Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

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

Horinouchi, Tomoko

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2019-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7453号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007453

※ 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

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

X染色体連鎖型Alport症候群におけるスプライシング異常の同定と臨床遺伝学的検討

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）

堀之内　智子

【背景】

X染色体連鎖型Alport症候群（XLAS）は、Ⅳ型コラーゲンα5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来す他、感音性難聴や眼病変の合併を特徴とする疾患である。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(ナンセンス変異、フレームシフト変異など)を有する患者が、non-truncating変異(ミスセンス変異、インフレーム変異など)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、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というのは未だ行われていない。

今回我々は、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なった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を示すもの、*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スプライシング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exon49skippingの家系（exon49-51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ため）を除いた29家系46人の男性患者を対象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をされる中で、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なったのち、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 変異で、5 家系（12%）は deep intron の変異、4 家系（10%）は exon 内の変異を認めた（Table1）。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（Table1）。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 Figure1 に示した。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うることが示された。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 人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 群でその中央値が 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（Table2, Figure2）。

【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という点で優れていると考えられる。

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くくりにされており、そのトランスクリプトに基づいた解析というのは未だ行われていなかった。本研究で我々は初めて、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、腎予後に関係しうる薬剤・高血圧・その他の腎疾患の可能性等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も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 トランスクリプトの方がより軽症であるということを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 トランスクリプトを 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得るだろう。

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2852号	氏　名	堀之内　智子
論文題目 Title of Dissertation	Detection of Splicing Abnormalities and Genotype-Phenotype Correlation in X-linked Alport Syndrome X染色体連鎖型Alport症候群におけるスプライシング異常の同定と臨床遺伝学的検討		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	西 慎一 小川 誠 古屋敷 智之	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

背景と目的: X 連鎖型アルポート症候群は *COL4A5* 伝子異常により発生する遺伝性疾患である。一般に non-truncating 変異は、truncating 変異より軽症型である。しかし、transcript 解析が十分になされていなかったことから、splicing 異常による non-truncating 変異と truncating 変異の臨床的差異は十分に解明されてこなかった。

この研究では、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）の解析を行った。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。

方法と結果: 2006 年 1 月から 2017 年 7 月までに神戸大学小児科で遺伝学的に診断を行なった 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 を示すもの、*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 exon49skipping の家系（exon49-51 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ため）を除いた 29 家系 46 人の男性患者を対象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。

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なったのち、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。

41 家系例はスプライシング異常による Alport 症候群例で、14 家系例は新規の点変異による非典型的 exon skipping 以外の Alport 症候群例であった。末期腎不全への進行速度は、truncating 変異例では平均 20 年(95%CI, 14-23 年)、non-truncating 変異例では平均 29 年 95%CI, 25-40 年)で有意差がみられた(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という点で新規のデータと考える。

既報では男性 XLAS 患者の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。しかしこれらの報告で、splice site 変異により発症する患者はひとくくりにされており、そのトランスクリプトに

基づいた解析というのは未だ行われていなかった。本研究で初めて、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、腎予後に関係しうる薬剤・高血圧・その他の腎疾患の可能性等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く、家族例や同じ変異をもつ例を含んでいる点である。

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 トランスクリプトの方がより軽症であるということを初めて明らかにした点において、優れた研究であり価値ある知見の集積である。よって本研究は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。