

2014/5050A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患政策研究事業

LMX1B 関連腎症の実態調査と診断基準の確立

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 張 田 豊

平成 27(2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患政策研究事業

LMX1B 関連腎症の実態調査と診断基準の確立

H26 年度 統括・分担研究報告書

研究代表者 張田豊

平成 27 (2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患政策研究事業

LMX1B 関連腎症の実態調査と診断基準の確立

(H26 -難治等(難)-一般- 015)

H26 年度 統括・分担研究報告書

平成 27 (2015) 年 5 月

研究組織

研究代表者	張田 豊	東京大学医学部附属病院	小児科
研究分担者	北中 幸子	東京大学医学部附属病院	小児科
	磯島 豪	東京大学医学部附属病院	小児科
	芦田 明	大阪医科大学	小児科
	服部 元史	東京女子医科大学	腎臓小児科

目次

I. 総括研究報告

<i>LMX1B</i> 関連腎症の実態調査と診断基準の確立-----	1
-------------------------------------	---

張田 豊 (東京大学 小児科)

II. 分担研究報告

1. <i>LMX1B</i> 関連腎症の実態調査 -----	6
---------------------------------	---

張田 豊 (東京大学 小児科)

芦田 明 (大阪医科大学 小児科)

服部 元史 (東京女子医科大学 小児科)

2. <i>LMX1B</i> 関連腎症の遺伝子解析-----	31
---------------------------------	----

北中 幸子 (東京大学 小児科)

磯島 豪 (東京大学 小児科)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	36
--------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患政策研究事業)
統括研究報告書

LMX1B 関連腎症の実態調査と診断基準の確立

研究統括者 張田豊 東京大学小児科 講師

研究要旨：我が国の慢性透析患者数は増加し続けているが、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) は緩徐に腎機能が進行する代表的な慢性糸球体疾患である。FSGS のごく一部は遺伝子異常を原因とするが、多くの原因は未だ不明である。

爪膝蓋骨症候群(nail-patella 症候群)は爪形成不全、膝蓋骨の低形成、腸骨の角状突起、肘関節の異形成を4主徴とする遺伝性疾患である。約半数は蛋白尿や血尿を呈する腎症を発症、その一部は末期腎不全に進行し、腎予後が QOL に多大な影響を及ぼす。原因は *LMX1B* の遺伝子異常である。

LMX1B 変異はまた nail-patella 症候群と同様の腎症を有するが爪、膝蓋骨、腸骨などの変化を伴わない孤発性腎症(nail-patella-like renal disease(NPLRD))や家族性 FSGS の原因となる。これまで FSGS や原因不明の腎不全と診断されている症例の中で、*LMX1B* 変異を原因とする症例が一定数いると考えられ、このような腎症全体を *LMX1B* 関連腎症という一つの疾患概念として定義し直す必要がある。

本研究では *LMX1B* 関連腎症の本邦で初めての実態把握を行い、可能な場合には遺伝子解析をあわせて行った。現在、本成果を活かし、*LMX1B* 腎症の診断基準の作成作業を行っており、本年度中の公表に向けて取り組んでいる。本研究の成果は、我が国における腎疾患の医療水準の向上に貢献することが期待される。

A. 研究目的

爪膝蓋骨症候群(nail-patella 症候群)は爪形成不全、膝蓋骨の低形成、腸骨の角状突起、肘関節の異形成を4主徴とする遺伝性疾患である。約半数は腎症を発症し、一割強は末期腎不全に進行するため、腎予後が QOL に多大な影響を及ぼす。爪や骨格異常のために小児科や整形外科を受診しても、疾患の認識度が低いため未診断の例が多く、腎症になって初めて気づかれる症例も存在する。頻度は5万人

に一人程度といわれているが、本邦の患者数は明らかでない。原因は *LMX1B* 遺伝子異常である。申請者らはこれまで本症候群の国内の症例を集積し報告してきた (Sato U et al. *Pediatr Res*, 2005)。

一方、nail-patella 症候群と同様の腎症を有するが爪、膝蓋骨、腸骨などの変化を伴わない例が少数報告されている (nail-patella-like renal disease (NPLRD))。NPLRD は、腎生検における特徴的な電子顕微鏡所見(糸球体基底膜の

不規則な肥厚、虫食い像)によってのみ診断されるため、腎疾患患者の中には診断に至っていない症例が多く存在すると推察される。近年申請者らは NPLRD の原因を *LMX1B* 変異と同定した(Isojima et al. NDT, 2014)。同時にフランスの研究チームが全く同じアミノ酸の変異(R246Q)が複数の家系において末期腎不全に至る巣状分節様糸球体硬化症を引き起こすことを報告した(Boyer O, et al. JASN, 2013)。これらから *LMX1B* 変異を原因とする、腎外症状を伴わない一群の腎症が存在することが明らかになったが、その頻度、予後は全く不明である。

本研究では、*LMX1B* を原因とする腎疾患(*LMX1B* 関連腎症)の全体像を明らかにするための全国調査を行い、さらに可能な場合には原因遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

1) *LMX1B* 関連腎症の実態調査

(1)爪膝蓋骨症候群、(2)NPLRD、(3)遺伝性ネフローゼ症候群、家族性 FSGS、(4)Collagenofibrotic Glomerulopathy 症例について、10年以内に診療経験が有るかどうかについて郵送によるアンケート調査を行った。対象は日本小児腎臓病学会代議員、日本腎臓学会評議員、日本腎臓病協会会員である。調査の際に *LMX1B* 関連腎症の説明(臨床経過、特徴的な電子顕微鏡所見等)を提示し、可能性のある症例のスクリーニングを行った。(1)爪膝蓋骨症候群および NPLRD、(2)巣状分節様糸球体硬化症および原因不明の糸球体腎炎、から *LMX1B* 関連腎症の可能性のある症例のスクリーニングを行う。

また、H26年度の腎病理診断標準化委員会および腎疾患データベース地域・領域中核ワーキングにおいて承認を受け、本邦の腎臓病総合レジストリー(J-RBR)からの該当症例の抽出を行った。対象は(1)爪膝蓋骨症候群、(2)NPLRD、(3)遺伝性ネフローゼ症候群、家族性FSGS、(4)Collagenofibrotic Glomerulopathyである。

一次調査で症例ありとされた医療機関に対し、主治医への二次調査を行った。臨床情報は、カルテより抽出を行った。主要観察項目は以下の通りである。

1. 対象症例の基本情報:診断名、生年月、性別、年齢、
2. 家族歴:爪膝蓋骨症候群の家族歴、腎疾患(検尿異常、腎機能障害、末期腎不全)の家族歴、血族婚の有無
3. 診断にまつわる状況:診断の契機となった症状、診断年齢
4. 爪、膝蓋骨、腸骨、肘関節異常の有無
5. 検査:レントゲン所見での特徴的な所見の有無、尿検査、腎機能検査(血清クレアチニン、eGFR、GFR 区分は CKD1: ≥ 90 , CKD2:60-89, CKD3:30-59, CKD4:15-30, CKD5:<15 それぞれ mL/min/1.73m²)
6. 遺伝子検査:同定された *LMX1B* 変異の有無、その他の遺伝子変異の有無
7. 腎生検所見(特に特徴的な基底膜変化の有無)
8. 経過中の状況:治療内容、維持透析の有無、腎移植の有無

2) *LMX1B* 遺伝子検査

患者および主治医より希望があった場合に *LMX1B* 遺伝子検査を実施した。

QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて末梢血からゲノム DNA を抽出した。*LMX1B*の全コード領域およびエクソンイントロン接合領域を PCR により増幅した。PCR 増幅に用いたプライマーと PCR の条件は既報の通りである(Sato U et al. *Pediatr Res* 2005)。PCR 産物を用いてダイレクトシーケンス法により塩基配列を同定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル」に従って行った。実態調査(疫学研究)、および遺伝子解析それぞれについて東京大学医学部倫理委員会の承認を得た。

遺伝子解析については各医療機関で*LMX1B*関連腎症疑いの患者を診断し、本人、家族の同意が得られた場合に、解析の同意を得た上で検体採取を行った。

C. 研究結果

1) 疾患の再分類

遺伝子検査の結果、NPLRD 症例の 1 例および家族性 FSGS1 家系 3 例に *LMX1B* R246Q 変異が同定された。R246Q 変異は一つの疾患概念にとらえるべきと判断され、疾患分類を以下のように再分類した。(1)爪膝蓋骨症候群(17 例)、(2) *LMX1B* R246 変異(4 例)、(3)NPLRD(*LMX1B* 変異無しあるいは遺伝子検査無し)(6 例)、(4) 遺伝性ネフローゼ症候群／家族性

FSGS(14 例)、(5)Collagenofibrotic Glomerulopathy(8 例)。

2) 各疾患群の実態

2-1 腎症を有する爪膝蓋骨症候群 (17 例)

海外より頻度が低い可能性や適切な診断がなされていない症例が存在する可能性が想定された。腎外症状が多彩であり、なおかつ軽微なものが存在するため、軽微な症状の症例では本症の診断がなされていない可能性がある。

2-2 *LMX1B* R246 変異による腎症(4 例)

爪膝蓋骨症候群と異なり、R246Q 変異症例はいずれも爪や関節所見が無い。1 例のみに爪膝蓋骨症候群腎症と同様の基底膜変化を認めている。腎組織所見で特徴的な基底膜変化が有る場合には本症を考慮することができるが、それ以外の場合には鑑別診断として本症を念頭に置くことは極めて難しい。網羅的遺伝子解析が今後臨床的に応用されるにつれ *LMX1B* 遺伝子の変異も明らかになると予想される。

2-3 *LMX1B* 変異を有しない NPLRD (6 例)

LMX1B 変異を有しないものの爪膝蓋骨症候群と同様の基底膜病変を有する症例が 5 例、また遺伝子検査がなされていない症例が 1 例あった。これらの症例はいずれの症例も腎機能低下を認めており、二例(同胞)で末期腎不全に至っていた。組織所見上は爪膝蓋骨症候群と区別することは困難である。若年で発症した二例で精神運動発達遅滞をみとめた。

2-4 遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS(14 例)

網羅的遺伝子解析を施行されているものは3例にとどまっていた。9例については全く遺伝子検査が行われていなかった。これらの患者における遺伝的な背景を明らかにするためには網羅的遺伝子解析の基盤整備が必要である。

2-5 Collagenofibrotic Glomerulopathy (8例)

2例は学童期の発症であった。高齢の症例も多いものの、腎機能が悪化する確率が高く、4例が維持透析を施行されていた。二例の小児期発症例では中枢神経症状を合併していた。爪膝蓋骨症候群の腎症との病理学的な鑑別については困難ではないと考えられた。

D. 考察

今回の調査により、*LMX1B* 関連腎症を診断するためには(1)検尿異常を呈する症例や、組織診断上 FSGS や微小変化とされる腎症を呈する患者において、爪や関節所見を正しく認識すること、(2)爪や関節の異常が有る際には *LMX1B* の異常の可能性を考慮して尿検査を施行すること、(3)遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS 症例においては *LMX1B* 遺伝子変異の可能性を考えて遺伝子検査を施行すること(あるいは網羅的遺伝子解析を実施する)が重要と考えられた。腎臓専門医、小児腎臓専門医のみではなく、一般小児科診療においてこの疾患の理解を広めることが重要と考えられる。また将来的な課題としては、特徴的な基底膜変化と病態の関連については依然不明な点が多いこと、また遺伝性腎疾患における網羅的遺伝子解析の環境整備に問題が有ること

などが課題として考えられた。また基底膜変化が存在するが *LMX1B* 遺伝子変異が見出されなかった NPLRD に属する患者については新たな疾患概念と考えられる可能性が示唆された。本調査では若年患者も多く含まれており、長期的な腎予後については不明な点が多いため、引き続き経過を追う必要がある。

E. 結論

LMX1B 関連腎症としては爪膝蓋骨症候群、R246 変異、NPLRD が挙げられるが、検尿異常のみを呈する軽微な腎症や家族性 FSGS などの症例においても *LMX1B* 変異を有する症例が存在する可能性が示唆される。蛋白尿を来す疾患は極めて多様な背景を有しているが、*LMX1B* による腎症の特徴や長期的な予後を明らかにするためには本疾患が広く認知され、症例の集積を行うことが必要である。

本研究を通して、本邦における *LMX1B* 関連腎症の疫学的側面及び遺伝子背景が明らかとなりつつあり、本邦の腎疾患患者の診断・診療の質の向上に貢献しうると考える。今後も本研究活動を通して、本疾患背景を明らかにし、*LMX1B* 関連腎症の診断基準の作成など、施策面にも積極的に反映させていきたいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1. Harita Y, Isojima T, Kitanak S, Ashida A, Hattori M. Clinical and genetic features of nail-patell-like renal disease. ISN (International Society of Nephrology) Forefronts Boston, Boston, September 11-14, 2014
2. 菅原 典子, 張田 豊, 磯島 豪, 徐 東博, 浅野 達雄, 西山 慶, 宮井 貴之, 神田 祥一郎, 石塚 喜世伸, 末廣 真美子, 久野 正貴, 近本 裕子, 秋岡 祐子, 北中 幸子, 服部 元史: Nail-patella-like renal disease が疑われる、急速に末期腎不全へ進行した巣状分節性糸球体硬化症の姉弟例 日本小児腎臓病学会 秋田 2014 年 6 月 5 日～7 日張田豊: 蛋白尿の成因 日本腎臓学会 横浜 2014 年 7 月 5 日
3. 張田豊: ネフローゼ症候群の遺伝子解析 遺伝医学研究会、東京、2014 年 7 月 25 日
4. 張田豊: 蛋白尿の分子生理学 近畿小児腎臓病研究会 大阪、2015 年 3 月 28 日

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患政策研究事業)
研究分担者報告書

LMX1B 関連腎症の実態調査と診断基準の確立

研究代表者	張田豊	東京大学小児科	講師
分担研究者	芦田明	大阪医科大学小児科	講師
分担研究者	服部元史	東京女子医科大学	教授

研究要旨：

LMX1B 遺伝子変異は爪形成不全、膝蓋骨の低形成、腸骨の角状突起、肘関節の異形成を 4 主徴とする爪膝蓋骨症候群(nail-patella 症候群)の原因となる。患者の約半数は蛋白尿や血尿を呈する腎症を発症、その一部は末期腎不全に進行し、腎予後が QOL に多大な影響を及ぼす。*LMX1B* 変異はまた nail-patella 症候群と同様の腎症を有するが爪、膝蓋骨、腸骨などの変化を伴わない孤発性腎症 (nail-patella-like renal disease(NPLRD))や家族性巣状糸球体硬化症(FSGS)の原因となる。このためこれまで FSGS や原因不明の腎不全と診断されている症例の中で、*LMX1B* 変異を原因とする症例が一定数いると考えられ、このような腎症全体を *LMX1B* 関連腎症という一つの疾患概念として定義し直す必要がある。

本研究では *LMX1B* 関連腎症の本邦で初めての実態把握を行った。その結果母集団を (1)爪膝蓋骨症候群、(2)*LMX1B*R246 変異、(3)NPLRD(*LMX1B* 変異無しあるいは遺伝子検査無し)、(4) 遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS、(5)Collagenofibrotic Glomerulopathy の病型に分類し、それぞれについて解析を行った。本研究により *LMX1B* 腎症の臨床的特徴を特定し、原因不明の腎症患者のなかから本症を診断する際に重要な情報が得られた。

A. 研究目的

1, 遺伝性ネフローゼ症候群／家族性巣状糸球体硬化症の解析から明らかになった遺伝的背景により生じる蛋白尿

我が国の慢性透析患者数は増加し続けており、そのうち巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)は腎機能が進行する代表的な糸球体疾患である。また FSGS のうち、遺伝性の要因が明らかになっているもの、

あるいは家族性があるもの遺伝性 FSGS とよび、小児期あるいは成人期にステロイド抵抗性ネフローゼ症候群として発症する人が多い(Rood et al., 2012)。その多くは糸球体上皮細胞および基底膜の機能異常を原因として発症する。また最近では必ずしも病理像が FSGS を呈さないネフローゼ症候群においても遺伝的な原因が明らかになる場合も報告されている

(遺伝性ネフローゼ症候群)。先天性ネフローゼ症候群、遺伝性 FSGS の原因遺伝子を表1に示す。これらは発症年齢により、先天性ネフローゼ症候群として生後早期に症状の出るもの (*NPHS1*, *NPHS2*, *NPHS3*, *CD2AP*, *MYO1E*, *PTPRO*)、常染色体優性遺伝の形式をとる成人発症のもの (*TRPC6*, *ACTN4*, *INF2*)、他臓器症状を伴うもの (*WT1*, *LAMB2*, *LMX1B*, *MYH9*)、と三つに大きく分類する事ができる。

遺伝性ネフローゼ症候群や家族性 FSGS のうち、腎外症状が診断に大きく寄与する場合がある。例えば、*WT1* 遺伝子のミスセンス変異はびまん性メサンギウム硬化(DMS)、Wilms 腫瘍、性分化異常を三徴候とする Denys-Drash 症候群(DDS)を来す。一方で *WT1* 遺伝子のスプライドナー部位の変異は DDS より軽症で遅発性の FSGS を来し Fraiser 症候群と呼ばれる。女性の *WT1* 変異患者では性腺腫瘍を合併しやすい(Chernin et al., 2010)。またラミニン β2 遺伝子(*LAMB2*)の先天的な欠損によりびまん性メサンギウム硬化症および、先天性な蛋白尿、眼の異常や精神発達遅滞(Pierson 症候群)が生じる。同様に腎外症状を有する遺伝的ネフローゼ症候群/FSGS を来す疾患として爪膝蓋骨症候群がある。

2, 爪膝蓋骨症候群(nail-patella 症候群)

爪膝蓋骨症候群(nail-patella 症候群, MIM161200)は爪形成不全、膝蓋骨の低形成あるいは無形成、腸骨の角状突起(ilial horn)、肘関節の異形成を4主徴とする常染色体性優性遺伝性疾患である。

爪膝蓋骨症候群の症状は多彩であるが(Sweeney et al., 2003)、爪の異形成はほぼ100%に認められ、程度は完全欠損から低形成まで様々である。三角状の爪半月が特徴である。爪の異常は生下時から認められることも多いが軽度であると気づかれにくい。膝蓋骨の形成不全は93%に認められ、理学所見上膝関節屈曲時の陥凹が認められる。機能的に問題となることは少ない。肘関節の異常も9割近くに認められ、肘関節の伸展、回内、回外が制限される。腸骨の角状突起は7-8割に認められ、大きいと外表からも触知される。しばしば腎症を発症し、一部は末期腎不全に進行するため、本症候群のQOLに大きく影響する。

1998年に爪膝蓋骨症候群の原因遺伝子として *LMX1B* が同定された(Dreyer et al., 1998)。*LMX1B* は染色体9q34に位置する。*Lmx1b* 遺伝子ノックアウトマウスのホモ接合体欠失個体で爪の低形成、膝蓋骨の欠損、腎の異常などの類似の症状を呈することが明らかになっている。

LMX1B はホメオドメインと一対のLIMドメインを持つ、LIMホメオドメイン蛋白の一つである。一般的にLIMホメオドメイン蛋白は様々な器官形成やニューロンの分化などに関与する転写因子である。ホメオドメインはDNAと結合し、LIMドメインはタンパク質間相互作用に関与する。ヒト *LMX1B* は372個(選択的スプライシングにより379個)のアミノ酸よりなり、そのmRNAは胎児、成人とも腎臓に強く発現している。さらに胎児期には *LMX1B* は膝蓋骨や手指の背側組織、特に母指側に強く見られ、爪膝蓋骨症候

群の表現型の部位と一致する。

*LMX1B*には今までに130種類以上の変異が同定されており、すべてヘテロ接合体変異で発症する(Bongers et al., 2008; Sato et al., 2005)。親からの遺伝あるいは *de novo* 変異が原因である。シーケンス解析では約20%の患者で変異が認められず、MLPA法などによりそのうち一部には遺伝子の部分的な欠失が報告されている。しかし、プロモーター領域の変異や関連する別の遺伝子に起因する可能性が示唆される症例も存在する。すべての患者に *LMX1B* 遺伝子異常が認められる訳ではないため、異常がない場合でも診断を除外することはできない。

3, 爪膝蓋骨症候群(Nail-Patella 症候群)における腎症について

爪膝蓋骨症候群の約半数(報告により25-62%)に腎症を合併する。通常は無症候性の蛋白尿、稀に血尿が見られるが、時に高度の蛋白尿により、ネフローゼ症候群を呈することもある。2-15%の症例で腎機能が進行性に悪化し末期腎不全になったと報告されている(Bongers et al., 2002)。小児期に腎不全に至った症例も報告されている。

腎組織所見としては、光学顕微鏡レベルでは腎不全の程度に応じた所見であり、FSGS、増殖性糸球体腎炎など多様で特徴的な所見がない(Bongers et al., 2002)。しかし電子顕微鏡で不規則に肥厚した糸球体基底膜、その緻密層に認められる虫食い像(moth-eaten appearance)、タンニン酸染色やリンタングステン酸染色などの特殊染色により基底膜とメサンギウム基

質にコラーゲン線維束が認められる(図1)。また免疫染色では沈着するコラーゲン線維はIII型コラーゲンである。典型的な腎組織所見を図に示す。

5, Nail-Patella-Like Renal Disease (NPLRD)

爪膝蓋骨症候群と同様の腎症を有するが爪、膝蓋骨、腸骨などの変化を伴わない孤発性腎症が存在し、nail-patella-like renal disease(NPLRD)と呼ばれている(MIM 256020)。これらの症例では蛋白尿などの検尿所見、ネフローゼ症候群、時には腎不全を呈し、特に電子顕微鏡所見として糸球体基底膜の変化が認められるものの、爪、膝蓋骨、腸骨などの腎外症状を有しない(Bongers et al., 2002; Salcedo, 1984; Zuppan et al., 2003)。私達は本邦の典型的なNPLRD症例において *LMX1B* R246Q 変異を同定した(Isojima et al., 2014)。この変異はDNA結合部位の変異であり、*LMX1B*の転写活性を部分的に阻害する。この症例では腎外症状は全くないものの糸球体基底膜の典型的な虫食い像が見られること、特殊染色により基底膜にIII型コラーゲンの沈着を認めたことがNPLRDの診断の決め手となった(Isojima et al., 2014)。

6, *LMX1B* R246 変異は腎外症状を呈さず、腎症のみを起す

2013年にフランスのグループは家族性FSGS症例に対して網羅的遺伝子解析を行い、*LMX1B*のR246Q(2家系)およびR246P(1家系)変異を報告した(Boyer et al., 2013)。一部の症例では末期腎不全に

至っていた。R246Q 変異は私たちが NPLRD の原因として報告したのと全く同じ変異である。これらの家系では爪や膝蓋骨などの腎外症状を有していないことは共通していたが、私たちの症例では認められた爪膝蓋骨症候群の腎症に特徴的な基底膜の変化がフランスからの 3 家系の報告では一切認められなかった。これらの事実から R246 変異は爪や骨格系に変化をおこさず孤発性腎症の原因となりうるということが明らかになった。また特徴的な基底膜変化については海外の症例において、観察された糸球体のみに変化がなかった可能性もあるが、必ずしも基底膜変化が *LMX1B* による腎症の発症に必須ではない可能性も示唆される。最近 R249Q 変異が家族性の腎機能不全家系の遺伝子解析でも見いだされており、その家系においても爪や骨格系に変化は認められなかった(Edwards et al., 2015)。

これらの結果からこれまで FSGS や原因不明の腎不全と診断されている症例の中で、*LMX1B* 変異を原因とする症例が一定数いることが想定される。腎症を中心としてみると、腎外症状を有しているかどうかに関わらず、このような腎症全体を *LMX1B* 関連腎症という一つの疾患概念として定義し直し、その発症頻度や予後調査を行う必要があると考えられる(Isojima et al., 2014; Lemley, 2014)。爪膝蓋骨症候群について本邦での大規模な調査は行われておらず、とくに腎外症状がない場合あるいは軽度な場合に見逃されている可能性が高いと考えられる。

7, 糸球体にコラーゲン線維の沈着する疾

患 —Collagenofibrotic Glomerulopathy—

爪膝蓋骨症候群の腎症と病理検査上、鑑別が必要な疾患として Collagenofibrotic Glomerulopathy がある。爪、膝、肘などの関節所見は有しないが、糸球体に III 型 Collagen 繊維の沈着を認める点が類似している。しかし Collagenofibrotic Glomerulopathy ではコラーゲンの沈着はメサンギウム領域から糸球体毛細血管基底膜内皮下であり、爪膝蓋骨症候群における基底膜内を首座としない点が異なる。血中の procollagen type III peptide が陽性になるなどの所見も診断には有用である(Alchi et al., 2007)。本症は本邦において頻度が高いとされるが、大規模な調査はこれまで行われていない。

8, 研究の目的、概要

本研究は全国調査により広範な情報を統合し、*LMX1B* を原因とする腎疾患(*LMX1B* 関連腎症)の全体像を明らかにし、さらに可能な場合には原因遺伝子解析をあわせて行うことにより、実態に基づいた診断基準を作成することを目的とした。

B. 研究方法

倫理面への配慮

実態調査については、「疫学研究に関する倫理指針」「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル」に従って行った。本研究の実施について、東京大学医学部倫理

委員会の承認を得た。一次調査は患者数の把握のみで個人情報取得しない。調査は診療録の後ろ向き調査のみであり、二次調査においても氏名・住所・IDなどの個人情報は取得せず、対応表は各施設で保管した。

一次調査 -アンケート調査-

1)爪膝蓋骨症候群、(2)NPLRD、(3)遺伝性ネフローゼ症候群、家族性 FSGS、(4)Collagenofibrotic Glomerulopathy 症例について、10年以内に診療経験が有るかどうかについて郵送によるアンケート調査を行った。対象は日本小児腎臓病学会代議員、日本腎臓学会評議員、日本腎病理協会会員である。調査の際に *LMX1B* 関連腎症の説明(臨床経過、特徴的な電子顕微鏡所見等)を提示し、可能性のある症例のスクリーニングを行った。

一次調査 -腎臓病総合レジストリー

(Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR))-

H26年度の腎病理診断標準化委員会および腎疾患データベース地域・領域中核ワーキングにおいて承認を受け、本邦の腎臓病総合レジストリー(J-RBR)からの該当症例の抽出を行った。対象は(1)爪膝蓋骨症候群、(2)NPLRD、(3)遺伝性ネフローゼ症候群、家族性FSGS、(4)Collagenofibrotic Glomerulopathyである。

二次調査

一次調査で症例ありとされた医療機関に対し、主治医への二次調査を行った。臨床情報は、カルテより抽出を行った。

主要観察項目は以下の通りである。

1. 対象症例の基本情報:診断名、生年月、性別、年齢、
2. 家族歴:爪膝蓋骨症候群の家族歴、腎疾患(検尿異常、腎機能障害、末期腎不全)の家族歴、血族婚の有無
3. 診断にまつわる状況:診断の契機となった症状、診断年齢
4. 爪、膝蓋骨、腸骨、肘関節異常の有無
5. 検査:レントゲン所見での特徴的な所見の有無、尿検査、腎機能検査(血清クレアチニン、eGFR、GFR 区分は CKD1:≥90, CKD2:60-89, CKD3:30-59, CKD4:15-30, CKD5:<15 それぞれ mL/min/1.73m²)
6. 遺伝子検査:同定された *LMX1B* 変異の有無、その他の遺伝子変異の有無
7. 腎生検所見(特に特徴的な基底膜変化の有無)
8. 経過中の状況:治療内容、維持透析の有無、腎移植の有無

C. 研究結果

一次調査結果

腎臓病学会代議員、日本腎臓学会評議員、日本腎病理協会会員への一次調査を平成 26 年 12 月に行った。合計 398 医療機関へのアンケートのうち、回答率は 46.0%であった。腎疾患総合レジストリーにおける爪膝蓋骨症候群登録症例、遺伝性ネフローゼ症候群症例、Collagenofibrotic Glomerulopathy 症例についても二次調査の対象とした。二次調査の対象は(1)爪膝蓋骨症候群 19 例、(2)NPLRD 6 例、(3)遺伝性ネフローゼ症候群/家族性 FSGS 22 例、(4)Collagenofibrotic Glomerulopathy 10 例、合計 57 例であっ

た。

二次調査結果

二次調査の回答率は 84.2%であった。内訳は(1)爪膝蓋骨症候群 17 例、(2)NPLRD 6 例、(3)遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS 17 例、(4)Collagenofibrotic Glomerulopathy 8 例である。

疾患の再分類について

遺伝子検査の結果、NPLRD 症例の 1 例および家族性 FSGS1 家系 3 例に *LMX1B*R246Q 変異が同定された。R246Q 変異は腎外症状を有しない変異であるが、基底膜変化の有無に限らず、一つの疾患概念ととらえるべきと判断された。そのため疾患分類を(1)爪膝蓋骨症候群、(2)*LMX1B*R246 変異、(3)NPLRD(*LMX1B* 変異無しあるいは遺伝子検査無し)、(4) 遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS、(5)Collagenofibrotic Glomerulopathy と再分類(図 3)し、以下の検討を行った。

爪膝蓋骨症候群

腎症を有する爪膝蓋骨症候群(N1-N17)の臨床情報を表 2 に示す。

発症時の年齢の中央値 6 歳であり、男性 11 名、女性 6 名であった。

家族歴の無い症例(発端者を含む)が 7 例、残りの 10 例は家族歴が存在した。

家族歴の無い症例(発端者を含む)では発症時年齢は全例 4 歳以上、診断時年齢は全例 8 歳以上であったが、家族歴のある症例では発症時年齢は 3 歳以下が

70%(7/10)、診断時年齢 5 歳以下が 60%(6/10)と、家族歴の無い症例で年齢がより高い傾向にあった。

家族歴が無い症例(発端者を含む)の診断の契機が特徴的であった。症例 N1 は 12 歳児から FSGS として治療を受けていたが、爪の変化や膝蓋骨欠損などから 24 歳になって爪膝蓋骨症候群の診断がなされた。症例 N3 は出生後から上肢の可動性が悪く、リハビリを受けていたが、12 歳児の学校検尿での異常を契機に腎症が疑われ診断されている。症例 N5 も一ヶ月検診で肘の伸展不良が指摘されていたが、その後の学校検尿で初めて尿所見異常を指摘され腎症および爪膝蓋骨症候群の診断に至っている。N7 は小学校で蛋白尿を指摘されており、中学に入って肘関節伸展異常を指摘され、診断に至っている。

腎生検は 12 例で行われており、基底膜の変化(虫食い像あるいは不規則な肥厚)が認められたのが 8 例であった。残りの 4 例は FSGS、微小変化、Focal glomerular obsolescence と診断されており、病理所見だけでは必ずしも爪膝蓋骨症候群を示唆するものではなかった。

治療としては免疫抑制治療(ステロイド、シクロフォスファミド)を受けた症例が 1 例、それ以外の症例では免疫抑制治療はされておらず、6 例でアンギオテンシン阻害薬等が用いられていた。その他の 10 例では無治療で経過観察されていた。

報告の有った 17 例のうち、末期腎不全に至った症例(CKD5)が 2 例、高度腎機能低下症例(CKD4)が 2 例あった。

LMX1B R246Q 変異症例

LMX1B R246Q 変異が同定された症例が 4 症例あった(表 3、R1-R4)。

血尿蛋白尿で発見され、腎病理組織所見により特徴的な基底膜変化が見いだされたために LMX1B 遺伝子検査を施行され診断された NPLRD 症例が 1 例(R1)、また家族性 FSGS として遺伝子検査を施行されて変異が明らかとなった家族例(1 家系 3 症例, R2-4)があった(表)。この家系の発端者は R3 と R4 が同胞、R2 はその母方いとこである。

R246Q 変異が同定された症例の診断年齢は 1-11 歳と小児期であり、全員小児期に血尿蛋白尿として発症している点が共通していた。また全員が女性である。

腎機能異常は現在までに指摘されていない。全員爪、膝蓋骨、腸骨、肘関節などの腎外症状はなく、その他中枢神経等の合併症も有していない。

特徴的な基底膜変化が診断につながった R1 と対照的に、家族性 FSGS R2-4 のうち腎生検が行われた R2 では基底膜の部分的な菲薄化が認められたものの、特徴的な基底膜変化(虫食い像など)は認められなかった。

NPLRD (LMX1B 変異無しあるいは遺伝子検査無し)

特徴的な基底膜変化を有するものの LMX1B 遺伝子変異が同定されていない症例をまとめた(表 4、L1-L6)。遺伝子検査は 5 症例について行われ、検討した限り 4 例で LMX1B 変異を認めなかった。一症例については遺伝子検査が施行されていない。

これらの症例はいずれも腎病理学的に部分的では有るものの爪膝蓋骨症候群と同様の基底膜変化(虫食い像)を有していた。特徴的な 3 症例の腎組織所見を図に示す。虫食い像が典型的であり、症例 1 ではタンニン酸染色で明らかな線維状沈着が基底膜緻密層に確認される。

5 症例のうち、末期腎不全に至った症例が 2 例、のこりの 3 例においても腎機能障害を有している。

5 症例のうち、2 例で精神運動発達遅滞の合併を有していた。

遺伝性ネフローゼ症候群/家族性 FSGS

LMX1B R246Q 変異の見つかった症例を除いた 14 例を表 5 に示す(F1-F14)。これらの症例のうち、遺伝子検査(WT1, NPHS1, NPHS2)が施行されたのは 5 例であり、うち 3 例は全エクソン解析により既報の原因遺伝子では原因が同定されなかった。

末期腎不全に至った症例が 4 例あった。

腎生検を施行された症例 12 例の内、FSGS の診断が 7 例、微小変化が 4 例であった。1 例において基底膜の不規則な肥厚が指摘されている。

Collagenofibrotic Glomerulopathy

二次調査で回答の有った 8 例(表 6、C1-C8)のうち、5 例が末期腎不全、1 例が高度腎機能障害(CKD4)を有していた。小児期に診断された二例については自閉症、選択性場面緘黙、および精神運動発達遅滞といった中枢神経症状を有していた。

報告された 8 例についてはコラーゲン線維の沈着が基底膜の緻密層を中心とし

たものではなく、メサンギウム領域や内皮下であったため、NPLRD と診断される症例は存在せず、*LMX1B* 遺伝子検査が施行された症例はなかった。8 例以外に Collagenofibrotic Glomerulopathy か NPLRD か明らかではない症例も二次調査 1 例で報告されたが、Collagenofibrotic Glomerulopathy で特徴的な血清学的所見が乏しく、また腎病理組織所見の再検討によって、いずれの疾患にも当てはまらないことが判明したため今回の調査の対象外とした。

各疾患分類における年齢及び GFR 区分

図 7 に年齢と GFR 区分の分布図を示す。一症例について、診断時または発症時における GFR 区分と、腎代替療法に至った時点あるいは最終観察時点の合計二点での GFR 区分を解析した。縦軸が GFR 区分、横軸が年齢を表す。

D. 考察

我が国における腎症を有する爪膝蓋骨症候群

今回我が国で初めて爪膝蓋骨症候群についての調査を行った。腎症を有する爪膝蓋骨症候群症例として、17 例の報告があった。

爪膝蓋骨症候群の発症頻度は 5 万人に 1 人とされ、種族差はないとされている。また腎症を発症する割合は 25-62%とされており、腎症を呈する爪膝蓋骨症候群は 20 万人に 1 人程度、すなわち我が国では 600 人程度いることが想定された。調査対象が全医療機関ではないものの、腎

疾患診療においては代表的な医療機関を網羅した調査であることから、海外で報告された疫学的なデータより頻度が低い可能性、および適切な診断がなされていない症例が存在する可能性が想定される。本調査でも明らかになったように本症候群は腎外症状が多彩であり、なおかつ軽微なものが存在する。肘関節の伸展異常などで整形外科等で診療を受けていた症例もあるが、例えば三角状の爪半月のみを呈する場合には異常所見とは認識されず、本症の診断がなされていない可能性も高い。実際に学校検尿での異常指摘の後、何年も経ってから関節所見を指摘される例や、爪、膝蓋骨、肘関節などの症状がそろっているにもかかわらず小児科で腎症について FSGS として診療を受けていた症例も存在する。小児領域あるいは腎臓内科領域において本症候群の知識が十分に認知されているとはいいがたい。正しい診断のためには本症を念頭に置いて尿所見を有する患者の家族歴で本症を聴取すること、また爪や関節所見の有無について丁寧に診察することが必要である。関節伸展異常は早期から診断されやすいが、爪の軽微な異常や膝蓋骨の有無は積極的に診断する姿勢が無いと見逃しうることに注意すべきである。

腎予後に関してはこれまでの報告通り症例により様々であり、年齢が高くても腎機能が保たれている症例が存在する一方で 10 代から腎機能不全に至る症例も存在する(図 7)。なお過去の報告で腎症を有する症例では女性の方が罹患率が高いという報告があったが、今回の調査では精査は明らかではなかった。

LMX1B R246 変異による腎症

爪や関節所見が無く、血尿蛋白尿のみを呈した症例や、家族性 FSGS とされた症例の中に L246Q 変異が見いだされた。腎組織所見で特徴的な基底膜変化が有る場合には本症を考慮することができるが、それ以外の場合には鑑別診断として本症を念頭に置くことは極めて難しい。実際に今回の家族例では網羅的遺伝子解析により *LMX1B* 遺伝子変異が同定されている。エクソーム解析が身近になりつつ有る現在、臨床的な遺伝子診断の手法が大きく変わろうとしており、遺伝性が疑われる症例では網羅的遺伝子解析をまず第一に行うことにより *LMX1B* 遺伝子の変異も明らかになると予想される。

LMX1B R246 変異については海外の 3 家系において同様の変異が報告されている。腎組織診断では FSGS あるいは微小変化であり、爪膝蓋骨症候群に特徴的な基底膜変化は認められないという(Boyer et al., 2013)。今回の調査においても FSGS と診断された例の中から R246Q 変異が同定されている。これらのことから、R246 変異では腎外症状を呈さず、組織学的には特徴的な基底膜変化を来さないことが多いという事が明らかになった。また、基底膜変化が無くても腎機能低下を来していることから、基底膜変化は二次的なものであり、腎症の増悪の本質ではない可能性が示唆される。またこの変異について海外の報告では 20 代から 70 代で診断され、30 代以降から末期腎不全へ進行することが報告されている。本邦での 4 例はいずれも小児例であり、診断年

齢は 1 歳から 11 歳までと年少である(図 7)。これは本邦では学校検尿や三歳児検尿が整備されていることも影響していると考えられる。いずれの症例も現在では血尿蛋白尿を認めるのみであり、予後については今後の長期の経過観察が必要である。

また R246 変異が明らかになった 4 例全例が女性であったが、海外の文献では R246 変異に関して性差は報告されていない。

LMX1B 変異を有しない NPLRD

LMX1B 変異を有しないものの爪膝蓋骨症候群と同様の基底膜病変を有する症例が 5 例、また遺伝子検査がなされていない症例が 1 例あった。これらの症例で特筆すべきことはいずれの症例も腎機能低下を認めており、二例(同胞、L1, L2)で末期腎不全に至っていることである。

図に示すように、組織所見上は爪膝蓋骨症候群と区別することは困難である。上で述べた通り、爪膝蓋骨症候群や R246 変異の腎症において基底膜の変化が病態において二次的なものである可能性をふまえると、*LMX1B* 変異を有しない NPLRD 症例では爪膝蓋骨症候群と同様の何らかのメカニズムで基底膜内にコラーゲン線維の沈着を生じていると考えられる。

また若年で発症した二例で精神運動発達遅滞をみとめている事も特筆すべきである。これは爪膝蓋骨症候群では一般に中枢神経症状を認めないためであり、何らかの他の原因による共通の症候群である可能性も示唆される。

LMX1B 変異を有しない NPLRD が同一の疾患群であるのかは不明である。またこれらの症例の中にダイレクトシーケンスでは検出できない *LMX1B* の部分欠損などの異常がある症例を含んでいるのかについては MLPA などを用いた今後の検討が必要である。

遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS の遺伝子解析の現状

本邦での遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS について、それぞれの医療機関でのデータの公表は有るものの、まとまった調査はこれまで行われておらず、その頻度は不明である。今回の調査では遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS の中で *LMX1B* 変異の可能性を含む症例を見いだせるかどうかという観点から、既知の遺伝子変異が明らかでない遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS を調査対象とした。その結果一次調査では 22 例の回答があった。

二次調査を施行した例のうち、3 例は網羅的遺伝子解析により *LMX1B*R246Q 変異が見いだされ、残りの 14 例については網羅的遺伝子解析を施行されているものは 3 例にとどまっていた。9 例については全く遺伝子検査が行われていなかった。網羅的遺伝子検査が広まる中で、米国および欧米では腎疾患の総合レジストリー制度が進んでいる。特に臨床データとあわせて血液や尿、さらには網羅的遺伝子解析結果も含めたレジストリーが構築されており、大規模な遺伝子解析の結果が次々と報告されている。例えば NEPTUNE(The Nephrotic Syndrome

Study Network, <https://www.rarediseasesnetwork.org/NEPTUNE/professional/studynetwork.htm>) などでは 450 人以上のネフローゼ症候群患者の遺伝子及び臨床情報を解析しており、次々と遺伝的な新規の知見を発表している(Gadegbeku et al., 2013)。また希少な腎疾患患者遺伝子を国際的に集積して解析することによって新たな原因遺伝子の同定に成功する例が相次いでいる(Devuyst et al., 2014; Hildebrandt, 2010)。本邦ではこれに代わるような統合的遺伝子解析システムは現在存在しておらず、臨床現場としては網羅的遺伝子解析へのハードルが高い。依然として遺伝性ネフローゼ症候群／家族性 FSGS の解析が諸外国に比べて遅れている現状が改めて明らかになった。これらの患者における遺伝的な背景を明らかにするためには網羅的遺伝子解析技術の基盤整備が必要である。

本邦の Collagenofibrotic Glomerulopathy

Collagenofibrotic Glomerulopathy について実態調査はこれまで行われていなかった。本邦からこれまで本症の症例報告はあったが、10 年間での診療経験とした本研究では 10 例(二次調査では 8 例)の報告となった。以前の総論でも挙げられているように小児例の発症も珍しくはなく、今回の調査でも 8 例中 2 例は学童期の発症であった。高齢の症例も多いものの、腎機能が悪化する確率が高く、4 例が維持透析を施行されていた(表 6、図 7)。

二例の小児期発症例では中枢神経症状

を合併していたが、これまでの報告では腎外症状は報告されていない。

爪膝蓋骨症候群の腎症との鑑別については、腎組織所見上基底膜へのコラーゲン線維の沈着が主ではないことが明らかであり、また爪や関節所見が無いため、鑑別は困難ではないと考えられた。

【引用文献】

Alchi, B., Nishi, S., Narita, I., and Gejyo, F.

(2007). Collagenofibrotic glomerulopathy: clinicopathologic overview of a rare glomerular disease. *Am J Kidney Dis* 49, 499-506.

Bongers, E.M., de Wijs, I.J., Marcelis, C., Hoefsloot, L.H., and Knoers, N.V. (2008).

Identification of entire LMX1B gene deletions in nail patella syndrome: evidence for haploinsufficiency as the main pathogenic mechanism underlying dominant inheritance in man. *Eur J Hum Genet* 16, 1240-1244.

Bongers, E.M., Gubler, M.C., and Knoers, N.V. (2002). Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings. *Pediatr Nephrol* 17, 703-712.

Boyer, O., Woerner, S., Yang, F., Oakeley, E.J., Linghu, B., Gribouval, O., Tete, M.J., Duca, J.S., Klickstein, L., Damask, A.J., *et al.* (2013).

LMX1B mutations cause hereditary FSGS without extrarenal involvement. *J Am Soc Nephrol* 24, 1216-1222.

Chernin, G., Vega-Warner, V., Schoeb, D.S., Heeringa, S.F., Ovunc, B., Saisawat, P., Cleper, R., Ozaltin, F., and Hildebrandt, F. (2010).

Genotype/phenotype correlation in nephrotic

syndrome caused by WT1 mutations. *Clin J Am Soc Nephrol* 5, 1655-1662.

Devuyst, O., Knoers, N.V., Remuzzi, G., and Schaefer, F. (2014). Rare inherited kidney diseases: challenges, opportunities, and perspectives. *Lancet* 383, 1844-1859.

Dreyer, S.D., Zhou, G., Baldini, A., Winterpacht, A., Zabel, B., Cole, W., Johnson, R.L., and Lee, B. (1998). Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet* 19, 47-50.

Edwards, N., Rice, S.J., Raman, S., Hynes, A.M., Srivastava, S., Moore, I., Al-Hamed, M., Xu, Y., Santibanez-Koref, M., Thwaites, D.T., *et al.*

(2015). A novel LMX1B mutation in a family with end-stage renal disease of 'unknown cause'. *Clin Kidney J* 8, 113-119.

Gadegbeku, C.A., Gipson, D.S., Holzman, L.B., Ojo, A.O., Song, P.X., Barisoni, L., Sampson, M.G., Kopp, J.B., Lemley, K.V., Nelson, P.J., *et al.* (2013). Design of the Nephrotic Syndrome Study Network (NEPTUNE) to evaluate primary glomerular nephropathy by a multidisciplinary approach. *Kidney Int* 83, 749-756.

Hildebrandt, F. (2010). Genetic kidney diseases. *Lancet* 375, 1287-1295.

Isojima, T., Harita, Y., Furuyama, M., Sugawara, N., Ishizuka, K., Horita, S., Kajiho, Y., Miura, K., Igarashi, T., Hattori, M., and Kitanaka, S. (2014).

LMX1B mutation with residual transcriptional activity as a cause of isolated glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 29, 81-88.

Lemley, K.V. (2014). LMX1B mutations with nails and kneecaps: a new paradigm? *Nephrol Dial Transplant* 29, 9-12.