

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15864

研究課題名(和文) Lowe症候群およびDent disease-2の発症機序の解明と新規治療開発

研究課題名(英文) Understanding the pathogenesis mechanism of Lowe syndrome and Dent disease-2 and new therapeutic development

研究代表者

榊原 菜々 (Nana, Sakakibara)

神戸大学・医学研究科・特務講師

研究者番号：90814319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：Lowe症候群およびDent disease-2はいずれもOCRLを責任遺伝子とするX染色体連鎖型の遺伝性疾患である。今回、全く異なる表現型を示すLowe症候群とDent disease-2の2疾患について、両者の重症度の違いを説明しうる分子生物学的機序を明らかにした。OCRLのexon6からはじまるトランスクリプトをクローニングし、このトランスクリプトから2種類の機能性蛋白(isoform)が合成されること、またこれらの機能性蛋白は5-phosphataseとしての酵素活性を有することを示した。isoformのレスキューにより、Dent disease-2では軽症な表現型を示すことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Dent disease-2がLowe症候群に比べ明らかに軽症な表現型を示す理由は、これまで明らかにされていなかったが、本研究ではDent disease-2患者にのみ発現するisoformのクローニングに成功し、またこのisoformがOCRL蛋白としての機能を持つことを証明した。本研究は長らく不明であったLowe症候群およびDent disease-2の発症メカニズムを解明するだけでなく、こLowe症候群の遺伝子治療の開発への足がかりとなる非常に重要な研究と考えている。

研究成果の概要(英文)：Both Lowe syndrome and Dent disease-2 are caused by OCRL mutations, but their clinical severities differ substantially; further, their molecular mechanisms remain unclear. Truncating mutations in OCRL exons 1-7 and 8-24 cause Dent disease-2 and Lowe syndrome, respectively; thus, OCRL isoforms are responsible for differences in disease severity. We successfully cloned novel OCRL isoform transcripts for exons 6-24 and identified the translation-initiation codons in exon 8. The isoforms translated from this novel transcript showed the same enzymatic activity as wild-type OCRL, consistent with the phenotypic divergence between OCRL exon 1-7 and exon 8-24. Our results will accelerate the elucidation of disease conditions associated with OCRL-related abnormalities, as well as promote the development of novel therapeutic agents for such conditions.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：OCRL Lowe症候群 Dent disease-2

1. 研究開始当初の背景

Lowe 症候群は先天性白内障、腎不全、筋力低下、精神運動発達遅滞を 4 徴候とする、先天性重症疾患である。一方 Dent disease-2 は、低分子蛋白尿、高 Ca 尿症、腎石灰化、腎結石などを特徴とする遺伝性腎疾患であるが、一般に症状は腎に局限している。この二つの疾患はいずれも OCRL を責任遺伝子とする X 染色体連鎖型の疾患であるが、両者の臨床的重症度はこのように大きく異なっている(図 1)。

OCRL 遺伝子がコードする OCRL 蛋白は、イノシトールリン脂質であるホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸(PI(4,5)P₂)の 5 位のリン酸基を脱リン酸化する酵素 PI(4,5)P₂ 5-phosphatase(以下ホスファターゼ)であり、この代謝制御は様々な細胞機能に関与している(図 2)。過去の報告では、Lowe

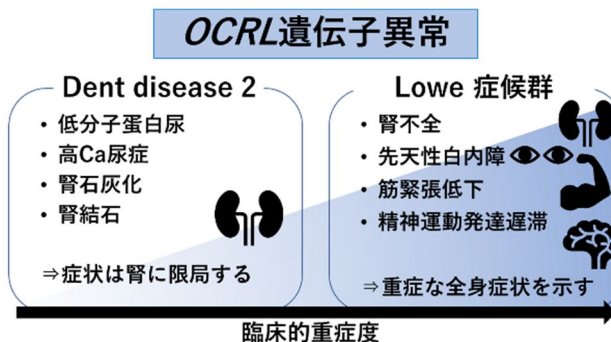


図1. 原因遺伝子は同じであるにも関わらず Dent disease-2とLowe症候群の臨床像は大きく異なる

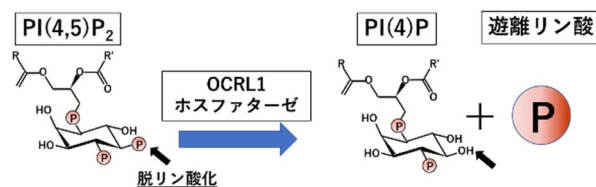


図2. OCRL1はイノシトールリン脂質PI(4,5)P₂の5位のリン酸基を基質特異的に脱リン酸化し、PI(4)Pにする酵素(ホスファターゼ)である。PI(4,5)P₂およびPI(4)Pのバランスの制御は細胞内シグナル伝達などの様々な細胞機能に密接に関与している。

症候群および Dent disease-2 患者培養細胞で、ホスファターゼ活性が低下していたことが示されているが、両者に差は認めなかったとされており、ホスファターゼ活性の低下が病態の本質であると考えられているものの、両疾患の重症度と酵素活性との関係は明らかになっていない。一方、過去の遺伝学的検討から exon1-7 の truncating 変異では Dent disease-2 を、exon8-24 の truncating 変異では Lowe 症候群を発症することが知られ、

我々がこれまで遺伝子診断を行ってきた OCRL 遺伝子異常の例も、この法則を満たしていた。また OCRL 蛋白の exon8 以降から合成される領域には、ホスファターゼ活性に重要なドメインが存在することがわかっている。これらのことから、Dent disease-2 では、exon8 以降に truncating mutation があっても、exon 8 以降の配列により構成される ' isoform ' が合成され、この ' isoform ' が OCRL1 蛋白として部分的に機能するため、Dent disease-2 が Lowe 症候群に比べ軽症な表現型をとると考えられている(図 3)。しかしながらこの詳細な分子生物学的機序についてはこれまで明らかにされていなかった。

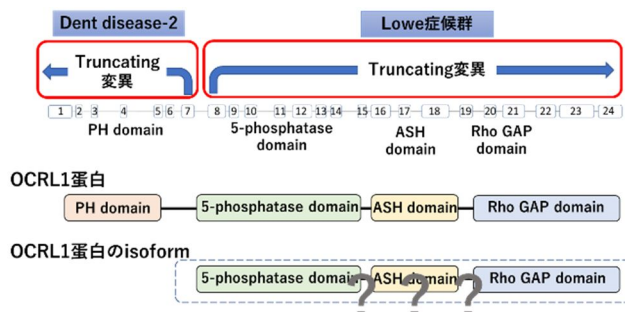


図3. OCRL遺伝子exon7より手前にtruncating変異をもつ患者はDent disease-2を発症するが、exon8より後にtruncating変異をもつ患者はLowe症候群を発症することがわかっている。この'isoform'はホスファターゼ活性に重要と考えられるドメインを有しており、このためOCRL1蛋白として部分的に機能するのではないかと考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Dent disease-2 と Lowe 症候群の発症機序の完全解明である。そしてこの研究の最終的な目的は、新規疾患特異的治療法によって、これまで治療法の存在しなかった Lowe 症候群を軽症化することにある。Dent disease-2 では、Lowe 症候群に比べて、' isoform ' 蛋白の存在によりホスファターゼ活性が高いのであれば、酵素活性を増加させることで、Lowe 症候群を Dent disease-2 に ' 軽症化 ' できる可能性がある。

具体的には患者由来細胞から、isoform を合成しうるトランスクリプトバリエーションおよび isoform 蛋白を同定することを目的とする。さらにトランスクリプトバリエーションや isoform 蛋白がどの程度発現しているのかを定量的に評価し、isoform 蛋白の酵素活性を明らかにすることで、臨床的重症度とホスファターゼ活性が相関することを示すことを目的とする。これらの結果を Lowe 症候群の治療法開発の礎とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子診断と臨床像の解析

我々は2014年からLowe症候群およびDent disease-2の遺伝子解析を行っている。これらの症例を遺伝学的に確定診断し、臨床データを収集することで、両者の遺伝学的特徴と表現型(臨床的重症度)との関連を検討する。

(2) 5'-RACE法を用いたトランスクリプトバリエーションの検索

健常コントロールおよび、truncating変異をもつDent disease-2の尿由来培養細胞からtotal RNAを抽出し、5'-RACE法を用いて、isoformに関連するトランスクリプトバリエーションの5'末端を検索する。

(3) 蛋白強制発現ベクターを用いたisoform蛋白発現の確認

OCRL蛋白強制発現ベクターをHela細胞にトランスフェクションし、合成された蛋白を免疫染色、Western blottingにより解析する。さらにisoform蛋白や実際のDent disease-2患者およびLowe症候群患者の変異を導入した蛋白と比較する。

(4) 強制発現蛋白を用いた酵素活性の測定

(3)で作成した蛋白の酵素活性(ホスファターゼ活性)を測定する。isoform蛋白、Dent disease-2患者およびLowe症候群患者の変異が導入された蛋白をPIP2と反応させ、遊離したリンの濃度を吸光度系を用いて測定することで酵素活性を比較する。

(5) in silico解析によるisoformの開始コドンの検索

NetStart(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetStart/>)およびATGpr(<https://atgpr.dbcls.jp/>)の2種類の開始コドン予測プログラムを使用し、isoform蛋白の開始コドンを検索する。

(6) 患者尿由来細胞を使用したRNAシーケンス及びproteinシーケンス

患者尿由来培養細胞のlong read RNAシーケンスにより、OCRL遺伝子exon6からはじまるmRNAが、実際にどの程度発現しているのか定量する。また患者尿由来培養細胞からisoform蛋白を抽出し、proteinシーケンスによりこの蛋白のN末端を明らかにする。これが(5)と一致していることを確認する。

(7) 患者尿由来培養細胞を用いた酵素活性の測定

(4)と同様の方法により、患者尿由来培養細胞から抽出した蛋白の酵素活性(ホスファターゼ活性)を測定する。この活性の程度と臨床的重症度が相関するかどうかを評価する。

4. 研究成果

OCRL蛋白強制発現系を用い、我々が新たに発見したmRNA配列から、exon8以降の配列で構成されるOCRLのisoform蛋白が合成されることを、Western blotやin silico解析により明らかにした。さらに機能解析により、このOCRL isoform蛋白が脱リン酸化酵素活性(ホスファターゼ活性)を持つことを明らかにした。これらの結果から、Dent disease-2では‘isoform’のレスキューにより軽症な表現型を呈することが証明された。

この研究結果はOCRL異常における2疾患の発症機序の解明のみならず、Lowe症候群の治療開発につながる重要な知見であると考えている。

具体的な研究成果は以下のとおりである。

(1) 遺伝子診断と臨床像の解析

Dent disease-2およびLowe症候群の患者33名のうち、truncating変異をもつ患者ではexon1-7の変異ではDent disease-2、exon8-24の変異ではLowe症候群の表現型を呈していた。

(2) 5'-RACE法を用いたトランスクリプトバリエーションの検索

OCRLのexon6からはじまるmRNAのクローニングに成功した。このトランスクリプトバリエーションはOCRLのexon6から24までを含むものであった(図4上)。Exon6の直前にpromoter配列があることから、この結果は妥当なものであると考えられた。

(3) 蛋白強制発現ベクターを用いたisoform蛋白発現の確認

OCRL蛋白強制発現系を用い、(2)で明らかとなったトランスクリプトバリエーションから、isoform蛋白が合成されることが蛍光免疫染色およびWestern blottingにより確認された(図4下)。またWestern blottingの結果から、約80kDaの2つのisoform蛋白が合成されることが明らかとなっ

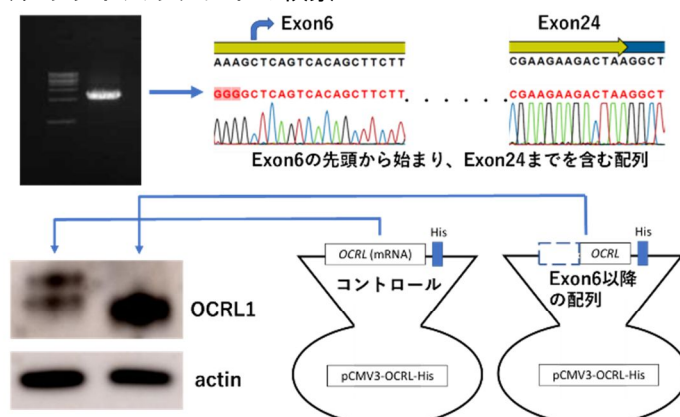


図4上. Dent disease-2患者の尿中落下細胞から、exon6から始まるmRNAがクローニングされた。

図4下. 野生型、exon6から始まるmRNA(isoform)配列を導入したDent disease-2型の2種類のプラスミドベクターを細胞にトランスフェクションし、蛋白を強制発現させたところ、Western blot法で、前者では105kDaと80kDaの2種類の質量の蛋白が検出され、後者では80kDaのみが検出された。蛋白のサイズから、isoformの開始コドンはexon7とexon8の境界に存在すると予想された。

た。isoform 蛋白と Dent disease-2 の変異をもつ蛋白は同様の発現を認めたものの、Lowe 症候群の変異を蛋白は発現を認めなかった。

(4) 強制発現蛋白を用いた酵素活性の測定

(3)で確認された蛋白は酵素活性(ホスファターゼ活性)をもつことが明らかになった。isoform 蛋白は完全長の OCRL 蛋白と同等の酵素活性を有しており、Dent disease-2 の変異をもつ蛋白は OCRL 蛋白の 50-85%の酵素活性であったが、一方 Lowe 症候群の変異をもつ蛋白では OCRL 蛋白の 20%以下に低下していた。(図 5)。

(5) in silico 解析による isoform の開始コドンの検索

開始コドン予測ツールでは、2 種類の ATG が開始コドンと認識される可能性が高いと判定された。さらにこれら 2 つの開始コドン Met187 と Met206 は exon8 に存在していた。さらに、合成される蛋白の質量は約 80kDa であることから、Western blotting で示された isoform 蛋白の質量と一致していた。

(6) 患者尿由来細胞を使用した RNA シークエンス及び protein シークエンス

患者尿由来細胞から抽出した mRNA の long read RNA シークエンスでは、(2)で検出されたトランスクリプトバリエーションは検出されなかった。このトランスクリプトバリエーションは健康人の小腸 mRNA から検出されており、発現量が少量であるため検出されなかった、あるいは mRNA の分解が進んでしまったことなどが原因として考えられた。

また protein シークエンスの N 末端解析では、蛋白の絶対量が少なく、シークエンス結果を得ることができなかった。

(7) 患者尿由来培養細胞を用いた酵素活性(ホスファターゼ活性)の測定

(4)と同様の方法で患者尿由来培養細胞から抽出した蛋白の酵素活性の測定を試みたが、測定系を確立することは困難であった。この原因として、強制発現系と異なりヒト由来のサンプルでは、他のホスファターゼの影響を受けてしまうこと、また OCRL のホスファターゼ酵素の絶対量は多くないため、これを検出するためには大量の蛋白が必要であることなどがあげられた。

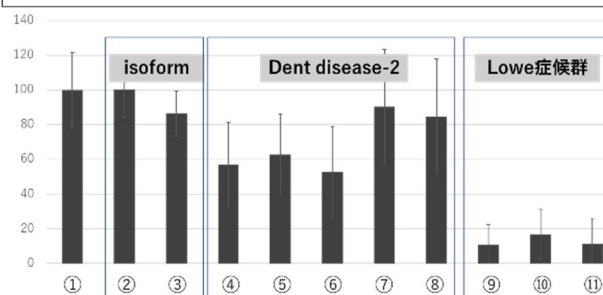
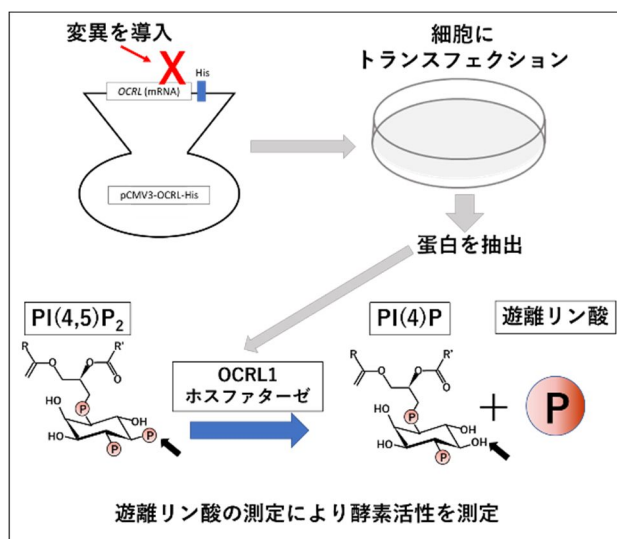


図5上. 強制発現系モデルにおける酵素活性測定。OCRL遺伝子のcDNAが導入されたベクターを細胞にトランスフェクションし、蛋白を強制発現させる。細胞から抽出した蛋白とPI(4,5)P₂を反応させ、遊離リン酸の定量により酵素活性を測定する。

図5下. OCRL1強制発現系モデルを使用し、正常コントロール(①)とisoform(②,③)、Dent disease-2(④-⑧)、Lowe症候群(⑨-⑪)のPIP₂ 5-phosphatase活性を比較した。isoformおよびDent disease-2モデルではPIP₂ 5-phosphatase活性を示したのに対し、Lowe症候群モデルでは活性は著しく低下していた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sakakibara Nana, Ijuin Takeshi, Horinouchi Tomoko	4. 巻 37
2. 論文標題 Identification of novel OCRL isoforms associated with phenotypic differences between Dent disease-2 and Lowe syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 262 ~ 270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ndt/gfab274	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榊原菜々
2. 発表標題 OCRL遺伝子splicing異常による疾患発症メカニズムの検討
3. 学会等名 日本腎臓学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------