Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

A comparison of splicing assays to detect an intronic variant of the OCRL gene in Lowe syndrome

Nakanishi, Keita

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2019-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第7451号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007451

※ 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

A comparison of splicing assays to detect an intronic variant of the *OCRL* gene in Lowe syndrome

Lowe症候群における*OCRL*遺伝子のイントロン領域の変異を同定するためのスプライシング分析の比較

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科系講座 小児科学
(指導教員:飯島 一誠 教授)
中西 啓太

【背景】

Lowe 症候群はX連鎖型遺伝病で、先天性白内障、重度の知的障害、尿細管障害といった症状を呈する疾患である。Lowe 症候群の原因遺伝子としては *OCRL* 遺伝子が発見されており、100 を越える病因とされる変異がこれまで報告されており、内約 30 はイントロンのスプライシング領域の変異が報告されている。AG-GT 以外のスプライシング変異が病因かどうか調べるためには、患者の臓器から直接抽出した異常な mRNA の同定が必要である。しかし、mRNA は不安定であり、逆転写 PCR は時に困難なことがある。さらに、Lowe 症候群の診断には腎生検は必要ではないことから、患児の腎臓から直接 mRNA を抽出することは困難である。これまで、末梢血のリンパ球から抽出したmRNA の分析が臓器から直接抽出した mRNA の分析の代用として有用とする報告がされている。さらに mRNA 解析が利用できない際には、Human Splicing Finder のような on line での in silico 解析が有用とする報告もある。

そこで、本研究では、末梢血リンパ球から抽出した mRNA 解析、minigene を用いた mRNA 解析、及び in silico での解析の 3 つの解析を比較し、その有用性を調べた。

【方法】

患者

症例は 16 歳の男児、生後すぐに先天性白内障と診断された。またその際に血液検査、尿検査を施行され、Fanconi 症候群と診断された。児は徐々に知的障害が顕在化した。16 歳時に尿検査を施行され、尿中 β2MG 424000 μg/L と著名な高値が見られ、腎エコー検査では石灰化を認め、臨床的に Lowe 症候群と診断された。

遺伝学的検査

患者の両親から同意を得た後、患者の末梢リンパ球から DNA を抽出し、尿細管疾患の原因遺伝子 panel を作成し、次世代シークエンサーを用いて解析を行った。mRNA 解析についても既報の方法を用いて行った。方法としては、total RNA を末梢血から抽出し逆転写を行った。cDNA 作成後 PCR を行い、配列を同定した。

In vitro splicing assay

H492 vector を用いて minigene を作成した。まず、患者とコントロールの末梢血リンパ球から DNA を抽出し、*OCRL* 遺伝子のイントロン 9 からイントロン 12 を含む領域を、制限酵素領域を追加した primer を用いて PCR で増幅した。PCR 産物と H492 vector を制限酵素処理した後、ligation を行い、minigene を作成した。患者とコントロールの PCR 産物を hybrid させた vector を HEK293T 細胞、及び HeLa 細胞に transfection し、強制発現した mRNA を抽出した。抽出した mRNA は逆転写を行った後に PCR を行い、その配列を確認した。

In silico splicing assay

Human Splicing Finder を用いてスプライシング領域の解析を行った。

【結果】

Mutation analysis

次世代シークエンサーを用いた解析から、患者にイントロン 11 領域の既報の変異(c.940-11G>A)を同定した。患児の末梢血リンパ球から抽出した mRNA 解析では、Exon9 と Exon10 の間に 9 塩基の挿入を同定した。またこの 9 塩基内に stop codon を同定した。

In vitro splicing assay

minigene 分析からは、患児の末梢血リンパ球から抽出した mRNA 解析と同様の結果が得られた。

In silico assay

The Human Splicing Finder での分析では、患児の変異は新たな acceptor 領域のスコアを 56.27 から 85.21 に変化させ、元の acceptor 領域のスコアを 76.4 から 76.15 に変化させるという結果が得られた。この結果は、患者の末梢血リンパ球から抽出した mRNA で行った解析、及び mingene 解析の結果と一致するものであった。

【考察】

本研究では、Lowe 症候群の患児において、*OCRL* 遺伝子のイントロン 11 における既報の変異を同定することができた。また、3 つの別々の方法で mRNA 解析を行ったところ、3 つの方法はすべて結果が一致した。

splicing 領域に変異を認めた場合、その病因性を調べるために組織から mRNA を直接抽出することは、mRNA の不安定な性質上困難なことが多い。加えて、遺伝性腎疾患が疑われた際に腎組織から直接 mRNA を抽出することは困難なことが多い。過去の報告からは、末梢血リンパ球から mRNA を抽出したとしても、すべての腎疾患の遺伝子がリンパ球に発現しているとはかぎらないとされている。

過去に、minigene を用いてイントロン領域の病因を証明したとする報告があり、この方法であれば、患者の DNA を抽出し、異常のある部位を minigene に挿入しmRNA の解析することができる。また、患者の DNA が手に入らなかったとしても mutagenesis を行い、変異を挿入することで mRNA 解析を行うことができ、大変有用な方法と考えられる。本研究では、3 つの方法が 1 つの結果で一致したことから、minigene が大変有用な解析方法であると考えられた。

また、本研究では Human Splicing Finder が予測した splicing 異常と末梢血リンパ球から抽出した mRNA 解析、及び minigene での mRNA 解析結果が一致し、in silico 解析も有用な方法と考えらえた。

結論としては、今回行った 3 つの方法は結果が一致したことから、すべてが有用な方法であると考えられた。特に遺伝性腎疾患においては、これらすべての方法が splicing 異常の解析に採用され、さらに複雑な splicing のメカニズムの解明に有用であると考えられた。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2850号	氏　名	中西啓太
論文題目 Title of Dissertation	A comparison of splicing assays to detect an intronic variant of the OCRL gene in Lowe syndrome Lowe症候群におけるOCRL遺伝子のイントロン領域の変異を同定するためのスプライシング分析の比較		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	小川 正弘 錦織 千佳子 榎本 秀樹	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

Lowe症候群はX連鎖型遺伝病で、先天性白内障、重度の知的障害、尿細管障害といった症状を呈する疾患である。Lowe症候群の原因遺伝子としてはOCRL遺伝子が発見されており、100を越える病因とされる変異がこれまで報告されており、内約30はイントロンのスプライシング領域の変異が報告されている。AG-GT以外のスプライシング変異が病因かどうか調べるためには、患者の臓器から直接抽出した異常なmRNAの同定が必要である。しかし、患児の腎臓から直接mRNAを抽出することは困難である。これまで、末梢血のリンパ球から抽出したmRNAの分析が臓器から直接抽出したmRNAの分析の代用として有用とする報告がされている。さらにmRNA解析が利用できない際には、Human Splicing Finderのようなon lineでのin silico解析が有用とする報告もある。本研究では、末梢血リンパ球から抽出したmRNA解析、minigeneを用いたmRNA解析、及びin silicoでの解析の３つの解析を比較し、その有用性を調べた。

解析対象症例は16歳の男児であり、生後すぐに先天性白内障と診断された。またその際に血液検査、尿検査を施行され、Fanconi症候群と診断された。児は徐々に知的障害が顕在化した。16歳時に尿検査を施行され、尿中β2MG 424000 μg/Lと著名な高値が見られ、腎エコー検査では石灰化を認め、臨床的にLowe症候群と診断された。患者の末梢リンパ球からDNAを抽出し、尿細管疾患の原因遺伝子panelを作成し、次世代シークエンサーを用いて解析を行った。その結果、次世代シークエンサーを用いた解析から、患者にイントロン11領域の既報の変異(c.940-11G>A)を同定した。患児の末梢血リンパ球から抽出したmRNA解析では、Exon9とExon10の間に9塩基の挿入を同定した。またこの9塩基内にstop codonを同定した。mRNA解析については、total RNAを末梢血から抽出し逆転写を行った。cDNA作成後PCRを行い、配列を同定した。H492 vectorを用いてminigeneを作成した。まず、患者とコントロールの末梢血リンパ球からDNAを抽出し、OCRL遺伝子のイントロン９からイントロン12を含む領域を、制限酵素領域を追加したprimer を用いてPCRで増幅した。PCR産物とH492 vectorを制限酵素処理した後、ligationを行い、minigeneを作成した。患者とコントロールのPCR産物をhybridさせたvectorをHEK393T細胞、及びHeLa細胞にtransfectionし、強制発現したmRNAを抽出した。抽出したmRNAは逆転写を行った後にPCRを行い、その配列を確認した。minigene分析からは、患児の末梢血リンパ球から抽出したmRNA解析と同様の結果が得られた。さらに Human Splicing Finderでの分析では、患児の変異は新たなacceptor領域のスコアを56.27から85.21に変化させ、元のacceptor領域のスコアを76.4から76.15に変化させるという結果が得られた。この結果は、患者の末梢血リンパ球から抽出したmRNAで行った解析、及びmingene解析の結果と一致するものであった。本研究では、Lowe症候群の患児において、OCRL遺伝子のイントロン11における既報の変異を同定することができた。また、３つの別々の方法でmRNA解析を行ったところ、3つの方法はすべて結果が一致した。

本研究は、 Lowe症候群の遺伝子のスプライシング分析法について解析したものであり、従来ほとんど行われていなかった３つの別々の方法の有用性についての新規かつ重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。