
結晶性M蛋白円柱腎症患者におけるM蛋白の構造解析

橋間清香*、古川裕介*、大谷 浩**、小松田 敦***、涌井秀樹*

秋田大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻*、秋田厚生医療センター 腎臓内科**、
秋田大学医学部附属病院血液・腎臓・膠原病内科***

Structrural analysis of M protein in a patient with crystalline cast nephropathy

Sayaka Hashima*, Yusuke Furukawa*, Hiroshi Ohtani**, Atsushi Komatsuda***,
Hideki Wakui*

Department of Life Science, Graduate School of Engineering Science,
Akita University*

Department of Nephrology and Internal Medicine, Akita Kousei Medical Center**
Department of Hematology, Nephrology, and Rheumatology,
Akita University Hospital***

<緒言>

単クローン性免疫グロブリン（M蛋白）軽鎖による腎疾患として、円柱腎症、尿細管症、アミロイドーシス、Randall型沈着症などが知られている¹⁾。M蛋白軽鎖は、骨髄で異常増殖した形質細胞から産生され、血液を介して腎組織に沈着し、これらの腎疾患を惹起する。尿中に排泄されたM蛋白軽鎖は、Bence Jones蛋白（BJP）と呼ばれる。

今回、結晶性M蛋白円柱腎症により急性腎不全を呈したBJP- λ 型骨髄腫の一例を経験した。結晶性M蛋白円柱腎症の報告例は極めて少なく²⁾、原因となったM蛋白の構造上の特徴に関する所見は限られている。部分アミノ酸配列の同定結果が、一例で報告されているのみである³⁾。そこで、今回の症例における結晶性円柱形成のメカニズムの解明に向け、BJP- λ 鎖の全アミノ酸配列の同定を試みた。

<対象と方法>

症例

73歳、女性。2015年の健診にて蛋白尿を指摘されたが放置していた。健診にて再び蛋白尿を指摘されたため、2018年2月に近医を受診した。蛋白尿、腎機能低下を指摘され、秋田厚生医療センター腎臓内科に入院した。

現症：血圧166/84 mmHg、脈拍78/分整、心肺雑音なし、下肢の浮腫なし。

検尿：蛋白2+ (9.1 g/gCr)、潜血2+、沈査赤血球1-4/HPF、 β 2-microglobulin 48,989 μ g/dL、BJP- λ 陽性。

末梢血：WBC 3,900/ μ L、Hb 5.0 g/dL、Plt 17.8万/ μ L。

血液生化学：TP 5.3 g/dL、Alb 3.2 g/dL、BUN 38.3 mg/dL、Cr 5.59 mg/dL、UA 6.6 mg/dL、Na 146 mEq/L、K 3.7 mEq/L、Cl 108 mEq/L、Ca 8.4 mg/dL、P 4.7 mg/dL。

血清免疫学：IgG 366 mg/dL、IgA<20 mg/dL、IgM 11.7 mg/dL、 λ 鎖7,910 mg/L。

骨髓穿刺所見：形質細胞が52.8%と増加し（図1）、flow cytometryにて λ 鎖陽性細胞が85.3%であった。

腎生検所見：光顕像で、糸球体に著変はなかったが、尿細管上皮細胞の変性・萎縮、周囲の間質線維化を広範に認めた。遠位尿細管内に多数の円柱形成が観察され、内部には菱形や針状の結晶を認めた（図2）。電顕像で、結晶内には特異的な構造は認めなかった（図3）。これらの結晶は、免疫組織染色で λ 鎖であることを確認した（図4）。

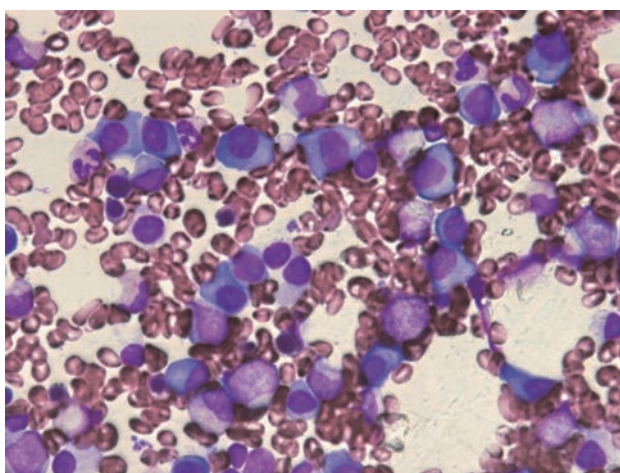


図1 骨髓穿刺所見（May-Giemsa染色×400）

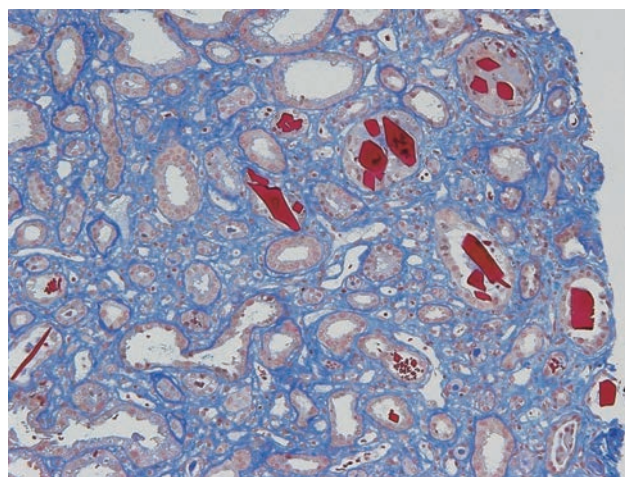


図2 腎生検所見（Masson trichrome染色×400）



図3 腎生検所見（電顕像）

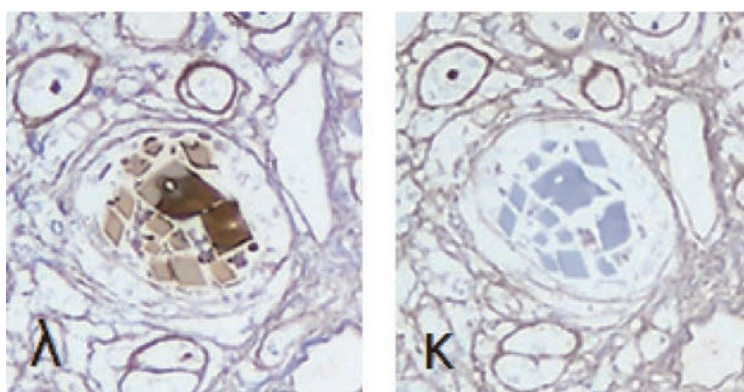


図4 腎生検所見（ λ 鎖 κ 鎖染色×400）

BJP- λ 鎖の精製

患者尿100 mLを用い、硫酸50–65%で尿中蛋白質を分画した。得られた分画をBuffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0) で透析後、Buffer Aで平衡化したDEAEカラムに添加した。Buffer Aでカラムを洗浄後、リニアグラディエント溶出 (Buffer A、0–500 mM NaCl) を行い、150–200

mM NaClで溶出した分画を得た。得られた分画をBuffer B (10 mM K-phosphate buffer pH 7.0) で透析後、Buffer Bで平衡化したhydroxyapatiteカラムに添加した。Buffer Bでカラムを洗浄後、リニアグラディエント溶出 (10–500 mM K-phosphate buffer pH 7.0) を行い、180–205 mM K-phosphate bufferでBJP-λ鎖を溶出した。

BJP-λ鎖の各精製段階のサンプルを用い、SDS-PAGEゲルとWestern blotで分析した。Western blotでは、一次抗体にウサギ抗ヒトλ鎖抗体を、二次抗体に酵素標識ヤギ抗ウサギIgGを用いた。

アミノ酸シーケンス

プロテインシーケンサー (島津製作所) を用いて、精製したBJP-λ鎖のN末端のアミノ酸配列を同定した。

BJP-λ鎖のcDNAクローニング

患者骨髄液から、Ficollによって単核球分画を採取し、TRIzol (Life Technologies) でtotal RNAを抽出した。次に、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて、RNAをcDNAに逆転写した。

PCRは、Ex Taq DNAポリメラーゼ (Takara) を用い、λ鎖のDNA断片を増幅した。アミノ酸シーケンスで同定した精製BJP-λ鎖N末端アミノ酸配列結果 (後述) から、PCRプライマーには、*IGLV3*遺伝子のN末端側塩基配列と、λ鎖定常領域*IGLC1*、*2*、*3*、*7*遺伝子のC末端配列を用いた。

得られたPCR産物を、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のベクターに挿入し、*E. coli* (DH5 α, ニッポン・ジーン社) に導入した。培養した後、FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス社) を用いて、プラスミド溶液を得た。制限酵素でプラスミドを切断し、目的のDNA断片の挿入を確認した後、ユーロフィンジェノミクス社にシーケンスを委託した。

DNAの塩基配列は、ExPASyサイト (Swiss Institute of Bioinformatics) によって、アミノ酸に変換した。また、同サイトで分子量と等電点を求めた。

<結果>

BJP-λ鎖の精製

患者尿から、硫酸分画、2種類のクロマトグラフィーにより、BJP-λ鎖を精製した。SDS-PAGEのCBB染色で、25 kDaのほぼ単一バンドとして認められた (図5：左図)。Western blotで、25 kDaのバンドがλ鎖であると確認した (図5：右図)。

アミノ酸配列の同定

精製したBJP-λ鎖のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサーによって解析し、図5に示す配列結果が得られた。ホモロジー検索を行ったところ、λ鎖可変領域をコードする*IGLV3S2*遺伝子に由来する既報のアミノ酸配列⁴⁾に類似していた (図6)。

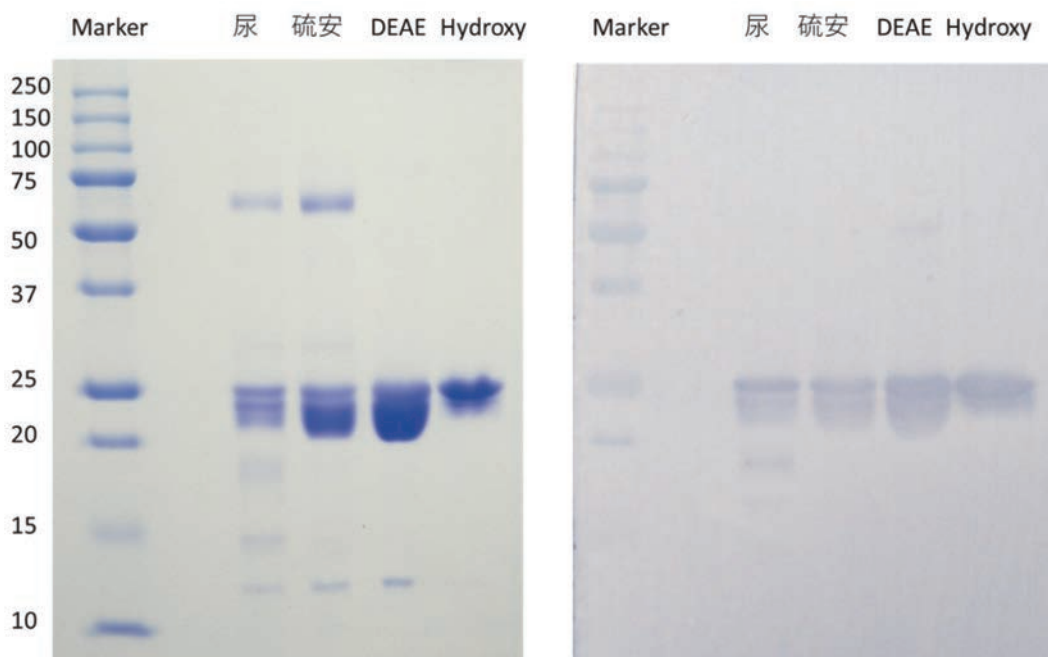


図5 患者尿からのBJP-λ鎖の精製
左図：SDS-PAGE ゲル（CBB染色）、右図：抗λ鎖抗体によるWestern blot
分子量markerはkDaで示す。

BJP-λ	YVLTQPPSVS	VAPGKTARIA	XEGNNIGSKS	VHWYQQKPGQ
IGLV3S2	YVLTQPPSVS	VAPGKTARIT	CGGNNIGSKS	VHWYQQKPGQ

図6 患者BJP-λ鎖のN末端アミノ酸配列とIGLV3S2遺伝子由来アミノ酸配列³⁾
赤字は両者で異なるアミノ酸を示す。

プロテインシーケンサーで同定した40個の部分アミノ酸配列を基に、BJP-λ鎖の全アミノ酸配列をコードする遺伝子を解析する目的で、患者骨髄単核球からcDNAを調整し、クローニングを行った。

cDNAをクローニングによって得られたBJP-λ鎖の全アミノ酸配列を、図7に示す。分子量は22649、等電点は6.1と計算された。ドメイン別の等電点は、V領域で5.1、J領域からC領域で8.0であり、大きく異なっていた。

<u>YVLTQPPSVS</u>	<u>VAPGKTARIA</u>	<u>CEGNNIGSKS</u>	<u>VHWYQQKPGQ</u>
APVLVVYDDS	DRPSGIPDRF	SGSNSGNTAA	LTISRVEAGD
<u>EADYFCQVWD</u>	<u>SNSNHQVFGG</u>	<u>GTKVTVLGQP</u>	KAAPSVTLFP
PSSEELQANK	ATLVCLISDF	YPGAVTVAWK	ADSSPVKAGV
ETTTPSKQSN	NKYTASSYLS	LTPEQWKSHK	SYCQVTHEGS
TVEKTVAPTE	CS		

図7 患者BJP-λ鎖の全アミノ酸配列
赤字はV領域、青字はJ領域、黒字はC領域を示す。アンダーラインは、プロテインシーケンサーで同定されたアミノ酸を示す。

<考察>

本症例は、BJP- λ 型骨髄腫に急性腎不全を合併し、腎生検所見で、BJP- λ 鎖による結晶性円柱腎症の特異な組織像を認めた。BJPによる結晶性M蛋白円柱腎症の報告例は極めて少なく²⁾、原因となったBJPの全アミノ酸配列を明らかにできたのは、本症例が最初の症例である。

本症例のBJP- λ の全長での等電点は6.1であるが、V領域のみの等電点は5.1、J領域からC領域での等電点は8.0と大きく異なっていた。このことから、 λ 鎖蛋白質ドメイン内にマイナス荷電を帯びた部位とプラス荷電を帯びた部位が存在し、 λ 鎖同士が電氣的に結合しやすい構造であると考えられる。3次元構造の解析が、今後の検討課題である。

骨髄腫症例に多い非結晶性M蛋白円柱腎症と、報告例の少ない結晶性M蛋白円柱腎症で、M蛋白が腎機能に及ぼす影響についての差異については、現時点で不明である。今後の症例蓄積により、明らかなるものと考えられる。

<結語>

今回、BJP- λ による結晶性M蛋白円柱腎症を呈した急性腎不全の一例を経験し、BJP- λ の全アミノ酸配列を明らかにした。結晶性円柱形成のメカニズムを解明するため、更なる構造解析が必要である。

<文献>

- 1) 涌井秀樹：多発性骨髄腫と類縁疾患の腎障害、臨床血液 54：1876-1887、2013.
- 2) Gallan AJ, Khalighi: Lambda light chain crystalline cast nephropathy and proximal tubulopathy. *Kidney Int Rep* 1: 316-320, 2016.
- 3) Toly-Ndour C, Peltier J, Piedagnel P, et al.: Acute renal failure with lambda light chain-derived crystals in a patient with IgD myeloma. *Nephrol Dial Transplant* 26: 3057-3059, 2011.
- 4) Jokiranta TS, Solomon A, Pangburn MK, et al.: Nephritogenic λ Light chain dimer: a unique human miniautoantibody against complement factor H. *J Immunol* 163: 4590-4596, 1999.