

氏名	西川 敦子
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工博4甲 第215号
学位授与年月日	平成29年 3月 23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	先進医療科学専攻
学位論文題名	Targeted massively parallel sequencing and histological assessment of skeletal muscles for the molecular diagnosis of inherited muscle disorders (遺伝性筋疾患の分子診断における骨格筋の組織学的検討を伴うターゲットシーケンスの有用性)
論文審査委員	委員長 教授 宮澤 恵二 委員 准教授 三井 貴彦 委員 客員教授 小牧 宏文

## 学位論文内容の要旨

(研究の目的)

遺伝性筋疾患の有用なスクリーニング方法を確立する

(方法)

2014-2015年に筋病理診断目的で国立精神・神経医療研究センターに筋検体、血液検体が送付され、遺伝性筋疾患が疑われたものの原因遺伝子が未確定の孤発例188例を対象とした。これらの患者を筋病理所見に基づき筋ジストロフィー、先天性ミオパチー／先天性筋無力症候群、代謝性ミオパチー、筋原線維性ミオパチー／縁取り空胞を伴うミオパチーの4つのグループに分類した。各疾患群に関連した遺伝子のエクソン、エクソン・イントロン境界をカバーする4つのターゲット遺伝子パネルを作製し（筋ジストロフィーパネル、先天性ミオパチーパネル、代謝性筋疾患パネル、筋原線維性ミオパチーパネル）、それらを用いてIonPGM次世代シーケンサーで遺伝子解析を行った。また、筋ジストロフィーが疑われた患者では、主要な筋ジストロフィーの原因蛋白について、欠損や局在異常を証明するために免疫組織化学を行った。更に、スプライス部位の変異については、筋由来のcDNAを用いてスプライシング異常の評価を行った。

(結果)

筋ジストロフィー65例、先天性ミオパチー65例、代謝性ミオパチー10例、筋原線維性ミオパチー48例に対して各パネルで解析を行ったところ、それぞれ30例(46.2%)、17例(26.2%)、3例(30%)、12例(25%)で候補遺伝子変異を見出した。全118患者での診断率は33.0%であった。機能喪失型の機序が想定される遺伝子に変異を認めた筋ジストロフィー患者の免疫組織化学では、蛋白の欠失や局在異常が確認された。また、イントロン領域に変異を認めた患者

では、cDNA解析にて異常なスプライシングが起こっていることを確認した。

(考察)

今回の研究では、Ion Torrent シーケンスシステムを用いた4つのターゲット遺伝子パネルと筋病理、蛋白解析を併用し、遺伝子診断率を評価した。費用効率、時間効率を考え、既知原因遺伝子を4つのパネルに分けて検索したが、このことにより、データの解釈に要する時間を削減できた一方で、予期していない表現型の場合、原因遺伝子変異を見逃している可能性があると考えられた。

日本では、筋ジストロフィーの中ではジストロフィノパチー、筋強直性ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィーなどの頻度が高いが、これらの疾患は臨床的に鑑別が可能であることが多く、地域の病院でMLPA法やPCR法、サザンブロット法などにより診断可能なため我々の施設に診断目的で検体が送られてくることは少ない。今回の研究でも大部分は除外されていたと考えられ、筋ジストロフィーパネルの診断率に影響した可能性がある。検索した筋ジストロフィーパネルの62遺伝子の中で、66%が劣性遺伝形式をとり機能喪失型の機序が想定されるため、蛋白の欠損や消失の評価に免疫組織化学が役立つことが想定された。今回、25例の患者で免疫組織化学の異常を認め、診断が確定した。このことは、免疫組織化学が正確な遺伝子診断に非常に重要であり、遺伝子診断時にはルーチンで行うべき検査であることを示唆していると考えられた。

先天性ミオパチーでは、バリエントの病原性の評価が困難な例が多かった。*NEB*にバリエントをもつネマリニンミオパチー患者複数例では、未報告のバリエントであること、高い相同性を持つ繰り返し配列のために*NEB*のカバー率が低く同部位に他の変異がある可能性があることなどから、その病原性を確定できなかった。次世代シーケンス法では繰り返し配列部位にあるバリエントの検出は困難と考えられ、診断には転写解析などが考慮される。また、先天性筋タイプ不均衡症、タイプ1線維優位を伴う先天性ミオパチー患者において、*RYR1*に稀なバリエントを認めたが、病原性の評価に適した方法がないため、バリエントが病的なものかどうかの判断ができなかった。

日本では、糖原病は関連酵素の活性を生化学的に評価することにより診断することが多いため、我々の施設に遺伝子診断目的で検体が送られてくることは稀である。今回、代謝性ミオパチーパネルで検索した例は10例のみであり、このパネルの診断率を評価するためには症例数を増やす必要があると考えられた。

筋原線維性ミオパチーは、近年報告された疾患で、これまでの報告はまだ少なく、未知の原因遺伝子が多くあると考えられており、症例の蓄積が必要である。

(結論)

我々の筋病理、mRNA、蛋白解析を併用した遺伝子診断法は、筋疾患患者における病的バリエントのスクリーニングに有用かつ効率が良い方法と考えられた。また、今回の研究の結果は、包括的な疾患関連の遺伝子変異データベースを発展させること、臨床、病理、分子学的実験など、多面的な評価が重要であることを示している。

## 論文審査結果の要旨

### 1. 学位論文テーマの学術的意義

遺伝性筋疾患には150以上の原因遺伝子が知られている上、その中には*NEB*(nebulin)や*TTN*(titin)のような巨大遺伝子も含まれており、従来は遺伝子診断が容易ではなかった。しかし、近年の次世代シーケンサーの普及により、状況は変わりつつある。本研究では、筋病理組織所見・免疫組織化学的所見とターゲット遺伝子パネルを併用した実用的な遺伝子スクリーニング法を考案し、患者検体(188検体)へと適用することにより、有効性を検証した。全患者での診断率は33%であったが、筋ジストロフィー患者に関しては、過去に報告されている全エクソームシーケンス法に匹敵する診断率(46%)が得られており、本手法が優れた遺伝子スクリーニング法であることを示している。

### 2. 学位論文および研究の争点、問題点、疑問点、新しい視点等。

ターゲット遺伝子パネルの使用により、遺伝子診断の効率はよくなったが、予期しない表現型の場合は原因遺伝子を見逃している可能性があり、今後のパネルの改良が必要と考えられる。また、プロモーター領域やイントロンの変異が現状では検出できていないこと、一部の遺伝子でカバー率が十分でないことは、今後の課題である。

一方、今回検討した方法はいずれ臨床で広く用いられる可能性が高く、筋疾患の診断のスキームを変えてしまう可能性、具体的には侵襲性を有する筋生検を行う前にターゲットシーケンスを行うことになる可能性がある。その点を十分意識したうえで、特に臨床所見、病理所見、ならびに遺伝子解析の結果との関連性について引き続き研究を進めることが望まれる。

### 3. 実験およびデータの信頼性

シーケンスデータのカバー率より、多くの標的遺伝子では信頼性の十分なデータが得られたと判断できる。

### 4. 学位論文の改善点、等々。

すでに出版された論文を学位論文にしているため、論文そのものには修正は必要なかった。ただし、出版された論文のデータの多くはOnline Supplementary Figuresであり、審査員が事前に閲覧することができなかった。そこで、論文本文で議論しているデータについては、学位論文に添付し、学位論文を再提出することを要望した。再提出された論文は審査委員長が確認し、最終的に合格と判断した。