

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：赤松 伸太郎

専攻分野：脳神経内科学

指導教授：山野 嘉久

主論文の題目：

Targeted Nanopore Sequencing Using the Flongle Device to
Identify Mitochondrial DNA Variants

(ミトコンドリア DNA バリエントを同定するための Flongle を用いた
標的ナノポアシーケンシング)

共著者：Satomi Mitsuhashi, Kaima Soga, Heisuke
Mizukami, Makoto Shiraishi, Martin C Frith,
Yoshihisa Yamano

緒言

ミトコンドリアゲノム (mitochondrial DNA : mtDNA) のバリエントは、ミトコンドリア脳筋症、ミオクロヌスてんかん、視神経症などのミトコンドリア病や、認知症、パーキンソン病といった神経変性疾患の原因となることが知られている。mtDNA は 13 個のタンパク質コード遺伝子、22 個の transfer RNA (tRNA)、2 個の ribosomal RNA (rRNA) を含む全長約 16kb の環状 DNA であり、ロングリードシーケンシング (long read sequencing : LRS) により連続的な配列解析が可能である。ミトコンドリア病では、ホモプラスミーまたはヘテロプラスミーとして存在するバリエントの定量が診断において重要である。しかし、短鎖リードシーケンスでは、核ゲノムに存在する核内ミトコンドリア配列 (nuclear mitochondrial DNA segments : NUMTs) の影

響により、正確な解析が困難な場合がある。LRSはこの問題を克服できるが、一般に高コストである。本研究では、小型かつ低価格なナノポア型 LRS デバイスである Flongle nanopore flowcell v10.4

(nanopore technologies, UK) を用いて、簡便かつ正確な mtDNA 全長シーケンス法を確立し、ミトコンドリア病の分子診断への応用可能性を検証することを目的とした。

方法・対象

既知の mtDNA バリエーションを有するミトコンドリア病患者由来の DNA 4 検体（うち 3 検体は Coriell Institute of Medical Research、1 検体は当院より提供）を用いて、mtDNA 全長の polymerase chain reaction (PCR) による増幅 (whole mtDNA amplification: WMA) 後に Flongle を用いて LRS を行った。対象疾患は Kearns-Sayre syndrome (KSS) 1 例、Myoclonic epilepsy associated with ragged red fiber (MERRF) 2 例、Leber hereditary optic neuropathy (LHON) 1 例であり、検出された変異は chrM: 11778G>A および chrM: 8344A>G が 2 例ずつであった。

これらの 4 検体において、Cas9 で切断された DNA 断片をアダプターでライゲーションし PCR 増幅を行わずに MinION を用いてシーケンスを行った群と、mtDNA を 4 つのプライマーセットを使用して全長 PCR で増幅し Flongle を用いてシーケンスを行った群とで、ヘテロプラスミーレベルの一致性を比較した。また、このうち 2 検体を用いて、既知変異を持たない対照 DNA と 0, 10, 25, 50, 75, 100% の割合で混合し、Flongle によるシーケンス結果と理論上のヘテロプラスミーレベルとの相関を評価した。さらに、1 検体についてはカバレッジの異なる 3 条件（低：平均 47×、中：94×、高：250×）で解析精度を比較した。加えて、当院のパーキンソン病患者 19 例の末梢血由来 DNA を用いて、mtDNA を WMA 後に Flongle で解析し、疾患リスク関連バリ

アントの検出を試みた。

本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会で承認を受け（承認番号第 4983 号）、全例で書面によるインフォームドコンセントを取得したのち実施した。統計解析は、R（バージョン 4.3.1）を用い、参照ヒトゲノム配列は hg38 を用い、アライメントは LAST、バリエント同定には last-genotype を使用した。

結果

ミトコンドリア病患者 4 例すべてで、既知の mtDNA バリエントが正確に検出された。WMA-Flongle 法と Cas9-MinION 法の比較では、ヘテロプラスミーレベルの差異は 10%以内であり（決定係数 $r^2 > 0.99$ ）、概ね一致した。さらに、2 検体を用いた混合比率実験においても、理論値と観測値の間に高い相関が認められた（ $r^2 > 0.99$ ）。この結果は、異なるナノポアフローセル（R9.4 および R10.4）やアンビギュイティコードの使用においても再現性が確認された。また、平均カバレッジ数を高い（*250）・中間（*94）・低い（*47）で分別し比較したが、カバレッジ数を低くした状態（*47）においてもヘテロプラスミーの定量が可能であった（ $r^2 > 0.99$ ）。パーキンソン病患者 19 例の解析では、平均 52.8 個の mtDNA バリエント（ヘテロプラスミー率 $>20\%$ ）が検出され、そのうち 3 例で既報の発症リスク関連バリエント chrM:5460G>A が認められた。ただし、本研究の症例数では統計的有意差は認められなかった。

考察

本研究は、従来の方法と比較すると約 1/10 の低コストかつ簡便な Flongle デバイスを用いることで、従来の LRS 法に比して実施負担を大幅に軽減した mtDNA シーケンス手法を確立できた点に意義がある。PCR による増幅を介してもヘテロプラスミーの定量精度は十分に

保たれており、カバレッジが低い条件下でも有用性が高いことが示された。今回検出対象とした mtDNA 変異の大半は一塩基多型 (single nucleotide variant : SNV) であり、MELAS、MERRF、LHON などの代表的なミトコンドリア病の既知変異の 90%以上を網羅できることから、Flongle による LRS は初期スクリーニング法として非常に適していると考えられる。

結論

Flongle を用いた低コストで簡便なロングリードシーケンスは、mtDNA バリエーションの高精度かつ網羅的な解析を可能にし、ミトコンドリア病や神経変性疾患における病態解明や分子診断の発展に貢献する可能性を示した。今後、より広範な臨床応用や大規模スクリーニングへの展開が期待される。