

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )	氏名	八木 亮一
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
疾患関連遺伝子の系統的な検索法の確立			
論文審査担当者			
主 査	教 授	兼松 隆	印
審査委員	教 授	川上 秀史	
審査委員	教 授	高田 隆	
〔論文審査の要旨〕			
<p>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、診断の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 才以上では 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 (PSEN)1, 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。</p>			

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製し 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、アミノ酸機能予測アルゴリズム (Sorting Intolerant From Tolerant [SIFT], Polymorphism Phenotyping v2 [Polyphen2], Pmut) 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 APOEε4 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であるかの評価は不可能であった。また、本研究において、APOEε4 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。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た。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。