特発性尿細管性蛋白尿症における CLCN 5 遺伝子の異常

五十嵐 隆^{*1}・芥 直子^{*1}・早川 浩^{*1}
 松山 健^{*2}・白髪 宏司^{*3}・川口 治夫^{*4}
 SE Lloyd^{*5}・SH Pearce^{*5}・RV Thakker^{*5}

要 旨

Dent らが報告した患者を含む 8 家系の患者を 1990 年 Wrong らは Dent 病と命名した。1995 年 Thakker らは Dent 病の責任遺伝子 CLCN 5 をクローニングし、翌年 Dent 病における CLCN 5 の遺伝子異常を解明した。一方、私どもは 1994 年より本症の臨床症状が 1980 年に岡田らがわが国で初めてその臨床的特異性を明らかにし独立の疾患であることを提唱した特発性尿細管性蛋白尿症に類似する事を指摘していた。今回私どもは鈴木の暫定的診断基準 (表 1) を満たす特発性尿細管性蛋白尿症 14 家系中 10 家系 (71%) にクロライドチャンネル N 5 (CLCN 5) の遺伝子異常 (nonsense mutation 4 家

系, missense mutation 3 家系, frameshift mutation 2 家系, CLCN 5 遺伝子全体を含む deletion 1 家系) を明らかにした。そのうち、明らかな血縁関係のない 2 家系の遺伝子異常は同一で、しかも Dent 病 1 家系の遺伝子異常と部位と塩基変化とが同一であった。遺伝子異常はエクソン 8 と 11 に好発部位が見られた。これらの研究と本症の臨床像との比較検討により、1) 特発性尿細管性

表 1 特発性尿細管性蛋白尿症の暫定的診断基準 (鈴木)

A. 主要項目

1. 尿中 β_2 -ミクログロブリンや α_1 -ミクログロブリンなどの低分子蛋白が異常に高値である
2. 身体発育や知能は正常である
3. 理学的に異常所見はない
4. 血液生化学的検査、免疫学的検査で異常はない
5. 腎エコーや静脈性腎盂撮影で腎の形態異常はない
6. 次のものがある場合は除外する
 - a. 腎障害を起こす薬物服用
 - b. 重金属に曝された既往
 - c. 明らかな尿細管障害を起こす疾患

以上を満足すれば本症の診断に間違いはない

B. 参考項目

1. 男性である
2. 血尿を伴うことは少ない
3. 小児期では腎機能は正常である
4. 腎生検で糸球体、尿細管や間質は微妙変化か、ごく軽い変化であることが多い

^{*1}東京大学医学部附属病院分院 小児科
 (〒112 文京区目白台3-28-6)

^{*2}国保連合会福生病院 小児科

^{*3}東京女子医科大学 腎臓小児科

^{*4}東京都八王子小児病院 小児科

^{*5}MRC Molecular Endocrinology Group,
 Royal Postgraduate Medical School
 CLCN5 gene abnormality in patients with
 idiopathic tubular proteinuria

Takashi Igarashi^{*1}, Naoko Akuta^{*2}, Hiroshi Hayakawa^{*1},
 Takeshi Matsuyama^{*3}, Hiroshi Shiraga^{*4}, Haruo Kawaguchi^{*4},
 Sarah E Lloyd^{*5}, Simon HS Pearce^{*5}, Rajesh V Thakker^{*5}

^{*1}Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,
 The University of Tokyo, mejirodai Campus

^{*2}Department of Pediatrics, Kokuhorengoukai Fussa
 Hospital

^{*3}Pediatric Nephrology, Tokyo Women's Medical College

^{*4}Tokyo Metropolitan Hachioji Children's Hospital

^{*5}MRC Molecular Endocrinology Group,
 Royal Postgraduate Medical School

Key Words : 特発性尿細管性蛋白尿症

Dent 病

クロライドチャンネル

CLCN 5

腎不全

図1 クロライドチャンネルファミリーの系統樹
(%は相同性を示す)

蛋白尿症の中核的疾患は CLCN 5 異常症 (Dent 病) であること、2) クロライドチャンネル N 5 は尿管にて種々の機能を果たすことが明らかとなった。

A. Dent 病とは

1964年英国の Dent らは、軽度のくる病、高カルシウム尿症、アミノ酸尿、低分子蛋白尿、尿濃縮力障害、腎機能障害、低身長を呈する6歳男児と、軽度のくる病、低分子蛋白尿、高カルシウム尿症、尿濃縮力障害、腎機能障害、低身長を呈する2.5歳の男児を報告した¹⁾。Dent らはこれらの患者に見られた症状は尿管機能障害によるものと判断し、renal tubular rickets と呼び遺伝性の疾患ではないと結論した。

Wrong らは Dent らの報告した2例の患者を長期にわたり経過観察しさらに同様の症例6例を加え8家系の臨床像を検討し、これをDent病: a familial renal tubular syndrome with hypercalciuria, tubular proteinuria, rickets, nephrocalcinosis and eventual renal failure と命名した²⁾。8家系23名の家族のうち、23名に尿管障害、22名に低分子蛋白尿、16名に高カルシウム尿症、6名にくる病または骨軟化症、12名に腎石灰化、8名に末期腎不全がみられた。2家系では3世代にわたり患者が見られ、初め彼らは常染色体優性遺伝による遺伝性疾患と考えたが、後にX染色体性と修正した。男性患者は女性患者よりも臨床的には重篤で、男性患者の末期腎不全に至る平均年齢は49歳であった³⁾。

B. Dent 病の責任遺伝子とその構造

Pook らはX染色体上の位置が判明している既知のDNAプローブを用いてDent病患者の連鎖解析を行い、

図2 クロライドチャンネルN 5の膜貫通部位の構造

Dent 病の責任遺伝子がX染色体短腕のセントロメアに極めて近傍の Xp11.22領域であることをまず明らかにした⁴⁾。次に、DXS255領域 (Xp11.22上) を認識するDNAプローブであるM27 β をハイブリダイズしないDent病患者が見られたことから、Fisher らは同プローブの近傍にDent病の責任遺伝子があるものと推定し同部位の正常遺伝子をgene walkingしDent病の責任遺伝子であるCLCN 5遺伝子を分離、同定した⁵⁾⁶⁾。

CLCN 5遺伝子は25-30kbの大きさに12のエクソンからなり、コーディング領域から推定されるアミノ酸数は746個である。CLC-N 5蛋白の推定されるアミノ酸組成はCLC-N 4蛋白とは約80%、他のCLC蛋白とは約20~30%の相同性が見られる (図1)。CLCN 5のmRNAは9.5kbの大きさに、コーディング領域 (2.2 kb) に比べるとmRNAは巨大であることもCLCN 4と同様の特徴である。

CLC-N 5蛋白は1) 11の膜貫通部位を有し、2) 疎水性の強いドメイン4のみが細胞外に存在し、3) ドメイン8と9の間の細胞外ループに糖鎖が付着し、4) C末端は細胞内に存在するという構造的な特徴を有する (図2)。ドメイン9~12の部分の詳しい構造は現在のところ不明である。また、CLC-N 5蛋白は主として腎、脳、肝に発現する。腎組織のうち、CLC-N 5蛋白は主として近位、遠位尿管に発現する。

C. Dent 病とその類縁疾患における CLCN 5 遺伝子の異常

CLCN 5の遺伝子異常がDent病の原因であることが濃厚となったことから、Lloyd らは英国のDent病8家系、Dent病に臨床症状が類似する北米のX染色体性腎石灰化症2家系、イタリアのX染色体性低P血症性くる病1家系を対象にCLCN 5遺伝子の解析を行った。その結果、3家系に nonsense mutation、4家系に mis-

sense mutation, 2 家系に splice site mutation, 2 家系にそれぞれ 2 kb, 515kb の deletion が見られることが明らかとなった⁷⁾。変異の結果, 1) 制限酵素切断部位が新たに出現あるいは消失すること, あるいは 2) 変異部位を認識する oligo-DNA probe を利用して, 患者の母親が患者と同じ CLCN 5 上の変異を有する保因者であることを確認した。さらに, missense mutation を有する Dent 病患者の CLC-N 5 蛋白をツメガエル卵に発現させ, 陰イオンの外向き電流 (chloride conductance) が低下することを証明した。

以上の研究により, CLCN 5 が Dent 病や X 染色体性腎石灰化症の原因遺伝子であることが証明された。

D. 特発性尿細管性蛋白尿症の臨床像

本症は 1980 年に富山医科薬科大学小児科の岡田敏夫教授らがわが国で初めて提唱した疾患である⁹⁾。本症は小児期には多くが無症状で, 集団検尿などにて偶然蛋白尿を指摘されることにより診断に至ることがほとんどである。身体, 知能に異常は見られないが, 身長がやや小柄な患者が多い。鈴木 の作成した暫定的診断基準を表 1 に示す⁹⁾。

本症に最も特徴的な検査所見は蛋白尿 (多い例では 1.5g/day) で, そのうち分子量が 4 万ダルトン未満の低分子蛋白の占める割合が高い (45~60% 以上)。患者は男児に多い。患者の尿中 β_2 -microglobulin は 10,000 $\mu\text{g/L}$ 以上, 母の尿中 β_2 -microglobulin は数千 $\mu\text{g/L}$ 程度にまで増加していることが多い。臨床的に本症は X 染色体性の遺伝性疾患と推定される。微少血尿を呈することがある。年長児ではアミノ酸尿, 糖尿, 低 P 血症などの近位尿細管機能異常, 尿濃縮力障害, 腎性高 Ca 尿症, 不完全型尿酸性化障害などの遠位尿細管, 集合管の機能異常, 糸球体機能の軽度低下を合併することがある。

腹部 CT で腎髄質を中心とする石灰化, 腎エコーで髄質の輝度上昇が認められることがある。ただし, 腎石灰化の程度は原発性遠位尿細管性アシドーシス患者のそれに比べると軽度である。

腎組織には異常が見られないとする報告がこれまでに多かったが, 糸球体硬化, 尿細管萎縮, 間質への細胞浸潤, 線維化が見られる例が増加している。PAS 染色で尿細管細胞やその周囲の間質が部分的に濃く染色され, Kóssa (カルシウム) 染色によりそれらが石灰化であることが明らかになった。

このように, 本症は小児期から低分子蛋白尿を初めとする各種近位尿細管や尿濃縮力, Ca 再吸収, 酸分泌などの遠位尿細管障害が機能および形態学的に加齢と共に

徐々に進行するだけでなく, 糸球体硬化などの糸球体障害も生じうる疾患であることが特徴的である。すなわち, 本症は何十年にもわたって徐々に進行する尿細管障害と糸球体障害を特徴とする X 染色体性の遺伝性疾患で, 腎機能予後は良好でないことが推察される。但し, 本症の多くが小児期に発見され観察期間の長い例が少ないため, 現在のところ長期的な腎機能予後は不明であり, 今後の検討が必要である。同様に, 本症では腎性高 Ca 尿症の合併が多く, osteomalasia などの骨病変や腎尿路結石の合併についても検討する必要がある。本症がこれまで内科医や泌尿器科医にあまり知られていなかったが, 私共の指摘により近年成人領域からの報告が見られるようになってきた¹⁰⁾¹¹⁾。しかし, 現在でも腎機能障害を呈する原因不明の Fanconi 症候群や尿路結石症として理解されている本症の成人例がいるものと推定される。

E. 特発性尿細管性蛋白尿症 における CLCN 5 遺伝子の異常

私共は英国の Dent 病がわが国の特発性尿細管性蛋白尿症に臨床像が類似していることを報告した¹²⁾。特に, X 染色体性の遺伝形式が推定される本症は Dent 病と同一の疾患である可能性が高いことを指摘した。鈴木 の診断基準を満たす本症患者 14 家系の CLCN 5 の遺伝子解析を行った¹³⁾¹⁴⁾結果, nonsense mutation を 4 家系に, missense mutation を 3 家系に, frameshift mutation を 2 家系に, CLCN 5 遺伝子全体を含む deletion を 1 家系に見いだした (表 2)。特記すべき点は nonsense mutation の内, 2 家系に見られた同一の変異 (コドン 279 の G to A change) は変異部位と塩基変異とが英国の Dent 病の 1 患者のそれと全く同一であった。CLCN 5 異常症ではエクソン 8 と 11 に変異部位が集中しており, 両部位が CLCN 5 変異の好発部位である可能性が高い。さらに私どもは missense mutation 患者の CLC-N 5 蛋白をツノガエル卵発現系にて発現させ, 陰イオンの外向き電流が低下することを確認した¹³⁾。

F. 特発性尿細管性蛋白尿症と Dent 病との関係

鈴木 の診断基準では慢性間質性腎炎などの疾患が紛れ込む可能性が高いこと, 臨床的に X 染色体性ではない家系が存在することなどが以前から指摘されており, 特発性尿細管性蛋白尿症は heterogenous な疾患であると, これまで考えられていた。そこで, 母親の尿中 β_2 -microglobulin 値と CLCN 5 遺伝子異常の有無との関係に

表2 特発性尿細管性蛋白尿症における CLCN 5 異常

Family	Codon (exon)	Base change	Amino acid change	Restriction enzyme change / SSO	Predicted effect
<i>Nonsense Mutations</i>					
1 & 2	279	TGG=>TGA	Val=>stop	MaeIII(+)	protein truncated by 469 AAs
3	343	TGG=>TAG	Val=>stop	EcoRII(-)	protein truncated by 404 AAs
4	347	CGA=>TGA	Arg=>stop	SSO	protein truncated by 401 AAs
<i>Missense Mutations</i>					
5	280	CGT=>CCT	Arg=>Pro	HaeIII(+)	disruption of the formation of alpha-helix at transmembrane domain D6
6	513	GGG=>GAG	Gly=>Glu	Mnl I(+)	disruption of the helix in D11
7	516	CGG=>TGG	Arg=>Trp	Hinf I(-)	disruption of the helix in D11
<i>Frameshift mutations</i>					
8	229	C=>TA	7 AAs frame shift and stop	SSO	protein truncated by 513 AAs
9	695	C deletion	3 AAs frame shift and stop	SSO	protein truncated by 47 AAs
<i>Deletion</i>					
10	Deleted for LEM1, M27R, CLCN5. DXS 146 and DXS 988 present.				absence of protein

AAs; amino acids, SSO; single strand oligonucleotide

つき検討した。その結果、母親の尿中 β_2 -microglobulin 値が高値であった8家系中7家系に、不明であった2家系中2家系に、正常であった4家系中1家系に CLCN 5 遺伝子の異常が認められた。つまり、鈴木らの診断基準を満たす本症の71%に CLCN 5 異常が認められた。この事実は特発性尿細管性蛋白尿症の中核的疾患は Dent 病であることを意味する (図3)。特に、母親の尿中 β_2 -microglobulin 値が高値でX染色体性の遺伝形式が推定される本症は CLCN 5 異常症 (Dent 病) である可能性が極めて高い。母親の尿中 β_2 -microglobulin 値の測定は本症の診断上重要な意味を持つので、1) 早朝尿を出来るだけ早期に測定すること、それができない場合には速やかに-20°Cに保存すること、2) 尿 pH が低値の場合に尿中 β_2 -microglobulin は速やかに崩壊するので pH 6 以下では重曹を投与して pH を7.0にしておく、などの注意が必要である。

今後、CLCN 5 異常症を臨床的に正しく診断することが出来る特異性の高い診断基準を作る必要がある。また、CLC-N 5 蛋白に特異性の高い抗体を作り腎組織での CLC-N 5 蛋白の発現を検索することができるよう

特発性尿細管性蛋白尿症 (岡田病)

図3 特発性尿細管性蛋白尿症と Dent 病との関係

なれば CLCN 5 異常症を臨床的に正しく診断する上で極めて有用である。

G. CLCN 5 の異常は特発性尿細管性蛋白尿症にみられる諸症状を説明できるか?

1) 近位尿細管における正常な endocytosis が行われる上で endosome 膜のクロライドチャンネルによる vesicle 内の酸性化が必要なこと¹⁵⁾、2) 遠位尿細管での Ca 再吸収にクロライドチャンネルが関与していること¹⁶⁾、3) 腎乳頭間質部を高張に保持する上でクロライドチャンネルが機能していること¹⁷⁾などの生理的機能が近年明らかにされつつある。それらが事実であるとするならば、本症に見られる1) 低分子蛋白尿症、2) 高Ca尿症、3) 尿濃縮力障害などの諸症状はクロライドチャンネルの異常により説明可能であろう。逆に、Dent 病や特発性尿細管性蛋白尿症に見られる種々の尿細管機能異常の原因が CLCN 5 の異常に起因する可能性があり、CLCN 5 にはこれまで予想されなかった多くの機能を有する可能性があり、今後 CLC-N 5 蛋白の腎尿細管における蛋白レベルでの検討が望まれる。

文 献

- 1) Dent CE, Friedman M: Hypercalcuric rickets associated with renal tubular damage. *Arc Dis Child* 39: 240-249, 1964.
- 2) Wrong OM, Norden AGW, Feest TG: Dent's disease: a familial renal tubular syndrome with hypercalciuria, tubular proteinuria, rickets, nephrocalcinosis and eventual renal failure *QJ Med* 77: 1086-1087, 1990.
- 3) Wrong OM, Norden AGW, Feest TG: Dent's disease: a familial renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *QJ Med* 87: 473-493, 1994.

- 4) Pook MA, Wrong O, Wooding C, et al : Dent's disease, a renal Fanconi syndrome with nephrocalcinosis and kidney stones, is associated with a microdeletion involving DXS255 and maps to Xp 11.22. *Human Mole Genet* 12 : 2129-2134, 1993.
- 5) Fisher SE, Black GCM, Lloyd SE, et al : Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and in a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum Mol Genet* 11 : 2053-2059, 1994.
- 6) Fisher SE, Bakel IV, Lloyd SE, et al : Cloning and characterization of CLCN5, the human kidney chloride channel gene implicated in Dent disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Genomics* 29 : 598-606, 1995.
- 7) Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, et al : A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379 : 445-449, 1996.
- 8) Suzuki Y, Okada T, Higuchi A, et al : The low molecular weight of protein components in children urine. *Acta Pediatr Jpn* 22 : 1-5, 1980.
- 9) 鈴木好文, 岡田敏夫 : 家族性特発性低分子蛋白尿—特発性尿細管性蛋白尿, 血尿と蛋白尿, 川戸英彦, 五十嵐隆編, 金原出版, pp210-214, 1992.
- 10) 五十嵐隆 : 特発性低分子蛋白尿症, 腎と透析 37 : 871-874, 1994.
- 11) 邵一勇, 福井光峰, 堀越哲他 : 家族性特発性尿細管性蛋白尿症の1症例, 腎と透析 40 : 303-306, 1996.
- 12) Igarashi T, Hayakawa H, Shiraga H, et al : Hypercalciuria and nephrocalcinosis in patients with idiopathic low-molecular-weight proteinuria in Japan : is the disease identical to Dent's disease in United Kingdom? *Nephron* 69 : 242-247, 1995.
- 13) Lloyd SE, Pearce SHS, Igarashi T, et al : Chloride channel CLCN5 mutations in Japanese patients with idiopathic low molecular weight proteinuria. *J Clin Invest* (in press).
- 14) Akuta N, Lloyd SE, Igarashi T, et al : Molecular analysis of idiopathic low molecular weight proteinuria. *Kidney Int* (in press).
- 15) Bae H-R, Verkman AS : Protein kinase A regulates chloride conductance in endocytic vesicles from proximal tubule. *Nature* 348 : 637-639, 1990.
- 16) Gesek FA, Friedman PA : On the mechanism of parathyroid hormone stimulation of calcium uptake by mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 90 : 749-758, 1992.
- 17) 内田信一 : クロライドチャンネル 膜輸送蛋白異常症 日本臨床 3 : 667-671, 1996.