

審査の結果の要旨

氏名 柴田 頌太

本研究は神経核内封入体病（Neuronal Intranuclear Inclusion Disease、NIID）の原因遺伝子変異の探索および遺伝子型表現型相関の解明を目的とした。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し、この内部配列（configuration）の決定を目指した。これに加え、NIID における伝子型表現型相関を解明するため、当施設における NIID 症例の臨床像を後方視的に検討し、同リピート長と臨床情報との関連解析を行った。これにより下記の結果を得ている。

1. *NOTCH2NLC* の CGG リピートを標的とした repeat-primed PCR を用いた検討において、対象とした NIID 症例全例で同リピートの伸長を認めた一方、コントロール 1000 例ではいずれも伸長を認めなかった。Southern blot hybridization analysis を用いて NIID 症例 35 例におけるリピート長の評価を行い、ロングリードシーケンサーを用いた multiplexed amplicon sequencing によってコントロール 182 例のリピート配列を決定した。この結果、NIID 症例における同リピート数は 90～180 回程度とコントロールの 7～35 回と比較して有意な伸長を認めた。
2. 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決定した。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が示された。*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。
3. NIID の多彩な臨床症状と経過の全貌を整理するため、臨床像の後方視的検討を行った。2008 年 10 月から 2019 年 12 月までの期間に当院脳神経内科を受診、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。

4. NIIDにおける遺伝子型表現型相関を明らかにするため、1. および2. 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、3. 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。

以上、本研究は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。同伸長リピートにおける**configuration**の多様性や、**somatic instability**の存在、世代間の不安定性を初めて示した。この過程において、従来法では評価が困難であった伸長リピートの配列決定に対して、サイズ分取による濃縮と**OriCiro technology**を用いた増幅をそれぞれロングリードシーケンサーと組み合わせた手法の有効性を実証した。本研究はこれまで原因遺伝子変異が明らかでなかったNIIDの病態機序の解明、そして難読領域の遺伝子解析研究に重要な貢献をもたらすものと考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。