

第5回腎臓セミナー・Nexus Japan プロシーディング

YIA 受賞講演

X 染色体連鎖型 Alport 症候群における splicing 異常の同定と臨床遺伝学的検討

Detection of Splicing Abnormalities and Genotype-Phenotype Correlation in X-linked Alport Syndrome

堀之内智子^{*1,2} 野津寛大^{*1} 飯島一誠^{*1}

Tomoko HORINOUCI, Kandai NOZU, and Kazumoto IJIMA

背景

X 染色体連鎖型 Alport 症候群 (XLAS) は、IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖をコードする *COL4A5* 遺伝子の変異により発症し、進行性の腎機能障害をきたすほか、感音性難聴や眼病変の合併を特徴とする。IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖は collagenous domain とそれに続く non-collagenous domain から成り、腎糸球体基底膜においては non-collagenous domain が重要であることが報告されてきた。さまざまな遺伝子変異のなかで、ナンセンス変異・フレームシフト変異 (3 の倍数以外の塩基の挿入・欠失など) は truncating 変異であり、IV 型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖においては non-collagenous domain が保持されない。それに対してミスセンス変異・インフレーム変異 (3 の倍数の塩基の挿入・欠失など) は non-truncating 変異であり、non-collagenous domain が保持される。過去の研究により、男性患者においては遺伝子型と臨床像の相関関係が比較的確立されており、truncating 変異を有する患者が non-truncating 変異を有する患者と比較し重症となることが明らかとなっている。一方、splicing に異常をきたしている場合、その影響を検討するためにはトランスクリプト解析 (mRNA 解析) が必要である。しかし、過去の大規模な研究では gDNA 解析のみを行っており、splice site 変異により発症する患者に関してはその中間の予後を示すと報告されて

いるものの、そのトランスクリプトに基づいた解析はまだまだ行われていない。

今回われわれは、splicing 異常が関与する可能性が考えられた XLAS 患者において、全例でトランスクリプト解析を行い、非典型的な未報告の splicing パターンを呈した患者 (n=14) の報告を行った。また、splicing 異常により発症していた男性患者においてはそのトランスクリプトレベルで truncating か non-truncating かを区別し、遺伝子型と臨床像の相関関係を比較した。

方法

2006 年 1 月から 2017 年 7 月までに当科で遺伝学的に診断を行った 279 家系の XLAS のうち、71 家系 (25%) は truncating 変異、159 家系 (57%) は non-truncating 変異、49 家系 (18%) は splicing 異常をきたしていた。本研究では 49 家系のうち、somatic mosaic や 47, XXY の karyotype を示す例、*COL4A4* 変異や *COL4A5* ミスセンス変異を合併する例などを除いた 41 家系を対象とした。そのうち 14 例では未報告の非典型的な splicing パターン、すなわちエクソンの前後 2 塩基 (splicing consensus 配列) の点変異による直近のエクソンスキッピング以外の splicing 異常を呈していたため、報告した。また、女性のみの家系 11 家系とエクソン 49 スキッピングの家系 (エクソン 49-51 は non-collagenous domain として知られ、もともと重症型を呈することが明らかになっている) を除いた 29 家系 46 例の男性患者を対象

*1 神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科

*2 兵庫県立こども病院 腎臓内科

表 Distribution of the participants

	Total (censored case)	ESRD age, median (95%CI)
Non-truncating	25 (10)	29 (25~40)
Truncating	21 (11)	20 (14~23)
Total	46 (21)	25 (21~34)

(Horinouchi, et al. J Am Soc Nephrol 29: 2244–2254, 2018. より許可を得て転載, Copyright Clearance Center, Inc.)

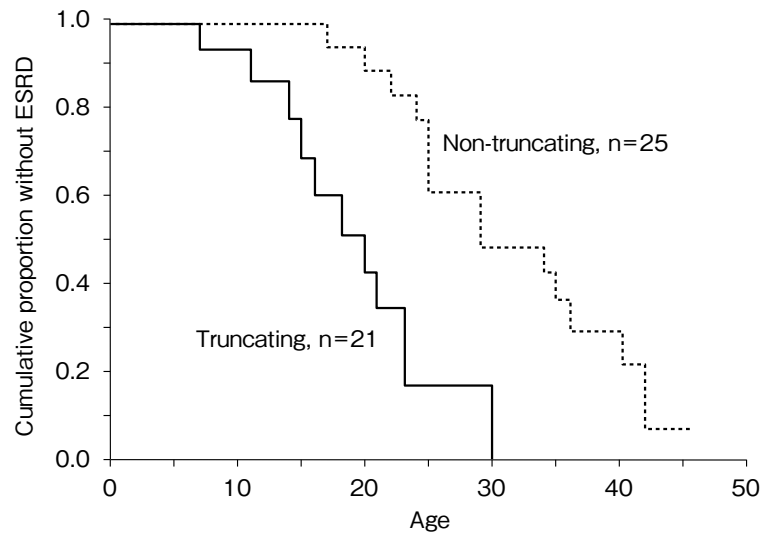


図 Probability of developing ESRD according to mutation types

(Horinouchi, et al. J Am Soc Nephrol 29: 2244–2254, 2018. より許可を得て転載, Copyright Clearance Center, Inc.)

に、そのトランスクリプトが truncating か non-truncating かを区別して ESRD に至った年齢と genotype との相関を検討した。これらの患者の大半は他院で継続フォローアップされるなかで、腎病理所見や家族歴、臨床症状から Alport 症候群が疑われ当科に遺伝子検査目的に紹介になっており、臨床データは患者の主治医が記載した調査書の内容に基づいて収集を行った。

遺伝学的診断は、サンガー法による *COL4A5* 遺伝子の解析、もしくは NGS 疾患パネルによる *COL4A5* 遺伝子を含めた網羅的遺伝子解析を行ったのち、変異が同定できない症例についてはコピー数異常の解析や mRNA の解析を追加した。また、splicing 異常をきたす可能性がある変異が検出された際にも mRNA の解析を追加した。

非典型的な splicing パターンを呈した 1 例 (A422) に関しては、*in vitro* assay として minigene を用いた splicing assay

を行った。また、41 家系の変異に関して、*in silico* assay として Human Splicing Finder を用いて splice site のスコアの変化を解析した。

結 果

本研究の対象となった 41 家系のうち、32 家系 (78%) は splice site 変異、5 家系 (12%) は deep intron の変異、4 家系 (10%) はエクソン内の変異を認めた。トランスクリプト解析の結果は 41 家系のうち、22 家系 (54%) でエクソンスキッピングをきたしており、13 家系 (32%) で新たな splice site が生じていた。さらに 5 家系 (12%) でクリプティックエクソンを生じ、1 家系で巨大エクソンが生じていた。未報告の非典型的な splicing パターンを呈した 14 例に関してはそのトランスクリプトを報告した。非典型的な splicing パター

ンを呈した1例(A422)に関する *in vitro* splicing assay では患者配列において、生体と同様のエクソンスキッピングが生じることが示された。41家系の Human Splicing Finder を用いた *in silico* 解析の結果から、19家系では完全に splicing パターンを予測可能であり、17家系では splicing 異常の可能性は予測できるものの、実際の splicing パターンは予測不能であり、5家系では splicing 異常の可能性が予測不能であった。29家系46例の男性患者の腎生存曲線を作成し求めた ESRD に至った年齢の中央値は、non-truncating 群で29歳、truncating 群で20歳であり、統計学的有意差をもって non-truncating 群で腎予後が良好であった(表、図：p=0.001)。

考 察

本研究は splicing 異常に伴う XLAS 患者を対象とした Case series であり、非典型的な未報告の splicing パターンを呈した患者(n=14)の報告を行うとともに、世界で初めてトランスクリプトレベルで truncating か non-truncating かを区別し、splicing 異常に伴う男性 XLAS 患者の遺伝子型と臨床像の相関関係を比較した。

すでにこれまでの報告で、男性 XLAS 患者において、遺伝子型と臨床像の相関関係は比較的確立されており、truncating 変異を有する患者が、non-truncating 変異を有する患者と比較し重症となることが示されている。しかしながらこれらの報告で、splice site 変異により発症する患者はひとつくりにされており、そのトランスクリプトに基づいた解析というのはいまだ行われていなかった。本研究でわれわれは初めて、splicing 異常に伴う男性 XLAS 患者におい

て、truncating トランスクリプトを示す患者が non-truncating トランスクリプトを示す患者と比較し重症となることを明らかにした。

近年、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエクソンスキッピング療法の開発が各種疾患で進んでいる。truncating 変異を non-truncating トランスクリプトに変換する治療法は筋ジストロフィーなどの疾患ですでに FDA の承認を受けており、遺伝子型と臨床像の相関関係が比較的確立されている XLAS においても同様の治療戦略をとれる可能性がある。エクソンスキッピング療法開発においても、本研究での non-truncating トランスクリプトのデータは非常に有用であると考えられる。

本研究の limitation は、腎組織から抽出した mRNA ではなく末梢血リンパ球から抽出した mRNA を用いたこと、腎予後に関係する薬剤、高血圧、その他の腎疾患の可能性などの関連を解析できていないこと、サンプルサイズが比較的小さいために、家族例や同じ変異を持つ例を含んでいることである。

本研究は、splicing 異常に伴う男性 XLAS 患者において、truncating トランスクリプトを示す患者と non-truncating トランスクリプトを示す患者は明らかに異なった腎予後を示し、non-truncating トランスクリプトを示す患者のほうがより軽症であるということ初めて明らかにした。このことは、XLAS 患者において、splicing パターンを修飾し、truncating 変異を non-truncating トランスクリプトに変換することが治療上有効である可能性を示す根拠となりうると考える。

利益相反自己申告：研究費・助成金(第一三共)