

最終試験の結果の要旨

| | | | |
|------|-----------|-------|------------------|
| 報告番号 | 総研第 587 号 | 学位申請者 | 寺崎 茜 |
| 審査委員 | 主査 | 高嶋 博 | 学位 博士 (医学・歯学・学術) |
| | 副査 | 浅川 明弘 | 副査 吉本 幸司 |
| | 副査 | 花谷 亮典 | 副査 橋口 昭大 |

主査および副査の5名は、令和3年1月4日、学位申請者 寺崎 茜 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 家系の地域偏在性はあるのか。

(回答) 全国に患者が存在するため、明らかな地域偏在性は不明である。私たちが解析した家系については出身地までの詳細情報は得られていない。

質問2) 生活習慣などの後天的な要素、地域偏在による症状の違いはあるのか。

(回答) どの家系症例の症状もミオクロヌス様振戦とてんかん発作を主要症状としており、後天的な要素や地域による違いは確認されていない。発症後は疲労やストレスなどにより一時的に増悪するという報告はある。

質問3) *SAMD12* は他に関連している疾患があるのか。

(回答) *SAMD12* 遺伝子そのものでは BAFME 以外に関連疾患はない。*SAMD12* と隣接する *EXT1* 遺伝子の一部が欠失した1患児の報告があり、患児は知的障害、てんかんや多発性骨軟骨腫を呈していた。

質問4) 今回の結果を予防や治療にどのように生かせるか。出産年齢との相関を指摘したが、早い年齢での出産が予防になりうるのか。

(回答) 今後研究が進み、分子病態機序がより明らかになれば、予防や治療法の開発につながる可能性はあると考えている。BAFME は、女性患者の早期出産による遺伝の予防はできないが、表現促進現象の抑制につながる可能性はあると考えている。

質問5) 生命予後は悪くないのか。

(回答) ヘテロ接合性の変異の場合は、生命予後に関して悪いという報告はなく、一般的に良性の経過をたどる。しかし、ホモ接合性変異の患者は希少であり、その自然史は不明である。

質問6) 既報では小脳の病理が提示されていたが、大脳皮質など他の部位にも病変はあるのか。小脳に特異的なのか。

(回答) 小脳プルキンエ細胞の病理以外には、他の脳部位において明らかな病理所見は認められなかったが、in situ hybridization でみつける RNA foci は、プルキンエ細胞よりも皮質の神経細胞に多いと記載があった。

質問7) 既報の標本の採取はどの様に行われたのか。

(回答) 剖検例からの採取であった。

質問8) 東大との共同研究においては、どのような方法論で変異が解明されたのか。

(回答) 我々の研究を含めた既報と合わせて、連鎖領域を *SAMD12* のイントロン4を含んだ領域にまで絞り込んだ。ハプロタイプ解析で共通するコアハプロタイプ領域のゲノムシーケンセスから、繰り返し領域における挿入と異常伸長を同定した。

質問9) サザンブロット解析と long-range PCR のみではなく、RP-PCR によるフラグメント解析まで行うのはなぜか。

(回答) RP-PCR は簡便なスクリーニングとして有用である。RP-PCR で速やかに TTTCA 繰り返し異常伸長の有無を確認できる。その後、伸長の程度をサザンブロット解析や long-range PCR を用いて診断する。long-range PCR では TTTCA 繰り返しの有無は同定できない。サザンブロット解析は DNA 量を消費し、制限酵素処理、電気泳動、プロッティング、ハイブリダイゼーション、露光など、解析に時間がかかる工程が多い。

質問10) 母親の出産年齢とリピート数はなぜ関連したのか。

(回答) なぜ関連するのか原因は不明である。卵母細胞から卵子へ減数分裂する段階において、加齢に伴い異常伸長の修復機構が弱まり、母親の出産年齢が上がるにつれて TTTCA/TTTTA 異常伸長アレルがより伸長するのではないかと予想している。

質問11) ミトコンドリア DNA の解析は行わなかったのか。

最終試験の結果の要旨

(回答) 母系遺伝のみではなく、父系遺伝も確認されていることから、常染色体遺伝性であることが明らかであった。また筋症状やCK上昇等、ミトコンドリア病に特徴的な症状を認めなかったことから、解析に含めなかった。

質問12) RNA foci は、TTTCA リピートがある閾値を超えると蓄積するのか。リピート数による違いはあるのか。

(回答) 閾値を超えると蓄積すると言われているが、BAFME ではリピート数による違いは確認されていない。

質問13) BAFME 関連遺伝子がいくつか報告されているが、それぞれによる症状の違いはあるのか。

(回答) 主要症状はいずれも概ね共通している。*STARD7* 変異や *MARCH6* 変異などは症状の進行が早い傾向にあり、歩行障害や認知機能低下を起こすものも報告されている。

質問14) 症状が経年的に増悪する報告はあるのか。

(回答) 長期的な観察では、症状が緩徐ではあるが進行するという報告がある。

質問15) BAFME の診断がついた時点で予後良好と言えるのか。

(回答) ヘテロ接合性の変異に関しては予後良好と考えている。

質問16) RNA foci が分布しやすい部位、大脳皮質での局在分布があるのか。

(回答) 小脳皮質のプルキンエ細胞の他に、後頭葉の神経細胞に RNA foci を認めており、大脳皮質の神経細胞に RNA foci が出現しているものと思われる。

質問17) TTTCA リピート数と症状、発症年齢との相関はあるのか。

(回答) 病的には TTTCA と TTTTA 配列が複合した繰返し配列の異常伸長であり、TTTCA リピート、TTTTA リピートそれぞれのリピート数の同定はできておらず、TTTCA 配列のみのリピート数と症状との相関は解析できていない。解析には long-read sequencing を要し、コスト面・消費 DNA 量の面で問題がある。

質問18) 他の神経変性疾患において、高齢出産によるリスクが報告されているものはあるか。

(回答) 私の知る限りでは報告はない。

質問19) *SAMD12* の伸長患者で *TNRC6A* の TTTTA 伸長の頻度が高いが、伸長の程度に健常と BAFME 患者とで差はなかったのか。

(回答) サンプル数が少なく、結論づけるのは困難であるが、長さにはいずれもばらつきがあり、明らかな差はなかった。

質問20) *SAMD12* と *TNRC6A* に関して、相関関係や共通分子などに踏み込んだ研究はあるのか。

(回答) 私の知る限りでは報告はない。

質問21) *SAMD12* と *TNRC6A* など遺伝子の場所は異なっているのに共通の症状を呈している、発現部位で似通っているところはあるのか。

(回答) *SAMD12*、*RAPGEF2*、*STARD7*、*MARCH6* については脳の発現が他部位に比較して高いが、脳の部位別の発現の差異は不明である。*TNRC6A* については脳より卵巣での発現が高いことが示唆されている。

質問22) 脳波の異常が起こりやすい部位はあるのか。

(回答) 明らかな焦点性はないが、前頭側頭性に焦点を持つ症例の報告がある。

質問23) 対立遺伝子長はどのようにして同定したのか。正確性はあるのか。

(回答) マーカーの泳動度から相対的に測定したものであり、正確性には欠ける。

質問24) ホモ接合性の患者は両親がいとこ婚であったが、他の遺伝子変異はないのか。発端者のエクソーム解析は行ったのか。

(回答) 今回は BAFME についての遺伝子検査依頼で受けた検体であったため、BAFME に関する遺伝子のみ解析を行った。発端者のエクソーム解析は行っていない。

質問25) 創始者効果解析において、孤発性患者のハプロタイプはどのようにして同定したのか。

(回答) 解析した SNPs はいずれもホモ接合性であったため、判定できた。

質問26) ホモ接合性ということは、アリル頻度は非常に高いということか。なぜアリル頻度の高い SNPs を使用したのか。

(回答) 今回検討した7つの SNPs について、日本人におけるアリル頻度はいずれも80%程度であった。これら7つの SNPs は既報の中国人と日本人の創始者効果を調査する解析で使用されていたものであり、既報の家系との創始者効果について検討した。

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。