

Title	Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with greater than 99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing( Abstract_要旨 )
Author(s)	Izawa, Kazushi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2012-05-23
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2433/158051">http://hdl.handle.net/2433/158051</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

京都大学	博士 (医学)	氏 名	井澤 和司
論文題目	<b>Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the <i>NLRP3</i> gene with greater than 99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing</b> (大量並列シーケンシングによって 99.9%以上の統計的信頼度で <i>NLRP3</i> 遺伝子の塩基置換型体細胞モザイクを検出可能であった)		
(論文内容の要旨) CINCA 症候群 (chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome) は新生児、乳児期からの蕁麻疹様の発疹、関節炎・関節症とくに成長軟骨過形成、慢性無菌性髄膜炎、うっ血乳頭、感音性難聴などの中中枢神経症状を認める自己炎症疾患である。細胞内のパターン認識受容体として自然免疫に関わる <i>NLRP3</i> 遺伝子 (蛋白 Cryopyrin) の機能獲得型変異によって発症する。常染色体優性遺伝と考えられているが孤発症例がほとんどで de novo の遺伝子変異のことが多い。また、臨床的に CINCA 症候群と診断される患者のうちサンガー法によるダイレクトシーケンスでは 40-50%において <i>NLRP3</i> 変異を認めないことが知られていた。最近、田中らはダイレクトシーケンスにて変異陰性の CINCA 症候群の約 70%が <i>NLRP3</i> 体細胞モザイク変異で発症することを国際多施設共同研究で示した。変異アリル頻度は 4.2-35.8%、中央値 10.2%であった。 適切な早期治療のためには正確な臨床診断・遺伝子診断が必要となるが、従来用いてきたサブクローニング法、サンガー法では低頻度のモザイクの検出に多大な労力を要する。そのため、超並列 DNA 塩基配列決定法を利用した次世代シーケンサー (Roche 454 Genome Sequencer FLX) による低頻度体細胞モザイクの検出のパイプライン構築を行った。次世代シーケンサーでおこる低頻度のシーケンスエラーと低頻度体細胞モザイクとの区別が重要となる。そのためモザイクのないと考えられるコントロール 50 検体 (健康人のゲノム DNA49 検体と <i>NLRP3</i> 遺伝子のエクソンとその隣接部位を組み込んだプラスミド 1 セット) で各塩基位置におこる次世代シーケンサーによるシーケンスエラーの統計量を見積もった。両鎖 (Upper 鎖と Lower 鎖) 読みでエラーの起こり方が変わることが確認され、各塩基位置において両鎖で $p < 0.001$ の確率でおこる変異をエラーではなく体細胞モザイクとする判定基準を作成した。特にホモポリマー領域などにおいては塩基挿入、塩基欠失の正確な検出は困難であったこと、これまで報告のある 80 以上の <i>NLRP3</i> 変異はほぼすべてが塩基置換型変異であることから、塩基置換型変異のみに解析を絞った。変異既知の検体で妥当性を確認したところ、 <i>NLRP3</i> ヘテロ変異 5 検体、 <i>NLRP3</i> 体細胞モザイク変異 5 検体いずれにおいても変異を検出可能であり、変異箇所以外に変異陽性と判定される箇所を認めなかった。 <i>NLRP3</i> ヘテロ変異を有するゲノム DNA と健康人のゲノム DNA による混合試験を行ったところアリル頻度で 1%の変異まで検出可能であった。最終的にダイレクトシーケンスにて変異陰性の新規 CINCA 症候群 10 人中 4 人に <i>NLRP3</i> 体細胞モザイク変異を検出した。そのうちの一つは CINCA 症候群として新規変異であったため、変異 <i>NLRP3</i> 遺伝子導入実験による機能解析を行った。その結果 ASC 依存性に NF- $\kappa$ B 活性化能を有し、THP-1 細胞誘導死を引き起こすことが確認され、有意な変異と考えられた。			

(論文審査の結果の要旨)

CINCA 症候群は自己炎症性疾患の一つであり、その約半数は *NLRP3* 機能獲得型ヘテロ変異を原因とする。近年、国際多施設共同研究により約 3 割の症例は *NLRP3* 体細胞モザイク変異が原因であることが判明し、原因不明の症例中により低頻度の体細胞モザイク症例が存在する可能性が示唆されているが、従来の方法では低頻度体細胞モザイクの検出は困難である。本論文は、次世代シーケンサー (Roche 454 Genome Sequencer FLX) を用いて低頻度の塩基置換型 *NLRP3* 体細胞モザイク検出法を確立したものである。正常 *NLRP3* プラスミドと健康人ゲノム DNA49 検体を用い、*NLRP3* 遺伝子の塩基位置・ストランド毎のシーケンスエラー率を算出した後、塩基置換型変異が両鎖においてシーケンスエラーとして起こる確率  $p < 0.001$  の時に、真の変異と判定することとした。同判定基準に準拠し、*NLRP3* 遺伝子のほぼ全エクソンとその近傍イントロンでアリル頻度 1%までの塩基置換型体細胞モザイクを検出可能なパイプラインを構築し、既知の *NLRP3* 変異検体やゲノム DNA 混合試験でその妥当性を確認した。本法の有効性は新規検体において確認された。

以上の研究は *NLRP3* 体細胞モザイク検出方法の確立と CINCA 症候群の遺伝学的背景の解明に貢献し CINCA 症候群患者の診断、治療の促進に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 24 年 3 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降