

C4 遺伝子の変異と腎疾患との関連について

* 阿部 淳、* 香坂 隆夫、* 小林 登

良性家族性血尿の24家系93名についてSouthern analysis を行った結果、11家系27名においてC4 遺伝子の欠損が認められた。IgA腎症、紫斑病性腎炎の患者群にもC4 遺伝子の変異が高頻度に見られることから、これらの疾患群における共通の遺伝マーカー (extendedハプロタイプ) として、今後検討を進める予定である。

C4 欠損症、IgA腎症、紫斑病性腎炎、良性家族性血尿
遺伝子欠損、MHCクラスⅢ抗原、遺伝子多型 (RFLP)

1. はじめに

近年、補体蛋白および遺伝子の解析からC2、B因子、C4A、C4Bの遺伝子がヒト6番染色体のMHC (主要組織適合性抗原) 領域に位置することが明らかとなり、MHCクラスⅢ抗原と呼称されている。またC4蛋白は、電気泳動によって多様なアロタイプを示すことから、他のMHCクラスI、II抗原と並ぶ遺伝マーカー (extendedハプロタイプ) として、種々の疾患との相関が報告されてきた。¹⁾ この中で興味ある事実は、C4Q0 (null allele) と種々の腎炎や自己免疫性疾患との関連である。先天性補体欠損症、とくにC1、C2、C4といったclassical pathway の成分欠損症で、膜性増殖性腎炎 (MPGN) や全身性エリテマトーデス (SLE) の

合併頻度の高いことは、既に種々の報告があるが、C4の部分欠損症ともいえるC4 null allele との関連が報告されているのは、SLE、Sjögren 症候群、若年性糖尿病 (IDDM) などの自己免疫性疾患のほか、IgA腎症、紫斑病性腎炎、良性家族性血尿などの腎疾患である。²⁾³⁾⁴⁾

これらの疾患において、C4 null allele が直接に発症と関連しているという証明は未だなされていないが、C4の多様な機能 (免疫複合体との結合による可溶化および除去への関わり、ウイルス感染防御への関わりなど) を考えるならば、C4 null allele によって生じると考えられる免疫系の異常と、これらの疾患との関連を追求することは重要である。

一方、C4 null allele を他の

* 国立小児病院、* 小児医療研究センター

MHC抗原遺伝子との連鎖という面から考えることも重要である。SLEのモデル動物ともいえるNZBマウスにおいて、発症を支配する遺伝子の一つがMHC領域にあることは既に知られているが、近年、IDDMの発症とMHCクラスII抗原であるDQβ鎖のアミノ酸配列との密接な関連が示唆されている。⁵⁾ またIgA腎症についても、昨年度の日本腎臓病学会でDQw4との関連や(比企ほか、1988)、患者家族の培養リンパ球におけるIgAの産生亢進が(宮崎ほか、1988)報告されるなど、免疫応答遺伝因子と腎炎発症との関係が注目されている。C4遺伝子は、MHC領域の中でも免疫応答に直接関与しているクラスII抗原の遺伝子に最も近接した位置にあり、この点からもAlperらの提唱した”extendedハプロタイプ”としてのC4の分析の重要性は増しているといえよう。

我々は以上の経過から、先ず上記3つの腎疾患(IgA腎症、紫斑病性腎炎、良性家族性血尿)におけるC4遺伝子の変異の有無について明らかにすることにした。その結果、良性家族性血尿の家系においてC4遺伝子の欠損の頻度が高いこと、また同様の傾向がIgA腎症および紫斑病性腎炎の患者群で見られることが明らかになった。今後、症例数を増やすと共に、C4アイソタイプ(A・B)間の比の測定や、MHCの他の抗原分子との連鎖の検定など、更に検討を続ける予定だが、今回は上記の結果について報告することにした。

2. 方法

1) 対象

良性家族性血尿の24家系93名を対象とした。1年間の経過観察中、常に尿沈査で5個/視野以上の赤血球が認められた者を発端者とし、家族の検尿で5個/視野以上の微少血尿が認められた家系を、良性家族性血尿と診断した。

2) 血清C4値の測定

血清中のC4蛋白の定量は、ヤギ抗ヒトC4抗体を用いて免疫比濁法にて行った。

3) DNA抽出とSouthern analysis

ヘパリン化末梢血10mlより遠心分離した白血球から、Maniatisらの方法⁶⁾によりDNAを抽出した。

DNA 4μgを制限酵素TaqIで処理し、0.7%アガロースゲルで電気泳動後、ニトロセルロースフィルターにblotした。Hybridizationは、6xSSC、10mMEDTA、0.1%SDS、5xDenhart's solution、100μg/ml salmon sperm DNA、³²P-labeledDNAプローブを含む溶液中で、65°Cの条件下で行った。Autoradiographyは-80°Cで3日間行い、バンド濃度をdensitometerで測定した。

4) cDNAプローブ

C4のcDNAプローブは、JCRB遺伝子バンクより提供を受けたクローンpAT-A(Carroll, et al⁷⁾)の5'端約500bpをsubcloningして使用した。また、C4遺伝子に隣接するSteroid 21-Hydroxylase遺伝子についても、癌研生化学部の藤井氏より恵与いただいたgenomic DNAクローン⁸⁾を用いて、

C 4 と同時に検索した。

3. 結果

1) C 4 遺伝子の多型 (RFLP)

図1、表1にTaqIおよびEcoRIで処理した場合に得られるC 4 遺伝子の多型パターンと、その出現頻度を示した。C 4 A 遺伝子とC 4 B 遺伝子とは塩基配列の点で非常に相同性が高いため、通常のHybridization 法では分別は困難だが、5' 端のプロンプを用いることにより、C 4 A 遺伝子はTaqIで7 kb、C 4 B 遺伝子はTaqIで6.0kb and/or 5.4kbに分かれることが知られている。⁹⁾ C 4 B の2種類のバンドは、イントロン部の欠失により生じたもので、いわゆる多型 (RFLP) である。¹⁰⁾ また、まれに認められる6.4kb のバンドは、我々の検討の結果では、C 4 A・B 遺伝子間のrecombination により生じたものと考えられた。¹¹⁾

図1 RFLP patterns of C4 genes

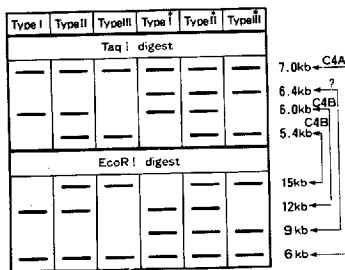


表1

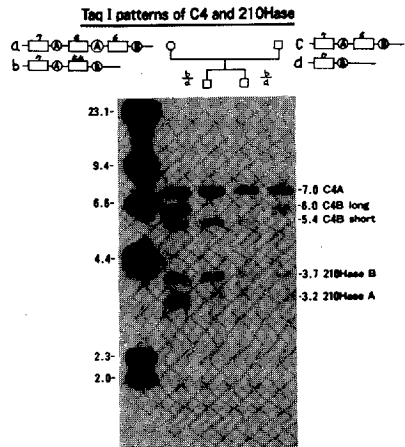
Frequency of C4 polymorphisms (TaqI digestion)

Type	I	II	III	I*	II*	III*	IV
Taq I 7.0 (C4A)	—	—	—	—	—	—	—
6.4 (?)	—	—	—	—	—	—	—
6.0 (C4B long)	—	—	—	—	—	—	—
5.4 (C4B short)	—	—	—	—	—	—	—
total 137	53	56	19	1	2	5	1
%	38.7%	40.9	13.9	0.7	1.5	3.6	0.7
correct 76	28	36	8	1	1	2	0
%	36.8%	47.4	10.5	1.3	1.3	2.6	0

2) C 4 遺伝子欠損・重複の検出

C 4 遺伝子の欠損及び重複は、C 4 A・B に相当するバンドの濃度比および各バンドの家系内での遺伝パターンを参考にして決定した。実例を図2に示す。

図2



通常、C 4 およびSteroid 21-Hydroxylase ともに、A : B のバンド比は1 : 1となる。しかし、A・B のどちらか片方が欠損した場合、そのバンド比は遺伝子量を反映して、2 : 1または1 : 2となる。図2のハプロタイプdがこれに相当し、dハプロタイプを持つ父親と2人の子供のC 4 B バンド (6.0kb または5.4kb) はC 4 A バンド (7.0kb) の半分の濃さになる。また同様に、図2の母親のバンドの濃度比は、C 4 A (7.0kb) 2 : C 4 B (6.0kb) 2 : C 4 B (5.4kb) 1 となり、ハプロタイプの一方(a)に、6.0kb を示すC 4 B の遺伝子が重複して存在していると考えられる。

C 4 遺伝子の欠損および重複のパターンはこれ以外にも存在する

が、判定の基準はおおよそ以上の例で述べた通りである。

3) 良性家族性血尿におけるC4遺伝子欠損頻度の増加

表2に、良性家族性血尿の家系についてのSouthern analysisの結果を示す。検索した24家系93名中、11家系27名においてC4遺伝子の欠損が認められた。このうち、独立したハプロタイプを持つと考えられる両親48名96ハプロタイプ中での欠損頻度は12/96=12.5%であり、コントロール群の92ハプロタイプ中の欠損頻度2.2%に比べて有意に増加していた。(P=0.006)

表2

The Frequencies of C4 Gene Deletions
in Benign Familial Hematuria

No. of Genes Deleted	F.B.H. (24 families)		Control
	No. of Patients	No. of Distinct Haplotypes	No. of Distinct Haplotypes
One deletion	26	12 (12.5%)	2 (2.2%)
Two deletions	1	0	0
No deletion	66	84 (87.5%)	90 (97.8%)
Total	93	96 (100%)	92 (100%)

P = 0.0063 (Fisher's exact P)

Relative Risk = 5.7

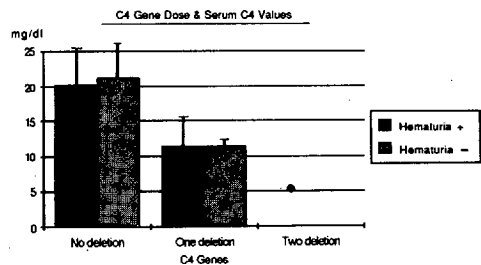
また、C4遺伝子の欠損数と血清C4値との関連を血尿陽性群と陰性群とに分けて測定した結果を図3に示す。遺伝子の欠損数と血清C4値は強い相関を示したが、欠損数の同じグループの中では血尿陽性群と陰性群との間に血清C4値の差は認められなかった。

4. 考察

以上の結果より、C4遺伝子の

欠損は、良性家族性血尿にたいするリスクファクターの1つと考えられる。この機序の1つとして、C4の蛋白量の低下が先ず考えられる。実際に、家族性低C4血症の家系で微少血尿の合併を認めることはまれではない。今回の我々の検索では、低C4血症が認められた23家系のうち16家系で家族性血尿が認められ、そのうちの11家系でC4遺伝子の欠損が証明されたことになる。しかし、図3に示されるように、同じ数の遺伝子欠損群の中では、血尿陽性群・陰性群ともに同程度のC4値の低下が見られたことから、蛋白量の低下自体が直接血尿の原因とは考え難い。C4のアイソタイプであるC4AとC4Bの間では、溶血力価に3-4倍の差があること、また免疫複合体との結合力にも差があることが知られているが、遺伝子欠損の結果、アイソタイプ間の比率および溶血力価にどのような変化が出るのか、今後の検討が必要である。

図3



さらに、もう1つの機序として、HLA領域内の、何らかの免疫応答遺伝子との連鎖が考えられる。IgA腎症や紫斑病性腎炎でも、C

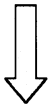
4 null alleleの頻度が高いことが報告されており、我々の preliminaryな検索の結果でも、これらの患者群ではC4遺伝子の欠損および重複の頻度が増加していた。これら3つの疾患において、共通の遺伝因子が関与していると考えられることもできる。臨床的にも、紫斑病性腎炎やIgA腎症の患者の家族に、微少血尿の陽性者が少なからず認められる。

今後は、これらの疾患の患者にみられるC4蛋白の特性について解析を進めると共に、C4遺伝子に連鎖する遺伝因子、とくにMHCクラスII抗原についての解析を進める予定である。現在、C4遺伝子の欠損、あるいは重複したハプロタイプとの連鎖不均衡を示すMHC抗原分子について、特にDQ、DR抗原の表現型およびDNA多型(RFLP)について検索を進めている。

5. 参考文献

- 1) Alper, C.A., Awdeh, Z., et al:
Biochem-Soc-Symp. 51;19-28
(1986)
- 2) McLean, R.H., Wyatt, R.J., et al:
Kidney International 26;
855-860 (1984)
- 3) Welch, T.R., Stitzel, A.E., et al:
Nephron 38;138-143 (1984)
- 4) Hauptmann, G., Tappeiner, G., et al:
Immunodeficiency Rev.1;3-22(1988)

- 5) Todd, J.A., Bell, J.I., et al:
Nature 329;599-604 (1987)
- 6) Maniatis, T., Fritsch, E.F., et al:
Molecular Cloning (1982)D.,
- 7) Carrol, M.C., Campbell, M.D., et al:
Nature 307;237-241 (1984)
- 8) Higashi, Y., Yoshioka, H., et al:
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83;
2841-2845 (1986)
- 9) Schneider, P.M., Carroll, M.C., et al:
J.Clin. Invest. 78;650-657
(1986)
- 10) Prentice, H.L., Schneider, P.M., et al:
Immunogenetics 23;299-304
(1987)
- 11) 阿部 淳、香坂 隆夫、ほか
Proc.Jpn.Soc.Immunol. 18;
762 (1988)



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



良性家族性血尿の 24 家系 93 名について Southern analysis を行った結果、11 家系 27 名において C4 遺伝子の欠損が認められた。IgA 腎症、紫斑病性腎炎の患者群にも C4 遺伝子の変異が高頻度に見られることから、これらの疾患群における共通の遺伝マーカー (extended ハプロタイプ) として、今後検討を進める予定である。