

論文の内容の要旨

論文題目 ロングリードシーケンサーを用いた神経核内封入体病の分子病態解明

氏名 柴田 頌太

【背景：神経核内封入体病の原因遺伝子変異探索研究の状況】

神経核内封入体病 (neuronal intranuclear inclusion disease, NIID) は、進行性的変性神経疾患である。全身臓器にエオジン好性の核内封入体が見られることを特徴とし、認知症や錐体外路症状、小脳失調、末梢神経障害、網膜障害、自律神経障害、一過性意識障害など、多彩な臨床像を呈することが知られている。原因遺伝子変異は明らかでないが、常染色体優性遺伝形式を疑わせる家系の報告も見られる一方、孤発例が3分の2を占めるとする報告もあり、その臨床的・遺伝学的背景は多様で複雑であるものと考えられてきた。

我々のグループでは、NIIDとFragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)の臨床像、頭部MRI所見が高度な類似点を共有する点に着目し、NIIDがFXTASと同様にCGGリピートの異常伸長によるリピート伸長性疾患である可能性を疑った。ショートリードシーケンサーによる全ゲノム解析の結果、NIID症例のみにおいてCGGリピートで埋め尽くされたリードが見られ、この考えを裏付ける可能性が示唆された。PacBio Sequelを用いたNIID症例1例の全ゲノムシーケンシングによって、*NOTCH2NLC(NBPF19)*のCGGリピートの伸長が認められたが、本リピート伸長が真にNIIDの原因遺伝子変異であるか否かを確認するためには、他のNIID症例やコントロール多数例におけるリピート伸長状況の確認による検証が必要な状況であった。

【背景：リピート伸長性疾患研究における技術的課題】

伸長リピート配列の遺伝子解析研究における無視できない問題として、配列決定と増幅における技術的課題がある。ショートリードシーケンサーの登場により大規模並列解析による全ゲノムシーケンシングが可能となった一方、ショートリードのリード長を超える長さのリピート配列は全貌の把握することは困難である。これに対し、ロングリードシーケンサーはリード長が数kbから数十kbに及ぶことから、伸長リピート領域を直接読み通すことが可能である。このため、伸長リピートを含む難読配列の解析研究におけるロングリードシーケンサーの有用性が期待されている。反面、その配列決定コストは依然高く、多数例の解析には向かない問題がある。標的ゲノム領域を選択的に濃縮することでこのコストの低減が可能だが、殆どの標的濃縮法はPCRやサブクローニングによる増幅に依存しており、従来法による増幅が困難であるGC-richな伸長リピート配列には適用できない。ロングリードシーケンサーと効果的に組み合わせることのできる伸長リピート配列の効率的な濃縮法、増幅法を欠く現状があった。

【研究の目的】

これらの背景を踏まえ、本研究では2つの目的を設定した。第一の目的はNIIDの原因遺伝子変異の探索である。これまでの検討によって原因遺伝子として疑われる*NOTCH2NLC*について、NIID症例およびコントロールにおける同遺伝子のCGGリピートの伸長状況を確認する。この過程で、

標的とする伸長リピート領域を選択的に濃縮し配列決定する手法の開発を目指した。第二に、NIID の同リピート長と臨床情報との関連解析により、遺伝子型表現型相関を解明することを目的とした。これに先立ち、当科における NIID 症例を後方視的に検討することで、NIID の多彩な臨床症状と経過の全貌の整理を目指した。

【本研究の概要】

1. NIID 症例およびコントロールにおけるリピート長と配列内容の決定

1) Repeat-Primed PCR (RP-PCR) による検討

NIID 26 例およびコントロール 1000 例を対象として、Repeat-Primed PCR により *NOTCH2NLC* の CGG リピートの異常伸長の有無について検討した。この結果、NIID 症例全例で CGG リピート伸長を認め一方、コントロールでは伸長を認めなかった。

2) Southern blot hybridization による検討

Southern blot hybridization analysis によって NIID 35 例における *NOTCH2NLC* の伸長リピート長の評価を行った。伸長リピート長は 270~550 bp (リピート数として 90~180 回程度) に分布していた。このうち 2 例は伸長アレルがスメア状のシグナルを呈し、somatic instability の関与が疑われた。2 組の親子例の解析では、いずれも未発症の子において親よりも長いリピート伸長を認め、世代間でのリピート伸長の可能性が示唆された。

3) Multiplexed amplicon sequencing による検討

PacBio Sequel を用いた multiplexed amplicon sequencing によって、コントロール 182 例における同リピート長および configuration を評価した。リピート数は 7~35 回の範囲に分布していた。Wild-type アレルにおける同リピートの configuration の多様性が明らかとなり、configuration とリピート回数との間に関連がある可能性が疑われた。

4) NIID 症例における伸長リピートの配列内容の決定

NIID 症例における伸長リピートの配列内容を決定するため、サイズ分取による標的ゲノム領域の濃縮を行った。これに加え、*E. coli* の複製機構を *in vitro* で再現した OriCiro technology を用いて伸長リピート領域を増幅した。これらの濃縮検体、増幅産物をそれぞれロングリードシーケンサーで配列決定することで、NIID 27 例の伸長リピート領域の内部配列を評価した。OriCiro による増幅産物においては、増幅過程のリピート短縮および伸長の可能性が否定できず、リピート長を正確に決定できない可能性が疑われたが、configuration の評価が可能であることを示した。*NOTCH2NLC* の伸長アレルの configuration は wild-type アレルと比較して複雑かつ多様であることが明らかとなった。同一症例由来の検体から 2 種類の configuration のリードが得られ、NIID 症例の伸長アレルにおける somatic instability の可能性が示唆された。

2. NIID の臨床像の後方視的検討

2008 年 10 月から 2019 年 12 月までの期間に当院当科を受診、または協力施設より遺伝子検査依頼のあった NIID 35 例を対象として臨床情報を後方視的に解析した。男性 19 例、女性 16 例で、孤発例 15 例、家族例 20 例であった。発症時年齢は 49~76 歳 (中央値 63 歳) でいずれも高齢発症例であった。60 歳代に認知機能障害で発症することが多く、9 割近い症例で経過中に認知機能

障害が出現していた。末梢神経障害は自覚されにくいものの、神経診察では9割以上で腱反射の減弱または消失を指摘され、約8割で電気生理学的異常を認めた。錐体外路徴候、自律神経障害を約8割、小脳性運動失調を約5割で認め、臨床像の多様性を裏付ける結果であった。家系内においても症状は多彩であるが、初発症状は家系ごとに傾向が見られる可能性が疑われた。

3. 遺伝子型表現型相関の検討

NIIDの遺伝子型表現型相関を明らかにするため、1.の検討で得られたNIID症例の伸長リピート長及び内部配列と、2.で整理した臨床情報との関連について検討した。リピート長と発症年齢の関連解析においては、全体の傾向として統計学的に有意な相関関係は認めなかった。初発症状に着目した解析では、無気力や気分障害、認知機能障害で初発する症例はリピートが長い傾向が疑われた。NIIDの遺伝子型表現型相関を明らかとするためには、より多数例を偏りなく集積し、多数の剖検脳における検討を行うことが必要と考えられた。

【本研究が明らかとしたこと】

本研究では、NIIDの原因遺伝子変異が*NOTCH2NLC*に存在するCGGリピートの異常伸長であることを明らかとした。NIID症例における同リピート数は90~180回程度で、コントロールの7~35回と比較して有意な伸長を認めた。サイズ分取とロングリードシーケンサーを組み合わせることで、標的配列を濃縮し高精度の配列決定を行う手法を確立した。比較的簡便ながら最大20倍の濃縮率を達成し、伸長リピートの配列決定における有用性を実証した。多量のDNA検体を必要とするものの、断片長さえ明らかであれば配列内容不明の標的にも適用できる高い応用可能性は本手法の利点と考えられた。また、本研究ではOriCiro technologyにより従来法では増幅が困難な伸長CGGリピートの増幅を行い、ロングリードシーケンサーとの組み合わせが内部配列の評価に有用であることを示した。これらによりNIID症例の伸長リピートにおけるconfigurationの多様性、somatic instabilityの存在、世代間の不安定性が示唆された。また、遺伝学的診断の担保されたNIID症例の臨床像を後方視的に検討した。NIIDの病態機序、遺伝子型表現型相関を明らかにするためには、より多数例の症例集積に加え、多数の剖検脳における統合的解析の必要性が示唆された。