

別紙 4

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主 論 文 の 要 旨

論文題目

F9 mRNA splicing aberration due to a deep Intronic structural variation in a patient with moderate hemophilia B

(中等症血友病患者に認められるイントロン深部の構造的変異による *F9* mRNA のスプライシング異常)

氏 名 大平 晃也

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

血友病 B とは血液凝固第 IX 因子 (FIX) 遺伝子 (*F9*) の異常に起因する FIX の量的・質的異常による遺伝性出血性疾患である。血友病 B は症例の血中 FIX 活性 (IU/dL) に基づき、重症 (<1 IU/dL)、中等症 (1-5 IU/dL)、軽症 (>5-<40 IU/dL) というように重症度分類がなされる。*F9* は X 染色体長腕末端側 (Xq27.1) に存在する 8 つのエクソンと 7 つのイントロンを持つ全長 33.5 kb の遺伝子であり、2.8 kb の mRNA に転写される。これまで血友病 B 症例では *F9* のエクソン領域において 1000 を超える遺伝子異常が報告されている。血友病 A やデュシェンヌ型筋ジストロフィといった遺伝子疾患の一部の症例には、各責任遺伝子のイントロン深部 (エクソン・イントロン境界から 100 塩基以上離れた領域) に複数の遺伝子異常が同定されており、それら遺伝子異常はスプライシング異常の原因となることが報告されている。その一方で、血友病 B 症例ではイントロン深部における遺伝子異常はほとんど報告されていない。本研究では血友病 B 中等症症例の *F9* イントロン 1 深部に新規遺伝子異常を同定し、その遺伝子異常が *F9* mRNA のスプライシングに及ぼす影響を検討した。

【対象・方法】

名古屋大学医学部倫理審査委員会の承認のもと血友病 B 中等症 (血中 FIX 活性 : 3.0 IU/dL) と診断された男性よりインフォームドコンセントを得たのち、症例の末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出、ダイレクトシーケンス解析や MLPA 解析、long-range PCR 解析などの遺伝子解析を実施した。同定した遺伝子異常が *F9* スプライシングに及ぼす影響を調べるために、Exon-trap 解析を実施した。Exon-trap 解析では exon-trap cloning vector pET01 に野生型あるいは変異型の *F9* エクソン 1 からエクソン 3 までを組み込んだベクターを作製した (野生型 pET01, 変異型 pET01)。これらベクターを遺伝子導入した COS-7 細胞より total RNA を抽出し、ベクター上に組み込まれた *F9* エクソンのスプライシングパターンを RT-PCR やダイレクトシーケンスにて解析した。また正常なスプライシングを受けた mRNA の発現量を RT-qPCR で解析した。また遺伝子異常が FIX のタンパク質発現に及ぼす影響を調べるために、正常なスプライシングを

受けた mRNA 量の減少をタンパク質発現量で評価することができる splicing-competent FIX 発現ベクターを使用した FIX 発現実験を実施した。pcDNA3.1 に野生型あるいは変異型 *F9* イントロン1を組み込んだ FIX 発現ベクターを作製した（野生型 FIX/pcDNA, 変異型 FIX/pcDNA）。これらベクターを遺伝子導入した HEK293 細胞より total RNA を抽出し、RT-qPCR にて *F9*mRNA のスプライシングパターンを解析した。また遺伝子導入細胞の細胞溶解液、培養上清中の FIX タンパク質をイムノブロットや ELISA で検出、定量した。

【結果・考察】

F9 エクソン、エクソン・イントロン境界領域に対するダイレクトシーケンス解析や MLPA 法による *F9* エクソンの定量を実施したが、エクソン内の遺伝子異常や重複は認められなかった。続いて、long-range PCR を用いた *F9* 構造解析およびダイレクトシーケンス解析により症例の *F9* イントロン 1 深部に 28-bp の欠失と 476-bp の挿入を伴う新規構造的変異を同定した。挿入配列に対してホモロジー解析を行ったところ、挿入配列は 12 番染色体上の HNRNPA1 遺伝子エクソン 12 由来であることが明らかとなった。

我々は *F9* イントロン1深部で同定された構造的変異の *F9* スプライシングに対する影響を検討するため、Exon-trap 解析を実施した。その結果、野生型 pET01 を遺伝子導入した細胞では明瞭な 488-bp の増幅産物が得られた一方で、変異型 pET01 を遺伝子導入した細胞では 488-bp の増幅産物の著明な減少が認められた。また変異型 pET01 を遺伝子導入した細胞では 488-bp の増幅産物以外に新たに 553-bp と 729-bp の増幅産物も認められた。ダイレクトシーケンス解析により 488-bp の増幅産物は *F9* のエクソン 1、エクソン 2、エクソン 3 から構成される正常なスプライシングを受けた mRNA 由来である一方で 553-bp、729-bp の増幅産物はそれぞれ *F9* エクソン 1 とエクソン 2 の間に挿入配列由来の偽エクソン 2 のみ、あるいは偽エクソン 2 と偽エクソン 3 を含む異常なスプライシングを受けた mRNA 由来であることが明らかとなった。これら異常スプライシング mRNA は偽エクソン 2 内に未成熟終止コドンが発生することから正常な FIX には翻訳されないと考えられた。また変異型 pET01 より転写された正常スプライシング mRNA は野生型 pET01 より転写された正常スプライシング mRNA の 10%以下であった。

また HEK293 を使用した発現実験では、変異型 FIX/pcDNA より転写された正常スプライシング mRNA は野生型 FIX/pcDNA より転写された正常スプライシング mRNA の 70%に減少していた。また細胞溶解液および培養上清中に対するイムノブロットで、細胞溶解液、培養上清中ともに変異型 FIX/pcDNA より翻訳された FIX タンパク質は減少していることが明らかとなった。さらに培養上清中の FIX タンパク質量を ELISA で定量したところ、変異型 FIX/pcDNA より翻訳・分泌された FIX 抗原量は野生型 FIX/pcDNA より翻訳・分泌された FIX 抗原量の約60%に減少していた。以上の結果より症例で同定された新規構造的変異は *F9* mRNA のスプライシング異常を引き起こし、正常なスプライシングを受けた *F9* mRNA および FIX タンパク質を減少させていることが示唆された。

【結語】

本研究では血友病中等症患者の *F9* イントロン 1 深部に 28-bp の欠失を伴う 487-bp の新規構造的変異を同定した。このイントロン深部の新規構造的変異は *F9* mRNA のスプライシング異常を引き起こすことで、未成熟終止コドンを持つ null な異常スプライシング mRNA を生じさせ、タンパク質に翻訳される *F9* mRNA を減少させていた。