

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

秦 ひろか

専攻分野：産婦人科学

コース：

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

原因不明胎児異常の網羅的遺伝子配列解析技術による遺伝学的診断の有用性の検討

共著者：

右田 王介、吉岡 伸人、嘉村 浩美、林 恵子、中林 一彦、岡村 浩司、大寺 由佳、諸隈 誠一、田中 守、鈴木 直、秦 健一郎

緒言

生殖異常や胎児異常の一部は、遺伝学的異常を背景に有すると推測されるが、多くの場合典型的なメンデル遺伝する単一遺伝性疾患ではないため、従来は遺伝学的解析が困難な疾患と位置付けられてきた。近年、いわゆるポストゲノム技術を応用したゲノム解析が長足の進歩を遂げ、DNA マイクロアレイ技術による微細（数 kb から 1Mb）な領域の染色体異常の同定が可能となった。また、次世代シーケンサーを用いた全遺伝子配列解析も実用化され、特に生活習慣病やがんなどの研究分野で先行して画期的な成果が報告されつつある。本研究では、これまで遺伝学的解析が困難と捉えられてきた胎児異常症例に対し、DNA マイクロアレイや

次世代シーケンサー等のハイスループットなゲノム解析手法を系統的に利用し、その有用性と問題点を検討した。

方法・対象

従来の手法による遺伝学的解析が困難であった胎児異常症例に対して、網羅的一塩基多型解析ならびに、次世代シーケンサーによる全エクソン配列解析を行った。羊水細胞、死産児の体液、臍帯血、両親末梢血から、ゲノム DNA を抽出した。網羅的一塩基多型解析は、DNA マイクロアレイ技術を利用した SNP (Single Nucleotide Polymorphism) アレイを使用した。全ゲノム領域にわたって稠密に配列されたプローブの蛍光強度から SNP の遺伝子型と遺伝子量を判定し、染色体構造変異を解析した。従来の細胞遺伝学的解析 (染色体分染法) に比し、より詳細な染色体の欠失や重複の同定を行った。次世代シーケンサーを用い、全エクソン配列解析による遺伝子変異候補の抽出を行った。患児、妊婦、そのパートナーの全エクソン配列を解析し、標準配列情報と比較して異なる一塩基置換、微小な欠失や挿入を抽出した。想定される疾患の遺伝様式や発症頻度および遺伝子機能への影響を考慮し、病因候補変異の絞り込みを行った。なお本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会 (承認第 2136 号 (遺 94))、国立成育医療センター倫理委員会 (234) および九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究生命倫理審査委員会 (476-00) の承認を得たものである。

結果

形態異常を呈した胎児の 4 例を解析した。そのうち 2 例には原因と考えられる遺伝学的異常を同定し、残りの 2 例にもこれまでに報告されていない遺伝子変異候補を同定した。

遺伝学的異常が同定された 2 例のうち 1 例は、一塩基多型情報を利用した染色体構造解析で 21 番染色体トリソミーと確定診断できた。同症

例は、死産児由来試料の培養が不調で、染色体分染法による細胞遺伝学的解析が困難であった例である。他の 1 例は、全エクソン解析により FGFR3 遺伝子にミスセンス変異を同定した。同変異は、タナトフォリック骨異形成症患者で既に複数の報告があるため、病因変異と確定診断した。残りの 2 例には、既知の疾患関連遺伝子変異は認めなかったが、未知の微細構造異常や遺伝子変異が観察され、今後これらの病理的意義の解明が待たれる。

考察

従来の手法では解析が困難な原因不明胎児異常症例に対して、DNA マイクロアレイ技術による網羅的一塩基多型解析および次世代シーケンサーによる全エクソン配列解析を行った。一部の症例は、確定診断に成功した。確定診断に至らなかった症例でも、既知の疾患関連遺伝子変異の除外診断に加え、未知病因候補遺伝子変異を同定できた。

本研究で用いた一塩基多型アレイによる染色体構造変異解析は、細胞遺伝学的な手法と比較して、培養不要で高解像度の分析が可能という重要な特長を有するため、通常の細胞遺伝学的検査が困難な流死産検体にも応用可能である。すでに米国人類遺伝学会は、先天異常のスクリーニングに DNA マイクロアレイ技術を応用したデジタルカリオタイピングを推奨しており、今後ますます利用されていく診断技術と考えられる。

全エクソン配列解析は、さらに高解像度の解析が可能であり、機器の普及に伴って急速に日常的な検査解析手技の 1 つになりつつある。しかし、これらの解析技術によって得られる膨大な情報の標準的解析手法は定まっておらず、症例毎に病態背景を考慮した詳細な検証作業が必要である。また、変異候補の正確かつ効率的な抽出には、正常対照群（本研究の場合、妊娠分娩歴に特段の異常を認めない集団）の標準配列情報を整備することが喫緊の課題であると考えられた。

結論

従来の手法では解析が困難な原因不明胎児発育異常症例に対して網羅的一塩基多型解析および全エクソン配列解析を行い、確定診断に成功した。確定診断に至らなかった症例でも、既知遺伝因子の除外診断を行い、未知病因候補遺伝子変異を抽出できた。これらの高解像度の分子遺伝学的診断は、新たな病型分類や疾患概念の提唱、病因と病態の解明につながると期待される。