

## 論文審査の要旨

筆頭著者（学位申請者）氏名

井上 友彦

主論文の題目  
および  
掲載・審査委員

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）

掲載誌 Clinical and Experimental Nephrology 2020; 24: 606-612

主査 菊地 栄次  
副査 武半 優子  
副査 伊澤 直樹

[論文の要旨・価値] 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とされているが、その詳細は不明である。本研究では、*CLCN5* 遺伝子のスプライシング異常に注目し、変異遺伝子を人工的に作成することで Dent 病の発症メカニズムの解明を試みた。対象と方法：過去に報告された Dent 病の症例報告より *CLCN5* 遺伝子のスプライシング変異をきたしていると疑われる 6 症例において候補関連エクソンを人工的に作成し vector に導入、HEK、Hela 細胞にトランスフェクション後、mRNA を抽出した。その後 cDNA に変換し mRNA の塩基配列を確認した。同時に in silico 解析で結果の信頼性を検証した。結果：6 症例のうち 5 症例でスプライシング異常により産生された転写産物の異常が検出され、変異体が病原性をきたしうる事が確認された。これは in silico 解析の結果と矛盾しなかった。結論：5 症例の *CLCN5* 遺伝子変異体は正常なスプライシング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事が確認された。本研究解析法は患者サンプルを利用せず、対象の塩基配列を挿入し、mRNA を評価する手法であり、患者組織採取が困難なケースにおいても有効な解析手段として期待される。総括：本研究で Dent 病の発症メカニズムに *CLCN5* 遺伝子のスプライシング変異が関与していることが明確に立証された。今後、本知見を基に、エクソンスキッピング療法（遺伝子変異のある近傍エクソンを人工的に排除し、正常に近い蛋白質の合成能を回復させる方法）や CRISPER/Cas 療法（特定の遺伝子配列を持った DNA を切断除去し、修復用鋳型となる DNA 断片を加えて正常な塩基配列へと戻す方法）への応用が期待される。

[審査概要] 審査は主査 1 名、副査 2 名、陪席 1 名で実施された。約 20 分のプレゼンテーションとそれに続く約 40 分の質疑応答が行われた。質疑応答では 1) 1 症例でスプライシング異常が検出されなかった理由と臨床的意義、2) 蛋白機能解析の必要性、3) in vivo での検証の必要性、4) より具体的な臨床応用の方向性、特にエクソンスキッピング法への応用など多岐にわたる質問・確認がなされたが、回答は的確になされ、自身の本研究に関する知見、今後の方向性などが明確に示された。

## 最終試験結果の要旨

[研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価] 本研究の背景、要旨は文献的考察を含め、簡潔、明確にプレゼンテーションがなされた。研究の目的や得られた知見を用いた臨床応用への展望はきちんと示され、質疑応答を含め研究遂行能力、専門知識、発表能力が十分に備わっていることが確認された。英語読解能力は引用文献の一つを指定し、おおむね的確に翻訳できていた。発表態度は真摯で今後の研究意欲もあり、学位授与に値すると評価した。