

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	成育科学領域小児病態学教育研究分野 氏名 山本 洋平
(論文題目) <b>Mutational analysis by targeted sequencing in 11 cases of tuberous sclerosis</b> (結節性硬化症 11 例における原因遺伝子変異の検討)	
(内容の要旨) <p>【はじめに】結節性硬化症は、全身の諸臓器に過誤組織または過誤腫が発生し、様々な臓器障害が認められる疾患である。原因遺伝子として第 9 染色体長腕 9p34 に位置する <i>TSC1</i> 遺伝子および第 16 染色体短腕 16p13.3 に位置する <i>TSC2</i> 遺伝子が同定されている。遺伝子検査は診断に必須ではないが、軽症例や非典型例においては、遺伝子解析により診断が確定することで、適切なフォローが可能となることも期待される。本研究では、臨床的に結節性硬化症と診断された症例について、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスにより遺伝子解析を行い、原因遺伝子変異の同定を試みた。</p> <p>【方法】結節性硬化症国際診断基準に基づき臨床的に診断された 11 例に対し、後方視的に原因遺伝子解析を行った。患者末梢血から抽出したゲノム DNA を用いて、<i>TSC1</i> および <i>TSC2</i> 遺伝子の全翻訳領域およびその周辺の領域を polymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅し、次世代シーケンサーにより変異解析を行った。スプライシングの異常を引き起こす可能性があると考えられる変異については、患者末梢血から抽出した RNA を用いて reverse transcription PCR (RT-PCR) 法や直接塩基配列決定法による解析を行うとともに、ゲノム編集およびミニジーンを用いた解析を行い、変異がスプライシングに与える影響を評価した。<i>TSC1</i> および <i>TSC2</i> 遺伝子に変異を同定できなかった症例については、イルミナ社の TruSight One シーケンスパネルを用いて 4,000 種類以上の遺伝子について変異解析を行った。バリエーションの病原性の判定には American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) のガイドラインを用いた。</p> <p>【結果と考察】検討した症例の内訳は確定診断 (definite) 10 例 (91.6%)、疑い診断 (possible) 1 例 (8.3%) であった。<i>TSC1</i> または <i>TSC2</i> 遺伝子の変異は 11 例中 7 例 (64%) で同定され、その割合は先行研究と同程度であった。変異が同定された症例は全て definite 症例であった。原因遺伝子の内訳は、<i>TSC1</i> 変異 1 例 (症例 2)、<i>TSC2</i> 変異 6 例 (症例 1, 3, 8, 9, 10, 11) であり、本邦からの既報と比べて <i>TSC2</i> 変異の比率が高かった。<i>TSC2</i> 変異を持つ症例は <i>TSC1</i> 変異を持つ症例に比べて知的障害を合併する頻度が高いと報告されており、今回の対象症例 11 例中、知的障害合併例が 10 例と多かったことが、<i>TSC2</i> 変異の比率が高かったことと関係しているかもしれない。</p> <p>同定された変異のうち 2 例 (症例 8, 9) は新規の変異であった。症例 8 で認められた新規 <i>TSC2</i> 変異 (c.4829_4831dupGGC, p.Trp1610_His1611insArg) は tuberin の機能に不可欠な GTPase 活性化タンパク質ドメイン内に位置しており、病原性は ACMG ガイドラインに従い、likely pathogenic と判定した。症例 9 に認められた新規 <i>TSC2</i> 変異 (c.1947-22_1947-1delinsAGAAGCAA) は、第 19 エクソンの近傍の第 18 イントロンに位置しており、スプライシングに異常を引き起こす可能性があると考えられた。そこで、患者末梢血から抽出した RNA を RT-PCR にて増幅し塩基配列を解析したところ、56 塩基対の欠失 (c.1947-2002del, p.Glu650Alafs*34) が検出された。この結果はゲノム編集およびミニジーンを用いた解析によっても再現された。また、スプライスサイト予測</p>	

プログラム NetGene2 を用いた予測結果からも、この変異により新たなスプライシング・アクセプターサイトが生じることが示唆された。これらの結果から、症例 9 に認められた新規 *TSC2* 変異はスプライシングの異常を引き起こす変異であると考えられた。病原性は ACMG ガイドラインに従い、pathogenic と判定した。

*TSC1* および *TSC2* 遺伝子に変異を同定できなかった症例について、TruSightOne シーケンスパネルを用いて変異解析を行ったが、結節性硬化症の発症に重要な mTOR 系に関連する遺伝子 (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *PTEN*) に変異は認められなかった。

【結語】今回我々は、結節性硬化症 11 例について、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスにより遺伝子解析を行い、7 例 (64%) に *TSC1* または *TSC2* 遺伝子の変異を同定した。新規の *TSC2* 変異を 2 症例で認め、そのうちスプライシングに異常を引き起こす可能性があると考えられた 1 例について詳細な解析を行い、新規の変異が特徴的なスプライシングの異常を引き起こすことを明らかにした。次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによる遺伝子診断は、結節性硬化症の補助診断として有用であることが示唆された。