

## 次世代シーケンサーを併用したジストロフィン遺伝子の解析

慶應義塾大学微生物学・免疫学教室 非常勤講師 加藤真吾

### 1. 背景及び目的

ジストロフィン異常症（デュシェンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィー、DMD/BMD）は、ジストロフィン遺伝子の変異によって引き起こされる疾患です。

ジストロフィン遺伝子はヒト遺伝子の中で最も長い遺伝子で、79 箇所のタンパク質を暗号化している領域（エクソン）からなり、骨格筋組織に存在するタンパク質であるジストロフィンを暗号化しています。

この遺伝子の異常は、DMD では、エクソン欠失が 60%、エクソン重複が 8%で、残りが DNA の突然変異によって起こるナンセンス変異（終止変異）、DNA の微小欠失・挿入変異、スプライシング異常（エクソンを連結する反応の異常）などです。

ジストロフィン遺伝子変異の同定は、DMD/BMD の診断を確定するのに役立つだけでなく、血縁者の保因者診断や出生前診断、および将来の遺伝子治療の開発するうえで重要です。

現在、ジストロフィン遺伝子のエクソンの欠失や重複は、保険収載されている方法で検査できますが、残りの微小な突然変異については DMD/BMD であることが確定している症例において、国立精神・神経医療研究センターで全エクソンの DNA 配列を調べる検査が行われています。

ジストロフィン遺伝子の微小な変異を同定する検査が容易でない原因の一つは、この遺伝子のエクソンが 79 個もあるため、非常に操作が煩雑で多額の費用を要することです。

そこで私達は、操作の簡略化と費用の軽減を図るため、最新技術である「次世代シーケンサー」を併用したジストロフィン遺伝子の解析法を開発しました。

### 2. 倫理について

本研究は一般社団法人日本筋ジストロフィー協会の倫理委員会の承認を受けて実施しました。

対象となる患者様には、研究の概要、方法、意義などについて十分な説明を行ったのち、自発的な同意を得て研究に参加していただきました。

### 3. 対象者

大塚病院診療所に通院中あるいは在宅医療を受け、あらかじめジストロフィン遺伝子異常が同定されている患者 4 名を対象としました。

患者 1：BMD、エクソン 5 が重複した例

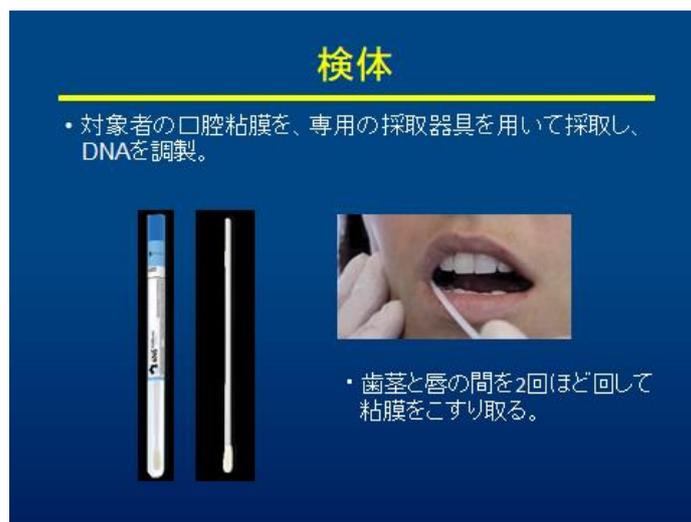
患者 2：DMD、エクソン 48-50 が欠失した例

患者 3：DMD、エクソン 51-53 が欠失した例

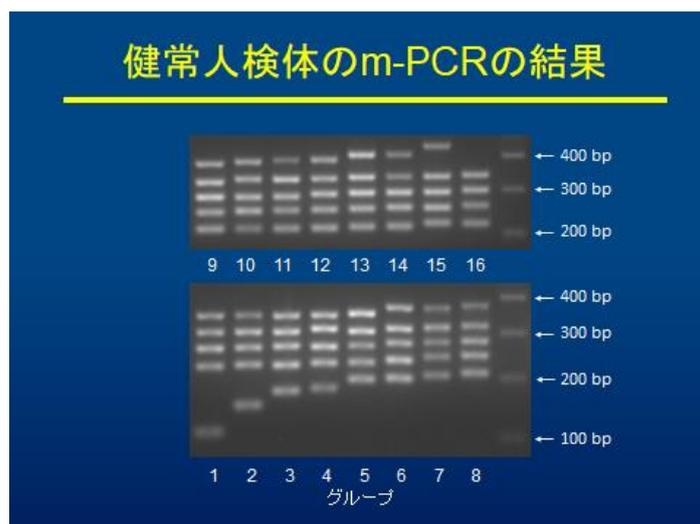
患者 4：ジストロフィン遺伝子 DNA の 10117 番目が C から T へと点変異した例

#### 4. 検体の採集方法

口腔粘膜を専用の採取器具（綿棒）で採取し、粘膜に含まれている細胞から DNA を採取して調べます。この方法では、採血などで体を傷つけることなく簡単に DNA を採取することができ、患者への負担が非常に軽いことが特徴です。

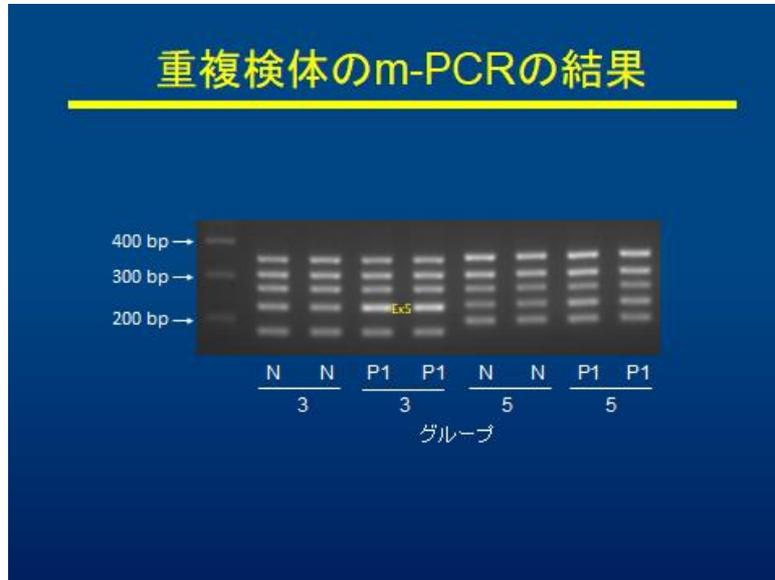


従来の方では、採取された DNA を材料にして、79 個のエクソンを一つずつ調べなければなりませんでした。新しい方法では 5~4 カ所をまとめて一つのグループとして、計 16 グループで調べられるように方法を改良しました (m-PCR 法)。



## 6. エクソン5の重複症例の結果

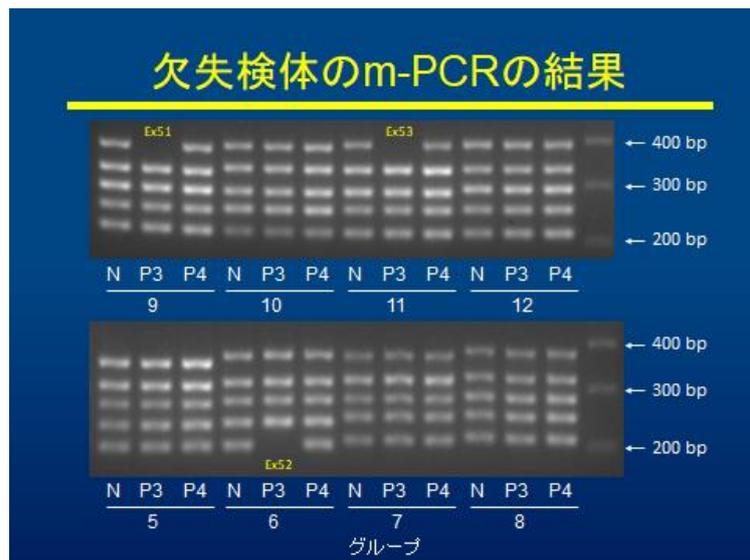
実際にBMDでエクソン5が重複した患者の検査の例を示します。



グループ3の下から2番目のバンドが、健常者(N)よりも患者(P1)の方が濃くなっていることがわかりました。これはエクソン5が2カ所あり、量が2倍となっているため、それを反映してバンドが濃くなっています。

## 7. エクソン51～53の欠失症例の結果

BMDでエクソン51～53が欠失した患者の検査の例を示します。



健常者 (N) と比較すると患者 (P3) のエクソン 51~53 (Ex51~Ex53) のバンドが無くなっている事がわかります。このことからエクソン 51、52、53 が無くなっている、大規模欠失であると判明しました。

点変異の患者 (P4) では重複も欠失も見つかりませんでした。

## 8. 点変異症例を次世代シーケンサーで確認した結果

ジストロフィン遺伝子を新しい技術である「次世代シーケンサー」で解析した結果、重複や欠失がない患者 (P4) では、ジストロフィン遺伝子の 10141 番目の C が T に置き換わっていることが判明しました。この変異は以前のジストロフィン遺伝子の研究において、筋ジストロフィーの責任変異であると報告されています。

対象者	m-PCR	NGS
健常人	-	c.5234G>A (p.Arg1745His) c.7096C>A (p.Gln2366Lys)
患者1	dup ex5	c.5234G>A (p.Arg1745His) c.7096C>A (p.Gln2366Lys)
患者2	del ex48-50	c.8810A>G (p.Gln2937Arg)
患者3	del ex51-53	c.5234G>A (p.Arg1745His)
患者4	-	c.5234G>A (p.Arg1745His) c.7096C>A (p.Gln2366Lys) c.10141C>T (p.Arg3381Ter)

NGSの結果はサイレント変異を除いた。  
黄字が責任変異とみなされる。これは既に報告された変異と一致していた。  
白字で示したミスセンス変異はLOVD<sup>2</sup>によればすべてエフェクトがない。

## 9. まとめと結論

従来行われていた 79 個のエクソンを一つずつ解析していく方法を改め、いくつかの領域をまとめて全部で 16 グループにすること (m-PCR 法) により、操作の簡略化が可能になりました。

重複や欠失のような大きな変異ではない、全 DNA の配列を調べなければならない点変異のような微小な変位を、新しい技術である「次世代シーケンサー」を使う事によって見つけることができるようになりました。

この二つの技術により、以前と比較して検査の操作が簡略化されました。また一検査あたりのコストが大幅に削減され、一検体あたり 4 万円ほどで調べられるようになりました。

新しい技術によって、原因変異がより簡便により安価に判別できるようになり、DMD/BMD の診断を確定するのに役立つだけでなく、血縁者の保因者診断や出生前診断、および将来の遺伝子治療の開発するうえで重要な技術が開発できたと考えます。