

主論文要旨

論文提出者氏名：井上 友彦

専攻分野：内科学(腎臓・高血圧内科)

指導教授：柴垣 有吾

主論文の題目：

Functional Analysis of Suspected Splicing Variants in *CLCN5* Gene in Dent Disease 1

(スプライシング異常が疑われる *CLCN5* 遺伝子変異の Dent 病発症メカニズムの解明)

共著者：

China Nagano, Masafumi Matsuo, Tomohiko Yamamura, Nana Sakakibara, Tomoko Horinouchi, Yugo Shibagaki, Daisuke Ichikawa, Yuya Aoto, Shinya Ishiko, Shingo Ishimori, Rini Rossanti, Kazumoto Iijima, Kandai Nozu.

緒言

Dent 病は低分子蛋白尿、高カルシウム血症、および腎石灰化を特徴とする X 染色体関連性遺伝性疾患である。Dent 病の約 60% は *CLCN5* 遺伝子の変異による尿細管の機能障害に起因する。近年、様々な遺伝性疾患の発症原因としてのスプライシング異常の解析が進められている。しかしながら、Dent 病における *CLCN5* 遺伝子の変異が疑われる症例についての包括的な報告はない。今回我々は mutagenesis による変異遺伝子を人工的に作成し、その変異遺伝子を minigene vector に挿入し、これら変異体の病原性および発症機序を調査した。

方法・対象

我々は過去に報告された Dent 病の症例報告から、*CLCN5* 遺伝子におけるスプライシング変異をきたしていると思われる 6 症例(c. 105G>A, c. 105+5G>C, c. 106- 17T>G, c. 393+4A>G, c. 517- 8A>G, c. 517- 3C>A) について、hybrid minigene を用いてスプライシング機構の解析を行った。症例については the Human Gene Mutation Database を参照し抽出した。

我々はこれらスプライス変異が疑われる関連エクソンを mutagenesis にて人工的に作成した。作成された関連エクソンを minigene vector に挿入し、*Escherichia coli* にトランスフェクションし、vector を増幅した。得られた minigene vector を抽出し、HEK 細胞および Hela 細胞細胞へトランスフェクションした。その後、これら細胞内にて合成された mRNA を抽出し、cDNA へと変換した上でサンガー法を用いた遺伝子解析を行い、mRNA の塩基配列を確認した。また、同時に *in silico* 解析も行い、両者の結果を比較した。

本研究は神戸大学大学院医学研究科の施設内倫理委員会およびヘルシンキ宣言の倫理基準に準拠している。

結果

in vitro 解析にて、これら 6 症例の変異体のうち 5 症例がスプライシング異常により産生された異常な転写産物の存在が確認され、さらにこれら変異体が病原性をきたしうることを確認できた。残り 1 症例については正常な転写産物のみが検出され、病原性がないことが示唆された。この結果は *in silico* 解析の結果と矛盾しないものであった。

考察

ほとんどの変異体は生来のスプライスサイトの破壊をきたし、かつ新たなスプライスサイトの出現が発生しており、*in silico* 解析および *in vitro* 解析において確認された。それぞれの遺伝子変異に生じたスプラ

イシング異常は該当領域の塩基配列から算出されるスプライシングスコアと矛盾しない結果であった。近年、アンチセンスオリゴヌクレオチドを利用したエクソンスキッピング療法が開発され、Duchenne 型筋ジストロフィーおよび脊髄性筋萎縮症に対してのエクソンスキッピング薬が米国食品医薬品局で承認されている。また、CRISPR/Cas システムを利用したスプライシングパターンの修正を行う遺伝子標的療法の開発も期待される。これらの開発促進のために、本研究の解析も含め、疾患への関連が不明な変異体の病原性を解析することが重要となる。

また、本研究にて対象とした変異体は過去に報告された症例であり、患者サンプルを利用した mRNA 分析は施行困難であった。しかし、今回利用した minigene 解析であれば、患者サンプルがなくとも対象の塩基配列を挿入することでその影響を解析することが可能である。その他の遺伝性腎疾患の解析についても同様の手法が可能である。一般的に遺伝性腎疾患が疑われる症例はその他腎疾患と比較し腎生検が施行される頻度が低いこともあり、腎組織を用いた解析ができないものも多い。そのため、これら症例においては minigene を利用した解析も有効な手段となりうる。

結論

5 症例の CLCN5 遺伝子変異体は正常なスプライスサイトを破壊することで、異常なスプライシングをきたすことが確認できた。この結果は *in silico* での解析と矛盾しなかった。これら解析結果は遺伝子標的療法開発を促進する上で重要となる。また、mRNA の脆弱性や末梢血における白血球での発現レベルの弱さのため、患者試料より mRNA を抽出し、かつ解析することは時に困難である。さらに、本研究において対象とした症例のように、患者試料を入手すること自体が困難な場合もある。これら症例を対象とした解析について、今回行った minigene を利用した *in vitro* 解析は *in vivo* 解析の代替として有用である。

