

ネイルパテラ症候群の遺伝子型・表現型相関に関する研究

研究分担者 張田 豊 東京大学・医学部附属病院・准教授

研究要旨

【研究目的】

ネイルパテラ症候群（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。*LMX1B*の遺伝子異常が原因である。

ネイルパテラ症候群患者の約半数は蛋白尿や血尿を呈する腎症を発症し，一部は末期腎不全に進行する。腎予後がQOLに多大な影響を及ぼすが，腎症の進展と関連する因子については不明な点が多い。本邦のネイルパテラ症候群症例について，腎機能高度低下あるいは末期腎不全となる症例の病理像および遺伝子変異の特徴を検討した。

【研究方法】

主治医より提供された病理標本または画像データから病理像を検討した。また*LMX1B*遺伝子の変異解析を行ない，同定された変異についてレポーターアッセイを用いた機能解析を実施した。

【結果】

本症候群腎症に特徴的な基底膜変化は腎機能低下と直接の相関を認めなかった。腎症を呈したネイルパテラ症候群患者に新規変異を含む複数の変異を同定した。特に腎機能低下症例で見られた変異はホメオドメインの一部分に集簇していた。これらの変異は転写活性を著明に低下させたが，ドミナントネガティブ効果は認めなかった。

【考察】

ホメオドメイン部位の変異によるハプロ不全が腎症重症化の原因であると考えられた。

【結論】

中等度以上の蛋白尿を呈する症例で，特にホメオドメインの変異が見られる場合には腎機能の低下に注意が必要である。

A. 研究目的

ネイルパテラ症候群（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。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*の遺伝子異常である。

ネイルパテラ症候群患者の約半数は蛋白尿や血尿を呈する腎症を発症し，その一部は末期腎不全に進行する。腎不全に至る症例の割合は高くはないものの，腎予後は本症候群のQOLに多大な影響を及ぼす。腎機能が高度に低下症例あるいは腎不全症例の報告は限られており，現時点ではどのような因子が腎症発症と関係するかについては不明な点が多い。

本研究では本邦のネイルパテラ症候群症例について，腎機能高度低下あるいは末期腎不全となる症例の病理像および遺伝子変異の特徴を解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) ネイルパテラ症候群腎症の臨床病理学的解析

H26-27年度 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)およびその後研究班で把握した患者について，主治医への二次調査の解析を行った。臨床情報は，カルテより抽出を行った。

2) *LMX1B* 遺伝子変異解析

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. *PediatrRes* 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、「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ネイルパテラ症候群および *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。

### 3) Western Blot および *LMX1B* レポーターアッセイ

野生型 *LMX1B* 発現プラスミド、shPan1 発現プラスミド(shPan1-BAT14)、ルシフェラーゼレポータープラスミド(5xFar/FLAT-pFOXluc1.prl)は既報(German MS. et al. Genes Dev, 1992 pg. 2165-2176)と同じものを使用した。

培養細胞へのトランスフェクションおよび Western blot は Udagawa et al. Sci Rep 8:2351, 2018 と同様の方法を用いて行った。またレポーターアッセイは既報の条件の通り実施した(Isojima et al. Nephrol Dial Transplant 29:81-88, 2014)。

## C. 研究結果

### 1) ネイルパテラ症候群腎症の病理像の解析

当研究班で把握した24症例の腎症を有するネイルパテラ症候群のうち、14例に腎生検が行われていた。そのうち病理像を入手することができた8例について検討した(図1)。

8例のうち、2例は高度腎機能低下(CKD stage4)、1例は末期腎不全に至った症例であった。そのほかの5症例は蛋白尿あるいは血尿蛋白尿を呈していたが、腎機能は保たれていた。

腎機能が正常な5例では1例を除き光学顕微鏡初見は正常であった。1例は52歳で初めて腎生検を受けた患者であり、一部の糸球体に硬化性変化を認められたが、正常糸球体が主体であった。この症例では、電顕所見としては本症候群に特徴的な基底膜の虫食い像、繊維状構造物の沈着を認めた(図1 A, B)。

高度腎機能低下(CKD stage4)の2例と末期腎不全に至った1症例においても電顕所見では基底膜の変化は腎機能正常な本症候群症例と同様に生じていた(図2 C, D)。またこれらの症例では中等度以上の蛋白尿が持続していた。

若年(15歳時)で末期腎不全に進行した症例の11歳時点では一部の糸球体で全節性硬化病変を認めた(図2 E, F)。

### 2) 重症腎症合併ネイルパテラ症候群の遺伝的要因の解析

24症例のうち、同意が得られた14症例に *LMX1B* 遺伝子解析を行なった。

1例では新規変異(c.783\_784insC, p.V626fs)、10例で既知のミスセンス変異(p.R223Q, p.V265L, p.V265F, p.E57X)あるいは既知のスプライス部位の変異(c.819+1G>A)を同定した(図2)。24歳で末期腎不全となった1例では特徴的なネイルパテラ症候群の腎外症状(爪低形成、肘関節拘縮、腸骨突起)を呈していたものの、サンガー法では *LMX1B* 遺伝子の異常を検出しなかった。

### 3) 重症腎症合併ネイルパテラ症候群の原因となる *LMX1B* 変異の機能解析

新規変異を含む高度腎機能低下症例および末期腎不全症例でみられた変異について、転写活性への影響を検討した(図3)。その結果、これらのすべての変異で転写活性が著明に低下することが明らかになった。一方で野生型と変異体の共発現は野生型による転写活性の増強を抑制しなかった。このことから特に末期腎不全を呈するような重症な表現型となる変異であってもドミナントネガティブ効果ではなく、ハプロ不全が発症に関与することが明らかになった。

## D. 考察

ネイルパテラ症候群合併する腎症の中でも特に腎機能が高度に低下する症例についてその臨床病理学的あるいは遺伝的な解析についてはまとまった報告が存在しない。これは本症候群において腎症を合併する比率が低く、その集積が困難なためと考えられる。本研究では本邦において腎症を合併するネイルパテラ症候群患者の集積により、腎機能の低下と関連する病理学的また遺伝学的要因について解析を行った。

病理学的には光顕レベルでは明らかな硬化病変を伴わない微小変化の症例がほとんどであった。しかし明らかに腎機能が低下した症例では尿細管間質の変化が著明であった。また電子顕微鏡レベルでは特徴的な基底膜の変化は腎機能が正常な軽症症例でも認められ、逆に腎機能が低下した症例において変化が認めない場合もあった。そのため、基底膜の変化は腎機能を反映せず、また将来の腎機能低下

を予測することもできないと考えられた。

一方で、高度腎機能低下症例および末期腎不全症例でみられた変異はホメオドメインの一部に集積していた。これまでネイルパテラ症候群で末期腎不全に陥った症例で遺伝子変異が同定されている症例は少ないものの、特にp.C59Yを除いて他の変異(p.A236P, c.741+1G>A, p.V263D)はいずれもホメオドメインに存在した。特に今回同定された変異は第3および第4ヘリックスに集積しており(図2)、第3ヘリックスはDNA上の塩基配列を特異的に認識する上で中心的な役割を果たすとされている。実際に新たな変異は転写活性をほとんど持たない機能喪失変異であった。

また重症の腎症をきたす可能性として機能喪失だけではなくドミナントネガティブ効果を持つかどうかを検討したところ、これらの変異体は野生型*LMX1B*による転写活性上昇を抑制せず、ハプロ不全により疾患が発症することが示唆された。

一方で、同一変異を有する家族内においても腎症の重症度は異なることが知られており、ある変異を有するだけで必ず腎症が重度になると予測することは困難である。今回の調査で高度腎機能低下症あるいは末期腎不全症例ではいずれも高度蛋白尿をきたしていたことから、中等度以上の蛋白尿を呈する症例で、特にホメオドメインの変異が見られる場合には腎機能の低下に注意をするべきと考えられた。

## E. 結論

本邦のネイルパテラ症例において、高度腎機能低下あるいは末期腎不全に至った症例の病理学的、遺伝学的特徴を明らかにした。腎機能低下症例では*LMX1B*のホメオドメインとくにその第3ヘリックスの部位に変異が多く、これらの変異では*LMX1B*の転写活性を著明に抑制した。高度蛋白尿持続症例、特に*LMX1B*のホメオドメインに変異を有する症例では腎機能低下の可能性を踏まえた診療の必要性があると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究成果の公表

### 1. 論文発表

1. Harita Y. Application of next-generation sequencing technology to diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis.

Clinical and experimental nephrology 22: 491-500, 2018

2. 張田豊：腎疾患に対する遺伝子診断 小児科 59: 1379-1385, 2018
  3. 張田豊：小児腎疾患における遺伝子診断の実際 日本小児腎不全学会雑誌 38: 28-33, 2018
  4. 張田豊：【小児疾患の診断治療基準】水・電解質・酸塩基平衡 中枢性塩類喪失症候群 小児内科 50巻増刊: 28-129, 2018
  5. 張田豊：小児腎領域の小児慢性特定疾病・指定難病 ネイルパテラ症候群(爪膝蓋骨症候群)・LMX1B関連腎症 小児科診療81: 1763-1768, 2018
  6. 張田豊：遺伝子から見た嚢胞性腎疾患 じん 40: 4-8, 2018
2. 学会発表
  1. 張田豊：ネフローゼ症候群の病因と病態 巣状分節性糸球体硬化症の病型分類. 第53回日本小児腎臓病学会学術集会, 福島, 2018年6月29-30日
  2. 張田豊：小児期から思春期・若年成人(AYA世代)のネフローゼ診断 Up to date. 第61回日本腎臓学会学術集会, 新潟, 2018年6月8-10日
  3. 張田豊：遺伝性腎疾患診療の現状と将来. 第4回 Kidney related disease symposium in KYOTO, 京都, 2018年11月22日
  4. 張田豊：-症例から学ぶ-子どもの水・電解質異常へのアプローチ. 小児科専門医インテンシブコース, 京都, 2018年8月19日
  5. 張田豊：蛋白尿・ネフローゼの発症機序. 北海道小児腎臓病研究会, 札幌, 2018年9月22日
  6. Harita Y: Pathogenic mechanism of childhood idiopathic nephrotic syndrome. ISN FRONTIERS Meetings. Kidney disease & Cardiovascular disease. Tokyo, Feb. 24, 2018

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3.その他

なし

図1 ネイルパテラ症候群腎症の病理像

(A, B)20代から血尿蛋白尿を発症し, 59歳で腎機能正常. 52歳時.  
(C, D)9歳で蛋白尿, 23歳でCKD stage 4と腎機能低下. 14歳時. p.V265F変異あり.  
(E, F)7歳で蛋白尿, 15歳で末期腎不全へと進行. 11歳時. p.V262fs変異あり.

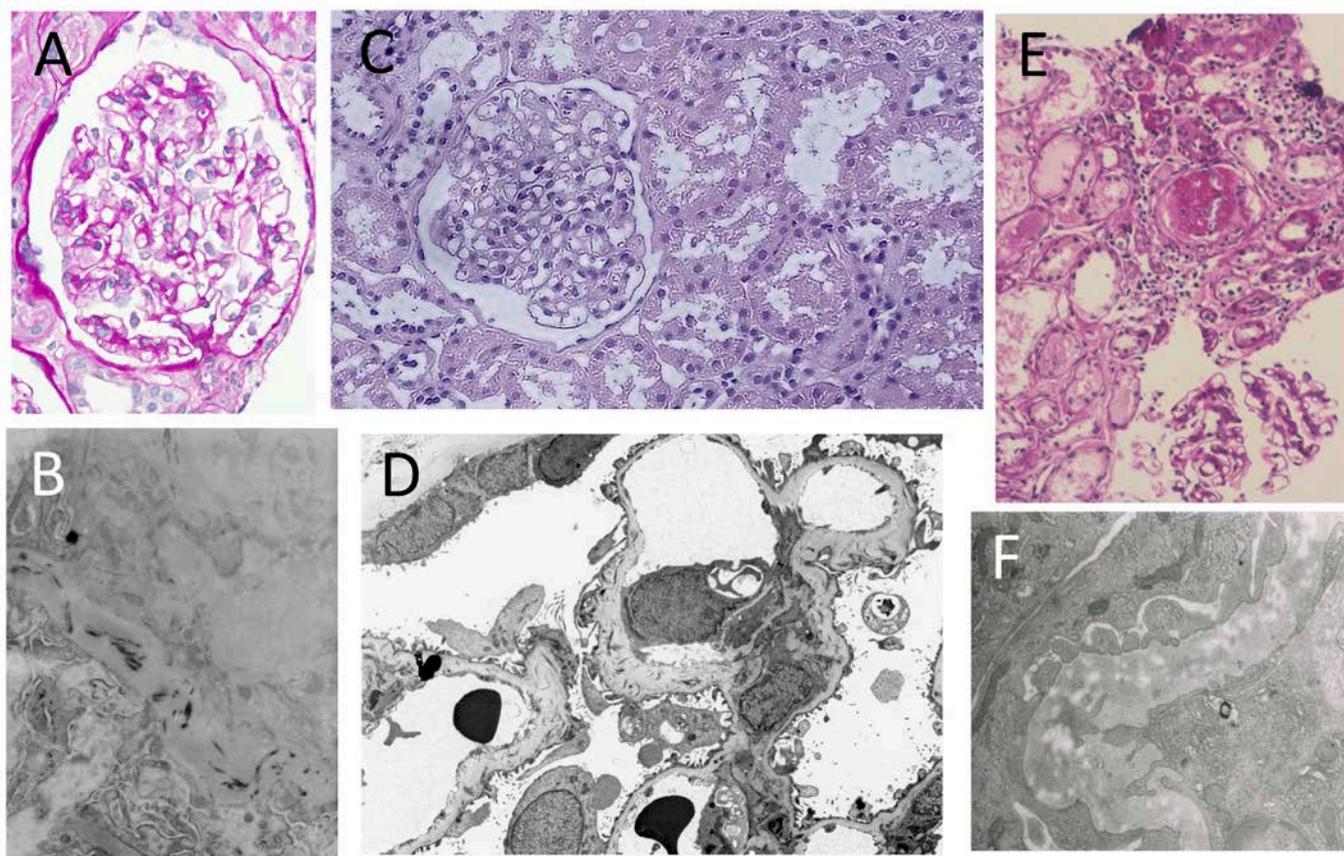


図2 *LMX1B*変異部位

*LMX1B*関連腎症（腎外症状を呈さない症例）で報告されている変異，および高度腎機能低下あるいは末期腎不全を合併したネイルパテラ症候群症例の変異を示す．アミノ酸配列上の四角により第1ヘリックス(Helix I)から第4ヘリックス(Helix IV)を示す．太字は今回の調査対象症例である．

腎機能低下症例で検出される変異のほとんどは*LMX1B*のホメオドメインに同定され，今回高度腎機能低下あるいは末期腎不全を合併した症例として同定された変異はDNA結合に直接関与する第3-第4ヘリックス(Helix III and IV)に集簇している．一方で*LMX1B*関連腎症で見られる変異は第2 (Helix II)および第4ヘリックス(Helix IV)に存在する．

