

氏名(本籍)	もり 森	もと 本	てつ 哲	し 司
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	医 第 3272 号			
学位授与年月日	平成14年3月6日			
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当			
最終学歴	平成3年3月31日 山形大学医学部医学科卒業			
学位論文題目	低分子蛋白尿症患者におけるCLCN5遺伝子の解析			

(主 査)

論文審査委員	教授 飯 沼 一 宇	教授 松 原 洋 一
	教授 谷 内 一 彦	

## 論文内容要旨

CLCN5 遺伝子の変異が、最近になって腎結石を特徴とする 3 つの疾患 (Dent 病, X 染色体連鎖劣性遺伝形式の腎結石症と低リン血症性くる病) で証明された。CLCN5 は 9 種類からなる電位依存性クロライドチャンネルファミリーに属し, その遺伝子座は Xp11.22 である。また, CLC-3, CLC-4 とサブファミリーを形成している。Fisher らによると, ヒト CLC-5 は腎臓に強く発現しており, 他には骨格筋と胎盤に弱い発現が認められる。上記の初報告に引き続き, 同じグループによって低分子蛋白尿症と高カルシウム尿症による腎石灰化を呈する日本の特発性低分子蛋白尿症患者 4 家系で, CLCN5 遺伝子の変異が報告された。高カルシウム尿症や腎石灰化を伴う低分子蛋白尿症の日本人患者は, イギリスの Dent 病患者でみられる徴候と似た症状を持っていたが, 概して軽症でくる病や腎不全の合併はほとんどなかった。今回の研究で, 我々は Dent 病患者で一般的にみられる症状や徴候を欠く低分子蛋白尿症単独の患者を経験した。そこで, 低分子蛋白尿症だけを呈する家系や低分子蛋白尿症以外に高カルシウム尿症, アミノ酸尿や低リン血症性くる病の徴候を合併している家系を対象に, CLCN5 遺伝子の遺伝子解析を行なった。

末梢血からゲノム DNA を抽出した後に, CLCN5 遺伝子のエクソンおよびエクソン-イントロン近傍の遺伝子変異の有無をシーケンス法で解析した。家族 E の発端者における遺伝子内欠失を評価する際には, 既報のサザンブロット法を用いた。10  $\mu$ g のゲノム DNA を EcoRI で消化した後に, 0.8% アガロースゲルを用いて電気泳動した。分離した DNA をナイロン膜に転写し, ヒト CLCN5 翻訳領域全長の cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。次に, アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現実験を下記の要領で行なった。ヒト CLC-5 cDNA をヒト腎臓 cDNA から RT-PCR で増幅し, pSPORT1 ベクターにサブクローニングした。そして, Stratagene 社の変異点導入キットを用いて, 野生型ヒト CLC-5 cDNA に変異点を導入した。得られたヒト CLC-5 cDNA の野生型および変異型を含むベクターを鋳型に *in vitro* で capped RNA を合成し, 卵母細胞 1 個あたり 20~30 ng の capped RNA をマイクロインジェクション法で注入した。2~3 日間 18°C で保育後, 卵母細胞に発現したクロライドコンダクタンスを two-electrode voltage-clamp 法で測定し, その解析には Axon Instruments 社の pCLAMP ソフトウェアを用いた。

解析の結果, 低分子蛋白尿症のみを呈していた 2 家系のうち 3 人の患者で, ナンセンス変異 (E118X) とミスセンス変異 (W22G) がみつかった。低リン血症性くる病をもつ患者では, エクソン 5~8 に及ぶ遺伝子欠失がみつき, また軽度の高カルシウム尿症と低分子蛋白尿症を呈

する患者では、R347X 変異がみつかった。低分子蛋白尿症、アミノ酸尿や低カリウム血症を併せ持つ患者では、検索した範囲内の CLCN5 遺伝子上には、遺伝子変異が証明されなかった。ナンセンス変異や欠失変異では、クロライドチャンネルの機能が消失することが予想されたが、W22G ミスセンス変異によってもチャンネルの機能が消失することが、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現実験で立証された。

今回の研究で、4つの新しい CLCN5 遺伝子の変異を証明した。また解析結果から、CLC-5 の機能を消失させる遺伝子変異が、病初期には必ずしも高カルシウム尿症や腎石灰化を引き起こさない可能性が示唆された。加齢の問題や欧米患者との生活環境、遺伝的背景の違いを考慮する必要があるが、低分子蛋白尿症が CLC-5 クロライドチャンネル異常症の初期あるいは必須の徴候であることが示唆された。

## 審査結果の要旨

CLCN5 遺伝子の変異が、最近になって腎結石を特徴とする 3 つの疾患 (Dent 病, X 染色体連鎖劣性遺伝形式の腎結石症と低リン血症性くる病) で証明された。CLCN5 は 9 種類からなる電位依存性クロライドチャネルファミリーに属し、その遺伝子座は Xp11.22 である。ヒト CLCN5 は腎臓に強く発現しており、他には骨格筋と胎盤に弱い発現が認められる。また、低分子蛋白尿症と高カルシウム尿症による腎石灰化を呈する日本の特発性低分子蛋白尿症患者 4 家系で、CLCN5 遺伝子の変異が報告された。高カルシウム尿症や腎石灰化を伴う低分子蛋白尿症の日本人患者は、Dent 病患者でみられる徴候と似た症状を持っていたが、概して軽症でくる病や腎不全の合併はほとんどなかった。そこで、低分子蛋白尿症だけを呈する家系や低分子蛋白尿症以外に高カルシウム尿症、アミノ酸尿や低リン血症性くる病の徴候を合併している家系を対象に、CLCN5 遺伝子の遺伝子解析を行なった。

末梢血からゲノム DNA を抽出した後に、CLCN5 遺伝子のエクソンおよびエクソン-イントロン近傍の遺伝子変異の有無をシーケンス法で解析した。発端者における遺伝子内欠失を評価する際には、既報のサザンブロット法を用いた。次にアフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現実験を行なった。

解析の結果、低分子蛋白尿症のみを呈していた 2 家系のうち 3 人の患者で、ナンセンス変異 (E118X) とミスセンス変異 (W22G) を見出した。低リン血症性くる病をもつ患者では、エクソン 5~8 に及ぶ遺伝子欠失が見つかり、また軽度の高カルシウム尿症と低分子蛋白尿症を呈する患者では、R347X 変異を見出した。低分子蛋白尿症、アミノ酸尿や低カリウム血症を併せ持つ患者では、検索した範囲内の CLCN5 遺伝子上には、遺伝子変異が証明されなかった。ナンセンス変異や欠失変異では、クロライドチャネルの機能が消失することが予想されたが、W22G ミスセンス変異によってもチャネルの機能が消失することが、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現実験で立証された。

今回の研究で、4 つの新しい CLCN5 遺伝子の変異を証明した。また解析結果から、CLCN5 の機能を消失させる遺伝子変異が、病初期には必ずしも高カルシウム尿症や腎石灰化を引き起こさない可能性が示唆された。加齢の問題や欧米患者との生活環境、遺伝的背景の違いを考慮する必要があるが、低分子蛋白尿症が CLCN5 クロライドチャネル異常症の初期あるいは必須の徴候であることが初めて示唆された。

この研究は CLCN5 クロライドチャネルの臨床的意義と機能を解明した点で独創的であり、医学博士の学位に値するものである。