

論文の内容の要旨

論文題目「ロキタンスキー症候群のエクソーム解析およびコピー数変異解析」

学位申請者 高橋 千果

キーワード： ロキタンスキー症候群、原発性無月経、次世代シーケンサー、
エクソーム解析、コピー数変異解析

【背景】

ロキタンスキー症候群は子宮の形成不全および膣欠損をきたす先天性疾患である。正式名称はMayer-Rokitansky-Küster-Hauser症候群という。原発性無月経で発見されることが多く、二次性徴、外陰部、卵巣機能および染色体核型（46, XX）は正常である。発生頻度は女児出生4,500例に1例とされ、子宮形成不全による無月経や不妊、膣欠損による性交障害が問題となる。腎・骨格・心奇形や難聴などを合併することもある。多くは孤発例であるが、家族例の報告や数々の分子遺伝学的研究結果から、遺伝要因が示唆されている。現在までに16p11.2, 17q12などの染色体異常、*LHX1*, *HNF1β*など遺伝子変異の報告はあるものの、再現性に乏しく未だ原因は明らかにされていない。

次世代シーケンサーの登場によりヒトゲノムの網羅的解析が可能になった。アミノ酸配列コード領域であるエクソン領域は、ヒトゲノム配列において約2%以下とわずかであるが、既知の疾患原因変異のおよそ85%がエクソン領域に存在するとされている。エクソン領域のみを全ゲノム領域から濃縮し、得られたDNA断片のシーケンス解析を行うのが全エクソーム解析である。全エクソーム解析によるメンデル遺伝病の診断到達率は25～50%とされ、希少難病を集約し、診断率をあげるためのプロジェクトが各国で行われている。我が国でも2015年より未診断疾患イニシアチブ（initiative on rare and undiagnosed disease: IRUD）が開始されている。

ゲノムコピー数変異（copy number variation: CNV）は2004年に初めて報告された。ヒトゲノムの多様性に深く関与することが多数の研究から解明されており、疾患との関連では、頻度の稀なCNVが統合失調症などの精神疾患の発症に関わることが明らかになってきている。

今回、我々はロキタンスキー症候群の遺伝要因を解明するために、全エクソーム解析とコピー数変異解析を計画した。ロキタンスキー症候群の発症要因が解明された暁には、本症候群の治療や予防だけでなく、性分化異常の解明に貢献できると期待される。

【目的】

日本初となる、ゲノムワイドな全エクソーム解析とコピー数変異解析を行い、ロキタンスキー症候群の遺伝要因を解明することを目的とした。

【方法】

対象は原発性無月経を主訴に当院産婦人科を受診しロキタンスキー症候群と診断された患者10名と患者の健常家族7名の計17名とした。本学の倫理委員会による承認と文書による同意を得て、末梢血由来のゲノムDNAを抽出し、Agilent SureSelect Human All Exon V5 Kit並びにIllumina HiSeq 2500を用いて全エクソームシーケンスを行った。一塩基変異 (single nucleotide variant : SNV) 解析にはBurrow-Wheeler Aligner(BWA)、Picard、並びにGenome Analysis Toolkit (GATK)を用いた。日本人のSNPデータベースも健常コントロールとして用いた。コピー数変異解析は患者10名について施行した。9名はInfinium OmniExpress-24 BeadChipsを用いてSNParray解析を、1名はAgilent Human Genome CGH Microarray 1M Kitを用いてアレイCGH解析を行った。

【結果】

3家系（患者とその両親、または患者とその両親および姉妹）のエクソーム解析により3個の遺伝子、*MYCBP2*、*NAV3* および*PTPN3*に*de novo* 変異を同定した。*MYCBP2*における変異は別の患者1名のエクソーム解析でも同定された。いずれも最新の一般集団データベースに登録のない変異であった。患者10名のコピー数変異解析では3カ所（2名にchr2 : 10886097-10890204重複、2名にchr8 : 135062170-135065947欠失、2名にchr16 : 5608833-5613997欠失）にCNVが同定された。

【考察】

エクソーム解析とコピー数変異解析によりロキタンスキー症候群の発症に関与している可能性のある候補遺伝子を発見することができた。*MYCBP2*は13q22.3に位置し、E3ユビキチンリガーゼをコードする。*MYCBP2*発現の減少は急性リンパ性白血病を引き起こすという報告や、*MYCBP2*の欠失がまれな遺伝性視覚障害の原因となるとの報告もあるが、子宮および膣の発達に関与するとの報告はまだない。*NAV3*は12q.21.2にあり、神経系で発現するニューロンナビゲータファミリーに属する。*NAV3*変異は結腸癌などとの関連性についての報告はあるが、ロキタンスキー症候群に関する報告はない。*PTPN3*は9q31.3に位置する。チロシンホスファターゼファミリーに属し、分化および増殖などの細胞プロセスにおいて複数の機能を有する。*PTPN3*の体細胞突然変異は細胞増殖と胆管癌を促進する可能性があるが、ロキタンスキー症候群への関与は明らかにならなかった。今回、*MYCBP2*、*NAV3* および*PTPN3*の変異とロキタンスキー症候群との因果関係を解明するには至らなかったが、*MYCBP2*に関しては、2名の患者で新規変異を2つ同定できたこと、特に1名の患者は*de novo*変異であったことから、ロキタンスキー症候群の病因における*MYCBP2*の機能的関与は、さらに調査する必要があると考えられた。

コピー数変異解析では3箇所のCNVが同定された。しかしながら、同定されたCNVは、既報のゲノム領域に位置せず、範囲はいずれも短く、non-coding領域に位置するものであった。また、2名の患者が各部位で同じ構造変化を示したことから多型と推測された。

【結論】

本研究の遺伝的アプローチにより、いくつかの候補遺伝子を発見することができた。しかしながら、ロキタンスキー症候群との因果関係を証明するには至らなかった。本症候群の完全解明のためには、遺伝要因に加えて非遺伝要因も含めて調査する必要があると考えた。今後は本疾患のエピジェネティクス制御および環境要因に焦点を当てるべきであろう。