審査様式２－１

氏　　名	宮　冬樹
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博乙第　2777　号
学位授与年月	平成　28 年　2 月　29 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	次世代シーケンサーを用いた先天性神経疾患の原因変異探索と同定

主　　査	筑波大学教授	医学博士	須磨崎　亮
副　　査	筑波大学教授	博士(医学)	野口　恵美子
副　　査	筑波大学教授	博士(医学)	増本　幸二
副　　査	筑波大学准教授	博士(医学)	山本　哲哉

論文の内容の要旨

（目的）

次世代シーケンサー（NGS）を用いて exon 領域を選択的に解析する全 exome シーケンス（WES）法は、未知の疾患原因遺伝子変異を発見するために有用性の高い検査法である。しかし、WES では未だ解析方法にゴールデンスタンダードと呼べる確立されたものが無く、多数の call される変異の中から如何にして効率的に疾患原因変異を同定するか、偽陽性と偽陰性を如何にして減らすか、その call 方法の各種パラメーターはどのように設定するのが最善なのか、そして WES を行っても疾患原因変異が見つけられない場合の原因はどこにあるのかといった課題が残されている。例えば WES は遺伝性疾患の原因変異同定に非常に有用ではあるが、実際の WES を行った際の疾患原因変異同定率は世界的に約 25%程度と見積もられており、原因遺伝子が見つけられなかった場合の対処法は不明である。本研究の目的は、上記の課題の解決策を模索し、新たな解析手法を開発し、実際の疾患検体を用いて解析を行い、これまで以上の精度と感度で疾患原因変異を同定することである。

（対象と方法）

研究対象は先天性の遺伝性疾患と想定される神経疾患（診断名としては小頭症、滑脳症、多小脳回、脳梁欠損、脳梁低形成、小脳低形成、水頭症、大頭症、大脳皮質形成異常、Angelman 症候群、Dandy-Walker 症候群、Phaces 症候群等）の患者およびその家族である。最初に実際の NGS データを用いて、NGS データを解析するプログラムの作製と解析時の各種閾値等のパラメーターを検証した。次に、臨床での応用を考慮に入れ、これまでの既知の論文やデータベース情報から神経系疾患関連遺伝子情報を収集して、

これをもとに 284 遺伝子をターゲットとしたカスタムリシーケンス用プローブを作製し、各種神経系疾患検体で原因変異探索を行った。さらに神経系カスタムリシーケンスでは疾患原因変異が同定できなかった検体および新規検体を対象に、全 exon をターゲットとした WES を実施して疾患原因変異を探索した。WES でも原因変異が未同定であった検体に対しては、WES ではカバーしきれていないタンパク質コード領域（CDS 領域）を洗い出し、WES とは別の選択的環状化法と呼ばれる方法で CDS 領域シーケンスを補完するカスタムリシーケンス用プローブを作製して、疾患原因変異の探索を行った。

（結果）

神経系遺伝子カスタムリシーケンスでは 119 検体中 17 検体（同定率 14.3%）、WES では 43 家系（139 検体）中 20 家系（同定率 46.5%）で疾患原因変異を同定することができた。その中には Rett 症候群様症状を引き起こす新規原因遺伝子としての *GABRD* 遺伝子、*NFIA* 遺伝子変異による新たな疾患、疾患原因遺伝子としては知られていたが本研究によって疾患病態の新規特徴を明らかにし得た *PTPN11* 遺伝子、*ACTB* 遺伝子、*DYRK1A* 遺伝子などが含まれていた。また、通常の WES では 10%弱程度の CDS 領域のシーケンスがカバーできていないことを明らかにし、これらを補完するカスタムリシーケンス用プローブを作製することで WES と統合した際の CDS カバー率をプローブのデザイン段階で 98.5%、実際のシーケンスでも最大 97.4%まで上昇させる方法を確立した。これを用いて WES では疾患原因変異が未同定であった 7 家系を検討し、うち 1 家系において *ASPM* 遺伝子上に新規の原因変異を同定することができた。これらの結果を累計 9 報の論文として公表した。

（考察）

本研究により、古典的な染色体試験や CGH アレイ等のゲノム構造異常試験では異常が明らかにできなかった検体から高感度に原因変異を検出できた。また、従来の Sanger シーケンスと比較すると、迅速性や効率性という面からも NGS を用いた原因変異探索は極めて有用であった。特に神経系疾患の場合は表現型が多岐に渡り、様々な疾患で重複する表現型（例えばてんかんや精神・運動発達遅滞など）や症状が典型例とは異なる場合が多く、臨床症状だけによる確定診断は困難と考えられる。

本研究での WES での同定成功率は 46.5%であり、世界標準の平均約 25%と比較すると高めであった。これは一般人の NGS データベース整備が進み、これらを利用できたこと、閾値等のパラメーターを精査し、偽陽性率と偽陰性率を極力減らすように調整した解析プラグラムを活用したことが理由であろう。

通常の WES 解析で異常の発見できなかった検体が約 20%あった。この理由の一つとして、WES で読まれていない CDS 領域に原因遺伝子が存在する可能性を考え、この領域を補完的に解析したところ、7 家系中 1 家系で新規の疾患原因変異を同定することができた。本法は WES で原因変異が見つからない場合に有用であろう。結論として、神経系遺伝子カスタムターゲットリシーケンス、WES、そして WES で読まれていない CDS 領域を補完する形のカスタムリシーケンスという 3 種の手法とバイオインフォマティクス的解析手法を統合することで、30 個以上の神経系疾患原因遺伝子の新規変異を同定できた。

審査様式２－１

審査の結果の要旨

（批評）

宮氏は次世代シーケンサーの解析方法を改良し、これを活用して 30 個以上の神経系疾患原因遺伝子の新規変異を同定した。特にシーケンサーで読み難い領域を明らかにして、通常の全エクソーム解析では発見できない場合に、この領域を補完的に解析する新たな研究手法を開発したことは、特筆に値する新規性の高い業績として評価される。

平成 28 年１月 6 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。