

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：太刀川 慶史

専攻分野：高度臨床医育成コース（内科学）

指導教授：山野 嘉久

主論文の題目：

Cost-Effective Cas9-Mediated Targeted Sequencing of
Spinocerebellar Ataxia Repeat Expansions

（脊髄小脳失調症におけるリピート伸長の Cas9 ターゲット・シーケ
ンスを活用した費用対効果の高い遺伝子解析）

共著者：

Takahiro Shimizu, Takeshi Imai, Riyoko Ko, Yosuke Kawai, Yosuke
Omae, Katsushi Tokunaga, Martin C. Frith, Yoshihisa Yamano,
Satomi Mitsuhashi

緒言

脊髄小脳変性症（Spinocerebellar degeneration:SCD）は、運動失調や痙性対麻痺を主症状とし、小脳、脳幹、脊髄、大脳を侵す神経変性疾患であり、常染色体顕性遺伝形式の SCD は脊髄小脳失調症

（Spinocerebellar ataxia:SCA）と呼ばれる。SCA には複数の型が存在し、本邦では SCA3、SCA6、SCA31、DRPLA が多く、いずれもリピートの伸長がその原因である。各型で特徴的所見はあるが主要臨床症候は重複する場合が多く、症候学からの鑑別は困難であるため、遺伝子解析は無視できない。ゲノム内のリピート配列を網羅的に解析する遺伝子検査方法として、ロングリードやショートリード型のシーケンサーによる全ゲノムシーケンスが知られている。ロングリード・シー

クエンスでは全ゲノムシークエンスの他、Adaptive sampling などのターゲット・シークエンスによるナノポア・シークエンサーを用いた方法が、ショートリード型のシークエンサーでは全ゲノムシークエンスデータを用いた Expansion hunter などの解析手法が知られている。各検査は非常に高精度である一方、解析には高額な費用を要し、専門の研究機関や検査機関への依頼が必要である。臨床上、SCA の型を絞れない場合、複数の領域の解析が必要になることもある。遺伝子検査では複数領域をターゲットとする必要があり煩雑になる。ゆえに、1 回の検査ですべての候補領域の解析が可能となれば、非常に有用である。ナノポア・シークエンス技術は、対象とする DNA 断片の塩基配列を解析する手法で、現在様々なシークエンサーで利用されている。アダプターの付いた DNA 断片がナノポアというポア蛋白質を通過するとき生じる微小な電気信号の差を深層学習で解析し、塩基配列を解読する。今回我々は、ナノポア・シークエンサーの中でも最小で最安価のフローセルとして知られる Flongle を用いて、SCA の遺伝子検査を高精度かつ安価に簡便に行う方法を提案する。

方法・対象

報告されている 16 種類の SCA の責任領域を標的とし、疾患責任リピートの前後 1000～3000 塩基以内に Integrated DNA Technologies (IDT) 社のカスタムデザインウェブツールを用いてガイド RNA をデザインし、SCA 遺伝子パネルを作成した。SCA1, 2, 3, 6, DRPLA の診断が確定している 5 名の患者ゲノム DNA を用いて Flongle によるシークエンス解析を実施し、正確に診断が可能かを評価した。さらに、リピート病として知られるハンチントン病と筋強直性ジストロフィーの領域に対するガイド RNA も作成し、SCA パネルに追加し、それぞれの確定診断がついている患者のゲノム DNA を解析した。また、コントロール DNA (NA24385, Coriell Institute から購入) を用いて、

Flongle とナノポアの大型フローセルである PromethION を用いたロングリード全ゲノムシーケンス (LR-WGS) におけるカバレッジを比較した。

ナノポア・シーケンスのためのライブラリ作成は、SQK-CS9100 (Oxford Nanpore Technologies (ONT), UK) を用いて行い、標的領域を Cas9 蛋白にて複数領域を選択し同時に切り出した。次に、切り出した DNA 断片にシーケンスアダプターを付加し、Flongle (FL0002, ONT, UK) を 1 検体につき 1 枚を用いてシーケンス解析を行った。ベースコールは Guppy (ONT, UK) を用いた。データ解析には、LAST を用いて hg38 ヒトゲノムリファレンス配列にマッピングし、tandem-genotypes を用いてリピート数を推定した。リピート内構造は Repeat Analysis Tools を用いて waterfall plot として可視化した。DNA のメチル化は Guppy を用いてベースコールを行い、Integrative Genomics Viewer で可視化した。

この研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会により承認され (承認 4983 号)、患者およびその親/保護者から文書による同意を得て実施した。

結果

コントロール DNA を用いた Flongle と LR-WGS の解析比較では、Flongle での解析はカバレッジ中央値が 31.69 であり、LR-WGS の 22.75 より優れていた。両方で検出されたリピート領域のリピート長に差は認められなかった。既に診断がついている患者 DNA を SCA パネルを用いて解析した結果、いずれの疾患においても異常リピート伸長塩基数のカットオフ前後で二峰性の分布が確認され、ヘテロ接合性のリピート伸長が確認できた。また、SCA パネルにハンチントン病と筋強直性ジストロフィーの疾患責任領域を新たに追加した検討でも、それぞれの疾患患者のゲノム DNA で異常リピート伸長が同定できた。

考察

Flongle を用いた SCA パネルは、SCA 患者の異常リピート伸長を検出可能で、候補遺伝子領域について網羅的な解析を可能とすることが示された。加えて、250bp を超える長いリピートも正確に解析可能である。また新規責任領域の追加にも柔軟に対応できることが示された。この結果は、新規の SCA 遺伝子が発見された場合や、他のリピート伸長病の可能性が疑われる場合に、そのリピートのサイズにかかわらず既存の SCA パネルに新たなガイド RNA を加えるのみで新たな責任領域の解析が可能となる。

結論

Flongle を用いた SCA パネルによる検査は、今後の遺伝子解析をより簡便で自在なものとする。加えて安価であることから、大規模な検討でもコストを抑えることができる。