

論 文 内 容 要 旨

疾患関連遺伝子の系統的な検索法の確立

応用生命科学部門歯周病態学

(主指導教員：栗原 英見 教授)

基礎生命科学部門口腔生理学

(副指導教員：杉田 誠 教授)

応用生命科学部門歯周病態学

(副指導教員：柴 秀樹 准教授)

八木 亮一

論文内容要旨

論文題目

疾患関連遺伝子の系統的な検索法の確立

学位申請者 八木 亮一

遺伝子疾患の確定診断には疾患関連遺伝子の塩基配列の読み取りが必要であるが、近年まではサンガー法が用いられてきた。サンガー法は結果に信頼性があるが、膨大な時間とコストがかかることから診断をルーティンワークとすることは困難であった。しかし、数年前から登場した次世代シーケンサーによって遺伝子診断の様相は一変した。本研究では、Ion Personal Genome Machine (IonPGM) を用いて疾患関連遺伝子の系統的な検索法を確立することを目的とした。IonPGM は半導体チップを利用して、水素イオンが発生する際の pH の変化を電気信号として検出することにより、光学的計測を必要とせずに高速シーケンスを行うことを可能とした卓上型次世代シーケンサーである。加えて、サンプルに特異なアダプターを付与することにより複数のサンプルを同時にシーケンスできることも大きな特徴である。検索対象とする疾患にアルツハイマー病を選択し、疾患関連遺伝子のスクリーニングと併行して IonPGM の欠点についても検討を行った。アルツハイマー病は最も一般的な認知症であり、根本的な治療法は未だになく、65 歳以上では 15% の人が罹患していると推定されている。近年では歯周病によってその発症リスクが増加するという報告もされている。アルツハイマー病は約 25% が遺伝性によるものと報告されており、これまでに原因遺伝子として amyloid precursor protein (*APP*)、presenilin (*PSEN1*)、*PSEN2* が、また晩発型アルツハイマー病のリスク遺伝子として apolipoprotein E (*APOE*) が同定されている。しかし、未だに約 75% の原因は不明のまま、同定されていない原因遺伝子の存在が考えられる。これら未知の原因遺伝子同定のためにも既知の原因遺伝子のスクリーニングは重要である。

そこで日本人 45 人の家族性アルツハイマー病患者と、29 人の孤発性早期発症 (60 歳未満) アルツハイマー病患者において、IonPGM を用いて上記遺伝子の変異のスクリーニングを行った。まず、*APP*、*PSEN1*、*PSEN2*、*APOE* のエクソン領域をカバーするプライマーを作成し PCR を行い、患者ごとに特徴的なタグを付与することによって複数の患者サンプルを同時にスクリーニングできるようにし、半導体チップを用いてアンプリコンシーケンスを行った。検出された変異をフィルタリングし、複数のアミノ酸機能予測アルゴリズムを用いてタンパク質の機能予測と、コントロールサンプルにおいて同一の遺伝子変異の有無を検証した。

家族性グループでは 5 人 (11%) に病原性変異を認めた。同一家系の 2 人を含む 3 人の患者には既知の *PSEN1* の変異 (c.488 A>G, p.H163R) を認め、同一家系の 2 人の患者に新規の *PSEN1* の変異 (c.1158C>A p.F386L) を認めた。この新規変異は非発症者である母親には認められなかった。孤発性グループでは、1 人に *PSEN2* の新規変異 (c.1262C>T p.T421M) と *APOE*ε4 アレルとを持つ患者を認めた。この患者の家族からはサンプルが入手できなかったため、これらの変異が *de novo* 変異か両親から遺伝したものかどうかの評価は不可能であった。また、今回のスクリーニングにおいて、*APOE*ε4 のアレルをもつアルツハイマー病患者の割合は 43% であり、これまでに報告があった日本人グループでの結果と有意差はなか

った。

家族性グループで認めた *PSEN1* の新規変異 (c.1158C>A p.F386L) の 1 塩基前の同一コドンに既知の変異 (c.1157T>C p.F386S rs63749860) が報告されている。この変異をもつ患者には認知症に加え、下肢のけい縮を伴う対麻痺が報告されていたが、私共の患者には認められなかった。孤発性グループで認めた *PSEN2* の新規変異 (c.1262C>T p.T421M) のアミノ酸は種を超えて非常に保存されており、421 番目のスレオニンを含め多くの部分が一致している。また *PSEN1* との相同性を検討すると、*PSEN2* の 421 番目のスレオニンは *PSEN1* においては 440 番目のスレオニンに相当し、アルツハイマー病の病因性欠損が報告されている。以上のことから、*PSEN2* の T421M 変異はアルツハイマー病に重要な影響を与えることが強く示唆される。加えて、この新規変異を持つ患者は *APOEε4* のアレルをホモで持っており、*PSEN2* の新規変異 (c.1262C>T p.T421M) と *APOEε4* とが互いに影響しあう事によってアルツハイマー病を早期に発症させた可能性がある。

本研究で用いた IonPGM であるが、一度に複数のサンプルのスクリーニングが可能であり、かつ大規模に行えば行うほどコストが安くなるという長所がある。一方、GC リッチの領域ではサンガー法で使用するキャピラリーシーケンサーでも時に困難であるが、IonPGM でもカバレッジが低くなることや、アンプリコンの設計上解析できない領域が存在するという短所も認められた。しかしながら、これらの短所を考慮しても変異のスクリーニングから検出までを短時間で自動的に行う IonPGM のメリットは大変大きいと考えられる。

本研究において IonPGM を用いてアルツハイマー病患者の既知の遺伝子スクリーニングを行うことによって、既知の変異ならびに病原性新規変異を同定した。IonPGM を用いた疾患関連遺伝子スクリーニング法はあらゆる疾患に応用可能であり、疾患関連遺伝子の系統的な検索法を確立することができたと考えられる。