

| 論文審査の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 筆頭著者（学位申請者）氏名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 赤松 伸太郎                                                                                                                                                |
| 主論文の題目<br>および<br>掲載・審査委員                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 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） |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 掲載誌 Scientific Reports 2024; 14: 25161                                                                                                                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 主査 北岡 康史                                                                                                                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 副査 山本 博幸<br>副査 右田 王介                                                                                                                                  |
| [論文の要旨・価値]ミトコンドリア DNA(mtDNA)のバリエントは、ミトコンドリア脳筋症である MELAS や MERRF、レーベル遺伝性視神経症などのミトコンドリア病や、認知症、パーキンソン病などの神経変性疾患の原因となることが知られている。ナノポア・ロングリードシーケンサーは、DNA がナノポアを通過する際の膜電位を読み取り塩基配列が確定できる手法であり、その中でも Flongle は最小で安価なナノポアフローセルとして知られている。今回既知の mtDNA バリエントを有する 4 検体、MERRF2 例、Kearn-Sayre syndrome1 例、LHON1 例において、Cas9 で断片後ライゲーションし MinION を用いてシーケンスを行う群、mtDNA の全長を PCR で増幅した後 Flongle を用いてシーケンスを行う群で、ヘテロプラスミーレベルの一致性を比較した。その結果 4 例すべてで既知の mtDNA バリエントが正確に検出された。PCR-Flongle 法と Cas9-MinION 法の比較でヘテロプラスミーレベルの差異は 10%以下であり概ね一致した。さらにパーキンソン病患者 19 例の末梢血から mtDNA を PCR で増幅後 Flongle を用いて解析したところ、平均 52.8 個の mtDNA のバリエントが検出され、そのうち 3 例で発症リスク関連である chrM5460G>A の変異が認められた。今回の結果は mtDNA のバリエントを高性能かつ網羅的に解析することが可能であり、今後広範な臨床応用への検討も可能にする価値ある研究である。 |                                                                                                                                                       |
| [審査概要]審査は主査、副査、指導教授、数名の陪席者のもと行われた。発表及び質疑応答において、ミトコンドリア病は mtDNA に病原性変異がある場合と核 DNA の遺伝子変異がある場合があることや、母系遺伝の遺伝形式、ヘテロプラスミーレベルの意味、核ゲノムに存在する核内ミトコンドリア配列 (NUMTs) を判別するのにロングリードシーケンスが効果的であること、実際のミトコンドリア病の治療の限界、さらには多くの神経変性疾患での発症リスク関連バリエントの検出への応用など、様々な質問がされ、申請者は概ね適格に答えることができた。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                       |
| 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]申請者は本研究分野及び成人の神経変性疾患に幅広い専門知識を有し、特に今回 PCR-Flongle と Cas9-MinION を比較し、同等のヘテロプラスミーレベルを定量できたことは価値が高いと考えられ、今後の活躍も期待できると考えられた。質疑応答も終始誠実であり、人格的にも学位授与に値する人物であると判断された。英語は引用文献の一部をその場で訳してもらい、十分な英語読解能力を兼ね備えていると判断された。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                       |