

慢性腎不全患者における潜在的ファブリー病の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4549

慢性腎不全患者における潜在的ファブリー病の検討

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子遺伝学

(旧講座名：内科学第二)

(主任：馬淵 宏教授)

武 藤 寿 生

ファブリー病 (Fabry disease) はリソソームに存在する α -ガラクトシダーゼAの欠損により発症するX染色体性劣性遺伝形式の疾患である。腎障害はその最も重要な臓器障害の一つであり、患者の予後を左右している。最近の分子遺伝学的解析により、 α -ガラクトシダーゼAの遺伝子変異がその原因であると報告されている。しかしながら、本症の頻度、遺伝型と臨床病型の関係など、未だ十分には解明されていない。本研究では、慢性腎不全患者における潜在的ファブリー病の頻度およびその遺伝子変異、臨床病型について検討した。慢性腎不全患者254例 (男性156例、女性98例) の血漿中の α -ガラクトシダーゼA活性を測定し、12例 (男性6例、女性6例) に活性値の低下を認めた。この12例の臨床所見を調査し、さらに白血球中の α -ガラクトシダーゼA活性を測定した。白血球中の α -ガラクトシダーゼA活性低値を示した8例 (男性5例、女性3例) は末梢白血球より分離した高分子DNAを用いて、遺伝子変異について検討した。すなわち、 α -ガラクトシダーゼA遺伝子の全7エクソンのそれぞれに対応したプライマーを設計し、PCRによりDNA断片を増幅させ、直接塩基配列決定法 (direct sequence) を用いて遺伝子変異の確定を行った。さらにPCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphism) 法により遺伝子変異を確認した。その結果、一例の男性患者に α -ガラクトシダーゼA遺伝子156番目のアミノ酸アラニンをとレオニンへと変化する変異、A156Tを見い出した。またもう一例の男性患者には339番目のアミノ酸バリンをグルタミン酸へと変化する変異、V339Eを見い出した。後者の変異はこれまでに報告されたことがない新しい変異であった。これらの変異は正常100ハプロタイプには認められなかった。A156Tは古典的なファブリー病を起し、V339Eは腎障害以外に臓器病変を認めない亜型ファブリー病を引き起こすと考えられた。慢性腎不全患者254例のうち男性2例 (0.8%) をファブリー病と診断した。中でも慢性腎炎と診断されていた1例は腎障害のみの亜型ファブリー病であった。ファブリー病は原因不明の腎不全の原因として取り上げられるべき疾患である。

Key words atypical Fabry disease, end-stage renal disease, α -galactosidase A activity, point mutation

緒 言

ファブリー病 (Fabry disease) は、リソソームに存在する加水分解酵素のひとつである α -ガラクトシダーゼAの遺伝的欠損に起因するスフィンゴ糖脂質代謝異常症でX染色体性劣性遺伝形式をとる¹⁾²⁾。 α -ガラクトシダーゼAをコードする遺伝子はX染色体の長腕に位置しその全長は約12Kbで7個のエクソンと6個のイントロンから構成される³⁾⁴⁾。この酵素欠損により糖リン脂質、特にグロボトリアオシルセラミドなどの生体内基質が分解されず、体液中や組織、主に皮膚、腎臓、神経、角膜さらに心臓に進行性に沈着する^{5)~8)}。多くの男性患者は40歳代に腎透析あるいは腎移植を必要とする⁹⁾¹⁰⁾。それに対して多くのヘテロの女性は臨床的には無症状であるか、あっても軽症であり生命予後はよい¹¹⁾¹²⁾。しかし男性患者の中には軽度の臨床症状のみを示し、若干の α -ガラクトシダーゼA活性を持つ亜型ファブリー病患者が存在し¹³⁾、これらのうち腎病変のみを呈する亜型ファブリー病も報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。よってファブリー病患者が慢性腎不全患者の中に潜んでいる可能性があり、特に腎病変のみを呈する亜型ファブリー病患者は正確な診断がなされていない可能性がある。本研究では慢性腎不全患者における潜在的ファブリー病の頻度、およびその遺伝子変異、臨床病型について検討した。

対象および方法

I. 対 象

対象は、金沢大学第二内科およびその関連施設に通院、入院しており透析療法あるいは保存的療法を受けている末期腎不全患者254例 (男性156例、女性98例) である。これらの患者の臨床症状、原疾患につき調査した (表1)。平均年齢は60.3 ± 13.5歳であり基礎疾患は慢性糸球体腎炎117例、糖尿病性腎症52例、

平成13年11月26日受付、平成14年1月17日受理

Abbreviations : CGN, chronic glomerular nephritis; CPN, chronic pyelonephritis; DN, diabetic nephropathy; 4MU- α -D-Gal, 4Methylumbelliferyl- α -D-Galactopyranoside; PCR-RFLP, PCR-restriction fragment length polymorphism; PO, primary oxalosis; UK, unknown etiology

腎硬化症17例, 多発性嚢胞腎14例, その他原因が明らかなものの34例, 原疾患不明が20例であった。これらの内, 男性一例は既にファブリー病と診断されていた。この患者を含む後述の8例の患者からは遺伝子採血および遺伝子診断の同意を得ている。また, 本研究は「金沢大学大学院医学系研究科等におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会」の承認(研究許可年月日2001年12月3日, 審査番号13号, 課題名: 慢性腎不全患者における潜在的ファブリー病の検討)を受けている。これら慢性腎不全患者254例を, 同患者におけるファブリー病の頻度についての検討, およびファブリー病患者における α -ガラクトシダーゼA遺伝子変異の同定と臨床病型の検討の対象とした。

II. 方 法

1. 血漿および白血球中 α -ガラクトシダーゼA活性の測定

対象者の末梢静脈血5 mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し血漿分離の上4℃にて移送, -20℃にて保存した。McIlvaineの緩衝液(0.1 M クエン酸, 0.2 M リン酸一水素ナトリウム, pH 4.3)に1.0 mM 4メチルウンベリフェリル- α -D-ガラクトピラノシド(4Methylumbelliferyl- α -D-Galactopyranoside, 4MU- α -D-Gal)(Sigma Chemical, St.Louis, USA)を加えこの基質溶液100 μ lに患者血漿100 μ l, 0.2 M N-アセチル-D-ガラクトサミニダーゼを100 μ l加えた²¹⁾。この反応溶液を37℃で120分加温した。最後に0.1 M グリシン緩衝液(pH 10.7) 200 μ lを添加して反応を終結させた。この反応液250 μ lを紫外線透過板に2検体ずつ注入し, 蛍光吸光度計(Biolumin 960, Molecular Dynamics, Piscataway, USA)を用いて励起波長360 nm, 吸光波長450 nmの条件にて測定した。2つの検体の平均値を測定結果とした。

白血球中の α -ガラクトシダーゼA活性はまず対象者の末梢静脈血7 mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取した。Kampineら¹⁷⁾の方法に従って遠心分離法にて白血球を分離した。以後前述のように4MU- α -D-Galを基質としてこれに患者白血球を加

えて反応させ, 蛍光吸光度計にて α -ガラクトシダーゼA活性を測定した¹⁸⁾。

2. 高分子DNA抽出

対象者の末梢静脈血10 mlをEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し4℃にて移送, -20℃にて保存した。この末梢血を室温にて解凍後Triton X-100融解変法にて高分子DNAを単離した。すなわち融解液(320 mM ショ糖液, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6)にて赤血球を溶血させ¹⁹⁾, 白血球を遠心により沈澱として集めた。これをN-ラウロイルサルコシン(Sigma)にて消化後, フェノール-クロロホルム(1:1)で1回, 続いてクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)にて2回抽出し, 最後にエタノール沈澱によりDNAを分離した²⁰⁾²¹⁾。こうして得られたDNAをTris-EDTA緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-2Na, pH 8.0)に溶解した。

3. PCR

Lianneら²²⁾の報告を参考に, α -ガラクトシダーゼAをコードする遺伝子配列から, エクソン1からエクソン7についてそれぞれプライマー計7組を作成した(表2)。スプライス部位の変異検出のため各プライマーはエクソンに隣接するイントロンを少なくとも5塩基含むものとした。

プライマーはDNA合成機モデルABI381A(Perkin-Elmer Applied Biosystems, California, USA)を用いベータシアノエチルホスホアミダイド法にて合成した²³⁾。アンモニア水に溶解し55℃で一晩静置したうえで-20℃に冷却, 減圧下で遠心して乾燥, 再滅菌蒸留水1 mlに溶解しカラムNAP-5(Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden)に通して精製した。そこで200倍に希釈し260 nmでの吸光度より濃度を測定し, 濃度を10 μ Mになるように調整した。

DNA断片の増幅にはLianneら²²⁾によるPCR法を用いた。高分子DNA 1 μ gを鋳型DNAとして10 μ Mのプライマー1セットと終濃度200 μ Mとなる量の各デオキシヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, TTP)と1単位のTth DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer-Cetus, Norwalk, USA)を, 0.01%ゼラチンを含む緩衝液(終濃度10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)に加え, 再滅菌蒸留水を計50 μ lとなるように加え攪拌した。遠心して反応液を集め50 μ lのミネラルオイル(Sigma)を滴下

Table 1. Characteristics of 254 patients with end-stage renal disease

Characteristics	$\bar{x} \pm SD$ or the actual numbers
Age (year)	60.3 $\pm$ 13.5
Gender	
Male	156
Female	98
Underlying disease	
Glomerulonephritis	117
Diabetes mellitus	52
Nephrosclerosis	17
Polycystic kidney disease	14
Toxemia of pregnancy	7
Membranous nephritis	5
Chronic pyelonephritis	4
Purpura nephritis	3
Systemic lupus erythematosis	3
Rapidly progressive glomerulonephritis	2
Membrano-proliferative glomerulonephritis	1
Gout	1
Fabry disease	1
The other etiologies	7
Unknown etiologies	20

Table 2. PCR and sequencing primers for the α -galactosidase gene

Exon	Primer	Sequence
1	Fb9	5'-TGATTGGTTAGCGGAACGTCTTAC-3'
	Fb10	5'-AAGGGAGTACCCAATATCTGATAC-3'
2	Fb13	5'-AGGTGCCTAATAAATGGGAGGTAC-3'
	Fb14	5'-GTGCTTACAGTCTCTGAATGAAC-3'
3	Fb15	5'-GCTACCTCACGATTGTGCTTCTAC-3'
	Fb16	5'-TCAGCTACCATGGCCTCAAAGTTC-3'
4	Fb17	5'-GGATGACAGACTGAACCCCATCTC-3'
	Fb18	5'-GGAGACCTTGGTTTCCTTTGTTGTC-3'
5	Fb19	5'-TCTCACAAGGATGTTAGTAGAAAG-3'
	Fb20	5'-CTTGAATGTCAAAATAGGAAACAA-3'
6	Fb21	5'-GTTTCTCCATATGGGTCATCTAGG-3'
	Fb22	5'-AGGCCCAAGACAAAGTTGGTATTG-3'
7	Fb23	5'-AACAGGGCCCACTTATCACTAGTTG-3'
	Fb24	5'-TGAATGGAGAAAAAGGTGGACAGG-3'

して蒸発を防ぎ、まず94℃5分で変性し、続いて94℃1分、50℃1分、72℃1分を1サイクルとし、30サイクルの反応を行った。

増幅されたそれぞれのエクソンを含むDNA断片は1%の通常のアガロースゲルに、鎖長マーカーとしてΦX174/Hae III消化物(東洋紡、東京)と共に泳動して断片長を確認した。

4. 直接シーケンス法による塩基配列の決定(Dye terminator cycle sequencing)

PCRで増幅したDNA断片を1%の通常のアガロースゲルに鎖長マーカーとしてΦX174/Hae III消化物(東洋紡、東京)と共に泳動し、断片長を確認した上で、目的とするDNA断片のバンドを含む部分を切り出した。マイクロピエアとマイクロコン-50(Millipore Corporation, Bedford, USA)を組み合わせるこのDNA断片を10,000 rpmで10分間遠心した。再滅菌蒸留水25 μlを加えて再度遠心し、濃縮すると同時に余分なプライマー、およびヌクレオチドを除去し鋳型DNAとした。

鋳型DNA 10 ng にDye™ Terminator Cycle Sequencingキット(Perkin-Elmer-Cetus)の反応液8 μl、3.2 pmolのプライマー、滅菌水を適量加えて全量20 μlとして反応液を調製した。これにGeneAmp™ PCR System 9700(Perkin-Elmer Applied Biosystems)を用いて以下の条件でPCR反応を行った。すなわち、前加熱を96℃1分間行った後、96℃30秒間、50℃15秒間、60℃4分間を1サイクルとし、25サイクルを行った^{24)~27)}。得られた反応溶液の過剰なプライマー、蛍光色素をエタノール沈殿により除去した後、減圧乾燥させた。その後Template Suppression Reagent (TSR)(Perkin-Elmer Applied Biosystems) 15 μlを加えた後、95℃2分間熱変性し、自動シーケンス解析装置ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(Perkin-Elmer Applied Biosystems)を用い塩基配列を解析した。

5. PCR制限酵素切断多型(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)法

変異配列が決定された後、変異の存在の確認およびスクリーニングのため変異により切断部位が出現あるいは消失する特定の制限酵素を選択した。この選択作業にはコンピューターを用いソフトウェアとしてGene Tool(DoubleTwist.com, Oakland, USA)を使用した。DNA断片を再度増幅しPCR産物を取り出し、切断部位に応じた制限酵素とその反応用緩衝液を加え酵素の至適温度条件下にて24時間反応させた²⁸⁾。反応産物を3%アガロースゲルに適当な大きさの鎖長マーカーと共に泳動して切断の有無で変異の検出を行った²⁹⁾。

成 績

I. 血漿および白血球中α-ガラクトシダーゼA活性の測定結果

1. 血漿α-ガラクトシダーゼA活性の測定結果

慢性腎不全患者254例の血漿中α-ガラクトシダーゼA活性は図1に示すように7.7~88.5 nmol/時間/ml(平均値±標準偏差, 44.4±12.2)であった。このうち32.2(平均-標準偏差) nmol/時間/ml以下であった12例(男性6例, 女性6例)を血漿中α-ガラクトシダーゼA活性低下とした。

2. 白血球中α-ガラクトシダーゼA活性の測定結果

血漿中α-ガラクトシダーゼA活性低下を示した12例に対してさらに白血球中α-ガラクトシダーゼA活性の測定を行った。白血球中α-ガラクトシダーゼA活性の正常値は50~100 nmol/時間/mgPであり、8例(男性5例, 女性3例)が活性低値を示した。

II. 直接塩基配列決定法による遺伝子変異配列の決定

血漿および白血球中α-ガラクトシダーゼA活性の測定にて両

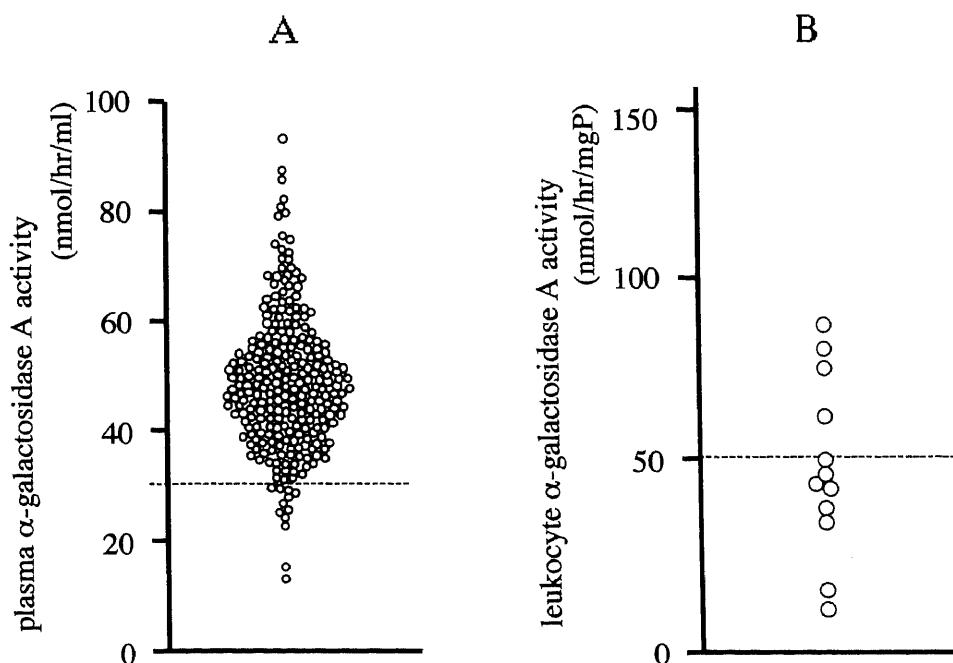


Fig. 1. Plasma (A) and leukocyte (B) α-galactosidase A activity in 254 patients with end-stage renal failure. The values in the plasma α-galactosidase A activity in the patients ranged from 7.7 to 88.5 nmol per hour per milliliter ($\bar{x} \pm SD$, 44.4 ± 12.2).

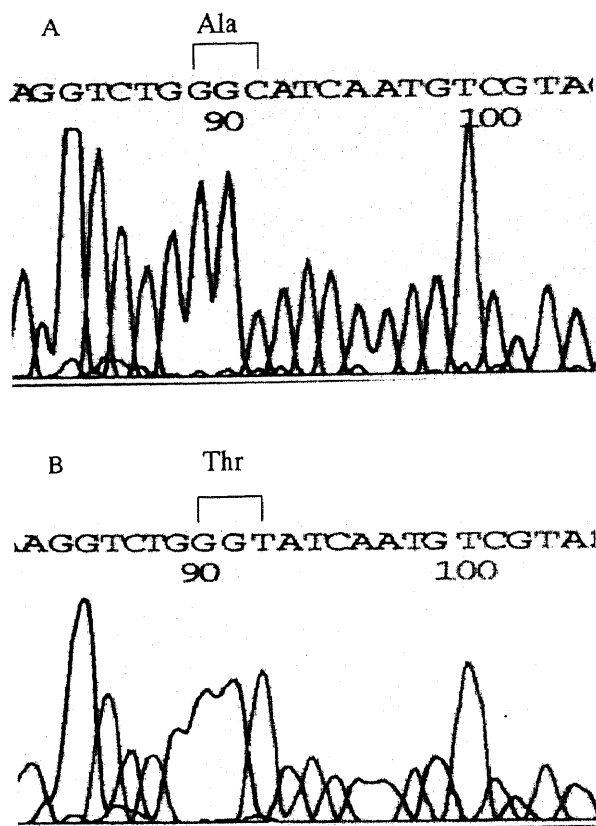


Fig. 2. Nucleotide sequence analysis of exon 3 of α -galactosidase A gene, indicating a C-to-T transition at nucleotide 468 (A156T) in Patient 1 (B). (A) Control.

Table 3. Characteristics of two patients with hemizygous Fabry disease

Characteristics	Patient 1	Patient 2
Age (yr.)	46	35
α -galactosidase activity		
In plasma (nmol/hr/ml)	7.7	9.6
In leukocyte (nmol/mgp/hr)	1.6	3.7
Corneal opacities	+	—
Hypohidrosis	+	—
Acroparesthesias	+	—
Angiokeratoma	+	—
Cerebrovascular damage	+	—
Left ventricular hypertrophy	+	—
Proteinuria	+	+
End-stage renal disease	+	+

者とも活性低下を示した8例に対して α -ガラクトシダーゼA遺伝子の塩基配列解析を行った。その結果、男性患者2例に同遺伝子の変異を認めた。うち1例は46歳の男性で我々が以前遺伝子解析とともに報告した典型的ファブリー病の症例である³⁰。この症例においては図2に示すように156番目のアミノ酸AlaをコードするGCCがThrをコードするACCへと変化する変異(A156T)を同定している。もう1例では図3のように339番目のアミノ酸ValをコードするGTGがGluをコードするGAGへと

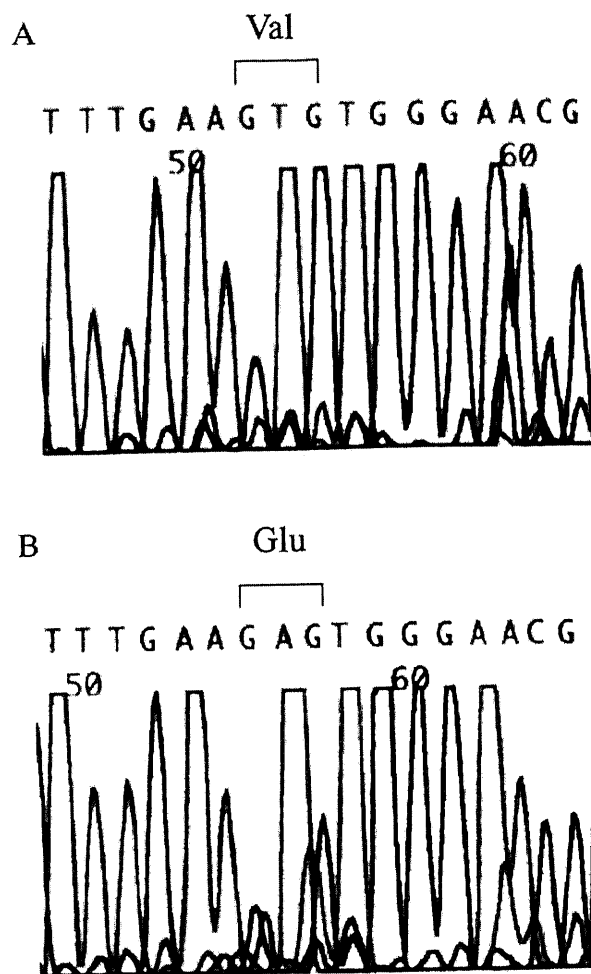


Fig. 3. Nucleotide sequence analysis of exon 7 of α -galactosidase A gene, indicating a T-to-A transition at nucleotide 1017 (V339E) in Patient 2 (B). (A) Control.

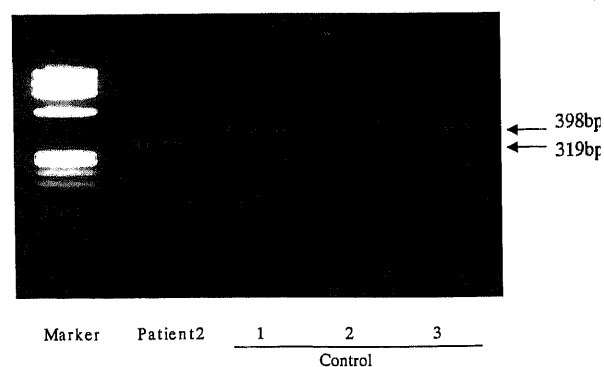


Fig. 4. *Mbo* II restriction digestion of exon 7 PCR products. The undigested PCR products of controls (1~3) are 398bp in length and in Patient 2 *Mbo* II digestion yields fragments of 319 bp and 79 bp that is omitted in this photograph.

変化する変異 (V339E) を同定した。この変異はこれまでに報告されていない新しい変異であった。

A156Tは制限酵素 *Sfa* I の切断部位 (GCATC) を、V339Eは制限酵素 *Mbo* II の切断部位 (GAAGA) を生じさせる。これらの

アミノ酸変化が疾患の原因であるかどうかを決定するために正常者100例で同エクソンのPCR-RFLP解析を行ったが *Sfa*NI, *Mbo*II で切断される変異は見出されなかった (図4)。

Ⅲ. 臨床像の検討

表3にA156T, V339E変異を呈した男性2症例の臨床症状を示す。症例1は被角血管腫、四肢の異常感覚、無汗症、水晶体混濁、心筋肥大を伴った古典的ファブリー病であった。症例2は症例1とは異なり、腎病変のみを呈する亜型ファブリー病であった。症例2は腎生検により当初、慢性腎炎とされていた。

考 察

ファブリー病は最近の分子遺伝学的解析により、 α -ガラクトシダーゼAの遺伝子変異がその原因であると報告されている。近年 α -ガラクトシダーゼAをコードするcDNA、およびゲノムのDNA塩基配列、 α -ガラクトシダーゼAの構造が明らかにされ研究が進んでいるが^{39,40}、ファブリー病は臨床的に非常に多彩な症状を示す。本症はX染色体性劣性遺伝形式をとるためヘミ接合体の男性ファブリー病患者に強い症状が現れる。ファブリー病はその臨床像からより重症で典型的な経過をとる古典型と、極めて軽症で心障害を中心とした症状を示す亜型とに大別される。古典型ファブリー病患者では少年期から青年期にかけて主に四肢末端に疼痛や不快な異常知覚を示し、さらに角膜混濁、低汗症、被角血管腫などが出現する。中年期になると痛みは軽快するが腎臓や心臓および全身の血管系に糖脂質が沈着し、腎不全、心不全、心筋梗塞や脳血管障害を起こし、これらを原因として死に至る³¹。

一方亜型ファブリー病患者では、このような典型的な経過はたどらず、極めて軽症で壮年期以後に心筋障害を主とする症状が現れるものがある³²⁻³⁴。近年、肥大型心筋症の中に比較的高頻度に亜型ファブリー病が存在することが示唆され^{35,36}、腎障害のみを呈する亜型ファブリー病も報告されている¹⁵。またヘテロ接合体の女性は臨床的に無症状から重症まで様々な症状を示す³⁷⁻⁴⁰。この場合一般には角膜の渦状混濁のみの場合が多く、腎および心血管障害を起こすものは少ないと考えられてきた。しかし最近ではヘテロ接合体の女性においても、心筋障害および腎障害の存在が明らかにされつつある⁴¹。男性慢性腎不全患者での古典型ファブリー病の頻度についての報告はあるが⁴²、女性患者や亜型ファブリー病を含めた報告はない。そこで我々は、末期腎不全患者の中にファブリー病が潜んでいないか α -ガラクトシダーゼA活性にてスクリーニングし、さらに α -ガラクトシダーゼA遺伝子の異常がないか調査した。

血漿中 α -ガラクトシダーゼA活性の低下を認めた12例 (男性6例、女性6例) に対し白血球中 α -ガラクトシダーゼA活性を測定したが、これらのうち4例 (男性1例、女性3例) は白血球中 α -ガラクトシダーゼA活性は正常値であった。血漿中および白血球中 α -ガラクトシダーゼA活性の不一致は、腎不全患者の血漿中に何らかの α -ガラクトシダーゼA活性阻害物質が存在するためと考えられる。我々は血漿中および白血球中 α -ガラクトシダーゼA活性を測定することにより8例の患者を抽出した。これらの患者に対して、直接シーケンス法により α -ガラクトシダーゼA遺伝子の塩基配列を同定した。

遺伝子異常としては稀なプロモーター部位の異常や発現因子の異常などは除外出来ないが⁴³、我々の方法により遺伝子異常の大部分を占める点突然変異、塩基脱落、塩基挿入などの有無

は評価できる⁴⁴。その結果、以前報告した1例を含む2例を見出した。このうちA156Tは古典型ファブリー病を、V339Eは腎障害のみの亜型ファブリー病を引き起こす遺伝子変異であると考えられる。一方、白血球中の α -ガラクトシダーゼA活性低値を示した他の6例 (男性4例、女性2例) においては α -ガラクトシダーゼA遺伝子に変異は認められなかった。このような症例では、 α -ガラクトシダーゼA遺伝子のプロモーター部位の異常やこの遺伝子発現に関する他の因子の異常、さらに酵素活性阻害因子などが想定され⁴⁵、さらなる解析が必要である。これら6例の末期腎不全に陥った原疾患は2例が慢性糸球体腎炎、1例は原発性蔭酸症、1例は慢性腎盂腎炎、残り2例は原因不明と診断されており、臨床像はそれぞれの診断に矛盾しないものであった。すなわち、2例は心筋肥大を呈していたが、被角血管腫、四肢の異常感覚、発汗低下および家族歴は全く認められなかった。よって、これら6例はファブリー病ではないと診断した。

本研究においてファブリー病のスクリーニングとしては血漿および白血球中の α -ガラクトシダーゼA活性測定のみ依存している。ヘテロ接合体の女性患者では細胞レベルにおいて発分化の段階で起こるX染色体の無秩序な不活性化により2種類の細胞から構成され一方は α -ガラクトシダーゼA活性を有し、他方は α -ガラクトシダーゼA活性を有さない⁴⁶。よって女性でヘテロのファブリー病患者は幅広い α -ガラクトシダーゼA活性を示す事が考えられる。従って、 α -ガラクトシダーゼA活性の測定のみでは、比較的高い α -ガラクトシダーゼA活性を持つヘテロ接合体の女性患者をスクリーニングしきれない可能性がある⁴⁷。現時点ではファブリー病の診断は α -ガラクトシダーゼA活性の測定に加えて臨床症状、他覚的所見、家族歴、および α -ガラクトシダーゼA遺伝子異常の同定の上になされるべきであるが、今回我々が検索した範囲では慢性腎不全患者中にヘテロ接合体の女性ファブリー病患者は存在しなかった。

α -ガラクトシダーゼA遺伝子の変異はこれまで多く報告されている。特に古典型ファブリー病において認められた変異は非常に多彩である⁴⁸⁻⁵²。 α -ガラクトシダーゼAのmRNA或いは翻訳される酵素蛋白質の大きさに比較的大きな変化をもたらすものから、単塩基置換によるアミノ酸置換まで様々な変異が含まれる^{22,40,53,54}。一方、亜型ファブリー病においては単塩基置換の報告しかなく^{15,55}、腎障害のみを呈する亜型ファブリー病の遺伝子異常はエクソン6の上流 (5'末端側) に存在するとされている⁵⁶。今回我々が見いだした α -ガラクトシダーゼA遺伝子の新しい変異V339Eは表現型として腎障害のみを呈する亜型ファブリー病の原因遺伝子であると考えられる。V339Eはエクソン7の上流の点突然変異であり、エクソン7の点突然変異にても腎障害のみの亜型ファブリー病の表現型をとることがあると考えられる。各エクソンごとの機能については諸家の報告があり、エクソン1は酵素の安定性に関与していると言われ^{33,57,58}、エクソン6および7は酵素活性発現に関与していると考えられている。しかし同一エクソンあるいはアミノ酸の変異にても表現型が異なることがしばしばある⁵⁹。この表現型の違いの原因の一部は血液型によるとされている。これは主な蓄積物質であるグロボトリアオシルセラミドに加え特定のB関連糖リン脂質がさらに蓄積するためと考えられ、そのためB型、およびAB型の血液型である患者はより重症な表現型を示すと言われている⁶⁰。このようにこの遺伝子の変異のみで病型が決

まるのではなく、血液型を含めた他の因子も関与している。よって遺伝子変異のみならずさらなる影響因子の検索も重要であると考えられた。

近年 α -ガラクトシダーゼA酵素の補充療法の効果が報告され実用化しつつある⁶¹⁾⁶²⁾。この治療により腎不全の進行抑制、さらに心肥大の改善が期待される。このため亜型ファブリー病および古典型ファブリー病の正確な診断、治療のために腎不全患者および原因不明の腎疾患患者に於いても積極的に同疾患を疑い精査する必要があると考えられた。

結 論

日本人慢性腎不全患者254例において、潜在的ファブリー病患者をスクリーニングするため、血漿中および白血球中の α -ガラクトシダーゼA酵素活性を測定した。さらに α -ガラクトシダーゼA遺伝子の変異を解析し、その臨床病型も検討し以下の結果を得た。

1. 血漿中および白血球中 α -ガラクトシダーゼA活性の低下を慢性腎不全患者254例中8例に認めた。
2. このうち2例(0.8%)に α -ガラクトシダーゼA遺伝子のエクソン部位に異常を見出した(A156T, V339E)。うち一例は古典的なファブリー病であり、他方は腎障害のみを示す亜型ファブリー病であった。
3. V339Eはこれまで報告のない点突然変異であった。
4. 慢性腎不全患者のうち女性98例中にはヘテロ接合体のファブリー病患者を認めなかった。
5. ファブリー病は慢性腎不全患者の中に潜んでいることがあり、特に原因不明の腎不全をみたときには注意が必要である。腎障害のみを示す亜型ファブリー病の頻度はこれまで考えられていたよりも多い可能性がある。
6. α -ガラクトシダーゼA活性が低値であったが、遺伝子異常を認めなかった症例は、測定時に阻害物質が存在した可能性や、遺伝子プロモーター部位など、遺伝子発現因子の異常が想定される。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師 馬淵 宏教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教示頂きました金沢大学医学部附属病院リウマチ、アレルギー内科の紺井一郎講師に心から謝意を表します。また、御助言、御協力を戴きました福井医科大学医学部医学科内科学第三講座の此下忠志助教授に厚く御礼申し上げます。また、多大なる御協力を頂きました藤田記念病院院長宮崎良一先生、小松市民病院内科竹田正廣先生、金沢大学大学院医学系研究科血管分子遺伝学講座第三研究室の各位、ならびに高分子DNAの採取等に際し御協力を頂いた山本幸夫氏、久保芳美氏に感謝いたします。

本研究の一部は第45回日本透析医学会総会(2000年、札幌)において発表した。

文 献

- 1) Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L. Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. N Engl J Med 276: 1163-7, 1967
- 2) Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygoties and heterozygoties. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. J Lab Clin Med 81: 157-71, 1973

3) Bishop DF, Calhoun DH, Bernstein HS, Hantzopoulos I, Quinn M, Desnick RJ. Human alpha-galactosidase A: nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the mature enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A 83: 4859-63, 1986

4) Bishop DF, Kornreich R, Desnick RJ. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 3903-7, 1988

5) Desnick RJ, Astrin KH, Bishop DF. Fabry disease: molecular genetics of the inherited nephropathy. Adv Nephrol 18: 113-27, 1989

6) Desnick RJ, Bernstein HS, Astrin KH, Bishop DF. Fabry disease: molecular diagnosis of hemizygoties and heterozygote Enzyme 38: 54-64, 1987

7) Linhart A, Palecek T, Bultas J, Ferguson JJ, Hrudova Karetova D, Zeman J, Ledvinova J, Poupetova H, Elleder I, Aschermann M. New insights in cardiac structural changes patients with Fabry's disease. Am Heart J 139: 1101-8, 2000

8) Dvorak AM, Cable WJ, Osage JE, Kolodny EH. Diagnostic electron microscopy. II. Fabry's disease: use of biopsies from uninvolved skin. Acute and chronic changes involving the microvasculature and small unmyelinated nerves. Pathol Ann 16: 139-58, 1981

9) Sheth KJ, Roth DA, Adams MB. Early renal failure in Fabry's disease. Am J Kidney Dis 2: 651-4, 1983

10) Clarke JT, Knaack J, Crawhall JC, Wolfe LS. Ceramidetrihexosidosis (Fabry's disease) without skin lesions. N Engl J Med 284: 233-5, 1971

11) Rodriguez FH, Jr., Hoffmann EO, Ordinario AT, Jr., Bali M. Fabry's disease in a heterozygous woman. Arch Pathol Lab Med 109: 89-91, 1985

12) Uchino M, Uyama E, Kawano H, Hokamaki J, Kugiyama Murakami Y, Yasue H, Ando M. A histochemical and electron microscopic study of skeletal and cardiac muscle from a Fabry disease patient and carrier. Acta Neuropathol 90: 334-8, 1995

13) Romeo G, D'Urso M, Pisacane A, Blum E, De Falco Ruffilli A. Residual activity of alpha-galactosidase A in Fabry disease. Biochem Genet 13: 615-28, 1975

14) Meroni M, Spisni C, Tazzari S, Di Vito R, Stingone Bovan I, Torri Tarelli L, Sessa A. Isolated glomerular proteinuria as the only clinical manifestation of Fabry's disease in an adult male. Nephrol Dial Transplant 12: 221-3, 1997

15) Sawada K, Mizoguchi K, Hishida A, Kaneko E, Koide Nishimura K, Kimura M. Point mutation in the alpha-galactosidase A gene of atypical Fabry disease with only nephropathy. Clin Nephrol 45: 289-94, 1996

16) Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson M. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. Clin Chim Acta 112: 247-51, 1981

17) Kampine JP, Brady RO, Kanfer JN, Feld M, Shapiro AM. Diagnosis of Gaucher's disease and Niemann-Pick disease from small samples of venous blood. Science 155: 86-8, 1967

18) Vidershain G, Beier EM, Mendel'son MM, Livandovski

- A. [Biochemical diagnosis of Anderson-Fabry disease in two brothers]. *Vopr Med Khim* 32: 120-3, 1986
- 19) Bose K, Allison DC. An improved method of preparing nuclei for absorption cytophotometry. *J Histochem Cytochem* 33: 65-8, 1985
 - 20) Potter AA, Hanham AF, Nestmann ER. A rapid method for the extraction and purification of DNA from human leukocytes. *Cancer Lett* 26: 335-41, 1985
 - 21) Jeanpierre M. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res* 15: 9611, 1987
 - 22) Lianne C Blanch, Cathy Meaney, Morris CP. A Sensitive Mutation Screening Strategy for Fabry Disease: Detection of Nine Mutations in the α -Galactosidase A Gene. *Hum Mutat* 8: 38-43, 1996
 - 23) Marlier JF, Benkovic SJ. On the mechanism of de novo polymerization by form I polynucleotide phosphorylase of *Micrococcus luteus*. *Biochemistry* 21: 2349-56, 1982
 - 24) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7, 1977
 - 25) Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-41, 1987
 - 26) Lee LG, Connell CR, Woo SL, Cheng RD, McArdle BF, Fuller CW, Halloran ND, Wilson RK. DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res* 20: 2471-83, 1992
 - 27) Tabor S, Richardson CC. A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6339-43, 1995
 - 28) Deng GR. A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer. *Nucleic Acids Res* 16: 6231, 1988
 - 29) Lin FH, Lin R. A comparison of single nucleotide primer extension with mispairing PCR- RFLP in detecting a point mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1202-6, 1992
 - 30) Konoshita T, Mutoh H, Yokoi T, Koni I, Miyamori I, Mabuchi H. A missense mutation, A156T, in the alpha-galactosidase A gene causes typical Fabry disease. *Clin Nephrol* 55: 243-7, 2001
 - 31) Donati D, Novario R, Gastaldi L. Natural history and treatment of uremia secondary to Fabry's disease: an European experience. *Nephron* 46: 353-9, 1987
 - 32) Sakuraba H, Yanagawa Y, Igarashi T, Suzuki Y, Suzuki T, Watanabe K, Ieki K, Shimoda K, Yamanaka T. Cardiovascular manifestations in Fabry's disease. A high incidence of mitral valve prolapse in hemizygotes and heterozygotes. *Clin Genet* 29: 276-83, 1986
 - 33) Sakuraba H, Oshima A, Fukuhara Y, Shimmoto M, Nagao Y, Bishop DF, Desnick RJ, Suzuki Y. Identification of point mutations in the alpha-galactosidase A gene in classical and atypical hemizygotes with Fabry disease. *Am J Hum Genet* 47: 784-9, 1990
 - 34) von Scheidt W, Eng CM, Fitzmaurice TF, Erdmann E, Hubner G, Olsen EG, Christomanou H, Kandolf R, Bishop DF, Desnick RJ. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N Engl J Med* 324: 395-9, 1991
 - 35) Elleder M, Bradova V, Smid F, Budesinsky M, Harzer K, Kustermann-Kuhn B, Ledvinova J, Belohlavek, Kral V, Dorazilova V. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. *Virchows Arch* 417: 449-55, 1990
 - 36) Nakao S, Takenaka T, Maeda M, Kodama C, Tanaka A, Tahara M, Yoshida A, Kuriyama M, Hayashibe H, Sakuraba H, et al. An atypical variant of Fabry's disease in men with left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 333: 288-93, 1995
 - 37) Van Loo A, Vanholder R, Madsen K, Praet M, Kint J, De Paepe A, Messiaen L, Lameire N, Hasholt L, Sorensen SA, Ringoir S. Novel frameshift mutation in a heterozygous woman with Fabry disease and end-stage renal failure. *Am J Nephrol* 16: 352-7, 1996
 - 38) Hainaut P, Mugabo P, Schapira M, Coche E. [Renal insufficiency manifesting a heterozygote form of Fabry's disease]. *Acta Clin Belg* 43: 374-7, 1988
 - 39) Grewal RP, McLatchey SK. Cerebrovascular manifestations in a female carrier of Fabry's disease. *Acta Neurol Belg* 92: 36-40, 1992
 - 40) Miyamura N, Araki E, Matsuda K, Yoshimura R, Furukawa N, Tsuruzoe K, Shirotani T, Kishikawa H, Yamaguchi K, Shichiri M. A carboxy-terminal truncation of human alpha-galactosidase A in a heterozygous female with Fabry disease and modification of the enzymatic activity by the carboxy-terminal domain. Increased, reduced, or absent enzyme activity depending on number of amino acid residues deleted. *J Clin Invest* 98: 1809-17, 1996
 - 41) Fukushima M, Tsuchiyama Y, Nakato T, Yokoi T, Ikeda H, Yoshida S, Kusumoto T, Itoh K, Sakuraba H. A female heterozygous patient with Fabry's disease with renal accumulation of trihexosylceramide detected with a monoclonal antibody. *Am J Kidney Dis* 26: 952-5, 1995
 - 42) Kouichi Utsumi RK, Tomoyo Takata, Hitoshi sakuraba, Noriaki Matsui, Hiroshi Saito, Tadashi Nakamura, Mitsuhiko Kawabe, Yasuhiko Iino, Yasuo Katayama. Fabry disease in patients receiving maintenance dialysis. *Clin Exp Nephrol* 4: 49-51, 2000
 - 43) Lobo SM, Hernandez N. A 7 bp mutation converts a human RNA polymerase II snRNA promoter into an RNA polymerase III promoter. *Cell* 58: 55-67, 1989
 - 44) Blanch LC, Meaney C, Morris CP. A sensitive mutation screening strategy for Fabry disease: detection of nine mutations in the alpha-galactosidase A gene. *Hum Mutat* 8: 38-43, 1996
 - 45) Handa Y, Yotsumoto S, Isobe E, Sai Y, Yoshii N, Nakao S,

- Fujita N, Hamaguchi S, Kanzaki T. A case of symptomatic heterozygous female Fabry's disease without detectable mutation in the alpha-galactosidase gene. *Dermatology* 200; 262-5, 2000
- 46) Redonnet-Vernhet I, Ploos van Amstel JK, Jansen RP, Wevers RA, Salvayre R, Levade T. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *J Med Genet* 33: 682-8, 1996
- 47) Spence MW, Goldbloom AL, Burgess JK, D'Entremont D, Ripley BA, Weldon KL. Heterozygote detection in angiokeratoma corporis diffusum (Anderson-Fabry disease). Studies on plasma, leucocytes, and hair follicles. *J Med Genet* 14: 91-9, 1977
- 48) Ishida S, Ichimura K, Yamakage A, Matsuzaki S, Yamazaki S. Missense mutation in exon 2 of alpha-galactosidase A in a patient with Fabry disease. *Arch Dermatol Res* 289: 303-5, 1997
- 49) Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, Kornreich R, Eng CM, Sakuraba H, Desnick RJ. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. *J Clin Invest* 83: 1390-9, 1989
- 50) Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, Astrin KH, Desnick RJ. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet* 53: 1186-97, 1993
- 51) Ploos van Amstel JK, Jansen RP, de Jong JG, Hamel BC, Wevers RA. Six novel mutations in the alpha-galactosidase A gene in families with Fabry disease. *Hum Mol Genet* 3: 503-5, 1994
- 52) Topaloglu AK, Ashley GA, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, Desnick RJ. Twenty novel mutations in the alpha-galactosidase A gene causing Fabry disease. *Mol Med* 5: 806-11, 1999
- 53) Ashton-Prolla P, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, Desnick RJ. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *J Invest Med* 48: 227-35, 2000
- 54) Rosenberg KM, Schiffmann R, Kaneski C, Brady RO, Sorensen SA, Hasholt L. Five novel mutations in fourteen patients with Fabry Disease. *Hum Mutat* (Online) 15: 207-8, 2000
- 55) Kase R, Bierfreund U, Klein A, Kolter T, Utsumi K, Itoha K, Sandhoff K, Sakuraba H. Characterization of two alpha-galactosidase mutants (Q279E and R301Q) found in an atypical variant of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta* 1501: 227-35, 2000
- 56) Ishii S, Sakuraba H, Suzuki Y. Point mutations in the upstream region of the alpha-galactosidase A gene exon 6 in an atypical variant of Fabry disease. *Hum Genet* 89: 29-32, 1992
- 57) Fitzmaurice TF, Desnick RJ, Bishop DF. Human alpha-galactosidase A: high plasma activity expressed by the -30G->A allele. *J Inher Metab Dis* 20: 643-57, 1997
- 58) Ishii S, Suzuki Y, Fan JQ. Role of Ser-65 in the activity of alpha-galactosidase A: characterization of a point mutation (S65T) detected in a patient with Fabry disease. *Arch Biochem Biophys* 377: 228-33, 2000
- 59) Beyer EM, Karpova EA, Udalova OV, Ploos van Amstel JK, van Diggelen OP, Tsvetkova IV. The multiple cases of Fabry disease in a Russian family caused by an E341K amino acid substitution in the alpha-galactosidase A. *Clin Chim Acta* 280: 81-9, 1999
- 60) Ledvinova J, Poupetova H, Hanackova A, Pisacka M, Elleder M. Blood group B glycosphingolipids in alpha-galactosidase deficiency (Fabry disease): influence of secretor status. *Biochim Biophys Acta* 1345: 180-7, 1997
- 61) Schiffmann R, Murray GJ, Treco D, Daniel P, Sello-Moura M, Myers M, Quirk JM, Zirzow GC, Borowski M, Loveday K, Anderson T, Gillespie F, Oliver KL, Jeffries NO, Doo E, Liang TJ, Kreps C, Gunter K, Frei K, Crutchfield K, Selden RF, Brady RO. Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 365-70, 2000
- 62) Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, Caplan L, Linthorst GE, Desnick RJ. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 345: 9-16, 2001

Fabry disease in patients with end-stage renal disease Hisao Mutoh, Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Division of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. J. J. Med Soc., 111, 35 — 43 (2002)

Key words atypical Fabry disease, end-stage renal disease, α -galactosidase A activity, point mutation

Abstract

Fabry disease is an X-linked disorder resulting from a deficiency of lysosomal α -galactosidase A. Renal insufficiency is one of the most important manifestations and affects the prognosis of the patients. In the present study we clarified the incidence of Fabry disease in patients with end-stage renal disease. We measured plasma α -galactosidase A activity in unselected 254 patients (male 156, female 98), including 20 patients with undiagnosed underlying diseases. Twelve patients (male 6, female 6) had low plasma α -galactosidase A activity, and their clinical manifestations were assessed and the leukocyte α -galactosidase A activities were investigated. Eight (male 5, female 3) of these 12 patients had low leukocyte α -galactosidase A activity and were screened for mutations in the α -galactosidase A gene. DNA regions of the α -galactosidase A gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the respective primer sets. The PCR products were sequenced by the fluorescent dye deoxy-terminator cycle sequencing method. One male patient had an A to T transition at codon 156 (A156T), and another male patient had a V to E transition at codon 339 (V339E) which has not been reported before. These point mutations were not detected in 100 control haplotypes. We deduced that A156T caused typical Fabry disease and V339E caused an atypical form without manifestation except renal involvement. Two male patients with Fabry disease were found among unselected 254 patients with end-stage renal disease, and we diagnosed one patient whose etiological disease had been thought for chronic glomerulonephritis as atypical Fabry disease. Fabry disease should be considered in the etiology of unexplained end-stage renal disease.