

皮膚生検と腎生検の IV 型コラーゲン染色でどこまでアルポート症候群は診断できるか

2005.1.7 2005.1.25 2005.2.5 2005.2.16 2005.2.2 2005.8.24 2008.10.25 改訂

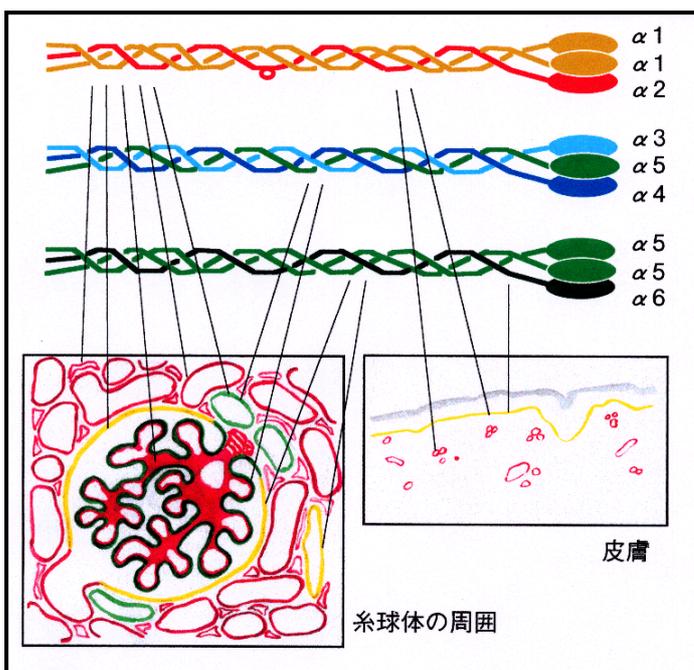
重井医学研究所免疫部門 佐渡義一

IV 型コラーゲンの遺伝性異常症であるアルポート症候群 (Alport syndrome; Alport s syndrome) の診断は Flinter の診断基準 (1987) と Gregory の診断基準 (1996) がある。Flinter の基準は臨床症状のみでできている。一方 Gregory の基準は原因遺伝子が IV 型 (4 型) コラーゲン遺伝子であることが明らかになってから作られたため、臨床症状に加えて、遺伝子の異常、遺伝子から産生される蛋白質の異常を検出する分子遺伝学的診断が付け加えられている。特に遺伝子レベルの異常が確認されれば家族歴、血尿、蛋白尿の異常がない場合でもアルポート症候群 (IV 型コラーゲン遺伝子異常症) と診断される。同様に、組織切片を用いて、遺伝子の産物である IV 型コラーゲンの染色を行い、特有の変化が認められたならば、遺伝子の異常を確認しなくともアルポート症候群と診断される。

アルポート症候群の診断においては、遺伝子の検査に比べ、切片染色による方法は簡単で、費用が少なくすむため中心的な役割をもつ。切片を染色する方法の理論的背景とこの方法の限界を理解して正しい診断を行う必要があること、さらに、アルポート症候群の疑いがある症例に初めて対応する場合の疑問と質問に答えるために本稿を作成した。

IV型コラーゲンには6種類の鎖と3種類の分子が存在する

腎臓の基底膜は IV 型コラーゲンからできている。IV 型コラーゲン分子はロープ状の分子で3本の鎖が三重らせんを巻いている。鎖の種類は6種類であり、生体の基底膜を形成する IV 型コラーゲン分子は下図の3種類のみである。

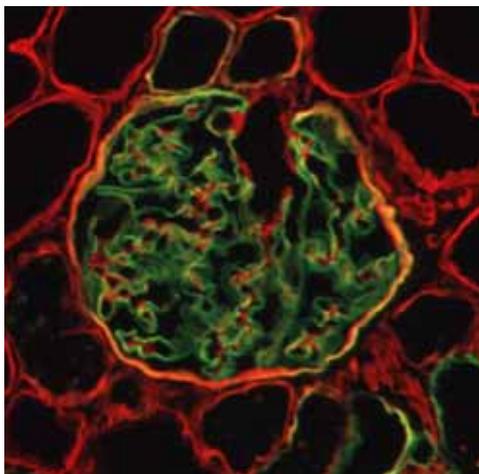


- 1) 1- 1- 2 分子
- 2) 3- 4- 5 分子
- 3) 5- 5- 6 分子である。

偶数鎖、すなわち、2 鎖、4 鎖、6 鎖に注目すると、これらの鎖と組み合わせられる奇数鎖の鎖が決まっていると理解される。

(図 IV 型コラーゲン 鎖の組み合わせと腎臓、皮膚基底膜での分布)

アルポート症候群の原因遺伝子は 3 鎖、4 鎖、5 鎖の遺伝子である



糸球体基底膜 (GBM) は左の写真のように 3- 4- 5 分子 (緑) の厚い層と 1- 1- 2 分子 (赤) の薄い層からできている。1- 1- 2 分子は内皮側の層であり、これがメサングウムマトリックスに連続的に移行している。GBM の主成分が 3- 4- 5 分子であるためこの分子を構成する 3、4、5 鎖遺伝子に起きた異常がアルポート症候群の原因になっている。(図 正常腎臓の 2 鎖 (赤) と 5 鎖 (緑) の二重染色 (蛍光顕微鏡写真)。赤と緑の蛍光が重なった部分は光の三原色の法則に従い、橙色から黄色になる。5 鎖が GBM、ボウマン嚢基底膜、一部の尿細管基底膜にあることがわかる。)

3 鎖と 4 鎖の遺伝子は常染色体上にあるため、変異を持った遺伝子がホモにならない限りアルポート症候群 (常染色体劣性遺伝) は発症しない。したがって、発症率は極めて低い。

5 鎖の遺伝子は X 染色体上にあるため、変異を持った遺伝子は X 染色体性 (伴性) 遺伝の型をとる。すなわち、男性では遺伝子が 1 個しかないため、遺伝子の影響がすぐに現れる。女性では X 染色体が 2 個あるが、細胞内ではどちらかの X 染色体がランダムに不活性化される。このため正常遺伝子が発現している部位と異常遺伝子が発現している部位がからだ全体にモザイク状態で存在する。これに伴い蛋白質の発現もモザイク状態で見られる。

アルポート症候群の始まり

アルポート症候群は 3 鎖、4 鎖、5 鎖の遺伝子に異常が起きるところから始まる。

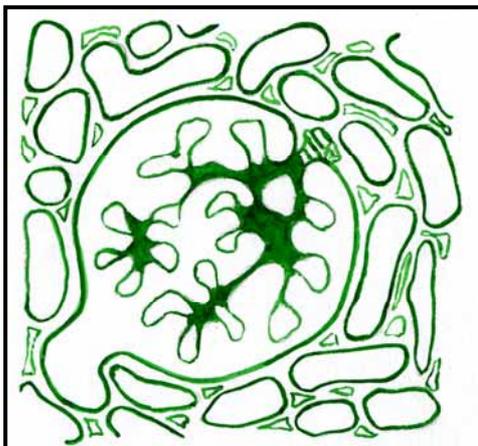
3 鎖または 4 鎖に突然変異が起きても遺伝子は 1 対あるため、直接症状を表すことはない。異常をもった遺伝子が子孫に伝えられ、異常をもつ遺伝子がホモになって初めてアルポート症候群の症状を示す患者が現れる。

これに対して、5 鎖の遺伝子に突然変異が起きた場合は、すぐに影響が現れる。両親のどちらにも 5 鎖遺伝子に異常がない男性孤発例では 3 鎖から 6 鎖蛋白質がモザイク状態で発現する。胎児発生の初期に一部の細胞に 5 鎖の突然変異が起き、正常の 5 鎖遺伝子をもつ細胞と変異をもつ細胞がからだ全体にモザイク状態に分布するためと思われる。変異をもつ細胞が生殖系列にあると子孫に遺伝子が伝えられる。

両親のどちらにも 5 鎖遺伝子に異常がない女性孤発例では 3 鎖から 6 鎖蛋白質がモザイク状態で発現すると考えられる。女性孤発例は遺伝性のアルポート症候群と同様にモザイク状態であると考えられる。変異をもつ細胞が生殖系列にあると子孫に遺伝子が伝えられる。

各 鎖染色は何を染色しているのか

1) 1 鎖と 2 鎖

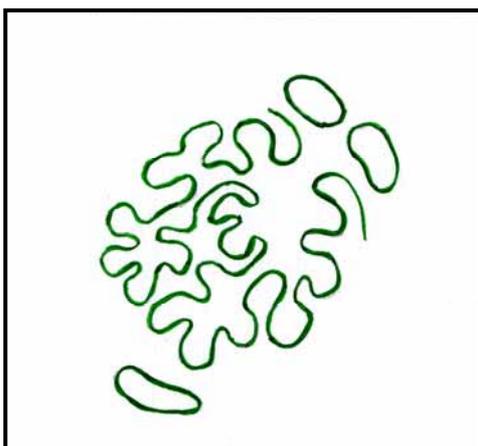


抗 1 鎖抗体と抗 2 鎖抗体の染色は同じパターンである。1- 1- 2 分子の存在場所を示している。正常ではGBMの内皮側、メサンギウムマトリックス、ポウマン嚢基底膜、尿細管基底膜、毛細血管の基底膜など全身の基底膜が染色される。

1- 1- 2 分子の遺伝子異常はいままでに報告されていない。これはこの分子の非常に重要な働きをしている部位に変異が起きた場合は致命的であるためと考えられる。また、重要ではない部位に起きた変異があるはずであるが 1 鎖、2 鎖の変異と結びつ

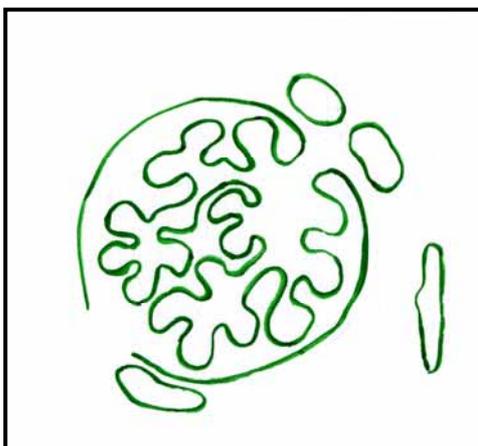
けるのは難しいと考えられる。

2) 3 鎖と 4 鎖



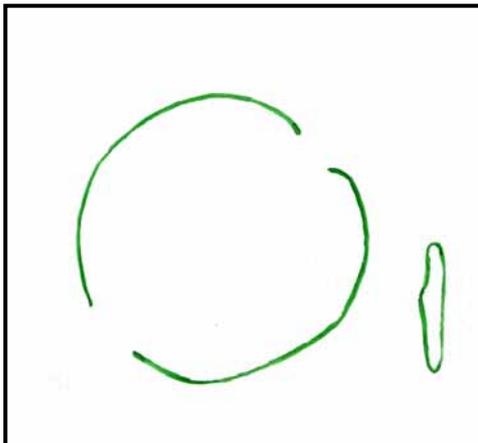
抗 3 鎖抗体と抗 4 鎖抗体の染色は同じパターンである。3- 4- 5 分子の存在場所を示している。正常では GBM、ポウマン嚢基底膜の血管極側、一部の尿細管基底膜が染色される。アルポート症候群では GBM の 3 鎖と 4 鎖蛋白質が欠損または染色の低下が認められる。このことから 3 鎖染色または 4 鎖染色で異常が認められるとアルポート症候群と診断される。抗 3 鎖抗体の染色と抗 4 鎖抗体の染色は同一であるためどちらか一方を行えばよい。

3) 5 鎖



抗 5 鎖抗体の染色は 3- 4- 5 分子と 5- 5- 6 分子の 2 種類の分子を染色するため、すこし複雑である。正常ではGBM(3- 4- 5 分子)、ポウマン嚢基底膜が全周性(5- 5- 6 分子)に、また一部の尿細管基底膜(3- 4- 5 分子と 5- 5- 6 分子)が染色される。腎臓以外では皮膚基底膜を含む体表面の基底膜に 5- 5- 6 分子が存在している。このことから、抗 5 鎖蛋白質の有無を皮膚基底膜の染色でも検査できる。アルポート症候群では特有の変化が認められる。

4) 6鎖



抗6鎖抗体の染色は5-5-6分子のみを染色する。このため、糸球体基底膜はまったく染色しないが、ボウマン嚢基底膜を全周性に、一部の尿細管基底膜を染色する。腎臓以外では皮膚基底膜を含む体表面の基底膜に5-5-6分子が存在している。アルポート症候群では特有の変化が認められる。

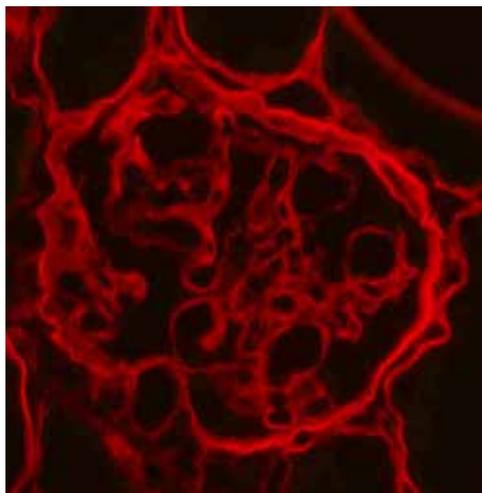
(注意:糸球体の中にはボウマン嚢の5-5-6分子が少ないものも存在している。)

アルポート症候群では遺伝型式に応じた3鎖から6鎖蛋白質に異常が認められる

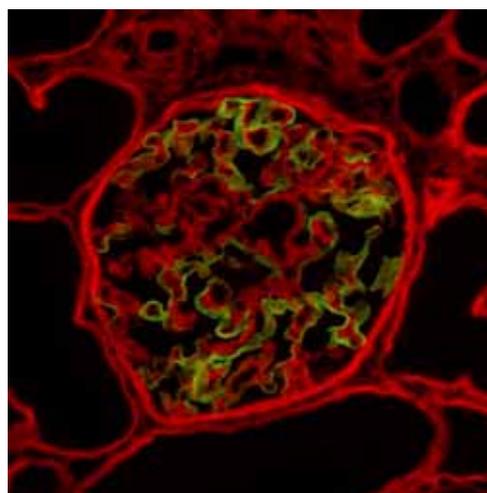
X染色体上の5鎖遺伝子の変異によるアルポート症候群が圧倒的に多い。遺伝子がX染色体に存在しているため男性の場合はすぐに遺伝子変異の影響がでる。女性の場合も遺伝子の影響がモザイク状態で発現するため、血尿、蛋白尿などの症状が現れることが多い。

5鎖遺伝子の異常

1) 5鎖蛋白質が産生されないケースはX染色体性アルポート症候群の約半数を占めていると考えられている。このケースは4型コラーゲンの染色で容易に診断ができる。それは5鎖蛋白質がまったくないため、3-4-5分子ができない。また、5-5-6分子もできない。このため男性では腎臓から3鎖から6鎖の染色が完全に消失(欠損)する。女性では3鎖から6鎖の染色が不連続モザイクとなり、正常との違いが一目瞭然だからである。

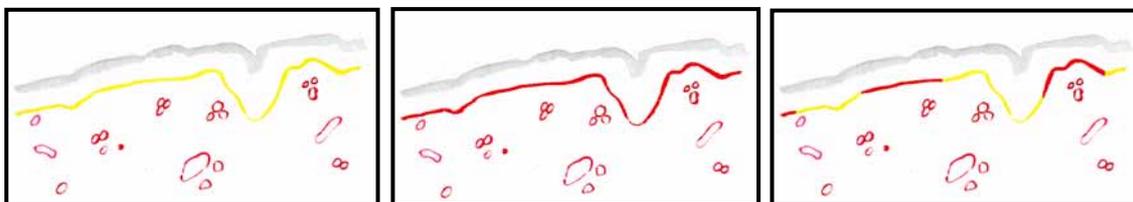


アルポート症候群、男性
2鎖(赤)と 5鎖(緑)の二重染色。
5鎖蛋白質が欠損のため緑の蛍光
が認められない。



アルポート症候群、女性
2鎖(赤)と 5鎖(緑)の二重染色。
5鎖蛋白質が一部欠損のため緑の
蛍光がモザイク状態に認められる。

皮膚基底膜においても 5鎖と 6鎖が男性の場合は染色が完全に消失する。女性ではモザイクとなる(下図)。染色の異常の発見は容易である。



正常皮膚 アルポート症候群、男性皮膚 アルポート症候群、女性皮膚
2鎖(赤)と 5鎖(緑)の二重染色(模式図)。 2鎖と 5鎖の両方の蛍光が重なるところは
黄色の蛍光になる。

2) 5鎖蛋白質は産生されるが正常より少ないケースはX染色体性アルポート症候群の半数程度あると考えている。この場合は 3- 4- 5分子が減少する。また、5- 5- 6分子も減少する。このため男性では腎臓から 3鎖から 6鎖の染色が正常に比べ弱くなる。女性では 3鎖から 6鎖の染色が強弱モザイクとなる。染色強度が正常と明らかな差がある場合は異常の判定が容易であるが、正常に近い場合は難しい。正常に近い染色で、5鎖遺伝子の異常によると強く疑われる場合は 5鎖遺伝子の解析が必要になる。

皮膚基底膜においては 5鎖と 6鎖が男性の場合は染色が正常より弱くなると考えられる。しかし、染色の強弱を判定することは結構難しいため、染色は弱いと思うけれどもアルポート症候群であるという確定診断は出来ない。女性では強弱モザイクになると考えられるがやはり判定が

難しいと考えられる。X染色体性アルポート症候群の半分程度は皮膚染色では確定診断に至らないと考えられる。

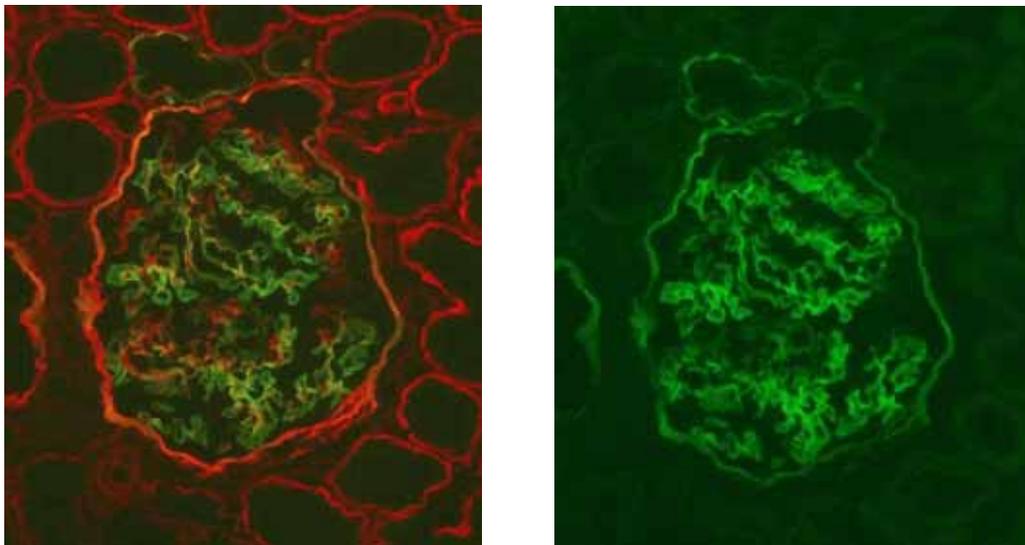


図 アルポート症候群、女性

2鎖(赤)と 5鎖(緑)の二重染色。左は赤と緑を同時に撮影。右は緑のみを撮影。
5鎖蛋白質の染色が低下しているためモザイク見える。5鎖(緑の蛍光)を強調するとモザイクながら GBM、ポウマン嚢基底膜の染色は連続している。

5鎖蛋白質がまったく産生されないケースと産生されるが正常より少ないケースの比率であるが、重井医学研究所に染色依頼のあった症例 24 例ではほぼ同数であった。

5鎖蛋白質が正常より少ない場合においてはポウマン嚢基底膜の 5鎖、6鎖が普通の強度で染色されることも数例に認められた。この場合は 5鎖遺伝子に起きた突然変異は 3鎖-4鎖-5鎖の分子を形成するには問題があるが、5鎖-5鎖-6鎖分子はあまり問題なく形成されると考えられる。常染色体劣性遺伝形式のアルポート症候群との鑑別では家族歴、遺伝子解析を考慮すること。3鎖-4鎖-5鎖分子がすこしでも染色される場合は X染色体性アルポート症候群の可能性のあることを忘れないでほしい。

3鎖遺伝子、または、4鎖遺伝子の異常

変異した 3鎖遺伝子がホモの状態になった場合、または、変異した 4鎖遺伝子がホモの状態になった場合は常染色体劣性型式のアルポート症候群が発症する。この場合は 3鎖蛋白質、または、4鎖蛋白質ができないため、3-4-5分子ができない。このため、GBMから 3鎖、4鎖、5鎖染色がなくなる。しかし、5-5-6分子はできるので、ポウマン嚢基底膜、一部の尿細管基底膜の染色は陽性となる(下図)。5鎖染色にもかかわらず 6鎖染色パターンで染色されるときは常染色体劣性型式のアルポート症候群ということになる。皮膚基底膜の 5鎖と

6 鎖染色は陽性であるため、この型式のアルポート症候群は皮膚基底膜の染色では診断できない。

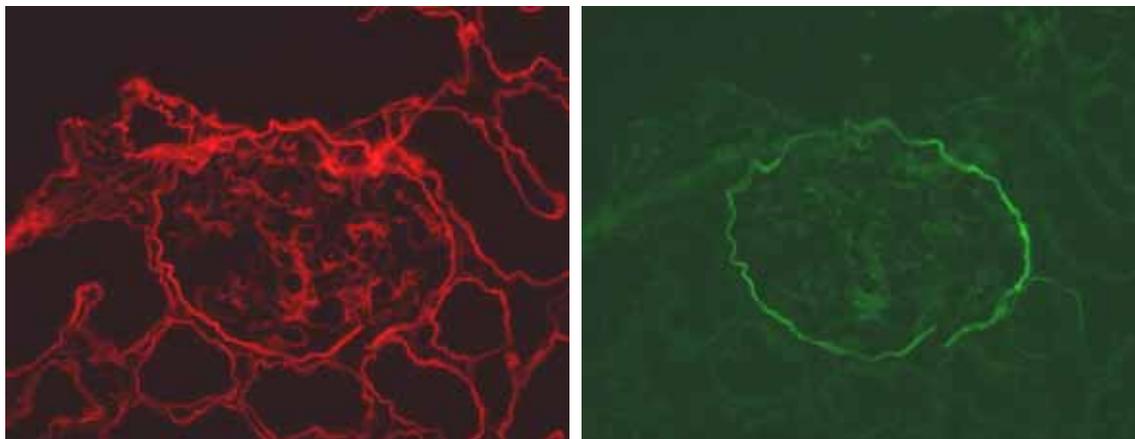


図 アルポート症候群、男性、常染色体劣性遺伝型式

2 鎖 (赤) と 5 鎖 (緑) の染色。左は赤のみを撮影。右は緑のみを撮影。

5 鎖蛋白質の染色は GBM では欠損しているが、ポウマン嚢基底膜は認められる。

6 鎖遺伝子の異常

6 鎖の遺伝子のみ異常は知られていない。これは 6 鎖遺伝子のみ異常はアルポート症候群の症状を示さないためと考えられる。5 鎖と 6 鎖遺伝子は隣り合わせにいるため、両方に異常がある症例は知られている。

6 鎖遺伝子のみ異常の報告例は未だない。この場合、皮膚染色で 5 鎖、または 6 鎖を染色した場合、5 鎖と 6 鎖蛋白質の染色異常が考えられる。男性では染色されない、女性ではモザイクパターンになると思われる。血尿、アルポート症候群の家族歴などがあればアルポート症候群と診断されるが、これらの症状がない場合は 6 鎖のみの遺伝子異常の可能性がかなり高い。腎臓染色では、糸球体基底膜には異常がないにもかかわらず、男性ではポウマン嚢基底膜が 5 鎖染色されない、女性ではポウマン嚢基底膜の 5 鎖染色がモザイクになると思われる。腎炎の疑いで腎生検を行い、5 鎖染色をした場合に偶然、このような染色パターンに出会うと考えられる。もしこのような経験をされたときは重井医学研究所までご連絡いただければ正確な鎖解析に協力させていただきます。

抗体染色によって必ず診断ができるか

抗 鎖抗体染色によってすべてのアルポート症候群が診断できるわけではない。診断ができる場合はアルポート症候群に特有の変化が認められた場合のみである。アルポート症候群の 90% 程度は診断が可能と思われるが正確な数値ではない。大切なことは抗 鎖抗体染色によって診断できないアルポート症候群があることである。

この場合の典型と考えられるのは 5 鎖遺伝子の変異で、1 塩基置換が起き、これにより 1 アミ

ノ酸置換が起きる場合である。このとき、蛋白質産生には問題がないため染色では異常が検出できない。しかし、アミノ酸置換により、蛋白質の機能の一部が失われ、アルポート症候群の症状を呈する場合である。また、スプライシング(サイト)変異でも染色異常が検出、確定できない場合もあると思われる。

また、3鎖遺伝子、または、4鎖遺伝子に優性遺伝型式の変異が起きた場合も蛋白質産生には問題がないため抗鎖抗体染色では異常が検出できない可能性が高い。

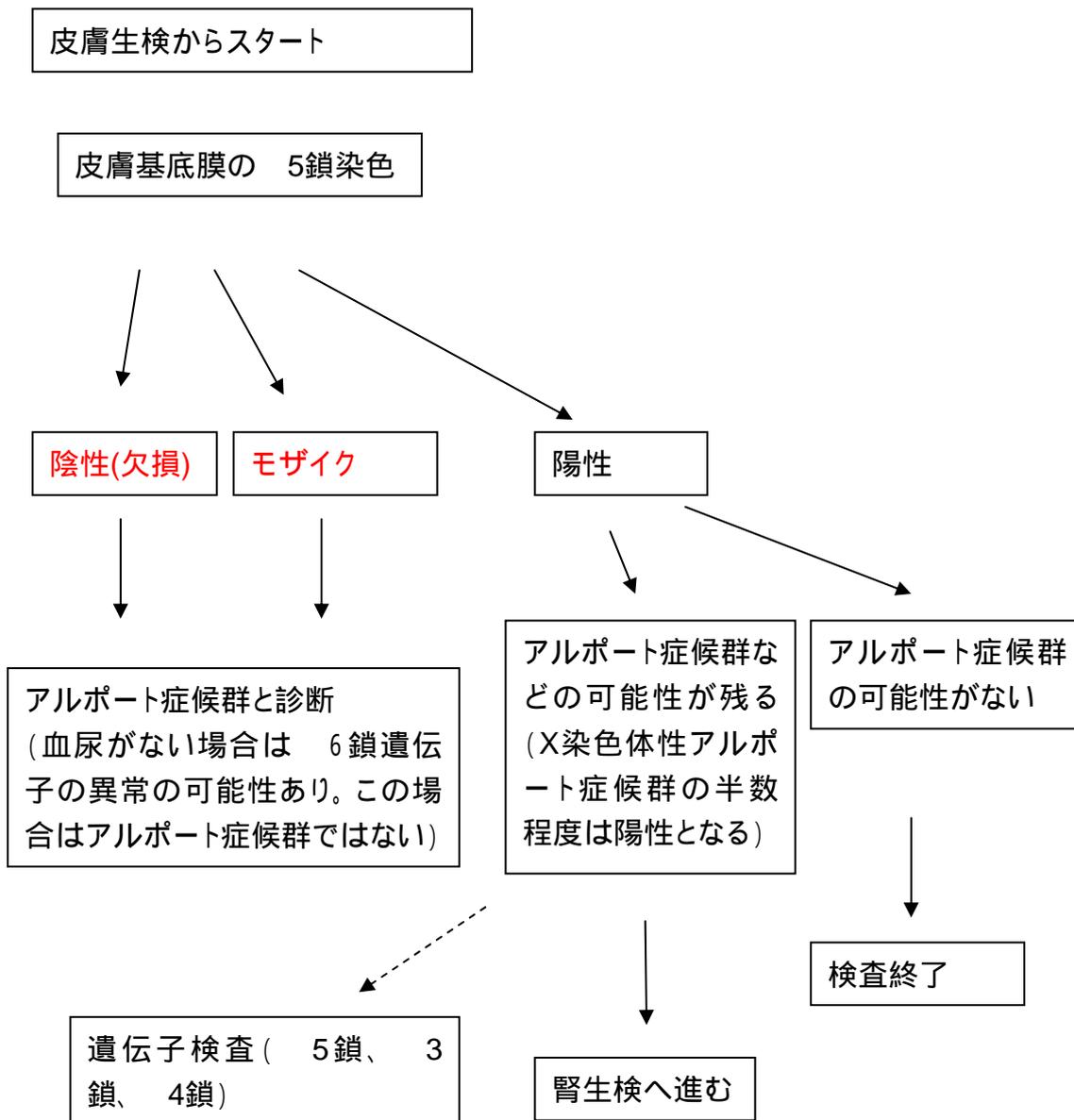
アルポート症候群を染色で診断する場合のチャート

以上のことを理解したうえで、鎖染色でアルポート症候群の診断を行う場合を続く2ページのチャートで示した。皮膚生検からスタートしても、腎生検からスタートしても、IV型コラーゲンの3鎖から6鎖にアルポート症候群特有の変化が確認できた場合に限り、アルポート症候群の診断が確定する。

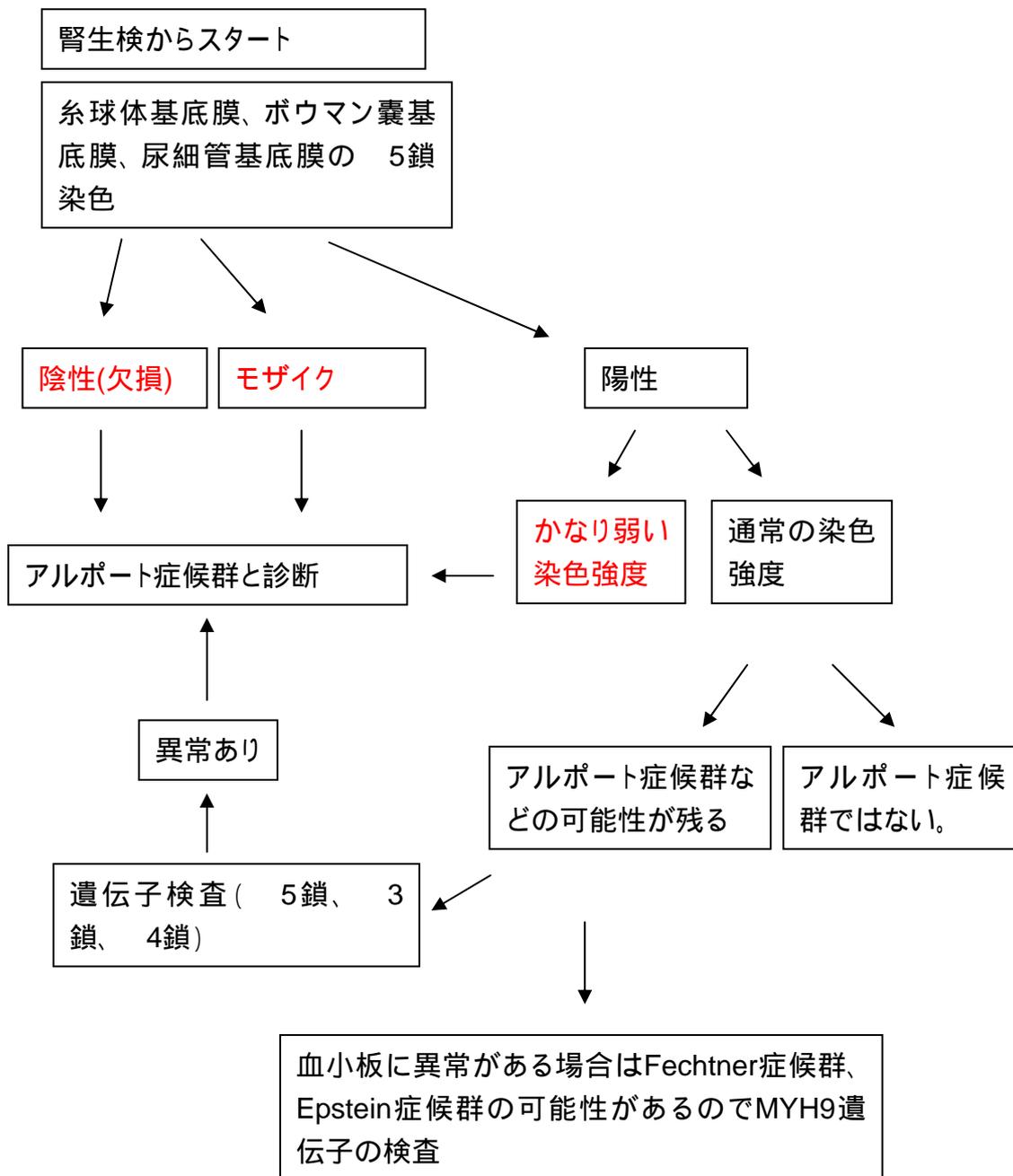
アルポート症候群と鑑別診断が必要な疾患として菲薄基底膜病(Thin basement membrane disease)、Fechtner症候群、Epstein症候群がある。これらの場合はIV型コラーゲンの鎖染色は正常である。菲薄基底膜病の診断には電子顕微鏡による検査でGBMが通常より薄いことを確認する必要がある。また、巨大血小板血症を伴うFechtner症候群、Epstein症候群ではMY9H遺伝子の遺伝子検査が必要である。

診断の理論とは直接関係がないが切片染色の状態が悪いものはさらに診断ができないことが多くなる。腎生検、皮膚生検の組織は慎重に取り扱って欲しい。組織はOCTコンパウンドに包埋して、必ず液体窒素を用いて瞬間的に凍結し、4μmに薄切した切片は新鮮なうちに染色する必要がある。凍結までに固定液、アルコールなどに組織が触れると抗原が変性する。また、ドライアイスアセトン、ドライアイスアルコールで凍結した場合は凍結速度が遅いため、糸球体、尿細管が萎縮するため、基底膜が波打ってしまう。

アルポート症候群の疑い



アルポート症候群の疑い



質問コーナー (よくあるご質問)

質問 1. 5 鎖蛋白に異常があり X 染色体性(伴性遺伝型)アルポート症候群であることがわかりましたが 3 鎖と 4 鎖の染色を行う必要があるでしょうか。

答え: 明らかな 5 鎖の異常があればアルポート症候群と診断できます。3 鎖と 4 鎖の染色は必要ありません。ただし、次のような場合は 1 鎖から 6 鎖の染色、または、必要な 鎖の染色をお勧めします。

- 1) 研究的見地から症例として報告価値があるかもしれない場合。
- 2) 教育的見地から IV 型コラーゲン 鎖の組織分布を確認したい場合。
- 3) 染色に不安がある場合の確認。

質問 2. 蛍光色素を標識した抗体の染色がいまひとつ良くありません。どうしてでしょうか。

答え: 市販されている抗体は新鮮な凍結切片を染色用に調製されています。新鮮な凍結切片とは腎生検試料を速やかに OCT コンパウンドに包埋して液体窒素瞬間的に凍結したもの(ドライアイス-アセトン法で凍結したものは劣る)を、クリオスタット内で 4 μm に薄切し、速やかにドライヤーの冷風を用いて乾燥したものです。室温での保存は夏であれば半日以内、冬であれば 1 日以内の状態を想定しています。冷蔵または冷凍保存する場合は密閉容器に入れます。冷蔵または冷凍から室温に戻すときは必ず試料が入った密閉容器をさらにポリエチレン等の袋に入れて封をし、室温に出して、温度が平衡に達してから密閉容器から出すことです。冷蔵保存では数日、冷凍保存(マイナス 80 度)では数週間は安心して保存できます。

切片の状態が悪くないと考えられる場合はもう一度保存してある凍結試料から切片を作製して染色するのがベストです。

切片の状態は良く、5 鎖の染色も良い場合は通常はアルポート症候群でないと考えられます。しかし、それでも、アルポート症候群の可能性が依然として残る場合は、重井医学研究所の担当者(sado@shigei.or.jp)に e メールで相談するのもよいでしょう。

質問 3. 冷凍保存してあった薄切腎臓試料を蛍光色素標識した抗体で染色しましたが、染色の状態がいまひとつ良くありません。どうにかできないでしょうか。

答え: この場合は切片を酸性処理してから染色しますと、染色できる場合があります。酸性処理とは 0.1M HCl と 0.1M KCl を 1:1 で混ぜた液を 10 分間切片の上に載せます。処理後生理的食塩水(PBS)で切片をよく洗い、10% ヤギ血清を用いてブロッキングを行い、蛍光標識抗体を 1 時間反応させて染色します。

質問 4. 凍結試料はないのですがパラフィン包埋組織ならばあります。パラフィン切片で 鎖の染色はできないのでしょうか。と言いますのは電顕所見からはアルポート症候群が強く疑えるものからです。

答え: 蛍光色素標識した抗体を用いての染色はできません。しかし、パラフィン切片に酸性熱処理

を行い、抗原を賦活する方法を用いるとたいいてい場合は染色できます。

パラフィン切片を貼ったスライドグラスを 0.2M HCl に入れ、115 度から 127 度のオートクレーブ処理を行うことにより抗原が賦活します。抗原が賦活する温度は試料ごとに異なりますので適正温度を探する必要があります。抗原を賦活後はそれぞれの鎖に対する抗体(H11, H22, H31, H43, H53, H63)を反応させ、Dako 社の LSAB キットを用いて染色します。この方法は熟練と手間を必要とします。また、染色方法に不安定なところがあるため、切片染色を読むのにも経験が必要です。

1 鎖と 2 鎖の染色がきちんと得られるにもかかわらず、3 鎖、4 鎖、5 鎖、6 鎖が染色されない場合、また、これらの鎖染色にモザイクが確認される場合はアルポート症候群と診断されます。

質問 5 . 蛍光色素標識した抗体を用いて染色を行いましたが、初めてなので、診断に迷っています。染色の見本のようなものはないのでしょうか。

答え : 重井医学研究所が販売しているアルポート症候群研究用試薬を用いて腎臓凍結切片ならびに皮膚凍結切片を染色した例が重井医学研究所の研究紹介(研究者向け)のホームページに染色の例(PDF ファイル)が載っています。参考にして下さい。

質問 6 . アルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体の以外の IV 型コラーゲン 鎖のモノクローナル抗体は市販しているのでしょうか。

答え : 重井医学研究所から発売している抗体はアルポート症候群研究用蛍光色素標識抗体と 5 鎖抗体(H52、コスモバイオ取り扱い)だけです。

質問 7 . アルポート症候群の疑いがある患者様の診断を考えていますが IV 型コラーゲンの鎖解析を重井医学研究所に頼めないでしょうか。

答え : できるといいですね。研究的価値の高いと考えらるものは是非相談してください。

質問 8 . 皮膚生検を行い、凍結切片を作製して、重井医学研究所の二重染色用の試薬で染色しました。染色が薄いように思われます。どうすればよいでしょうか。

答え : アルポート症候群と診断するには明らかな 5 鎖染色が陰性であること、または、明らかなモザイクであることを確認しなければなりません。皮膚の基底膜が薄く、染色の判断が難しい場合があります。このような場合は 5 鎖抗体(H52、コスモバイオ取り扱い)を用いて間接蛍光抗体法で染色するとよいでしょう。直接法より染色が強くなります。また、重井医学研究所の担当者(sado@shigei.or.jp)に e メールで相談するのもよいでしょう。

* * * * *