

氏名・(本籍)	井上 雅貴 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1011 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	A STUDY OF URINARY EXOSOMES IN GENETICALLY DEFINED DENT'S DISEASE (Dent 病における尿中エクソソームに関する研究)

論文審査委員	(主査) 長谷川 仁志 教授
	(副査) 小松田 敦 准教授 羽瀧 友則 教授

学位論文内容要旨

A STUDY OF URINARY EXOSOMES IN GENETICALLY DEFINED DENT' S DISEASE (Dent 病における尿中エクソソームに関する研究)

申請者氏名 井上 雅貴

研究目的

Dent 病は低分子蛋白尿、腎石灰化・尿路結石、高カルシウム尿症、進行性腎障害を特徴とする X 連鎖遺伝性疾患である。その病態の中心となる尿細管機能障害は、Cl⁻/H⁺交換体である CLC-5 をコードする *CLCN5* 遺伝子、あるいは、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 5-ホスファターゼをコードする *OCRL1* 遺伝子、どちらか一方の変異によって引き起こされる細胞エンドサイトーシス機能不全をもたらす近位尿細管の低分子蛋白再吸収障害である。Dent 病の約 60%に *CLCN5* 遺伝子に変異がみられ、*OCRL1* 遺伝子の変異は約 20%にみられる。

エクソソームは、さまざまな細胞によって細胞外に放出される細胞外小胞体の 1 つであり、細胞の恒常性と細胞間の情報伝達に役割を果たすとされている。腎臓において細胞外小胞体は、尿細管内、糸球体内、糸球体―尿細管間、尿細管―間質間のシグナル伝達を行っている。細胞内へのエクソソームの取り込みはエンドサイトーシスを介して行われるため、エンドサイトーシスの機能不全を呈する Dent 病においては尿細管細胞におけるエクソソーム調整障害を引き起こす可能性がある。

今回、Dent 病患者 3 名における尿中エクソソームの定量化を行い、*CLCN5* 遺伝子および *OCRL1* 遺伝子変異の尿中エクソソームに対する影響について検討を行った。

研究方法

対象患者は臨床的に Dent 病と診断された 3 症例、正常対照として成長ホルモン欠損症で成長ホルモン補充療法により治療中の 3 症例とした。

症例 1 は、定期健康診断で蛋白尿を指摘された 4 歳の男児。蛋白尿が持続したため腎生検が実施されたが重大な病理学的所見はみられなかった。家族歴として母方叔父に無症候性蛋白尿があった。症例 2 は、RS ウイルス細気管支炎で入院した際に偶然蛋白尿を指摘された 1 歳の男児。患者には腎疾患の家族歴はなかった。症例 3 は定期健康診断で蛋白尿を指摘された 3 歳の男児。家族歴として母方祖父に尿路結石症があり、母方従弟に無症候性蛋白尿があった。Dent 病の 3 症例にはいずれも腎機能障害はみられなかった。

Dent 病患者の 3 症例を対象にサンガー法によるダイレクトシーケンスによって *CLCN5* 遺伝子および *OCRL1* 遺伝子の解析を行った。さらにダブルサンドイッチ ELISA を用いて、Dent 病患者と正常対照患者のスポット尿と血清中のエクソソームを定量的に分析した。本研究は秋田大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得て実施した。

研究成績

Dent 病患者に対するサンガー法を用いたダイレクトシーケンスの結果、症例 1 では *CLCN5* 遺伝子および *OCRL1* 遺伝子に明らかな変異はみられなかった。症例 2 で *OCRL1* 遺伝子における c.300_319dup 変異、症例 3 で *CLCN5* 遺伝子における c.1726delT 変異を同定した。両変異は The Human Gene Mutation Database などのデータベースにおいて報告がなかった。

さらに CD9 を利用したサンドイッチ ELISA 法による尿中エクソソームの定量的な分析の結果、Dent 病患者の症例 1 と症例 3 において尿中エクソソームの有意な増加がみられた。本研究は *CLCN5* 遺伝子変異によって引き起こされる変化が、尿中エクソソームの増加と関連している可能性を示唆するものである。

結論

Dent 病患者において、*CLCN5* 遺伝子および *OCRL1* 遺伝子に明らかな変異を有さない症例と *CLCN5* 遺伝子変異を有する症例で尿中エクソソームの有意な上昇がみられた。

CLCN5 遺伝子変異によって引き起こされる病態生理学的変化は、尿中エクソソームの量の増加と関連する可能性が示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査 長谷川仁志

申請者 井上雅貴

論文題名 : A study of urinary exosomes in genetically defined Dent's disease
(Dent 病における尿中エクソソームに関する研究)

要旨

Dent 病は、低分子蛋白尿、腎石灰化・尿路結石、高カルシウム尿症、進行性腎障害を特徴とする X 連鎖遺伝性疾患で、その病態の中心となる近位尿細管障害は、CLCN5 遺伝子あるいは OCRL1 遺伝子の変異により引き起こされるエンドサイトーシスの機能不全が原因とされる。また、エクソソームは様々な細胞によって細胞外へ放出される細胞外小胞体の 1 つであり、腎臓内各部位のシグナル伝達を行っている。細胞内へのエクソソームの取り込みはエンドサイトーシスを介して行われるため、エンドサイトーシスの機能不全を呈する Dent 病においては近位尿細管細胞におけるエクソソーム調整障害が生じる可能性がある。著者の研究は、Dent 病患者における尿中エクソソームの定量化を行い、CLCN5 遺伝子および OCRL1 遺伝子変異の尿中エクソソームに対する影響について検討を行っている。その結果、遺伝子変異が同定されなかった症例と CLCN5 遺伝子変異を有する症例で尿中エクソソームの有意な上昇がみられ、CLCN5 遺伝子変異により引き起こされる病態生理学的変化が尿中エクソソームの増加と関連する可能性が示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

本研究は、希少疾患である Dent 病の尿中エクソソームの定量化を行い、それを遺伝子異常の種類によつての相違について検討を行っている。この点に関してこれまで報告がなく本研究の斬新さといえる。

2) 重要性

Dent 病の病態の中心は CLCN5 遺伝子あるいは OCRL1 遺伝子の変異によるエンドサイトーシスの機能不全が原因と考えられているが、不明な点が多い。予後について、欧米では 30~80% が 30~50 歳の間に末期腎不全に至るといふ報告がある一方で、本邦では長期の追跡調査がなく、末期腎不全に至るかどうかは現時点では不明である。エクソソームは内部に蛋白、核酸、脂質などを含み、新たな情報伝達機構として注目されている。エクソソームは血液、尿、唾液、髄液などの様々な体液中に安定して存在していることが確認されており、その解析は生体恒常性の維持や疾患メカニズムの理解、疾患の早期診断に利用できる可能性があると考えられている。以上から、Dent 病における尿中エクソソームの解析と遺伝子変異の尿中エクソソームに対する影響についての検討を行った本論文は、Dent 病の病態と予後を解明する上で意義があると考えられる。

3) 研究方法の正確性

臨床的に Dent 病と診断された 3 症例を対象にサンガー法によるダイレクトシーケンシングによって CLCN5 遺伝子および OCRL1 遺伝子の解析を行っている。また、エクソソーム特異的 CD9 抗体を利用したダブルサンドイッチ ELISA 法によって患者と正常対照者のスポット尿と血清中のエクソソームを定量的に分析し、統計的解析を行っており正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

これまでの課題の解決のための研究目的、方法、結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。