X連鎖型アルポート症候群女性患者の腎炎重症度と IV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖発現率

中西 浩一^{*1}・黒田 直人^{*2}・井上 祐司^{*1}・飯島 一誠^{*1}
中村 肇^{*1}・佐渡 義一^{*3}・吉川 徳茂^{*4}

要 旨

X連鎖型アルポート症候群はIV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖遺伝子の異常が原因で、女性患者では $\alpha 5$ 鎖は皮膚基底膜・糸球体基底膜にモザイク状に存在する。X連鎖型アルポート症候群女性患者の重症度は様々であり、正常 $\alpha 5$ 鎖遺伝子を有するX染色体の不活化の程度、つまり正常 $\alpha 5$ 鎖の発現程度により決定されると考えられる。そこで、X連鎖型アルポート症候群女性患者の重症度と皮膚基底膜・糸球体基底膜における $\alpha 5$ 鎖発現率の関係を検討した。皮膚基底膜と糸球体基底膜における $\alpha 5$ 鎖発現率には有意の正の相関を認めた。皮膚基底膜における各群の $\alpha 5$ 鎖発現率は重症群ほど有意に低く、皮膚基底膜の $\alpha 5$ 鎖発現率は腎炎の重症度をよく反映していた。X連鎖型アルポート症候群女性患者の腎炎重症度は

正常 $\alpha 5$ 鎖遺伝子を有するX染色体の不活化の程度、つまり正常 $\alpha 5$ 鎖の発現程度により決定される。皮膚生検による皮膚基底膜の $\alpha 5$ 鎖発現率の検索は、X連鎖型アルポート症候群女性患者の予後判定に極めて有用である。

序 言

進行性遺伝性腎炎は病初期には血尿が唯一の所見であるが、やがて蛋白尿が出現増加し徐々に腎機能が低下していく疾患である。難聴を伴うものはアルポート症候群としてよく知られているが¹⁾、難聴を伴わない進行性遺伝性腎炎もよくみられる。難聴を伴わない進行性遺伝性腎炎とアルポート症候群の臨床病理所見は全く同じで、本質的にも同一の疾患と考えられ難聴の無い場合でも広義のアルポート症候群と考えてよい²⁾。また、腎炎の家族歴の無い血尿症例のうち感音性難聴を伴い腎生検でアルポート症候群と同一の病理所見を呈することがあり、アルポート症候群の new mutation と考えられる^{2)~4)}。

進行性遺伝性腎炎の特徴的な病理所見は糸球体基底膜 (GBM) の広範な網目状変化で、大部分の症例で認められる。もうひとつの特徴的な変化は GBM の菲薄化である。網目状変化のみられない進行性遺伝性腎炎の多くは GBM の広範な菲薄化を示す^{5)~9)}。

アルポート症候群の遺伝形式は多くはX連鎖型であるが、常染色体優性、常染色体劣性のものもある^{10)~12)}。アルポート症候群の一次的病因は GBM の異常で、その主要構成成分であるIV型コラーゲンの分子異常が原因で

*1神戸大学医学部小児科
(〒650 神戸市中央区楠町7-5-1)

*2神戸大学医学部病理学第一

*3重井医学研究所免疫部門

*4神戸大学医学部保健学科

Expression of the type IV collagen $\alpha 5$ chain in the epidermal basement membrane and the severity of the disease in females with X-linked Alport syndrome

Koichi Nakanishi^{*1}, Naoto Kuroda^{*2}, Yuji Inoue^{*1},
Kazumoto Iijima^{*1}, Hajime Nakamura^{*1},
Yoshikazu Sado^{*3}, Norishige Yoshikawa^{*4}

*1Departments of Pediatrics, Kobe University School of Medicine

*2Department of Pathology, Kobe University School of Medicine

*3Shigei Medical Research Institute

*4Department of Health science, Kobe University, School of Medicine

Key Words: X連鎖型アルポート症候群
女性患者
IV型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖発現率
皮膚基底膜
X染色体不活化

ある。IV型コラーゲン分子は3本の α 鎖よりなる三重らせん構造をとり¹³⁾、さらにそのC末端のNCドメイン、N末端の7SDドメインが異なる分子間で結合して高次の網目状構造を形成している¹⁴⁾。

α 鎖は現在 $\alpha 1$ から $\alpha 6$ までの6種類が同定されている。 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ と $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ と $\alpha 6$ の遺伝子はhead to headの位置関係で、それぞれ第13番染色体、第2番染色体、X染色体上に存在する。 $\alpha 5$ 鎖の遺伝子はXq22に存在し、 $\alpha 5$ 鎖遺伝子の異常がアルポート症候群の一部に発見されていることより、X連鎖型アルポート症候群(XAS)の病因は $\alpha 5$ 鎖の異常と考えられている^{15)~18)}。 $\alpha 6$ 鎖遺伝子もX染色体に存在することからXASの病因である可能性が示唆されたが¹⁹⁾、免疫組織化学的検索からGBMには $\alpha 6$ 鎖は存在しないことより否定的である²⁰⁾。最近、常染色体劣性型アルポート症候群の家系において $\alpha 3$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖の遺伝子異常が報告され、それらがアルポート症候群の原因と考えられる²¹⁾。5本の α 鎖のうちどの3本が三重らせん構造を形成するかについては現在のところ一部を除き不明である。XASは $\alpha 5$ 鎖蛋白以外に $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖蛋白にも異常を認める²²⁾²³⁾。XASにおいて $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖のmRNAは発現しており、蛋白レベルでの異常は $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖のGBMへの組み込みの異常による可能性が高い²⁴⁾。

$\alpha 5$ 鎖は皮膚にも存在し、XAS男性患者では皮膚基底膜(EBM)・GBMの $\alpha 5$ 鎖は完全に欠損しており腎不全に至る。一方、女性患者ではEBM・GBMの $\alpha 5$ 鎖は部分的に発現し、腎炎の重症度は顕微鏡的血尿から腎不全までさまざまである²²⁾。XAS女性患者の腎炎重症度は正常 $\alpha 5$ 鎖遺伝子を有するX染色体の不活化の程度、つまり正常 $\alpha 5$ 鎖の発現程度により決定されと考えられる。

そこで、XAS女性患者の重症度とEBM・GBMにおける $\alpha 5$ 鎖発現率の関係を検討した。XAS女性患者27名を臨床所見により、皮膚生検時、A群：血尿のみ、B群：軽度蛋白尿($<1.0\text{g/day/m}^2$)、C群：高度蛋白尿($\geq 1.0\text{g/day/m}^2$)・腎不全に分類し、重症度と $\alpha 5$ 鎖発現率の関係を検討した。各群の年齢の平均に有意差は認めなかった。前腕屈側皮膚および腎生検組織を抗 $\alpha 5$ 鎖ラットモノクローナル抗体を用いて間接蛍光抗体法で染色し $\alpha 5$ 鎖発現率を検討した²²⁾。

皮膚基底膜と糸球体基底膜における $\alpha 5$ 鎖発現率の相関

図1にEBMとGBMにおける $\alpha 5$ 鎖発現率の相関を示した。EBMとGBMにおける $\alpha 5$ 鎖発現率には有意

図1 EBMとGBMにおける $\alpha 5$ 鎖発現率の相関

の正の相関を認めた。この所見は、皮膚と腎における $\alpha 5$ 鎖遺伝子不活化の程度が同じであることを示す。

皮膚基底膜の $\alpha 5$ 鎖発現率

図2に群別のEBMにおける $\alpha 5$ 鎖発現率の分布を示した。EBMにおける各群の $\alpha 5$ 鎖発現率は重症群ほど有意に低かった。A群とC群では50%を境界にして二分されていた。複数の患者を検討した一家系を図3に示した。この家系において、血尿のみの10歳の女兒はEBMの $\alpha 5$ 鎖発現率が85%と高値であったが、5歳と幼少にもかかわらず高度蛋白尿を示す妹のEBMの $\alpha 5$ 鎖発現率は35%と低値であった。また、36歳の母親は軽度蛋白尿を示すのみで腎機能低下はなくEBMの $\alpha 5$ 鎖発現率は50%であったが、39歳の伯母は腎不全で血液透析を施行しておりEBMの $\alpha 5$ 鎖発現率は31%であった。これらの所見は、EBMの $\alpha 5$ 鎖発現率が腎炎の重症度をよく反映することを示す。

女性の性染色体はXXであり一方は胎生早期にランダムに不活化される²⁵⁾。X染色体不活化の片寄りにより、X連鎖型疾患女性患者の臨床的重症度が規定されることが報告されている²⁶⁾²⁷⁾。Vetrie等はXAS女性患者の重症度と白血球のX染色体不活化パターンに相関はなかったと報告しているが、XASにおいて異常のみられる臓器においては違う可能性があると考えしている²⁸⁾。我々は、XAS女性患者の重症度が、正常 $\alpha 5$ 鎖遺伝子を有するX染色体の不活化の程度、つまり正常 $\alpha 5$ 鎖の発現程度により決定されることを確認した。XAS女性患者の重症度を規定する要因として遺伝子異常の型(genotype)も考慮しなければいけない。Renieri等は201人のイタリア人アルポート症候群患者のIV型コラー

図2 群別の EBM における $\alpha 5$ 鎖発現率

ゲン $\alpha 5$ 鎖遺伝子の全51エクソンを検索し、男性患者では遺伝子異常の型と腎炎重症度に相関を認めたが、女性患者では相関が認められず、X染色体の不活化のパターンなど、他の要因が腎炎重症度に影響しているのだろうと考察している²⁹⁾。遺伝子異常の型による影響を完全に否定することはできないが、X染色体の不活化のパターンが腎炎重症度を規定する大きな要因であることは明らかである。

今回検討した EBM の $\alpha 5$ 鎖発現率は1人の患者につき1箇所のみであり、そのため値がばらついた可能性がある。複数部位の EBM における $\alpha 5$ 鎖発現率が検討できればさらに精密な検討を行い得ると考えられるが、実際の臨床においては制約があり不可能である。また、発生の過程におけるX染色体不活化機構より考えて、ある臓器におけるX染色体の不活化のパターンは多少のばらつきは否めないものの、そのかたよりに一定の傾向を示すと考えられる³⁰⁾。現在分子生物学的手法によりX染色体の不活化のパターンを検索する方法が確立されており³⁰⁾、今回の検討と併せて検索できれば非常に興味深い。やはり実際の臨床においては皮膚生検検体や腎生検検体の量に制約があり困難である。

皮膚基底膜の $\alpha 5$ 鎖発現率と予後の関係

アルポート症候群における臨床所見は年齢とともに変

図3 複数患者を検討した一家系

化するが、3群間の年齢に有意差はないので各群は予後の違いを反映すると考えられる。特にB群においては、ほぼ50%を中心に各症例が分布しているので、EBM の $\alpha 5$ 鎖発現率が今後の経過を推測するうえで有用と思われる。したがって、皮膚生検による EBM の $\alpha 5$ 鎖発現率の検索は、XAS 女性患者の予後判定において有意義である。

結 論

1) XAS 女性患者の腎炎重症度は正常 $\alpha 5$ 鎖遺伝子を有するX染色体の不活化の程度、つまり正常 $\alpha 5$ 鎖の発現程度により決定される。

2) 皮膚生検による、EBM の $\alpha 5$ 鎖発現率の検索は、XAS 女性患者の予後判定に極めて有用である。

文 献

- 1) Alport A. C. : Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. Br Med J 1 : 504-506, 1927.
- 2) Yoshikawa N., White R. H. and Cameron A. H. : Familial hematuria; clinico-pathological correlations. Clin Nephrol 17 : 172-182, 1982.
- 3) Habib R., Gubler M. C., Hinglais N., Noel L. H., Droz D., Levy M., Mahieu P., Foidart J. M., Perrin D., Bois E. and Grifeld J. P. : Alport's syndrome : experience at Hôpital Necker. Kidney Int 21 (Suppl 11) : S20-S28, 1982.
- 4) Yoshikawa N., Matsuyama S., Ito H., Hajikano H. and Matsuo T. : Nonfamilial hematuria associated with glomerular basement membrane alterations characteristic of hereditary nephritis : comparison with hereditary nephritis. J Pediatr 111 : 519-524, 1987.
- 5) Hinglais N., Grifeld J. P. and Bois E. : Characteristic ultrastructural lesion of the glomerular basement membrane in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). Lab Invest 27 : 473-487, 1972.
- 6) Spear G. S. and Slusser R. J. : Alport's syndrome. Emphasizing electron microscopic studies of the glomerulus. Am J

- Pathol 69 : 213-224, 1972.
- 7) Churg J. and Sherman R. L. : Pathologic characteristics of hereditary nephritis. Arch Pathol 95 : 374-379, 1973.
 - 8) Yoshikawa N., Cameron A. H. and White R. H. : The glomerular basal lamina in hereditary nephritis. J Pathol 135 : 199-209, 1981.
 - 9) Yoshikawa N., Ito H., Matsuyama S., Hazikano H., Okada S. and Matsuo T. : Hereditary nephritis in children with and without characteristic glomerular basement membrane alterations. Clin Nephrol 30 : 122-127, 1988.
 - 10) Grufeld J. P. : The clinical spectrum of hereditary nephritis [clinical conference]. Kidney Int 27 : 83-92, 1985.
 - 11) Feingold J., Bois E., Chompret A., Broyer M., Gubler M. C. and Grufeld J. P. : Genetic heterogeneity of Alport syndrome. Kidney Int 27 : 672-677, 1985.
 - 12) Atkin C. L., Gregory M. C. and Border W. A. : Alport syndrome, chapter 19, in Diseases of the kidney (4th ed), edited by Schrier R. W. and Gottschalk C. W., Boston, Little, Brown, 1988, pp 617-641.
 - 13) Johansson C., Butkowski R. J. and Wieslander J. : The structural organization of type IV collagen. Identification of three NC1 populations in the glomerular basement membrane. J Biol Chem 267 : 24533-24537, 1992.
 - 14) Timpl R., Wiedemann H., van Delden V., Furthmayr H. and Kuhn K. : A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. Eur J Biochem 120 : 203-211, 1981.
 - 15) Hostikka S. L., Eddy R. L., Byers M. G., Hoyhtya M., Shows T. B. and Tryggvason K. : Identification of a distinct type IV collagen chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 87 : 1606-1610, 1990.
 - 16) Barker D. F., Hostikka S. L., Zhou J., Chow L. T., Oliphant A. R., Gerken S. C., Gregory M. C., Skolnick M. H., Atkin C. L. and Tryggvason K. : Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. Science 248 : 1224-1227, 1990.
 - 17) Tryggvason K., Zhou J., Hostikka S. L. and Shows T. B. : Molecular genetics of Alport syndrome. Kidney Int 43 : 38-44, 1993.
 - 18) Hudson B. G., Reenders S. T. and Tryggvason K. : Type IV collagen : structure, gene organization, and role in human diseases. J Biol Chem 268 : 26033-26036, 1993.
 - 19) Zhou J., Mochizuki T., Smeets H., Antignac C., Laurila P., Paepe A. d., Tryggvason K. and Reenders S. T. : Deletion of the paired $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen genes in inherited smooth muscle tumors. Science 261 : 1167-1169, 1993.
 - 20) Ninomiya Y., Kagawa M., Iyama K., Naito I., Kishiro Y., Seyer J. M., Sugimoto M., Ohashi T. and Sado Y. : Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. J Cell Biol 130 : 1219-1229, 1995.
 - 21) Mochizuki T., Lemmink H. H., Mariyama M., Antignac C., Gubler M. C., Pirson Y., Verellen C., Chan B., Schröder C. H., Smeets H. J. M. and Reenders S. T. : Identification of mutations in the $\alpha 3(\text{IV})$ and $\alpha 4(\text{IV})$ collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. Nat Genet 8 : 77-81, 1994.
 - 22) Nakanishi K., Yoshikawa N., Iijima K., Kitagawa K., Nakamura H., Ito H., Yoshioka K., Kagawa M. and Sado Y. : Immunohistochemical study of $\alpha 1-5$ chains of type IV collagen in hereditary nephritis. Kidney Int 46 : 1413-1421, 1994.
 - 23) Kitagawa K., Nakanishi K., Yoshikawa N., Iijima K., Nishio H., Sano K., Sado Y. and Nakamura H. : Mutation in $\alpha 5(\text{IV})$ Collagen Chain Gene in Nonfamilial Hematuria. J Am Soc Nephrol 6 : 264-268, 1995.
 - 24) Nakanishi K., Yoshikawa N., Iijima K. and Nakamura H. : Expression of the type IV collagen $\alpha 3$ and $\alpha 4$ chain mRNAs in X-linked Alport syndrome. J Am Soc Nephrol 7 : 938-945, 1996.
 - 25) Gartler S. M. and Riggs A. D. : Mammalian X-chromosome inactivation. Annu Rev Genet 17 : 155-190, 1983.
 - 26) Brown R. M. and Brown G. K. : X chromosome inactivation and the diagnosis of X linked disease in females. J Med Genet 30 : 177-184, 1993.
 - 27) Jørgensen A.L., Philip, J., Raskind W. H., Matsushita M., Christensen B., Dreyer V. and Motulsky A. G. : Different patterns of X inactivation in MZ twins discordant for red-green color-vision deficiency. Am J Hum Genet 51 : 291-298, 1992.
 - 28) Vetrie D., Flinter F., Bobrow M. and Harris A. : X inactivation patterns in females with Alport's syndrome : a means of selecting against a deleterious gene? J Med Genet 29 : 663-666, 1992.
 - 29) Renieri A., Bruttini M., Galli L., Zanelli P., Neri T., Rossetti S., Turco A., Heiskari N., Zhou J., Gusmano R., Massella L., Banfi G., Scolari F., Sessa A., Rizzoni G., Tryggvason K., Pignatti P. F., Savi M., Ballabio A. and Marchi M. D. : X-Linked Alport syndrome : an SSCP-based mutation survey over all 51 exons of the COL4A5 gene. Am J Hum Genet 58 : 1192-1204, 1996.
 - 30) Belmont J. W. : Genetic control of X inactivation and processes leading to X-inactivation skewing. Am J Hum Genet 58 : 1101-1108, 1996.