

論 文 要 旨

**Remapping and mutation analysis of Benign Adult
Familial Myoclonic Epilepsy in a Japanese pedigree**

日本人家系における良性成人型家族性ミオクローヌステんかんの
連鎖解析と変異解析

森 さつき

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

良性成人型家族性ミオクローヌステんかん、Benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME)、別名 familial adult myoclonic epilepsy 1/familial cortical myoclonic tremor with epilepsy 1 (FAME1/FCMTE1) は、成人発症の手指振戦、ミオクローヌス、頻度の低いてんかん発作、小脳失調や認知症に至らない良性の経過を示すといった常染色体優性遺伝形式の疾患である。以前我々のグループは BAFME の疾患遺伝子候補領域を 8 番染色体長腕のマーカー D8S784 から D8S1694 間に同定した。その後、他のグループがイタリア人家系において 2 番染色体短腕、フランス人家系において 5 番染色体長腕を FCMTE の疾患遺伝子候補領域として報告した。今回我々は 10K single nucleotide polymorphism (SNP) arrays と追加の microsatellite markers を用いて、全ゲノムリンケージ解析を行い、BAFME の疾患遺伝子候補領域を再確認した。また BAFME の疾患変異遺伝子を同定するため、候補領域内の全 38 遺伝子を対象に変異解析を行った。

【材料および方法】

一つの BAFME 日本人大家系を対象にしている。前回我々が解析を行った家系と同一であり、対象者も前回と同様である。ただし、一名に関しては、今回患者から非患者へ変更となり、対象者は 16 人の患者と 11 人の非患者を含む合計 27 人となっている。GeneChip® Human Mapping 10K 2.0 Xba Array (Affymetrix) を用いた全ゲノム解析後、GeneSpring GT®2.0 (Agilent Technologies) を用いてリンケージ解析を行った。その後、SNP と追加の microsatellite markers の遺伝子型をもとに、ハプロタイプ解析を行い、組換え部位の同定を行った。同定された候補領域内の全 38 遺伝子を対象に、直接シーケンス、全ゲノムシーケンスを行った。さらに Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix) を用いて、コピー数変異解析も行った。

【結 果】

全ゲノムリンケージ解析にて、マーカー rs1021897 (8q24.12) において、2 点ロッドスコア 6.0 をマークした。2 染色体、5 番染色体への連鎖は否定された。ハプロタイプ解析から、マーカー rs1898287 ~ rs2891799 間の 7.16 Mb (8q23.3-8q24.13) が BAFME の疾患遺伝子候補領域であると同定した。シーケンス解析では NCBI の SNP データベースに報告されていない、30 個の塩基変化部位を認めたが、そのうち 25 個は健常コントロールにも認め、残り 5 個はイントロン部のヘテロ性の塩基変化であった。いずれにせよ、コピー数変異解析も含め、明らかな BAFME の疾患変異遺伝子を同定することはできなかった。

た。

【結論及び考察】

今回変異が同定できなかった可能性として、シーケンス解析やコピー数変異解析にて同定できないような1つもしくは数個のエクソンすべてを含んだ逆位が存在する、候補領域内に未同定の遺伝子が存在し、そこに変異が存在する、イントロンや遺伝子間のスペーサー領域といった非翻訳領域にBAFME発症に関与する変異が存在するといったことが考えられた。今後、BAFMEの疾患変異遺伝子を同定するためには、遺伝子の非翻訳領域も含めた解析が必要である。

(Journal of Human Genetics, in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 165 号	学位申請者	森 さつき
審査委員	主査	高嶋 博	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	乾 明夫	副査 宮田 篤郎
	副査	橋口 照人	副査 古川 龍彦

Remapping and mutation analysis of Benign Adult Familial Myoclonic Epilepsy in a Japanese pedigree

(日本人家系における良性成人型家族性ミオクローヌステんかんの連鎖解析と変異解析)

以前、学位申請者らのグループは、良性成人型家族性ミオクローヌステんかん、Benign adult familial myoclonic epilepsy (BAFME) の原因遺伝子候補領域を 8 番染色体長腕のマーカー D8S784 から D8S1694 間に同定した。その後、BAFME 類似疾患において、2 番染色体短腕 (イタリア人)、5 番染色体長腕 (フランス人) が原因遺伝子候補領域であると報告された。そこで、本研究では BAFME の原因遺伝子候補領域を全ゲノム領域において再確認するとともに、詳細な変異解析から BAFME 原因遺伝子を同定することを目的とした。

本研究では以下の結果が得られた。

- (1) Genome-Wide Linkage 解析において、BAFME は 8 番染色体長腕のみに有意な連鎖を示すことを再確認した。
- (2) マイクロサテライトマーカーや SNP マーカーを用いた詳細なマッピングを行い、BAFME 原因遺伝子候補領域を、8 番染色体長腕に存在する SNP rs1898287~rs2891799 間の 7.16 Mb に同定し、候補領域内の全 38 の遺伝子を対象に、遺伝子配列およびコピー数変異も含めた解析を行ったが、明らかな変異はなく、変異同定には至らなかった。
- (3) BAFME 発症には、候補領域内の未同定の遺伝子や非翻訳領域の異常が関与する可能性が高い。今後、さらなる解析が必要である。

本研究は BAFME の原因遺伝子候補領域を同定し、その後、変異解析から原因遺伝子の同定を試みたものである。残念ながら原因の同定には至らなかったが、詳細な解析がなされており、今後の研究に向けて、示唆に富むものである。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 165 号	学位申請者	森 さつき
審査委員	主査	高嶋 博	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	乾 明夫	副査 宮田 篤郎
	副査	橋口 照人	副査 古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成24年1月25日、学位申請者 森 さつき 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) BAFME 類似疾患において、2番染色体短腕、5番染色体長腕といった異なる候補領域が報告されているが、候補領域内の遺伝子に関連性はないのか？

(回答) 候補領域として同定された 8q23.3-8q24.13 と 2p11.1-q12.2、5p15.31-p15.1 間に存在する遺伝子において、同義遺伝子やパラログ遺伝子の存在、個々の遺伝子の機能について調べたが、今のところ明らかな関連性のある遺伝子は認めていない。

質問2) 前回研究と今回研究では候補領域が少しずれているが、II-18 の診断が変更となったことと、マーカーの並びが変更になったことの、どちらがより影響しているか？

(回答) それぞれが影響している。

質問3) 未同定の遺伝子に原因遺伝子がある可能性はどれくらいあるのか？

(回答) ここ半年程で、候補領域内で新たに同定された新規の遺伝子は 8 つもあり、未同定の遺伝子に変異を有する可能性がある。

質問4) non-coding region の変異によって実際に疾患を発症した例があるのか？

(回答) non-coding region の point mutation からスプライシング異常が起こり、下流にある exon が発現されずに、collagen VI-related myopathies 等の発症に至った報告がある。

質問5) BAFME に血液学的に特徴のある異常所見はないのか？

(回答) 特記所見はない。

質問6) ミトコンドリア病であることを疑ったことはないのか？

(回答) 脳神経症状の他には、筋力低下や筋萎縮、CK 上昇といった筋疾患の所見を認めない等、臨床症状からミトコンドリア病を否定した。さらに臨床遺伝形式は母系遺伝ではなく、常染色体優性遺伝であることから常染色体遺伝子を調べた。

質問7) Direct-Sequencing に Genome-Sequencing を追加した目的は何か？

(回答) 人為的ミスを除く目的に加えて、Genome-Sequencing にて intron 部の変異も検討できる可能性を考え、Genome-Sequencing を行った。

質問8) BAFME が良性というのは、てんかんをコントロールできるということか？

(回答) 進行性の神経変性疾患ではないため、良性と言われている。てんかんも薬剤が奏功する。

質問9) 患者の脳の病理はどうなっているのか？

最終試験の結果の要旨

(回答) 患者の剖検脳の報告はないため、不明である。

質問 1 0) COLEC10 と MRPL13 の機能は？

(回答) COLEC10 は C-lectin family で、コラーゲンに似た配列や糖を認識するドメインをもつ蛋白をコードすると言われている。MRPL13 はミトコンドリアのリボソーム蛋白の一部のサブユニットをコードしていると言われている。

質問 1 1) Genome – Sequencing で Direct – Sequencing で認めた新規塩基変化のうち、80%は検出できなかったのはなぜか？

(回答) 解析に使用した当時の Genome – Sequencing は、Depth of coverage が 20 程度と現在のものに比べ感度が低く、さらにヘテロ接合性の変異検索であるため、検索がさらに難しくなってしまったと考えている。

質問 1 2) コピー数変異が生じるメカニズムは？

(回答) 大きく分けて、3つの機構が言われており、一つ目には、non-allelic homologous recombination : Low Copy Repeat と呼ばれる相同配列を介して遺伝子の短縮や重複が生じる。次に、fork stalling and template switching : 遺伝子複製の過程において、複数の replication fork 間で類似の配列を誤認識して複製された結果、他の遺伝子配列が入り込む。さらに non-homologous end joining : 修復過程において DNA2 本鎖断端が削られてつながった結果、deletion を生じるという機構がある。

質問 1 3) コピー数の変異では RNA も変化するのか？

(回答) 以前、我々のグループが行った研究において、コピー数変異をもつと、コードする蛋白が発現しなかった例がある。

質問 1 4) BAFME 発症に環境要因は関係しないのか？

(回答) 環境要因が症状を修飾している可能性も考えたが、明らかな環境要因は認めない。

質問 1 5) 70 歳で症状を認めないことから、非患者と言えるのか？

(回答) BAFME は通常 30~40 歳台の発症が多い。また表現促進現象もみられず、親子で発症年齢に差がない疾患であり、親の発症時期は 18~45 歳であることから、非患者と考えた。

質問 1 6) II-18 を除いて、連鎖解析ができなかったのか？

(回答) II-18 を除いてしまうと、ハプロタイプ解析において組換えの位置が同定できなくなり、連鎖解析が不可能となった。

質問 1 7) repeat expansion や repeat の挿入は解析していないのか？

(回答) exon 部においては、PCR で検出できるような repeat expansion は存在しなかった。Intron 部の repeat expansion や PCR で検出できないような expansion の解析については、今後検討したい。

質問 1 8) ターゲット領域のプロローベ設計が 81.1%であったのは、物理的距離からみたパーセントか？

(回答) 物理的距離の 81.1%にあたる。

質問 1 9) Genome – Sequencing は患者全員を解析しているのか？

(回答) 非常にコストがかかるため、一人の患者のみ解析している。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。