



SLC26A3 gene analysis in patients with Bartter and Gitelman syndromes and the clinical characteristics of patients with unidentified mutations

Ishimori, Shingo

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Date of Publication)

2013-08-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5903

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005903>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

SLC26A3 gene analysis in patients with Bartter and Gitelman syndromes and the clinical characteristics of patients with unidentified mutations

Bartter および Gitelman 症候群における *SLC26A3* 解析と非同定例の臨床的特徴に関する研究

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

小児科学

(指導教員：飯島 一誠 教授)

石森 真吾

Bartter および Gitelman 症候群における *SLC26A3* 解析と非同定例の臨床的特徴に関する研究

石森 真吾, 貝藤 裕史, 松野下 夏樹, 大坪 裕美, 橋本 総子, 忍頂寺 毅史, 野津 寛大, 森貞 直哉, 飯島 一誠

神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学分野

Abstract

臨床的に Bartter および Gitelman 症候群と診断されるも遺伝学的に診断を確定し得なかった症例に対して *SLC26A3* の解析を行い、その変異の有無について検索を行った。さらに遺伝学および臨床的特徴について検討を行った。対象は 10 例で遺伝学的特徴として、1 例に *SLC12A3* のヘテロ接合体変異 (c.2573A>T, p.L858H) を認めた。臨床的特徴として、3 例は健康診断や他疾患から検査異常を指摘され、1 例に羊水過多を、また 1 例に腎石灰化を認めた。一方で平均身長を下回る症例が 8 例に及んだ。この 10 例につき *SLC26A3* の解析を行ったが、病的変異を有する者は 1 例もなかった。各症例の転帰として検査所見が正常化した症例が 3 例、感冒時にのみ低カリウム性代謝性アルカローシスを認める症例が 1 例含まれていた。結論として、*SLC26A3* の変異により疾患を発症した症例は少ないと予測され、他にも責任遺伝子が存在する可能性がある。また、低カリウム性代謝性アルカローシスを呈する病態は極めて多岐にわたることから、その鑑別が極めて重要であることが改めて示された。

Introduction

Bartter 症候群 (BS)、Gitelman 症候群 (GS) は、低カリウム血症、代謝性アルカローシスを特徴とした先天性尿細管機能異常症である。責任遺伝子の解明が飛躍的に進んだ結果、これらの病型は表現型でなく遺伝子型で分類・診断されることが主流となった。しかしその一方で、臨床的に BS および GS と診断された症例でも既知の責任遺伝子に何ら変異を認めなかったり、劣性遺伝性疾患であるにも関わらずヘテロ接合体変異しか同定し得ない症例が存在することが知られている。

近年、腸管 Cl-/HCO₃- exchanger の遺伝子である solute carrier family 26, membrane 3 gene (*SLC26A3*) にホモ接合体を有する BS 症例の存在が判明し、本遺伝子が BS の新規責任遺伝子であることが示された。そこで我々は、臨床的に BS および GS と診断し既知の遺伝子に変異を認めなかった症例について *SLC26A3* を解析することとした。さらに遺伝学および臨床的特徴についても検討を行った。

対象と方法

本研究は神戸大学大学院医学研究科の医学倫理委員会に審査を申請し、承認された後に行った。

症例

臨床的に BS もしくは GS と診断し既知の遺伝子に変異を同定し得なかった 10 例を対象とした。対象は全て Nozu らが提唱する BS・GS の遺伝子解析アルゴリズムに則って遺伝子解析を行っている (Fig 1)。

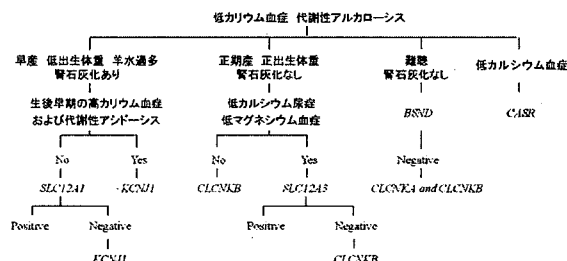


Figure 1 Bartter 症候群、Gitelman 症候群の遺伝子解析アルゴリズム

対象は以下の 3 つを全て満たし、臨床医が BS もしくは GS と臨床的に診断した症例、つまり (1) 低カリウム血症 (<3 mEq/L) と (2) 代謝性アルカローシスを呈し、(3) 神経性食欲不振症や慢性下痢、嘔吐、下剤・利尿薬の長期投与などが明らかでない症例である。

遺伝子解析

同意を得た後、末梢血リンパ球から抽出したゲノム DNA を用いて、*SLC12A1*、*KCNJ1*、*CLCNKB*、*BSND*、*CASR*、*SLC12A3* それぞれの各 exon と exon-intron 境界領域について PCR 法で増幅後、直接シーケンス法で解析した。また、*SLC12A3* に GS の disease-causing mutation として既報の c.2573A>T、p.L858H のヘテロ接合体変異を認めた 1 例 (Case1) については、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いて、広範囲欠失との複合ヘテロ接合体変異でないことを証明している。

定義

腎機能の指標に estimated glomerular filtration rate (eGFR) を用いた。18 歳未満は Schwartz の式を、18 歳以上には日本人推定 Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) 式を用いた。

結果

対象の背景

対象の背景を Table 1 に示す。男性が 4 名、女性が 6 名で、遺伝子解析時の年齢の中央値は 28 歳 (0.3- 55 歳) であった。10 例中 3 例は健康診断や他疾患から検査異常を指摘され、1 例に羊水過多を、1 例に腎石灰化を認めた。遺伝子解析時の身長 SD 値は中央値で -1.0SD (-2- 0.3 SD) であった。

Case	年齢(歳)	性	主訴	羊水過多	腎石灰化	身長 (SD)	解析した遺伝子
1	55	男	四肢脱力	NA	-	0.3	<i>CASR</i> , <i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>
2	0.3	男	意識消失	-	-	-1.5	<i>SLC12A1</i> , <i>KCNJ1</i> , <i>CLCNKB</i> , <i>BSND</i> , <i>SLC12A3</i> , <i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>
3	23	男	検査異常	NA	-	-0.8	<i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>
4	55	男	上肢しびれ	-	-	-0.6	<i>SLC12A1</i> , <i>KCNJ1</i> , <i>CLCNKB</i> , <i>CASR</i> , <i>SLC12A3</i>
5	35	女	検査異常	NA	-	-0.1	<i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>
6	35	女	四肢脱力	-	-	-1.5	<i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>
7	0.3	女	哺乳不良	-	-	-2.0	<i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>
8	0.4	女	顔面拡大	-	-	-1.6	<i>SLC12A1</i> , <i>KCNJ1</i> , <i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i> , <i>SLC12A1</i> , <i>KCNJ1</i> , <i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>
9	33	女	多飲多尿	-	-	NA	<i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>
10	13	女	四肢しびれ	-	+	-1.0	<i>CLCNKB</i> , <i>SLC12A3</i>

NA: not available

Table 1 対象の背景

10 例の検査所見を Table 2 に示す。血清カリウムの中央値は 2.7 mEq/L (1.7- 2.9 mEq/L) で、全例低カリウム性代謝性アルカローシスを呈していた。また 3 例に eGFR の低下を認めていた。

Case	血清 K (mEq/L)	血清 Mg (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cr (mg/dL)	eGFR (ml/min 1.73m ²)	HCO ₃ (mEq/L)	尿 Ca:Cr (mg/mg · Cr)
1	1.7	1.8	19.5	1.62	36.2	25.5	0.15
2	2.9	2.3	3.5	0.23	84.0	31.7	0.06
3	2.9	1.4	20	1.15	68.5	29.6	0.04
4	1.9	2.1	8.2	0.62	105	29.4	0.03
5	2.9	1.8	18	0.57	95.6	27.3	0.02
6	2.4	2.3	12	1.23	40	39.9	0.04
7	2.6	1.9	12.6	0.25	74	48.2	0.06
8	2.9	2.1	7	0.15	120	31.3	0.18
9	2.7	2.4	NA	NA	NA	26.5	0.02
10	2.0	2.0	13.2	0.52	113	21	0.58

NA: not available eGFR: estimated glomerular filtration rate BUN: blood urea nitrogen

Table 2 対象の検査所見

SLC26A3 解析

10 例に *SLC26A3* 解析を行った。その結果、2 例に c. 1299A>G のホモ接合体、2 例に c. 1299A>G のヘテロ接合体、1 例に c.2130T>C のヘテロ接合体、1 例に c.1661A>G のヘテロ接合体変異を認めた (Fig 2) が、これらの変異は Ensembl データベースから一塩基多型 (SNP) で、disease-causing mutation ではないと判断した。

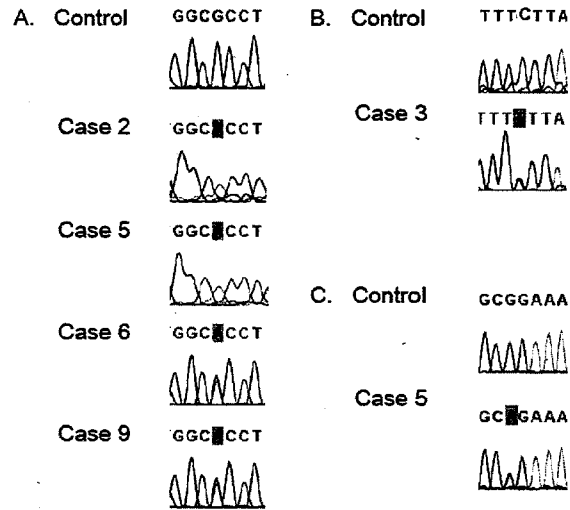


Figure2 遺伝子解析の結果
 case2,5にc.1299A>Gのホモ接合体、case6,9にc.1299A>Gのヘテロ接合体、case3にc.2130T>Cのヘテロ接合体、case5にc.1661A>Gのヘテロ接合体変異を認めた

症例の転帰

検査所見が正常化し投薬が不要となった症例が3例 (Case 3、7、10) にみられた。また1例 (Case 8) は感冒時のみ低カリウム性代謝性アルカローシスを認めるも、平時には無投薬で検査所見は正常化していた。

考察

本研究により我々は、臨床的にBS・GSと診断されるも既知の責任遺伝子変異を認めない症例におけるSLC26A3の変異の有無と、臨床的所見の特徴について検討した。BS・GSの診断には遺伝子解析が最も有用であるが、なお責任遺伝子変異が同定されない例が存在する。そこで我々はこのような症例におけるSLC26A3変異の関与を考えたが、全10例に変異を同定できなかった。

SLC26A3は回腸に発現するCl/HCO₃⁻ exchangerをコードする遺伝子で、先天性Cl下痢症の責任遺伝子である。Choiらは、臨床的にBSと診断された39症例中5例にSLC26A3のホモ接合体変異を同定したと報告している。本研究ではSLC26A3の変異は同定できず、臨床的にBSやGSと診断された症例においてSLC26A3変異の頻度は少ないのかもしれない。

本研究では、1例にSLC12A3のヘテロ接合体変異を認めた。MLPAで広範囲欠失は認めず、遺伝学的にGSと確定診断できていないが、ヘテロ接合体変異によるloss of functionの可能性やスプライシング異常を有する可能性も考えられる。

また臨床的特徴として、3例に腎機能の低下を認めた。BSは高頻度に腎不全へと進行し、GSでも腎不全例が報告されている一方で、偽性BS・GS症例も腎機能の低下を呈しうる。それ故、低カリウム性代謝性アルカローシスと腎機能障害との合併はBS・GSのみならず偽性BS・GSに共通し、診断および遺伝子解析の適応は慎重に判断すべきである。

責任遺伝子変異を同定できなかった理由として、第一に検査所見が正常化した3例が含まれていた点が挙げられる。BS・GSの臨床症状は通常、自然軽快せずに生涯持続する。低カリウム性代謝性アルカローシスはBS・GS以外でも安易に呈する、と銘記すべきである。第二に感冒時のみ低カリウム性代謝性アルカローシスを認める1例の存在である。成人期に確定診断されたBSやGS症例がどのような経過を辿ってきたかは不明で、本症例は軽症のphenotypeである可能性がある。

残りの6例は、典型的なBS・GSの経過にも関わらず、遺伝子変異を認めなかった。既知の責任遺伝子以外の関与があるのかもしれない。

Limitationとして、広範囲欠失やスプライシング異常については検討ができていない。ただしBS・GSは劣性遺伝性疾患であり、サンガー法によるゲノムDNA解析で検出されない変異のみから構成される可能性は極めて低い。また既知の責任遺伝子全ての解析を行ってはいないが、遺伝子解析のstrategyは著者らが提唱したもので、その変異検出率は既報を上回る。最後に本研究は症例数の少ないことが挙げられる。

まとめとして、本研究では、臨床的にBSおよびGSと診断された症例に対してSLC26A3を解析したが、SLC26A3変異を同定できた症例はなかった。SLC26A3変異を有するBS・GS症例は非常に限られるのかもしれない。今後さらに症例を蓄積し、新規責任遺伝子探索を含めて検討を進める必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2345 号	氏 名	石森 真吾
論文題目 Title of Dissertation	SLC26A3 gene analysis in patients with Bartter and Gitelman syndromes and the clinical characteristics of patients with unidentified mutations Bartter および Gitelman 症候群における SLC26A3 解析と非同定例の臨床的特徴に関する研究		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner	西 慎一	
	副 査 Vice-examiner	西尾久英	
	副 査 Vice-examiner	平井みどり	

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

【背景・目的】

Bartter 症候群と Gitelman 症候群は、低カリウム血症と代謝性アルカローシスを特徴とする先天的な尿細管機能異常疾患であり、近年これらの疾患に関わる遺伝子異常が急速に明らかになっている。しかし、臨床的に Bartter 症候群や Gitelman 症候群と診断されても、既知の病因遺伝子に異常が認められない症例もある。遺伝子解析を更に拡大向上させることは技術的に容易ではあるが、コスト面では問題も生じる。Bartter 症候群と Gitelman 症候群に対して、未だ理想的な遺伝子診断法は確定されていない。最近、Cl⁻/HCO₃⁻ 交換蛋白のコード遺伝子である SLC26A3 のミューテーション異常が Bartter 症候群を惹起し、この遺伝子が病因遺伝子の一つとして報告されている。本研究では、既知の病因遺伝子に異常は認められないが、臨床的に Bartter 症候群と Gitelman 症候群と診断された症例に関して、この SLC26A3 遺伝子の異常の有無を検討した。

【方法】

神戸大学倫理審査委員会を通過した後、本研究は実施されている。臨床的に Bartter 症候群と Gitelman 症候群と診断された症例 10 例を対象とした。遺伝子診断分析は、既知の病因遺伝子異常に関しては Bartter 症候群と Gitelman 症候群に関する遺伝子診断アルゴリズムによって行った。Bartter 症候群と Gitelman 症候群の臨床的診断は、1) 低カリウム血症、2) 代謝性アルカローシス、3) 神経性食欲不振症、慢性下痢・嘔吐、長期下剤・利尿剤服用がないこと、これらの条件を満たす症例とした。

既知の病因遺伝子である SLC12A1、KCNJ1、CLCKNB、BSND、CASR と SLC12A3 遺伝子を増幅し、direct sequence 法で解析した。SALSA MLPA アッセイによる MLPA も実施した。SLC26A3 遺伝子は、対象患者より DNA を抽出し PCR 法で増幅し、やはり direct sequence 法で解析した。また、腎機能は Schwartz の式による推計糸球体濾過量 (eGFR) で評価した。しかし、18 歳以上に関しては MDRD 式による eGFR を算出した。

【結果】

対象患者男性 4 例、女性 6 例の計 10 例のうち、1 例に羊水過多症が認められ、低出生体重児、早産児はいなかった。Nephrocalcinosis が 1 例に認められた。症例のカリウム平均値は 2.7mEq/L で、ほぼ全例が HCO₃⁻ の上昇を示した。eGFR は 36.2~120 ml/min/1.73m² に分布していた。対象とした症例には SLC12A1、KCNJ1、CLCKNB、BSND、CASR と SLC12A3 遺伝子には異常は認められなかった。SLC26A3 遺伝子の分析では、c.1299A>G の homozygous mutation 異常が 2 例に、a c.1299A>G heterozygous mutation 異常が 2 例、a c.2130T>C heterozygous mutation 異常が 1 例に、a c.1661A>G heterozygous mutation 異常が 2 例に認められた。Data-base からは、これらの異常は SNP と判断され、疾患原因となる mutations であるとは分類されなかった。また、MLPA アッセイにおいても異常は発見されなかった。

3 例の臨床的異常は自然経過で正常化し、治療を必要としなかった。また、1 例は急性疾患の時のみ臨床的異常がみられ、加療をしなくとも臨床検査異常は正常化した。他の症例は、低カリウム血症と代謝性アルカローシスが持続した。

【考察】

対象とした 10 症例には、既知の Bartter 症候群と Gitelman 症候群の病因遺伝子の異常は見つからなかった。また、新規候補遺伝子の SLC26A3 についても、homozygous 及び heterozygous な mutation 異常は見つかったものの、SNP であり責任病因遺伝子異常として同定されなかった。SLC26A3 遺伝子は回腸の $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換蛋白をコードする遺伝子であり、この遺伝子異常は先天性クロール性下痢を惹起することも報告されている。従って、Bartter 症候群と Gitelman 症候群の責任病因遺伝子としての可能性は推測されるが、今回の SLC26A3 遺伝子の解析においては、高頻度に見られ、かつ責任病因遺伝子として働く遺伝子異常は発見されない状況であった。

1 例においては、持続的な低カリウム血症と代謝性アルカローシスがみられ、かつ heterozygous mutation 異常が SLC26A3 にみられた。そこで、MLPA による大きな遺伝子欠失異常も検討したが、やはり異常は確認されなかった。残された可能性として、splicing 異常は否定できないと考えられた。今回検討した症例のうち 3 例には腎機能低下がみられた。一般に Bartter 症候群には腎機能低下がみられるが Gitelman 症候群にはみられない。今回検討した症例では、腎機能が低下している症例は 3 例とも成人であった。この点に関しては、腎機能低下が必ずしも遺伝子異常からくと判断できず、偽性 Bartter/Gitelman 症候群でも腎機能低下がみられることを考えると、持続する低カリウム血症などがこの腎機能低下の原因である可能性も否定できない。

責任病因遺伝子が発見できなかった理由としては、対象症例の選択の問題もあると考えられた。臨床的異常が持続しなかった例も含まれており、他の原因で類似臨床検査異常が出現していた可能性もある。また、典型的な臨床症状が持続した症例においては、今回検討した遺伝子座以外の異常があり、それが発見できなかった可能性もある。

今回の検討では、検討症例も少なく、Sanger 法での DNA 解析であり、大きな欠失、あるいは splicing 異常は確認できていない。この点は本研究の limitation である。

【結論】

Bartter 症候群と Gitelman 症候群と臨床的に診断された症例を対象として、新規候補遺伝子である SLC26A3 に関して遺伝子異常を検討したが、責任病因遺伝子としての異常は発見することができなかった。

「本研究は、Bartter 症候群と Gitelman 症候群の病因遺伝子異常を検討したものであるが、今まで十分に探索されていなかった SLC26A3 遺伝子異常に関して検討を加えている。従来ほとんど行われていなかったこのような臨床研究において重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。」