

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 尾堀 佐知子

横浜市立大学大学院医学研究科 産婦人科学 生殖生育病態医学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 分子生物学 教授 高橋 秀尚
副査 横浜市立大学大学院医学研究科 神経内科学 准教授 竹内 英之
副査 横浜市立大学大学院医学研究科 組織学 講師 富澤 信一

博士の学位論文審査結果の要旨

2022年2月10日（木曜日） 尾堀 佐知子

ロングリードシーケンスによるヒト染色体構造異常解析

A pipeline for complete characterization of complex germline rearrangements from long DNA reads

（ロングリードシーケンスを用いたヒト染色体構造異常解析のパイプライン構築と複雑な構造異常の解明）

学位論文の審査にあたり、審査冒頭で以下のように学位研究の要旨が説明された。申請者は上記表題について以下のように発表を行った。

ロングリードシーケンス（LRS）解析は、近年技術的進展がめざましく、現在ではショートリードシーケンス（SRS）解析の短所を補う技術となり、疾患解明に有効な解析手法となっている。今回、患者の LRS データから染色体構造変化を抽出し、コントロール集団と共通の構造変化を差し引いていくことで、患者固有の構造変化を絞り込むという、新しい手法を用いた LRS 解析パイプライン（dnarrange）を構築した。さらに解析パイプラインの有用性を検証するために、染色体核型分析やマイクロレイ解析、SRS 解析等の既存の遺伝学的検査方法では全ての切断点を検出できていなかった、染色体構造異常症例の解析を行った。その結果複雑な構造異常の切断点を正確に検出し、切断点を組み立てて全体像を把握することが可能であることが示された。

続いて、この解析パイプラインを使用して、全エクソーム解析で原因が未同定であった症例の解析を行った。その結果、1 症例で原因遺伝子の構造異常を同定し、さらにてんかん遺伝子の新規病原性機能を発見した（現在機能検証中）。

また、複雑な構造異常の LRS 解析において、想定される構造異常が 2 通りとなり、古典的細胞遺伝学的検査が必要となった症例も経験した。

昨今ロングリードシーケンス等の最新ゲノム解析技術を用いて、ヒト参照ゲノム配列が改良されてきている。最新の参照配列（T2T-CHM13）を用いた解析を行うことで、セントロメア領域にある切断点の検出も実現可能であることが示された。

今後もロングリードシーケンスを用いて種々の構造異常が同定される可能性がある。

論文要旨の説明に続いて以下のような質疑応答がなされた。

高橋主査，竹内副査，富澤副査より以下の論評・質問がなされた。論評・質問と申請者応答を示す。

竹内先生

◆ヒトの構造多型の数が2万種類あるという報告もある中，dnarrangeで使うコントロールデータは何人分を使用するのが妥当であるか

申請者応答：

コントロールの人数としては，最初の数人で，残る構造多型数は指数関数的に減少し，最終的にはほとんど数の変動がないところまで引き算されることを考慮すると，33人で十分と考えられる。また，日本人症例の解析には，アライメントするヒト参照ゲノム配列を日本人特有の配列を用いることができれば，さらに効率的に病的な構造異常の抽出が可能となると予測される。

◆ロングリードシーケンス解析は，いずれ保険収載されるような汎用される遺伝学的検査になりうるのか

申請者応答：

現状では，ヒトの構造多型の病的意義については検証不十分で，解析技術として発展途上の段階であり，数年のうちに保険収載される検査にはならないと考える。しかし，今後ヒトでの解析データが集積し，解析パイプラインの開発と確立，さらに染色体核型分析などの細胞遺伝学的検査などの確立された検査との併用などによって，汎用されうる解析手法と考えられる。また一塩基変異の検出精度の上昇によっては全エクソーム解析に勝る，一塩基変異の主だった解析手法になりうる。

ターゲットとなる遺伝子が絞られている場合のリピート病の解析については，コストも比較的安価に解析可能であり，構造異常解析よりも早い段階で，一般臨床で汎用されるようになると思う。

◆クロモスリプシスの進化学的な視点について

申請者応答：

破壊的な事象が単一のエピソードで起こるということで，種の進化の過程でもそのような劇的な事象が大きなインパクトとして生じた可能性を述べている論文もあるが，今のところエビデンスとして示されてはいない。今後，ロングリードシーケンスで，動物の生殖細胞でのクロモスリプシス研究の進展とともに新たな発見が期待される (Pellestor, F. et al. Mol Cytogenet 13, 3 (2020)) .

富澤先生

◆今回提示した症例3はクロモスリプシスと言えるのか

申請者応答：

複雑な染色体構造異常は，Chromothripsis, Chromoanasythesis, Chromoplexyの3種類に分類されている．

Chromothripsisは染色体の破砕後に，Non-homologous end joining (NHEJ)によって修復され，逆位や欠失，フラグメントの順序の変化等が起きる（重複はほとんどない）．

Chromoanasythesisは microhomology-mediated break-induced replication; MMBIRによる修復が行われることによる発生が想定され，コピー数変化として欠失だけでなく2-3倍に重複していることがある．

Chromoplexyは前立腺がん細胞で初めて報告された．複数の染色体構造異常がループ状に次々と連結していくような構造異常(連環染色体断裂融合)で，多数の欠失や転座が生じており最大8の染色体が関わる事が報告されている．発生機構として転写が盛んであるゲノム領域に集中していることから，複数の染色体が同時に近接している細胞核内における転写ハブにおいて，何らかの原因によりゲノム断裂・融合が誘発された結果と考えられている．

クロモスリプシスの特徴としては

1. 切断点が局所にクラスター化
2. コピー数の状態が1~2の間である
3. 単一のハプロタイプ、すなわち2本の相同染色体のうちの1本に影響を与える再構成である
4. DNA断片の結合と順序がランダム
5. 切断点を結合して派生染色体を組み立てることができる

などが挙げられており（Pellestor, F. and V. Gatinois, *Methods Mol Biol*, 2018. **1769**: p. 35-41, Pellestor, F. et al. *Mol Cytogenet* 13, 3 (2020)），症例3の複雑な構造異常はクロモスリプシスの特徴と合致していると考ええる．

◆複数の構造異常があればどのように評価するか

申請者応答：疾患原因が，1つの遺伝子の構造異常ではないことは大いにありうると考える．患者の表現型を引き起こす可能性のある遺伝子の変化に関してはそれぞれが，突然変異であるのか，また変異同士が相互作用を起こして疾患を引き起こす可能性はないのか等，様々に検証する必要がある．

高橋先生

◆クロモスリプシスは DNA の修復の脆弱性が根底にあるのか

申告者応答：

クロモスリプシスが親からの遺伝の場合には主に母親から受け継がれている報告が多いが、突然変異の場合の大半は精子形成に起因する染色体異常である。精原細胞から何百回もの有糸分裂を連続して行う精子形成中には、複製ストレスと、分裂エラーが染色体不安定性と染色体切断の発生を誘導する可能性がある。精子形成の際、アポトーシスはセルトリ細胞が制御する異常生殖細胞の排除のためのメカニズムであるが、組み換えチェックポイント（pachytene checkpoint）が働かずにアポトーシス機構が働かない場合などでは異常生殖細胞が残ってしまう。

また、精子形成中に、90%以上のヒストンがプロタミンに置き換わることによって核凝集が起こり、成熟精子となる（精子では、ヒストンの90%以上がプロタミンと呼ばれる小型タンパク質に置換され、DNAがよりコンパクトに折り畳まれることにより、クロマチンは高度に凝集し、精子核は普通の細胞核の数分の1の大きさになる）。このヒストンからプロタミンへの移行段階で精子の染色体DNAの切断が起こることがあり、この段階の細胞ではハプロイド染色体であるため、相同組み換えではなく、NHEJによってのみ切断は修復される。このことも精子でクロモスリプシスが生じるひとつの要因と考えられている。

精子と対照的に卵子は相同組換えとNHEJの両方によって切断を修復することができるため、卵子形成時のクロモスリプシスは精子形成時よりも起こりにくいとされている。

精子形成がDNA損傷に対して脆弱でDNA修復能力に限界があることが示されている。

(Pellestor, F et al. *Methods Mol Biol.* 2018;1769:35-41.)

以上よりご指摘のとおり、生殖細胞（主に精原細胞～精子）におけるDNA損傷とその修復機構の脆弱性が、クロモスリプシスの発生に関わっていると考えられる。

◆T2T-CHM13で読まれていない領域はどういった領域か

申請者応答：

CHM13（全胎状奇胎の細胞株由来）にはY染色を含まないため、Y染色体の配列の決定はなされていない。また、元となっている論文では、基本的には染色

体の端から端までギャップなく配列を決定しているが、0.3%の領域（それぞれの染色体の反復配列領域）でシーケンスカバレッジに偏りがあり配列の信頼性の低い領域がある、と記されている。さらに CHM13 は一倍体の染色体の配列であるためハプロタイプを区別する必要がなかったが、今後通常のヒトの生殖細胞でみられる両親由来の 2 組の染色体（二倍体）の配列をハプロタイプ毎に決定することを目標としている。

(Nurk, S. et al. Preprint at bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.05.26.445798> (2021).

◆ナノポアのモータータンパク質には何が使用されているか

申請者応答：

DNA を一本鎖にして、ナノポア内でのシーケンス速度を調節するために、ヘリカーゼエンザイムが用いられている (Scientific Reports, 2019. 9(1): p. 5370) とされている。

以上の質疑応答が行われた。審査員による協議の結果、本研究は博士号（医学）の授与に値するものと判定された。