



# Development of ultra-deep targeted RNA sequencing for analyzing X-chromosome inactivation in female Dent disease

Minamikawa, Shogo

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7242号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007242>

※ 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

### Development of ultra-deep targeted RNA sequencing for analyzing X-chromosome inactivation in female Dent disease

Ultra-deep targeted RNA シークエンス法による女性 Dent 病の X 染色体不活化解析

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)

南川 将吾

#### 【背景】

Dent 病は近位尿管障害を主症状とする稀な X 連鎖型劣性遺伝性腎疾患であり、CLCN5 を責任遺伝子とする Dent-1 と OCRL を責任遺伝子とする Dent-2 に分けられる。病原性のあるヘミ接合体変異を有する Dent 病男性患者は全て高度な低分子蛋白尿 (LMWP) を呈し、30-60% の患者は腎石灰化や慢性腎臓病も認める。女性キャリア症例は一般的に非常に軽度な表現型を呈するが、一部の女性キャリアでは高度な LMWP や慢性腎障害などを示したという報告がある。

X 染色体不活化 (XCI) とは母または父由来のどちらかの X 染色体に対する転写抑制機構であり、どちらの X 染色体が不活化されるかはランダムである。理論上はそれぞれの染色体における XCI の比率は 50:50 であるが、XCI 比率は各個人の各臓器で異なっており、一部の女性においてはこの比率が極端に偏ることが知られている (skewed XCI)。Skewed XCI は X 連鎖型遺伝性疾患のキャリア女性における症状に影響すると考えられているが、Dent 病の女性症例における XCI と表現型の関係性を示した報告は今まで無い。

XCI 比率の解析にはヒトアンドロゲン受容体 (HUMARA) 法が最も用いられている。HUMARA 法はヒトアンドロゲン受容体遺伝子に対してメチル化感受性制限酵素を用いて PCR を行い、各アレルからの PCR 産物量を比較する方法であるが、これには以下の制限がある。i) 疾患の責任遺伝子ではなく、ヒトアンドロゲン受容体遺伝子に対してメチル化の有無を測定する方法である。ii) DNA におけるメチル化の測定であり、症状により直接的に影響する蛋白量や mRNA 発現量を測定しているわけではない。実際、一部の文献では HUMARA 法で算出した XCI 比率は RNA 発現比率と異なっていたため、患者の重症度を反映しなかったと報告している。そこで、近年この問題を解決するために次世代シーケンサー (NGS) を用いた XCI 解析法が報告された。これは NGS により RNA 全体のシーケンスをを行い、各遺伝子全ての RNA 発現率を解析する方法であり、上記の HUMARA 法の弱点を克服したが、手順が複雑であることや高価な検査費用が問題となった。

今回我々は著名な LMWP 尿を呈する 4 人の女性 Dent 病患者において、NGS を用いた遺伝子解析にて Dent-1 と診断し、さらに skewed XCI とデント病発症についての関係性を示すために XCI 解析を行った。XCI 解析には患者の血液と尿検体から抽出した DNA と mRNA を用いて、HUMARA 法と ultra-deep targeted RNA-Seq 法を使用した。Ultra-deep targeted RNA-Seq 法は責任遺伝子のみをターゲットとして各アレルの RNA 発現を比較する XCI 解析の新法である。

#### 【方法】

高度 LMWP 尿を呈する女兒 4 例において、18 の尿管疾患関連遺伝子を含む遺伝子パネルを

利用した NGS による遺伝子解析を行った。病原性を有する CLCN5 の変異を認めた部位に対してサンガー法による確認を行い、CLCN5 のスプライシングサイトの変異を認めた 1 例に対してはトランスクリプト解析を行った。また、これら 4 症例と症例 2 の母において、血液と尿沈渣細胞の両方からゲノム DNA と RNA を抽出し、DNA を用いて HUMARA 法による XCI 解析を行った。不活化比率は 80:20 以上の偏りを skewed、90:10 以上を extremely skewed と定義した。さらに、RNA を用いて ultra-deep targeted RNA-Seq 法による XCI 解析も行った。この方法は、一般的な RNA-Seq で行う RNA の断片化を行わず、変異部位を有する CLCN5 の領域について RT-PCR により増幅し、その産物を断片として扱う。以降は RNA-Seq のプロトコールに従ってこれら RT-PCR 産物の断端の修復、アデニル塩基の付加、アダプターの接着を行い、PCR を施行した後にシーケンスを行う方法である。

## 【結果】

症例は1歳または3歳時の尿スクリーニング検査にて高度のLMWPを指摘された女兒4例であり、腎石灰化、高Ca尿症、CKDや腎外症状は認めなかった。LMWPは症例1、3、4の父にも認めしたが、症例2の両親には認めなかった。症例1、3においては腎生検が施行されたが、特記すべき異常所見は認めなかった。遺伝子解析では全症例においてCLCN5のヘテロ接合体変異を認め(症例1: c. 337+5 G>C) (症例2: c. 608C>T, p. Ser203Leu) (症例3: c. 2152C>T, p. Arg718\*) (症例4: c. 800A>T, p. Glu267Val)、症例1、3、4の父と症例2の母にも同部位の変異を認めた。トランスクリプト解析では症例1のmRNAに23塩基の挿入を認めたため、症例1の変異は病原性を有すると判断した。HUMARA法によるXCI解析では、症例1の血液リンパ球において100:0で変異を有するX染色体が優位に活性化しているextremely skewed Xが認め、症例3の血液検体においても変異を認めるX染色体が優位である87:13のskewed Xを認めた。一方で症例2とその母、症例3においてはskewed Xを認めなかった。また、全症例において、血液リンパ球と尿沈渣細胞による結果はほぼ同等であった。ultra-deep targeted RNA-Seq法によるXCI解析においてもHUMARA法と完全に一致した結果であった。シーケンスデプスは30-230万と十分な解析深度であった。

## 【考察】

我々は CLCN5 のヘテロ接合体変異を持ち、高度の LMWP 尿を呈する 4 人の Dent-1 の女性症例と無症状の 1 例の母を加えた計 5 例において、HUMARA 法と ultra-deep targeted RNA-Seq 法による XCI 解析を行い、Dent 病の表現型と XCI の関連性について検討した。この報告は、

我々の知る限りでは女性の Dent 病発症における XCI の関連性を示す初めての報告である。

X 連鎖型遺伝性疾患の女性キャリアにおける表現型と XCI の関連性については Fabry 病や Duchenne/Becker 型筋ジストロフィーなど様々な疾患において報告されている。一方で、Dent 病においては無症候の女性例における血液リンパ球を用いた HUMARA 解析の報告 1 例のみであり、この報告では 0:100 で変異を有する X 染色体が優位に不活化していたことが無症候の原因であったと結論付けられている。しかし、XCI 比率は臓器によって異なっているため、腎疾患における表現型の検討には腎組織由来の DNA 検体が必要である。さらに、HUMARA 法には前述した欠点が報告されている。そこで我々の検討では XCI 解析には血液検体と腎組織由来である尿沈渣細胞を使用し、解析方法には DNA メチル化解析のみならず RNA 解析も行った。

今回の検討では、重度の LMWP を呈する 4 例の内 2 例において skewed X を認めた。1 例は 100:0 の extremely skewed X であり、明らかに発症に関与していた。また、健常女性における Skewed X の発生頻度は 7-34% であるのに対して、我々の検討では半数の症例で skewed X を認めたことも、skewed X が女性における Dent 病の発症に関与する傾向があることを示しているかもしれない。一方で、残り 2 例においては skewed X を認めなかった。症例 2 とその母においては遺伝子変異と XCI 比率が同一であるにも関わらず尿中 LMWP の値は大きく異なっていたことから、Dent 病には XCI 以外の発症機序の存在も示唆される。我々の検討では NGS によるパネル解析により、CLCN5 以外の多数の尿細管関連遺伝子に異常が無いことは確認したが、*INPP5B* や未知の遺伝子の変異が修飾遺伝子として作用した可能性は否定できない。

我々のデータでは、血液リンパ球と腎組織の XCI 比率は全ての例でほとんど同一であった。過去の報告においてもこれらの組織間で XCI は近似性があるとされており、この傾向は若年者ほど強いと報告されている。

我々は ultra-deep targeted RNA-Seq という新しい XCI 解析法を立ち上げた。この方法を用いれば、疾患の責任遺伝子におけるアレル間の転写産物発現比率を直接的に測定可能である。しかし、我々のデータでは全 5 例に対して HUMARA 法と新法について完全に一致したことから、HUMARA 法もまた信頼できる解析法であることを示した。

この研究にはいくつかの制限がある。一つは Dent 病の女性症例が非常に稀であることに起因する検討症例の少なさである。もう一つは尿沈渣細胞の RNA 抽出量が少なかったため、ultra-deep targeted RNA Seq による XCI 解析の際に、尿検体由来の cDNA のみ nested PCR を行っている点である。しかし、血液検体からの結果や HUMARA 法による結果と一致したからは、nested PCR によるバイアスは少ないと考えられた。

結論として、我々は新規の XCI 解析法を立ち上げ、4 例中 2 例における女性の Dent 病発症に

XCI が関連していることを示した。XCI 解析の結果は血液リンパ球と尿沈渣細胞由来の検体間で完全に一致し、さらには HUMARA 法による DNA 解析も新法による RNA 解析も共に有効な XCI 解析法であると考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2787号	氏名	南川 将吾
論文題目 Title of Dissertation	Development of ultra-deep targeted RNA sequencing for analyzing X-chromosome inactivation in female Dent disease  Ultra-deep targeted RNA シークエンス法による女性 Dent 病の X 染色体不活性化解析		
審査委員 Examiner	主 査 錦織 千佳子 Chief Examiner 副 査 小川 涉 Vice-examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【背景と目的】

申請者達は近位尿管障害を主症状とする稀なX連鎖型劣性遺伝性腎疾患であるDent病のうち責任遺伝子CLCN5とするDent-1について、その重症度に深く関わるとされるX染色体不活化(XCI)の不均衡について検討した。

XCI比率の解析によく用いられるヒトアンドロゲン受容体(HUMARA)法は、疾患の責任遺伝子ではなく、ヒトアンドロゲン受容体遺伝子に対してメチル化の有無を測定する方法で、DNAにおけるメチル化の測定であり、症状により直接的に影響する蛋白量やmRNA発現量を測定しているわけではない。一方、近年次世代シーケンサー(NGS)によりRNA全体のシーケンスを行い、各遺伝子全てのRNA発現率を解析する方法も用いられるが、手順が複雑で高価な検査費用が問題となる。

今回申請者達は著明なLMWP尿を呈する4人の女性Dent病患者において、NGSを用いた遺伝子解析にてDent-1と診断し、さらにskewed XCIとDent病発症についての関係性を示すために患者の血液と尿検体から抽出したDNAとmRNAを用いたHUMARA法と責任遺伝子のみをターゲットとして各アレルのRNA発現を比較するultra-deep targeted RNA-Seq法を使用し、XCI解析を行なった。

【方法と結果】

症例は1歳または3歳時の尿スクリーニング検査にて高度の低分子蛋白尿(LMWP)を指摘された女兒4例であり、腎石灰化、高Ca尿症、CKDや腎外症状は認めなかった。LMWPは症例1、3、4の父にも認めたが、症例2の両親には認めなかった。症例1、3においては腎生検が施行されたが、特記すべき異常所見は認めなかった。遺伝子解析では全症例においてCLCN5のヘテロ接合体変異を認め(症例1: c.337+5 G>C)(症例2: c.608C>T, p.Ser203Leu)(症例3: c.2152C>T, p.Arg718\*)(症例4: c.800A>T, p.Glu267Val)、症例1、3、4の父と症例2の母にも同部位の変異を認めた。トランスクリプト解析では症例1のmRNAに23塩基の挿入を認めたため、症例1の変異は病原性を有すると判断した。HUMARA法によるXCI解析では、症例1の血液リンパ球において100:0で変異を有するX染色体が優位に活性化しているextremely skewed Xを認め、症例3の血液検体においても変異を認めるX染色体が優位である87:13のskewed Xを認めた。一方で症例2とその母、症例3においてはskewed Xを認めなかった。また、全症例において、血液リンパ球と尿沈渣細胞による結果はほぼ同等であった。ultra-deep targeted RNA-Seq法によるXCI解析においてもHUMARA法と完全に一致した。シーケンスデプスは30~230万と十分な解析深度であった。この報告は、女性のDent病発症におけるXCIの関連性を示す初めての報告である。

X連鎖型遺伝性疾患の女性キャリアにおける表現型とXCIの関連性についてはFabry病やDuchenne/Becker型筋ジストロフィーなど様々な疾患において報告されているが、Dent病においては無症候の女性例における血液リンパ球を用いたHUMARA解析の報告1例のみであり、この報告では0:100で変異を有するX染色体が優位に不活性化していたことが無症候

の原因であったと結論付けられているが、XCI 比率は臓器によって異なっているため、腎疾患における表現型の検討には腎組織由来の DNA 検体が必要である。今回の検討では XCI 解析には血液検体と腎組織由来である尿沈渣細胞を使用し、解析方法には DNA メチル化解析のみならず RNA 解析も行ない、重度の LMWP を呈する 4 例の内 2 例において skewed X を認めた。1 例は 100:0 の extremely skewed X であり、明らかに発症に関与していた。また、健常女性における Skewed X の発生頻度は 7-34%であるのに対して、半数の症例で skewed X を認めたことも、skewed X が女性における Dent 病の発症に関与することを示唆する。一方で、残り 2 例においては skewed X を認めなかったことや症例 2 とその母においては遺伝子変異と XCI 比率が同一であるにも関わらず尿中 LMWP の値は大きく異なっていたことは、Dent 病には XCI 以外の発症機序の存在も示唆する。

今回の結果から、血液リンパ球と腎組織の XCI 比率は全ての例でほとんど同一であったことは過去の報告においてもこれらの組織間で XCI は近似性があるとされていることと一致する。

本研究は ultra-deep targeted RNA-Seq という疾患の責任遺伝子におけるアレル間の転写産物発現比率を直接的に測定可能な新しい XCI 解析法を立ち上げ、4 例中 2 例における女性の Dent 病発症に XCI が関連していることを示した。XCI 解析の結果は血液リンパ球と尿沈渣細胞由来の検体間で完全に一致し、HUMARA 法による DNA 解析も新法による RNA 解析も共に有効な XCI 解析法であることも示した。よって本研究は重要な知見を得たものとして価値ある集積であり、博士（医学）学位を得る資格があると認める。