

日本人ジスフェリン異常症の遺伝子検索への次世代シーケンサーの導入

研究分担者 青木 正志¹⁾

研究協力者 高橋 俊明²⁾, 鈴木 直輝¹⁾, 井泉瑠美子^{1),3)}, 八木沼智香子⁴⁾, 小野 洋也¹⁾,
島倉奈緒子¹⁾, 新堀 哲也³⁾, 片山 望⁵⁾, 齋藤 京之⁶⁾, 谷口さやか²⁾, 大泉 英樹²⁾,
田中 洋康²⁾, 吉岡 勝^{2),4)}, 武田 篤²⁾, 青木 洋子³⁾, 三橋 里美⁷⁾, 西野 一三⁷⁾

研究要旨

当科では、1995 年より三好型遠位型ミオパチーもしくは肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2B) の疑われる患者に対する *DYSF* 遺伝子の変異スクリーニングを SSCP 法により行ってきたが(参考文献 1, 2)、発端者 169 例の約 40% で診断が未確定である。本解析の第一の目的は、ターゲットシーケンズ解析により、これら未診断例における診断率の改善を得ることである。また診断例における臨床的特徴について考察する。さらに遺伝子解析のシステムについても考察する。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いてターゲットシーケンズ解析を行う。解析対象としては、既知の筋疾患関連遺伝子である 44 遺伝子の検索を行う。また、診断例での臨床的特徴について、とくに変異の種類について考察する。

B. 研究方法

次世代シーケンサーを用いてターゲットシーケンズ解析を行う。解析対象としては、既知の筋疾患関連遺伝子である 44 遺伝子の検索を行う(H25 年 2 月時点で作製)。また見出した *Dysferlin* 変異に関しては変異のタイプについて調べた。

(倫理面への配慮)

患者からの臨床情報の取得および DNA の採取に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、最初に東北大学医学部のヒトゲノム委員会および倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得ている。

C. 研究結果

現在までに、20 例のターゲットシーケンズ解析を行った。12 サンプル毎のターゲットシーケンズ解析を行った結果、解析対象とした全標的領域の約 90% 以上が、目標としている最低 Depth 30 以上でカバーされた。

SSCP 法で片アレルにのみ *DYSF* の病的変異を検出していた 9 例中、6 例に病因となりうるホモ接合もしくは複合ヘテロ接合の *DYSF* 遺伝子変異を検出した。全く *DYSF* に変異を検出していなかった 11 例では、*DYSF* には病的変異を認めなかったものの、3 例でその他の筋疾患遺伝子に原因の可能性のある変異を検出した。

c.2997G>T (p.W999C)変異が日本人で最も高頻度に見出された(24.2%)。この変異は肢体型に多く、発症が比較的遅く、つま先立ちが保たれることも見出した。

さらにこれまで解析した 180 家系を振り返ると nonsense が 19 種類、small insertion/deletion が 16 種類、missense が 25 種類、splice 異常が 13 種類あることがわかった。In frame の deletion も 1 種類見出した。1 アレルのみに変化が見出されたのも 9 家系あった。

D. 考察

既に解析した症例で、従来の解析方法で検出できていなかった *DYSF* 遺伝子の変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる、他の筋関連遺伝子での変異が検出されてきている。今後、サンガー法に相当する結果を得るためにサンプル当たりどの程度のデータを得る必要があるかについては検討が必要である。また、変異の病的意義を考える上では、解析症例の蓄積やデータベース化も重要である。1 アレルのみ見出した 9 家系ではもう片側のアレルに検出できていない splice 異常な

1) 東北大学大学院 医学系研究科 神経内科学

2) 国立病院機構 仙台西多賀病院 神経内科

3) 東北大学大学院 医学系研究科 遺伝科

4) 国立病院機構 仙台西多賀病院 臨床検査科

5) 国立病院機構 仙台西多賀病院 リハビリテーション科

6) 国立病院機構 仙台西多賀病院 薬剤科

7) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第一部

どが見出される可能性が有り、エクソンイントロン境界を中心に今後の検討が必要と考えられた。

今年度は dysferlinopathy が疑われる症例の次世代シーケンサー結果のまとめを Neurology Genetics 誌に報告することができた。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンズ解析が筋疾患網羅的スクリーニングとして有用である。今後診断率の向上をめざし、実用的で有用な診断システムとなるよう検討を行う。また、病因変異が同定されなかった症例では新規原因遺伝子同定を目指しエクソーム解析を行う。診断を確実にし、自然歴の把握や患者数把握に努めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) Izumi R, Niihori T, Takahashi T, Suzuki N, Tateyama M, Watanabe C, Sugie K, Nakanishi H, Sobue G, Kato M, Warita H, Aoki Y, Aoki M. Genetic profile for suspected dysferlinopathy identified by targeted next-generation sequencing. Neurology Genetics 2015;1:e36; doi: 10.1212/NXG.0000000000000036

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし