

論文審査の要旨

筆頭著者（学位申請者）氏名

今泉 太一

主論文の題目
および
掲載・審査委員

題目 Establishment of a Simple and Rapid Method to Detect *MECP2* Duplications Using Digital Polymerase Chain Reaction

（ドロップレットデジタル PCR を用いた *MECP2* 遺伝子重複の簡便・迅速な検出方法の確立）

掲載誌 Congenital Anomalies, Jan 25, 2019 (in press)

主査 山野 嘉久

副査 北岡 康史

副査 佐藤 工

[論文の要旨・価値]

<目的> ゲノムコピー数変化 (copy number variation: CNV) は、染色体断片が欠失や重複する現象であり、染色体微細欠失/重複症候群としてヒトの表現型に直接関連する場合がある。CNV の検出は、array comparative genomic hybridization (aCGH) 法を用いた網羅的なゲノムコピー数解析により可能であるが、検査結果の再検証や家系内検索が必要となる場合があり、これまで fluorescence in-situ hybridization (FISH) 法が用いられてきた。しかし FISH 法では、CNV の領域が微細な場合に適切なプローブの準備が困難であり、また特に重複の場合はシグナルが重なるため判定困難という欠点がある。そこで本研究では、methyl-CpG-binding protein 2 [*MECP2*] 遺伝子領域が重複する *MECP2* 重複症候群 (X連鎖劣性遺伝) を対象として、デジタル PCR (digital PCR: dPCR) を利用した CNV の簡便迅速な解析方法を確立し、その応用可能性について検討した。

<方法> 対象は *MECP2* 重複症候群患者 13 名、*MECP2* 重複保因者 4 名、正常対照 6 名。ゲノム DNA を末梢血から抽出し、ドロップレットデジタル PCR (BIO-RAD 社) を用いてインターカレーション法により解析した。常染色体上の 2 つの遺伝子 (RPP30, RPPH1) および X 染色体上の 2 つの遺伝子 (AR, XIST) をリファレンスとして、*MECP2* 遺伝子と *MECP2* の近傍に位置する *IRAK1* 遺伝子の CNV について解析した。

<結果> X 染色体上に存在する AR, XIST, *MECP2*, *IRAK1* 遺伝子は、正常対照男性で 1 コピー、正常対照女性で 2 コピーと検出できた。一方、患者男性の *MECP2*, *IRAK1* 遺伝子は 2 コピー、保因者女性では 3 コピーと検出され、患者症例のみでなく保因者でも CNV を確実に検出可能であることを示せた。

<考察> 本研究は、*MECP2* 重複症候群患者ならびにその保因者において、dPCR を用いた CNV 解析法を世界で初めて確立した。今回確立した方法は、FISH 法と比較して細胞培養の必要がなく、結果判明まで約半日と作業時間が短い。また結果判定も定量的で判定困難な症例もなく、費用面でも経済的である。このように本研究で確立した方法は、aCGH 法を用いた診断結果の再検証や家系内検索の新しい方法として有用であり、学術的のみならず実用的な価値を有する論文で学位に値すると判断した。

[審査概要]

審査は、約 20 分の発表と約 35 分の質疑応答ならびに約 5 分の英語読解力テストを実施した。発表内容はよくまとめられており、これまでの研究の背景や未解決点、研究仮説、方法、結果や考察にわたり、わかりやすい発表であった。質疑応答では、具体的な実験方法、プライマー設計時の工夫、dPCR においてプローブ法でなくインターカレーション法を用いた理由、ドロップレット法において制限酵素を用いなかった理由、今後の課題や発展性など、多岐にわたる質問があったが概ね適切な回答が得られた。

最終試験結果の要旨

[研究能力・専門的学識・外国語（英語）試験等の評価]

方法に関する細かい質問にも適切に回答し、実際に苦勞して研究に取り組んだ様子がよく理解できた。質問に対しても論理的に回答し、本領域に関する専門的知識を習得していると判断した。さらに本研究をもとにした研究課題にも取り組んでおり、研究への関心が高く十分な研究能力を獲得していると判断した。英語読解力は英文文献の一部を指定し、その場での音読・和訳により十分な能力があると判断した。また発表や質疑応答を通して誠実で礼儀正しく、真摯な態度に終始しており、学位授与に値する人物であると判断した。