収集した IgA 腎症孤発例 400 例を用いて関連解析を行う。この際に、発症のみではなく、腎機能低下の進行との関連を生存分析にて解析する。さらに他の糸球体腎炎との関連についても解析する。申請者らの既報の遺伝子群と、本研究で同定された遺伝子の相互作用・相乗作用を解析する。以上の結果を統合して、最終的には臨床的に有用な、腎機能予後推定システムを構築する。このシステムを利用した治療への介入を実現するため、prospective study を行うためのプロトコルを作成する。

<2008 年度の成果>

イタリア、ドイツ、ならびに米国で行われた家族性 IgA 腎症の連鎖解析では 30 家系 (罹患者と健常者の合計 160 名) が解析された (Nat Genet, 2000, 26:354)。しかし、彼らの報告では、罹患者に血尿もしくは蛋白尿のみの症例が含まれており、必ずしも IgA 腎症のみの症例とはいえない。事実申請者らの予備調査でも、IgA 腎症患者の家族に蛋白尿や血尿を認めても、詳細に調べると、それは糖尿病性腎症や腎結石、他の糸球体腎炎である例も少なからず含まれていた。そこで、本研究では罹患者の定義をより厳密に設定した。すなわち、腎生検で IgA 腎症と確認されているか、糖尿病性腎症以外の慢性腎炎で腎不全に至った症例だけを罹患者とし、検尿異常のみの症例は不明と定義する。また、IgA 腎症の平均発症年齢が 37.5 歳であることから、40 歳以上で尿所見が正常であることを非罹患者の定義とした。上記の条件をクリアする複数の罹患者と非罹患者を含む家系を収集した。約 1 年間で、27 家系 (罹患者 58、非罹患者 49 名) のゲノム DNA を収集した。これらの家系図から、本症は低浸透率の常染色体優性遺伝性疾患であることが明らかである。これらの試料を支援班東京大学徳永教授の研究室に送付し、GeneChip による解析を依頼した。

一方、HAA レクチンを利用した ELISA 系を確立し、血清 IgA1 ヒンジ部の糖鎖不全を評価した。健常コントロール (尿所見正常者) に比して、家族性 IgA 腎症家系のメンバーは明らかに糖鎖不全 IgA の増加をみとめた。しかし、罹患者と家系内の非罹患者に差はなかった。したがって、糖鎖不全は少なくとも部分的に遺伝的に規定されているが、IgA 腎症発症には他の要素が必要である可能性が示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

欧米ではイタリアを中心に IgA 腎症家系を収集し、ゲノムワイド関連解析を行っているが、上記のように腎生検で確定診断した

症例はごく一部である。また多施設共同研究のため、診断の基準や臨床データの質が保証できず、腎機能の予後や治療に対する反応など経過を追うような研究は不可能である。また人種・民族、生活環境も多様であり、得られた結果の解析（例えば環境因子との関連など）が困難であることが予想される。

一方、本研究は新潟県という比較的限定的な地域を中心に、単施設でIgA腎症家系を27家系以上収集したものであり、上記の大規模な多施設共同研究に比較すると、明らかに遺伝的バックグラウンドや環境因子は揃っている集団を対象としている。したがって、有意な結果が得られる可能性が高く、環境や治療との関連、腎機能の予後についても追跡可能である。

孤発例についても、IgA腎症をはじめとする腎臓病の遺伝的背景解明の試みは国内外で行われているが、本研究では保有するデータベースの規模が単一施設では最大であり、経年的な予後を含む詳細な臨床データと定量化された組織病理所見がリンクしているため、腎機能低下のリスクを評価することが可能である。また、この臨床データは随時更新されており、腎疾患におけるゲノム解析と前向きコホート研究を可能としている。このような性格を有する腎臓病のデータベースは、国内唯一であり世界でも稀である。

家族性発症をみとめる common disease において、その疾患感受性遺伝子が、孤発例でも発症に関与していることは、稀なことではないが、本研究のように家族性発症群と孤発例を同時に解析することにより、両者に共通なものやそうでないものが検出される可能性が高い。従来、それは方法論的な相違による差であることを否定できなかったが、臨床表現型の評価をそろえ、全く同じ遺伝子を解析することにより、この問題は解決可能である。本研究の成果は、腎臓病学におけるゲノム多型情報の臨床応用にとって必要不可欠な基礎データとなり、方法論は他疾患における解析でも有用となる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

約1年間で、27家系（罹患者58、非罹患者49名）のゲノムDNAを収集することができた。家系内の正常者も含めて可能な限り多くの検体を収集することを目指したが、多くの時間と労力を要した。特に遠方に居住するメンバーからの採取は困難であった。郵送や電話、インターネット通信でのインフォームドコンセント、同意取得および検体の送付、受け取りが可能となるような法的な整備が望まれる。

また臨床経過からIgA腎症による慢性腎不全と診断され、透析に導入されていた患者の子2名が糸球体性血尿陽性であり、家族性IgA腎症と思われていたが、長女の腎生検を行ったところ、Alport症候群であることが判明した。臨床所見のみで本症を診断し、遺伝子解析を行うばあい、このような症例が含まれる可能性がある。

<今後の課題>

GeneChipによる解析は今後の結果を待たねばならない。その結果を受けたデータの処理、解釈なども今後の課題である。同定された家族性IgA腎症の疾患感受性遺伝子について、当該遺伝子のSNPsを検索し、既に申請者が収集したIgA腎症孤発例400例を用いて関連解析を行う。この際に、発症のみではなく、腎機能低下の進行との関連を生存分析にて解析する。さらに他の糸球体腎炎との関連についても解析する。

一方、家族性IgA腎症家系のさらなる収集を進める必要もある。特に既に発症者とその近傍の肉親から収集した家系で、他のメンバーの存在が確認されているケースを中心に、収集を進める。

<成果公表リスト>

- 0901071517 (論文) Sato H, Kazama JJ, Kuroda T, Narita I, Nakano M, Gejyo F. Serum cystatin C measured by a sol particle homogeneous immunoassay can accurately detect early impairment of renal function. *Clin Exp Nephrol*, (2009) in press
- 0901081534 (プロシーディングス) Wada S, Goto S, Miura T, Inomata S, Sakamaki Y, Wang X, Skatsume M, Narita I, Gejyo F. Aberrant glycosylation of IgA1 is heritable in familial IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 19: SA-PO2423 (2008)
- 0806231753 (論文) Narita I, Gejyo F. Pathogenetic significance of aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, 12: 332-338 (2008)
- 0806231749 (論文) Suzuki Y, Narita I, Aizawa M, Kihara M, Yamanaka T, Kanou T, Novak J, Horikoshi S, Tomino Y. Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 19: 2384-2395 (2008)
- 612201057 (論文) Narita I, Kaneko Y, Kondo D, Goto S, Sakatsume M, Gejyo F. The genetic susceptibility to IgA nephropathy: A novel functional candidate gene for incomplete O-glycosylation of IgA1. *Kidney Int*, 71(5), 379-381 (2007)
- 701241817 (論文) Alchi B, Nishi S, Narita I, Gejyo F. Collagenofibrotic Glomerulopathy: Clinicopathologic Overview of a Rare Glomerular Disease. *Am J Kid Dis*, 49: 499-506 (2007)
- 704261542 (論文) Ajiro J, Alchi B, Narita I, Omori K, Kondo D, Sakatsume M, Kazama JJ, Akazawa K, Gejyo F. Mortality predictors after 10 years of dialysis: A Prospective Study of Japanese Hemodialysis Patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2: 653-660 (2007)
- 704261548 (論文) Sakatsume M, Kubota R, Ogawa A, Narita I, Matsuda T, Shiba K, Gejyo F. Rapid and sensitive electrophoresis of urinary protein clearly reveals the pathophysiological feature of renal diseases. *Nephrology (Carlton)*, 12: 191-196 (2007)
- 705011536 (論文) Imai E, Horio M, Iseki K, Yamagata K, Watanabe T, Hara S, Ura N, Kiyohara Y, Hirakata H, Moriyama T, Ando Y, Nitta K, Inaguma D, Narita I, et al. Prevalence of chronic kidney disease (CKD) in the Japanese general population predicted by the MDRD equation modified by a Japanese coefficient. *Clin Exp Nephrol*, 11: 156-163 (2007)
- 705011814 (論文) Imai E, Horio M, Nitta K, Yamagata K, Iseki K, Hara S, Ura N, Kiyohara Y, Hirakata H, Watanabe T, Moriyama T, Ando Y, Inaguma D, Narita I, et al. Estimation of glomerular filtration rate by the MDRD study equation modified for Japanese patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*, 11: 41-50 (2007)