

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	461	号	学位申請者	安藤 匡宏
審査委員	主査	橋口 照人		学位	博士 (医学)
	副査	久保田 龍二		副査	熊本 一朗
	副査	武田 泰生		副査	中村 雅之

主査および副査の5名は、平成30年3月7日、学位申請者 安藤 匡宏君に面接し、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) 論文 Table1 の ACMG ガイドラインに沿って likely pathogenic に分類された変異の病原性を証明するためには今後どうしたらいいか。

(回答) 機能解析における病原性の証明や、塩基置換は異なるものの同じアミノ酸置換を有する変異の病原性が証明されることが必要である。

質問2) ACMG ガイドラインで pathogenic と分類されたものは真に病原性があるのか。

(回答) 病的変異である可能性が高い変異や良性変異である可能性が高い変異を効率的に分類する手法であり、pathogenic と分類された変異でも病原性がない場合もある。

質問3) MFN2 変異による CMT の既報告のレポートでミトコンドリア形態異常や呼吸鎖不全などの所見は得られているのか。

(回答) 本解析は全国の施設から提供された診療情報をベースにしており、本症例の中でミトコンドリア形態異常や呼吸鎖機能不全を証明した症例は存在しない。MFN2 変異を導入したラットの後根神経節ニューロンを用いた報告では複数の MFN2 変異においてミトコンドリア形態異常が観察されている。

質問4) ミトコンドリアが全身に存在している中で MFN2 変異はなぜ神経障害を起こすのか。

(回答) MFN2 がコードする mitofusin2 はミトコンドリア融合を介したミトコンドリア品質管理やミトコンドリア輸送に関与している。MFN2 変異によりミトコンドリア品質管理が障害され、turn over の長い神経細胞に障害が起こり、またミトコンドリア輸送障害のため輸送距離の長い末梢神経に障害をきたすと考えられる。

質問5) CMT の遺伝子検査をした症例で地域差はあったのか。

(回答) 地域差は存在する。72 遺伝子の網羅的解析のデータでは関東と近畿、九州が多い。

質問6) その差は神経内科医の多寡によるものか、家系が集積しているためか。

(回答) 神経内科医の多寡もあるが、地域別で原因遺伝子の頻度は異なっており、家系の集積も関連している。

質問7) CMT の発症年齢が二峰性になっているのはなぜか。

(回答) 遺伝子変異が末梢神経にもたらす障害の程度が強いものは若年発症となる。障害の程度が軽いものの発症年齢は40-50歳を中心に分布するため結果として二峰性の分布となる。

質問8) 孤発例が重症化しやすいということだが、末梢神経以外の神経障害もきたすか。

(回答) 重症化する症例の中では視神経萎縮や嚥下障害といった脳神経障害を呈する症例も存在する。

質問9) 遺伝子診断を早期につけることで患者にとってはどのような利点があるのか。

(回答) 治験を含めた治療に繋げる前段階として診断確定は重要であり、MFN2 変異のような比較的頻度の高い遺伝子診断を早期に行うことは将来の治療法の開発という観点から利点がある。

質問10) 学校保健などで CMT を早期発見し遺伝子診断に導くために診断するポイントは何か。

(回答) 症例を蓄積していく中で得られた頻度の高い初発症状 (徒競走が遅い、足の変形、転倒が増え

えたなど)がCMTを早期に診断するために重要である。

質問11) ミトコンドリア融合や輸送にかかわる部位は明らかにされているのか。

(回答) *MFN2* 変異によるミトコンドリア融合や輸送障害について機能解析を行った過去の論文において、それらの障害を確認できた変異の多くがGTPaseドメインに位置する変異である。そのためミトコンドリアの融合や輸送においてGTPaseドメインが最も重要な役割を果たしていると考えられる。

質問12) *MFN2* 変異の症例もエクソーム解析を行っているのか。重複変異を同定するために *MFN2* 変異をすでに同定した症例もエクソーム解析が必要なのか。

(回答) エクソーム解析で *MFN2* 変異を同定した症例は18症例あるが、いずれもMicroarray法で検出できなかった症例である。*MFN2* 変異をすでに同定した症例において *MFN2* 変異以外の重複変異の有無を確認するためにエクソーム解析する必要があり、今後再解析を検討する。

質問13) エクソーム解析で得られた変異はエラーが多いが確認はしているのか。

(回答) 変異についてはSanger法で確認している。エクソーム解析のデータでDepthやQualityの数値を確認することによってエラーの可能性が高い変異については除外が可能である。

質問14) 変異を同定できないエラーが出た場合は変異を見逃してしまうのか。

(回答) Whole genome sequencingsや第3世代シーケンサーといった技術の進歩により同定できない変異は減っていくと考えられるが、現時点では変異を見逃す可能性はある。

質問15) *MFN2* 変異はtoxic functionだと思われるが、loss of functionの場合はどうなるのか。

(回答) ヘテロ接合性では問題ないが、ホモ接合性にknock outしたマウスの報告では胚性致死が報告されている。

質問16) *MFN2* 変異の症例で発症後の経過の中で中枢神経まで障害が進展した症例はあるのか。

(回答) 発症した当初は末梢神経障害のみであったが、上位運動ニューロンが障害され筋萎縮性側索硬化症のような病型を呈した症例や視神経萎縮を含めた脳神経障害をのちに合併した症例は存在する。

質問17) In silico 解析において gain of function でも十分な感度を有しているのか。

(回答) SIFTとPolyphenでは機能喪失型変異で高い精度を示し機能獲得型変異の場合は精度が下がることが報告されている。そのため本手法では5つのin silico解析ラインを組み合わせることで感度の向上を図っている。

質問18) 今回の解析で founder mutation は存在したか。

(回答) founder mutationの有無についてハプロタイプ解析を行った症例はない。

質問19) CMTレジストリーは変異が同定されてから登録するのか。主治医が登録するのか。

(回答) Web上で患者本人が登録するシステムである。原因遺伝子変異の同定や患者会の参加などを通してCMTレジストリーに協力している。

質問20) *MFN2* は全身のどの細胞にも発現しているのか。

(回答) 発現データの結果から全身の臓器に広く発現していることが知られている。

質問21) Functional assayでGTPase活性の変化を証明している論文はあるのか。

(回答) *MFN2* p.V327TにおいてGTPase活性の低下が報告されている。

質問22) *MFN2* p.T105Sの変異はSNPではないのか。

(回答) 機能解析をしていないため病原性の証明はできない。*MFN2* p.T105Sの変異は複数のコントロールデータベースに存在せず、in silico解析を行った5プログラムの全てで”Damaging”と判断されている。codon105は複数の病的変異が報告されているため *MFN2* の正常機能に強く関わる部位と考えられ、病的変異と推測される。

質問23) 論文中に記載したこれらの変異はコントロールデータベースに存在しないのか。

(回答) 提示している新規変異はいずれの変異も複数のコントロールデータベース (EXAC, ESP, HGVD, iJGVD) に登録されていない。

質問24) 機能解析をすとしたらどのような方法を考えるか。

(回答) *MFN2* 変異によるCMTではミトコンドリア融合障害と輸送障害が病態に強く関わっているため、細胞に *MFN2* 変異を導入したのちミトコンドリアの融合ならびに輸送の障害の有無を確認する手法が望ましい。

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しての学力・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。