

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 岩間 一浩
横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻 遺伝学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科 教授	宮城 悦子
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 准教授	奥寺 康司
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 准教授	土井 宏

博士の学位論文審査結果の要旨

Identification of novel *SNORD118* mutations in seven patients with leukoencephalopathy with brain calcifications and cysts (白質脳症, 頭蓋内石灰化, 嚢胞形成を呈した 7 患者の *SNORD118* 変異同定)

論文内容の要旨:

全エクソーム解析 (Whole exome sequencing; WES) は, ヒトのほぼ全ての遺伝子のタンパク質コーディング領域を網羅的に解析する手法であり, 原因不明の遺伝性疾患の責任遺伝子を探索するときの中心的手法である. 本研究では, 白質脳症, 頭蓋内石灰化, 嚢胞形成を画像上の 3 徴とする Leukoencephalopathy with brain calcification and cysts (LCC) 患者群と, 小脳症状を呈する患者群に対して, 主に WES を中心とする遺伝学的手法による病因の探索を行った. LCC 8 家系に対して行った初めの WES 解析からは病因は同定できなかったが, 新たに疾患責任遺伝子として報告された *SNORD118* バリエントについて, サンガーシーケンスを行ったところ, 7/8 家系(87.5%)で 4 つの新規バリエント (n.19C>G, n.24C>T, n.61A>T, n.118T>G)を含む両アレル性バリエントを検出した. また, WES データの後方視的解析から, *SNORD118* は, アノテーションを行う際に参照する遺伝子リストである Refseq Gene には含まれておらず, 参照遺伝子リストを Ensemble Gene に変えることで, ENSG00000200463 (*SNORD118*)のバリエントとしてコールされることが明らかになった. また, *SNORD118* バリエントについては, タンパク質非コーディング領域に対しても定義されている統合アノテーションスコア (Combined annotation dependent depletion; CADD) と PhyloP (Phylogenetic P-values; 系統発生学的塩基保存性スコア) を比較したところ, CADD よりも PhyloP の方がバリエントの評価に有用であった. このことは, タンパク質非コーディング遺伝子の重要領域が, 生物種間で高度に保存された領域であることを示唆すると考えられた. 小脳症状を呈する 160 家系からは, 既知遺伝子の病的バリエントが 85 家系 (53.1%)で検出された. このうち, Human Gene Mutation Database (HGMD) のバリエント登録数の少ない 4 つの遺伝子(*SEPSECS*, *SLC9A1*, *MSTO1*, *SLC1A3*)の病的バリエントが検出された 6 家系 7 患者について, 臨床医から表現型の詳細な情報を得て, 既報との比較検討やバリエントの病的意義の評価を行った. *SEPSECS* の同定症例については, 既報よりも進行が緩徐であり, 表現型のスペクトラムを修正する知見であった. WES 解析を中心とした遺伝学的探索により同定した 5 つの遺伝子の新規病的バリエント 12 個 (*SNORD118*: 4 個, *SEPSECS*: 3 個, *SLC9A1*: 1 個, *MSTO1*: 3 個, *SLC1A3*: 1 個) と, 患者 14 名の臨床情報は, 今後の遺伝子診断の精度向上, 患者の予後の推測に資するものと考えられた.

審査結果の要旨：

学位論文の審査にあたり、申請者による論文要旨の説明の後に、以下のような質疑応答がなされた。

まず、奥寺副査より以下の論評・質問がなされた。

1. 研究室独自のエクソームコントロールデータでのフィルタリングが重要なのか。

申請者応答：バリエーションのフィルタリング方法は、各解析者によって少しずつ異なっている。研究室で独自に構築したコントロールデータは、解析サンプルと民族グループが一致しており、フィルタリングの効率が良いため、自分の方法では、最初のステップで、研究室独自コントロールデータでのフィルタリングを適応させる方法をとっている。

2. 病原性を予測する際には、保存性が大切なのか。

申請者応答：今回、検証したのはタンパク質をコードしない領域だったので、特に PhyloP のようなスコアによる塩基保存性の評価が重要であるという結果が得られた。通常のコーディング領域についても、保存性の評価は同様に重要であるが、さらに、アミノ酸置換のインパクトを示す他のスコアリングも参考にすることが出来る。

3. 小脳症状の患者で同定された遺伝子は、生物学的パスウェイがつながるのか。

申請者応答：疾患のグループによっては、同定される遺伝子が生物学的パスウェイなどの機能的グループに集積するものもあるが、小脳症状の患者群については、heterogeneity (異質性)が高く、パスウェイとの関係は明らかには出来なかった。

次に、土井副査より以下の論評・質問がなされた。

1. 中間審査のときから既知の原因同定症例数が増えているのはなぜか。

申請者応答：症例数自体が増えたことで、同定症例数が増えた症例もある。また、新規の疾患感受性遺伝子の候補バリエーションを検出していたものについて、新しく疾患感受性遺伝子の報告がなされ、新規遺伝子が既知遺伝子となったことで、同定症例数が増えたものもある。

2. コピー数変化(CNV)の検出・確認はどのようにやっているか。

申請者応答：バイオインフォマティクスツールとしては、eXHMM(エクソーム隠れマルコフモデル)と Nord プログラムの 2 種類を使っており、そのどちらかで検出されたものについて、定量 PCR による確認を行っている。

3. 同定できていないものに対するアプローチはどうするか

申請者応答：劣性遺伝形式をとる遺伝子について、片アレルだけに病的意義が高いバリエーションが見られたケースに対して、cDNA を用いて簡単な解析を追加したりはしている。本格的に調べるには、別手法の(費用のかかる)解析を追加する必要があるため、現状ではまだ明確な方針は決めていない。

最後に、宮城主査より以下の論評・質問がなされた。

1. 遺伝学の研究の中で、疾患概念や疾患名が変わったりすることはあるか。

申請者応答：起こり得ると考えられるが、自分の解析の中では体験していない。

2. 着床前診断 (Preimplantation genetic diagnosis; PGD)の対象につながりそうな疾患について、どのように臨床で対応していくか。

申請者応答：網羅的な解析では、Variant of uncertain significance (VUS, 病的意義の不確かなバリエーション)が検出されることも多く、バリエーションの評価に専門的な知識が必要となる。クライアントへの情報公開の線引きを事前にしっかり行う必要があると考えている。

その他、本研究に関連する内容について質問がなされたが、いずれの質問に対しても適切な回答がなされた。申請者は本課題に対して深い理解と洞察をもって取り組んでおり、学術的価値の高いデータと知見を提示した。以上より審査の結果、本学位論文は医学博士の学位に値するものと判断された。