

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16087

研究課題名（和文）患者由来近位尿細管細胞を用いたLowe症候群の病態解明および新規治療法の開発

研究課題名（英文）Clarification of pathophysiology and development of new treatment for lowe syndrome using patient-derived proximal tubular cells

研究代表者

南川 将吾（Minamikawa, Shogo）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：10772634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：Dent病2型（D2）、Lowe症候群（LS）の症例を収集し、次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行った。その結果、D2を11家系14例、LSを14家系14例の遺伝学的診断を行い、それぞれにおける表現型と遺伝子型の差異を明らかにした。また、D2とLSの患者由来尿中落下細胞株ではOCRLの発現の差異を確認できなかったものの、OCRL変異を含むベクターを導入したOCRL過剰発現細胞株を作成し、D2とLSの細胞株でOCRL活性を比較した結果、LS細胞株にて有意なOCRL発現と活性の低下を認めた。一方で、ナンセンス変異を有するLS細胞株にリードスルーを導入したが、OCRL発現量の改善は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一遺伝子の変異が原因であるにも関わらず全く異なる表現型を示すDent病2型（D2）とLowe症候群（LS）の病態の違いについては未だ不明な点が多く、有効な治療法もみつかっていない。我々はこれらの疾患に対して、遺伝子型と表現型、さらにはOCRL発現量やOCRL活性を比較することで病態解明を試み、さらにはLSの治療法としてナンセンスリードスルー療法の有用性について検討した。残念ながら治療法確立とまでは進んでいないが、病態解明に向けて引き続き研究を継続していく予定である。

研究成果の概要（英文）：We collected cases of patients with Dent disease 2 (D2) and Lowe syndrome (LS), and genetically diagnosed 14 cases of D2 and 14 cases of LS by a next-generation sequencer. We revealed the differences in phenotype and genotype between D2 and LS. Because we could not confirm the difference in the expression of OCRL in the urine-derived cell lines derived from patients with D2 and LS, we created an OCRL overexpressing cell line into which a vector containing the OCRL mutation was introduced. As a result, in the LS cell line, OCRL expression and activity were significantly decreased compared with D2. On the other hand, the nonsense readthrough was introduced into the LS cell line having the nonsense mutation, but no improvement in OCRL expression was observed.

研究分野：小児科学

キーワード：Lowe syndrome Dent disease 2 urine-derived cell OCRL activity

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Dent 病 2 型 (D2) は尿細管性蛋白尿を呈し、全身症状は合併せず多くが無症状で、末期腎不全への進行は稀である一方で、Lowe 症候群 (LS) は知能障害、先天性白内障、ファンコニ症候群などを呈し、20-40 歳頃には末期腎不全へと進行する。両疾患の責任遺伝子は X 染色体長腕上の OCRL 遺伝子であり、主に膜輸送や細胞骨格系に携わる蛋白である Phosphatidylinositol 4,5 bishosphate(PIP2) 5-phosphatase をコードしており、PIP2 5-phosphatase 活性の低下が Lowe 症候群の本態とされている。しかし、これまで病態の検討は皮膚線維芽細胞が用いられており、腎表現型の本態である腎由来細胞を用いた酵素活性の測定や病態解析は未だ行われていない。

2009 年 Shrimpton らは OCRL にはアイソフォームがあり、Exon8 以前に truncating 変異を持つ患者はアイソフォームによってレスキューされるため軽症の D2 を発症し、Exon8 以降に truncating 変異を持つ患者は重症の LS を発症するという仮説を唱えた。しかし、これは今なお証明されておらず、D2 と LS の表現型の差異を発生させる要因は不明のままであり、これらの疾患の有効な治療法も見つかっていない。

2. 研究の目的

尿中落下細胞や iPS 細胞などの患者の尿細管由来細胞を用いて D2 と LS の病態解明を行うと同時に、LS においてナンセンスリードスル 療法によりナンセンス変異 (truncating mutation) をミスセンス変異 (non-truncating mutation) に置換することで十分な酵素活性を獲得させ、LS の治療法としての有用性を確認することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

Dent 病・LS と臨床的に診断された患者の血液検体・尿検体を全国医療施設より収集し、NGS を用いて網羅的に遺伝子解析を行った。また、これらの検体の内遺伝学的に確定診断した D2 と LS 患者それぞれの尿検体より尿中落下細胞の細胞株を作成し、RT-PCR・Western blotting・ELISA・遊離リン酸定量解析によって D2 と LS における OCRL 蛋白の発現量や機能解析を行った。また、同様の解析を OCRL 変異を組み込んだベクターを導入した HeLa 細胞を用いても行った。更に、ナンセンス変異を持つ LS 患者の尿中落下細胞株を用いて、PTC124 を用いたナンセンスリードスルーを行い、ELISA・Western blotting による OCRL 発現量の解析も行った。

4. 研究成果

Dent 病 2 型 (D2) と Lowe 症候群 (LS) の病態解明のため、まずは各疾患が疑われる患者の血液検体に対して次世代シーケンサーを用いて網羅的遺伝子解析を行い、遺伝学的に確定診断した。D2 14 例、LS 14 例における遺伝学的特徴は、これまでの報告にもあるように Exon8 以降の truncating 変異では LS の表現型を呈し、Exon7 以前の truncating 変異では D2 の表現型を示した。また、missense 変異の中でも重症度に差異があることや、LS 患者内でも重症度に大きく差を認めることが明らかとなった。D2 と LS における表現型の差異の原因解明のため、近位尿細管細胞における OCRL の mRNA 解析・蛋白発現レベル・OCRL 活性の解析を目的として、両疾患患者の尿検体より尿中落下細胞の細胞株を作成し、RT-PCR・Western blotting・ELISA・遊離リン酸定量解析を行ったが、これらの結果では両疾患群の差異は明らかに出来なかった。尿中落下細胞はヘテロな細胞集団であることが一つの要因と考え、D2 と LS を引き起こす遺伝子変

異を組み込んだベクターをHela細胞に組み込んでOCRL発現量を解析した結果、D2とLSでOCRL発現量に明らかな差異（LSで低下）を認め、更に遊離リン酸定量による酵素活性解析でもLSはD2に比較して低下を認めた。また、Western blotting解析において、D2にアイソフォームを疑う蛋白の発現を確認したため、現在解析中である。ナンセンス変異を有するLS患者の尿中落下細胞株を用いたナンセンスリードスルー治療では蛋白発現量・酵素活性にて改善を証明することは出来なかったが、これも尿中落下細胞のヘテロ性が影響した可能性がある。D2とLSの病態解明はこれら難病疾患の治療開発に必須の項目であり、今回の研究によって長年仮説に止まっていたアイソフォームの同定に大きく進展することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minamikawa Shogo, Miwa Saori, Iijima Kazumoto, Nozu Kandai	4. 巻 65
2. 論文標題 Molecular mechanisms determining severity in patients with Pierson syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 355 ~ 362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0715-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minamikawa Shogo, Nozu Kandai, Maeta Shingo, Yamamura Tomohiko, Nakanishi Keita, Fujimura Junya, Horinouchi Tomoko, Nagano China, Sakakibara Nana, Nagase Hiroaki, Shima Hideaki, Noda Kenta, Ninchoji Takeshi, Kaito Hiroshi, Iijima Kazumoto	4. 巻 8
2. 論文標題 The utility of urinary CD80 as a diagnostic marker in patients with renal diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35798-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Minamikawa Shogo, Nozu Kandai, Iijima Kazumoto	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of ultra-deep targeted RNA sequencing for analyzing X-chromosome inactivation in female Dent disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 589 ~ 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-018-0415-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南川 将吾、野津 寛大、飯島 一誠
2. 発表標題 Lowe症候群およびDent-2における分子生物学的検討
3. 学会等名 第52回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榊原 菜々、南川 将吾、野津 寛大、飯島 一誠
2. 発表標題 Clinical and genetic characteristics in Dent disease 2 and Lowe syndrome.
3. 学会等名 ASN Kidney Week 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榊原 菜々、南川 将吾、野津 寛大、飯島 一誠
2. 発表標題 Comparison of clinical and genetic characteristics between Dent disease-1 and Dent disease-2
3. 学会等名 IPNA Congress 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榊原 菜々、南川 将吾、野津 寛大、飯島 一誠
2. 発表標題 Lowe症候群とDent disease-2の2疾患における分子生物学的発症機序の解明
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 南川 将吾、野津 寛大、飯島 一誠	4. 発行年 2018年
2. 出版社 金原出版株式会社	5. 総ページ数 9
3. 書名 小児科 Vol.59 No.10	

1. 著者名 南川 将吾、野津 寛大、飯島 一誠	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社 日本臨牀社	5. 総ページ数 4
3. 書名 内分泌症候群（第3版）（ ）	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	飯島 一誠 (Iijima Kazumoto)		
研究協力者	野津 寛大 (Nozu Kandai)		
研究協力者	庄野 朱美 (Shono Akemi)		
研究協力者	高里 実 (Takasato Minoru)		