

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

家族性慢性糸球体腎炎症候群の責任遺伝子の同定

研究代表者 岡田 浩一（埼玉医科大学 腎臓内科）

研究分担者 井上 勉¹⁾，岩佐 泰靖²⁾

緒 言：

わが国の毎年3万人にのぼる新規透析導入患者の原疾患の32.4%を慢性糸球体腎炎が占めており，糖尿病性腎症につぐ透析導入の主要な原疾患となっている。慢性糸球体腎炎は慢性糸球体腎炎症候群と呼ぶべき多数の疾患の総称であり，その中心となる主要疾患がIgA腎症である。IgA腎症の発症には人種差が認められ，わが国を含めた環太平洋に位置するアジアオセアニア諸国，および南部ヨーロッパ諸国に集中しており，アフリカ系アメリカ人に有意に少ないことから，遺伝的因子の関連が示唆される。一方，大多数の症例が家族内集積を示さない散発例であることから，遺伝的因子以外の様々な要因が関連した多因子疾患と推定される。このような場合，ランダムな対象サンプルから遺伝的因子を明らかにするためには，連鎖不平衡解析や大規模な相関解析を行う必要があり，単一施設での検討は困難である。そこで今回，我々は現在追跡中および今後組み入れる慢性糸球体腎炎多発家系の罹患者サンプルを用い，homozygosityハプロタイプ(HH)法を用いたノンパラメトリック連鎖解析を行う。まず埼玉医科大学呼吸器内科の萩原弘一教授が作成し，同大学ゲノム医学研究センター・トランスレーショナル研究部門で運用しているHH解析プログラムを用いて，罹患者間に共有されるゲノム領域を絞り込む。この際，家族内で共有される広範なゲノム領域が検出されてくるものと想定され，その縮小のために非罹患者と罹患者間で共有される領域を同定し，その疾患ゲノムを含まないと考えられる領域を罹患者間で共有されるゲノム領域よりサブトラクションする。その結果得られる，罹患者間でのみ共有されているゲノム領域内に責任遺伝子が含まれている可能性が高く，その領域内の候補遺伝子群の塩基配列や発現情報，機能情報等か

ら慢性糸球体腎炎関連遺伝子同定を試みる。

方 法：

- 1: 埼玉医科大学病院およびその関連施設に通院中で，血縁関係者に既知の遺伝性腎疾患が否定された慢性糸球体腎炎患者が4例以上認められる家系の内，少なくとも1例が慢性腎不全（維持透析例を含む）を呈している家系を対象家系とする。罹患者，非罹患者に埼玉医科大学倫理委員会で承認された説明文書（申請番号498）を用いて本研究への参加，DNA検体の提供を依頼し，文書による同意を得る。
- 2: 全血10 mlよりゲノムDNAを精製し，埼玉医科大学ゲノム医学研究センター・トランスレーショナル研究部門にてヒトSNP解析用のマイクロアレイ（Affymetrix社：GeneChip Human Mapping 500K Array Set）による精密SNPタイピングを行う。
- 3: SNPタイピングデータを用いてhomozygosity ハプロタイプ法により，同一家系内の罹患者間で共有されているゲノム領域の絞り込みを行う。さらに非罹患者家族と罹患者間で共有されているゲノム領域を，候補領域よりsubtractionする。
- 4: PosMed databaseを用いて，責任遺伝子を含む可能性の高いゲノム領域に含まれる，慢性糸球体腎炎の発症／進展に関わるキーワードと関連して報告されている候補遺伝子进行を特定する。
- 5: 患者DNAを用いてリストされた候補遺伝子のエクソンシーケンスを行い，変異が検出された遺伝子を最終候補遺伝子とする。

結 果：

第1家系 (FCGN_1)

第1家系の家系図をFig.1に示す。DNAサンプルを集めている段階で，罹患者（Pt-2，Pt-4）の腎生検よりAlport症候群であることが判明し，サンプリングを中止し，以後の検討は行わなかった。

第2家系 (FCGN_2)

1) 埼玉医科大学 腎臓内科

2) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター・トランスレーショナルリサーチ部門

第2家系の家系図をFig. 2に示す。罹患者4例 (Pt-1～4) と非罹患者2例 (Ct-1, 2) よりDNAサンプルを取得し、マイクロアレイを用いたSNPタイピングを施行した。まず最初に罹患者のデータでHH法を施行し、罹患者間で共有されるゲノム領域を同定したところ、かなり広範なゲノム領域が該当した。(Fig. 3) その後、罹患者と非罹患者間で共有されるゲノム領域を差し引いて、罹患者間のみで共有されるゲノム領域を同定したところ、最終的にはかなり絞り込むことができた。(Fig. 4)

第8, 11, 12および17番染色体上の比較的大型の共有領域 (> 15 Mb) に関して、PosMed database (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) で物理的位置情報と慢性糸球体腎炎に関連したキーワード (glomerulonephritis, nephropathy, proteinuria, hematuria) を用いて、候補遺伝子を探索した。参考文献も参照し、第一段階でエクソンシーケンスを行うべき候補遺伝子が、以下のようにリストされた。(Table 1)

第3家系 (FCGN_3)

第3家系の家系図をFig. 5に示す。第2家系と並行してSNPタイピングとHH解析を終了しており(データは省略)、現在、候補遺伝子のエクソンシーケンスを進めている。

考 察：

現在までにエクソンシーケンスを終了した候補遺伝子からの変異の検出はなく、責任遺伝子としての検証は行っていない。今後、変異が検出された場合、その最終候補遺伝子の機能評価を、*in vitro*の系を用いて検討する。具体的には、特にアミノ酸置換型の変異の場合、full-length cDNAに変異を導入してアデノウイルスベクターに組み込み、*in vitro*で発現させたミュータントペプチドと野生型ペプチドの機能を比較検討する予定である。

今回の検討で同定が期待される家族性慢性腎炎症候群の責任遺伝子は、その家族内の慢性糸球体腎炎のみならず、その他の非家族性慢性糸球体腎炎の発症／進展にも部分的に関与している可能性があり、また直接の因果関係が証明されなくても慢性糸球体腎炎の発症／進展メカニズムの解明に大きく貢献することが期待される。

研究成果：

(現在、第2, 3家系の候補遺伝子のエクソンシーケンスを継続中である。)

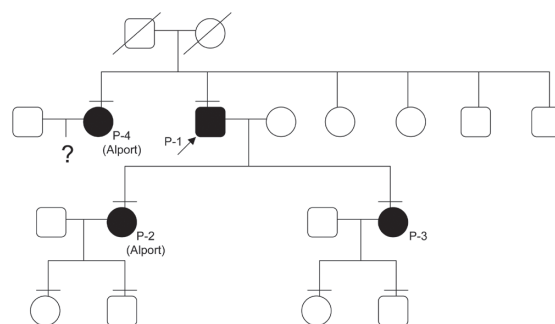


Fig. 1. The family tree of FCGN_1.

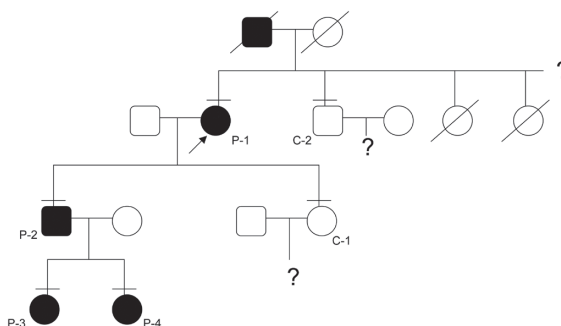


Fig. 2. The family tree of FCGN_2.

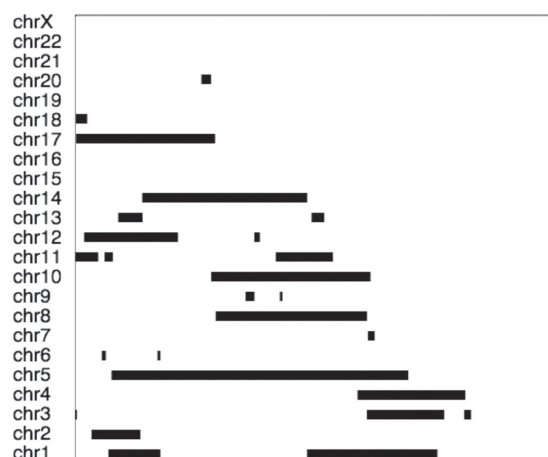


Fig. 3. Candidate regions for the disease gene for FCGN_2.

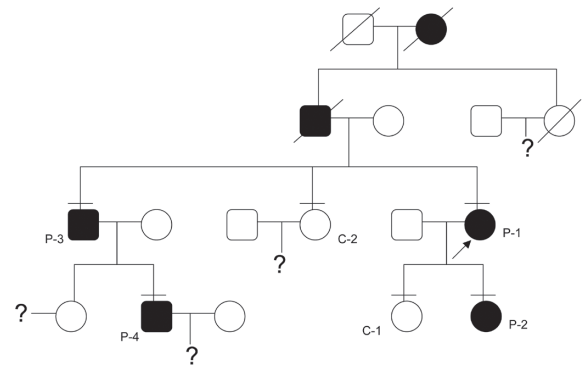


Fig. 4. Narrowed, candidate regions for the disease gene for FCGN_2.

Table. 1. Candidate genes for FCGN_2

| Chromosome No. | Position | Gene ID | Symbol |
|----------------|-------------------------|-----------------|----------|
| 8 | Hs:8:89118580-89408892 | ENSG00000156103 | MMP16* |
| 8 | Hs:8:79807564-79880313 | ENSG00000104432 | IL7 |
| 12 | Hs:12:9102453-9159825 | ENSG00000175899 | A2M* |
| 12 | Hs:12:6308185-6321522 | ENSG00000067182 | TNFRSF1A |
| 12 | Hs:12:6363595-6370994 | ENSG00000111321 | LTBR |
| 17 | Hs:17:45488431-45522843 | ENSG00000005884 | ITGA3* |
| 17 | Hs:17:40192094-40214740 | ENSG00000073670 | ADAM11* |

現在までに*の遺伝子のエクソンシーケンスを終了したが、変異は検出されなかった。現在もエクソンシーケンスを継続中である。

**Fig. 5.** The family tree of FCGN_3.