



## Exploring unsolved cases of lissencephaly spectrum: integrating exome and genome sequencing for higher diagnostic yield

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2025-05-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 古川, 省悟 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/0002000408">http://hdl.handle.net/10271/0002000408</a>

博士（医学）古川 省悟

論文題目

Exploring unsolved cases of lissencephaly spectrum: integrating exome and genome sequencing for higher diagnostic yield

（滑脳症スペクトラムの未解決症例の原因検索：エクソームとゲノムシーケンスの統合による診断率の向上）

論文の内容の要旨

[はじめに]

滑脳症は胎生期の神経細胞遊走異常により起因する稀な脳形成障害であり、出生 10 万人に 1 人の割合で発症する。滑脳症は通常 6 層構造を持つ大脳皮質が 3~4 層となり、知的障害、発達遅滞、てんかんなどの重篤な症状を呈する。脳 MRI 所見では、無脳回（皮質厚 10 mm 以上）、厚脳回（皮質厚 4-9 mm）などの特徴的な所見が見られる。

古典的滑脳症患者の遺伝子解析において、約 8 割の患者に 5 つの主要な原因遺伝子 [*PAFAH1B1* (49.3%), *DCX* (28.3%), *TUBA1A*, *ARX*, *DYNC1H1*] の病的バリエーションが同定されるが、2 割の滑脳症患者は多様な遺伝的背景を有しており、未診断症例も多数存在する。本研究では、エクソーム解析 (ES) とゲノム解析 (GS) を組み合わせた包括的遺伝子解析を行い、非典型的滑脳症患者における遺伝子診断率向上を目指した。特に構造変異 (SV) の検出における GS の有用性と、反復配列の多いゲノム領域での SV 発生メカニズムの解明に焦点を当てた。

[患者ならびに方法]

本研究は昭和大学における人を対象とする研究等に関する倫理委員会および浜松医科大学臨床研究倫理委員会の承認（承認番号 91-130）を得て施行した。

国内の医療機関から集積された滑脳症患者に対し、臨床所見に基づいて推定された候補遺伝子について Sanger 法による初期スクリーニングを行い、バリエーションが検出されなかった 12 名の滑脳症患者を対象とした。対象患者の臨床情報、家族歴、神経学的所見、画像所見を収集し、全例 ES を実施した。患者は男性 7 名、女性 5 名で、最終評価時の年齢中央値は 12 ヶ月（四分位範囲：3.5 - 59.5 ヶ月）であった。ES 解析では、塩基置換バリエーションおよび 2 種類の解析ツール (XHMM 法と jNord 法) を用いたコピー数バリエーション (CNV) の検索を行った。

ES で原因が同定できなかった 8 名に GS を実施した。塩基置換バリエーションのほかに、Canvas、Manta、TEMP2 ソフトウェアを使用して CNV、SV およびトランスポゾンの検索を施行した。同定された CNV/SV は Integrative Genomics Viewer (IGV) で可視化のうえ、break point PCR によって切断点の配列を決定した。また、UCSC Genome Browser の RepeatMasker データを用いて、滑脳症関連遺伝子における反復配列の分布を解析した。特にヒトゲノムにおいて占める割合が高

い *Alu* 配列と LINE-1 配列に注目し、これらの反復配列が SV の発生に与える影響を調査した。*Alu* 配列の相同性解析には The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を使用し、"megablast"と"discontiguous megablast"アルゴリズムを用いて評価を行った。

#### [結果]

ES により 12 名のうち 4 名の患者 (33.3%) で *CEP85L*, *DYNClHI*, *LAMC3*, *DCX* の病的バリエーションを同定した。GS では、8 名中 3 名 (37.5%) の患者で *PAFAH1B1* 遺伝子の構造異常 (逆位 1 名、欠失 2 名) を検出した。特に 2 例の欠失は ES データを用いた CNV 検出ツール (XHMM と jNord) では同定できなかった。また、*PAFAH1B1* 遺伝子の切断点には転移活性の高い *Alu* 配列 (*AluY* および *AluSx*) が存在していた。

滑脳症関連遺伝子の中で *PAFAH1B1* 遺伝子 (35.1%) と *DYNClHI* 遺伝子 (26.8%) は *Alu* 配列密度の密度が高かった。megablast アルゴリズムを用いて *Alu* 配列ペア間の相同性を検証すると、*PAFAH1B1* では 96.4%の *AluY* ペアが高度の相同性を有していたのに対し、*DYNClHI* で相同性が見られたペアは 63.6%と有意に ( $p < 0.001$ ) 低かった。

#### [考察]

*PAFAH1B1* 遺伝子は滑脳症の主要な疾患原因遺伝子であるが、ES ベースの CNV 検出ツールでは構造異常の検出が困難であることが示された。*Alu* 配列はヒトゲノムの 10%程度にみられるが、*PAFAH1B1* 遺伝子では遺伝子配列全体の 35%と高率に *Alu* 配列が存在しており、Non-Allelic Homologous Recombination (NAHR) による構造異常が起りやすいことが知られている。XHMM プログラムが 10%以上の相同配列を含む領域を解析から除外すること、jNord プログラムが 75%未満の相同性を持つ領域のみを処理できることから、ES ベースの CNV 解析においては反復配列の占有率が高い遺伝子においてはバリエーション検出が制限されるものと考えられる。

多くの *Alu* 配列は 70-75%の相同性を持つが、86%未満の相同性では NAHR は非常に起りづらい。一方で、97%を超える相同性の場合には DNA 二本鎖修復という組換えが起りにくい機序で DNA は修復される。このことから *Alu* 配列間の相同組換えは 86-97%の相同性範囲に制限される可能性があり、*PAFAH1B1* 遺伝子ではこの条件を満たす *Alu* 配列ペアが多く存在することが確認された。一方で、同じく高い *Alu* 配列密度を有している *DYNClHI* 遺伝子にはほとんど SV が報告されていない。*AluY* 配列全体での相同性は *DYNClHI* が *PAFAH1B1* よりも高かったが、*PAFAH1B1* では連続する長い相同配列がより高率に一致していた。これらの結果から、*PAFAH1B1* は *Alu* 相同配列内で長い完全一致領域を持つために、相同組換えを介した SV が起りやすい可能性を示唆している。

#### [結論]

本研究は、ES と GS を組み合わせた包括的遺伝子解析が滑脳症患者の高い診断率につながることを示した。特に *PAFAH1B1* 遺伝子のような反復配列の多い遺伝子では、GS が構造異常の検出に有効である。これらの知見に基づき、我々は段階的な診断ワークフローを提案する。第一段階では主要な古典的滑脳症遺伝子のターゲットシーケンスと Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 解析、第二段階で ES、最終段階で GS を実施することで、滑脳症患者の診断率向上が期待できる。