

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：29-23

課題名：社会実装を目指した迅速な疾患原因遺伝子解析法の開発

分担研究者（所属施設）国立成育医療研究センター

（所属・職名 氏名）ゲノム医療研究部・研究員 柳 久美子

我が国では確定診断のために数個の遺伝子だけに標的を絞ってDNA配列の解析を行いたいといった症例の解析を引き受ける機関を見つけることが困難な状況が続いている。いっぽうで、未診断症例に対する網羅的遺伝子解析は研究ベースで浸透しつつあり、臨床症状等から疾患原因遺伝子をしばりこむことが可能な症例であっても、確定診断を目的として網羅的な解析に提出される症例が後を絶たず、解析現場では困惑する場合が少なくない。そこで、本研究では過去5年間に成育医療研究センター病院の各診療科から遺伝性希少疾患を疑う症例のうち、網羅的な遺伝学的解析された症例を詳細に分析し、確定診断目的症例が網羅的な遺伝学的解析に相当数混在していること、小児慢性特定疾患に含まれる遺伝子でさえも検査会社を含め解析されていないことなどの問題点を明らかにした。このような問題点を解決することを目的に社会実装を目指した疾患原因遺伝子解析法を開発し、解析時間、対費用効果、解析の自由度、作業の難易度の側面から評価した。これまで以上に遺伝学的解析が求められる現状において、開発した解析法は有用であることを示した。

### 1. 研究目的

本研究の目的は社会実装を目指した疾患原因遺伝子解析法を開発することである。目的達成のために具体的に、1) 遺伝学的解析における現状を調査分析し問題点を明らかにする、2) 遺伝学的解析の需要について臨床の立場から調査考察する、3) 効率よく確定診断に至るための技術を開発する、4) 対費用効果、解析の自由度に優れた解析プロトコルを開発する。なお、作業の難易度にも留意し、基本的な分子生物学的な技術を習得すれば精度、再現性よく解析できる解析方法の開発を目指す。

### 2. 研究組織

柳久美子 国立成育医療研究センター  
要 匡 国立成育医療研究センター  
守本倫子 国立成育医療研究センター  
福原康之 国立成育医療研究センター

### 3. 研究成果

1) 過去5年間に成育医療研究センター病院の各診療科から遺伝性希少疾患を疑う症例のうち、網羅的な遺伝学的解析された126症例につ

いて詳細に分析した。125症例で全エクソーム解析、1症例で標的遺伝子のみ全領域シーケンス解析がなされていた。検体を受け取ってから報告書返却までに要した期間は、最短で3カ月（標的遺伝子のみ解析）、中央値は10カ月、平均は15.2カ月であり、網羅的な遺伝学的解析には1年弱の期間を要することが明らかとなった。

47症例で疾患の原因となる遺伝子バリエーションが同定され（同定率37.3%）、このうち45症例は小児慢性特定疾患、指定難病に登録されている疾患であった。また、47症例のうち、7症例で原因遺伝子が重複して認められた。重複を除く40遺伝子について国内での解析受け入れ状況（受託検査）を調べると、検査としてDNA配列解析を行うことが可能な遺伝子はわずか16であった。

臨床情報から、候補遺伝子を十数個程度までに絞り込めた症例は21症例であり、そのうち11症例では臨床診断と遺伝学的解析により確定された遺伝子が一致した。この11

遺伝子の中で、受託検査可能であったものは5遺伝子に限られた。

以上のことから、確定診断目的にもかかわらず、解析可能な機関がないために網羅的遺伝学的解析に提出される症例が20%に登る現状が明らかになった。そのうちの半数では臨床診断と遺伝学的解析結果が一致しており、解析目的に応じた解析手法開発の必要性が示された。

2) 何らかの顎顔面奇形を伴い、難聴が認められる症例6例について遺伝学的解析を行い、得られた遺伝学的解析結果と臨床の対応について分析した。6症例のうち3症例について疾患の原因と考えられる遺伝子バリエントが同定された (EDNRA、CDC42、COL11A1)。EDNRA 遺伝子症例 (auricular dyscondylar症候群) では発症機序を含め、患者さんご家族へ具体的な説明をすることができた。さらに、患者さんご家族にご理解していただいたことで、その後の治療に対する積極性が増すという効果も認められた。CDC42 遺伝子症例 (takenouchi-kosaki 症候群)、COL11A1 遺伝子症例 (stickler 症候群2型) では、過去の症例報告から合併症や随伴症状が予測され、その後の十分な経過観察、治療予後改善つながった。残り3例は遺伝学的な素因が疑われたが、原因遺伝子の同定につながらず、現時点では解明に困難な症例であった。

顎顔面奇形を伴う難聴がある場合、何らかの原因遺伝子となるバリエントが検出される可能性は高い。まれに全身疾患を合併していることもあるため、遺伝学的解析を行う価値は非常に高く、遺伝学的解析の需要は今後一層増大すると考えられる。

3) 解析に意外と時間を要するのが検体処理のステップであることから、主要な検体である血液からの迅速 DNA 抽出法を開発した。本手法では塩化ナトリウムを主成分とする低浸透圧溶液と卓上遠心機程度の設備程度で血液試料の前処理作業が完結し、調製に

要する時間は数分程度であった。当該方法により前処理した資料から抽出した DNA は高品質で Long-PCR による増幅が可能であった。

次に1回の作業での解析範囲を増やすことを目的にマルチプレックス Long-PCR を開発した。増幅に用いるプライマー (増幅長はプライマーセットあたり 10-15 kb) をお互いに干渉しない位置に設定することで、市販の DNA ポリメラーゼを用いて 2-3 領域までを 1 チューブ内で増幅させることが可能であり、作業の効率化に繋げることができた。

4) これまでに 170 を超えるプライマーペアを作成した (約 40 遺伝子、プライマーあたりの平均増幅長は 11.2 Mb)。1回で解析可能なデータ量は 300Mb (最小)、1.2Gb、4.5Gb のいずれかの範囲で設定でき、かつ、作成したプライマーペアを自由に組み合わせることが可能である。今後、必要に応じて追加にしていくことも対応している。さらに、随意の Deep sequence を組み合わせると同時に解析することができるなど、自由度の高さは他解析方法に追随を許さない。

解析精度ではライブラリ中に含まれる分子のモル比を正確に算出すること、十分なシーケンス深度で情報を取得することで、サンガーシーケンスと同等以上の精度が得られるようになった (約 1% のモザイク頻度の検出も可能)。

ベンチトップ型次世代シーケンサーでの解析は取得可能なデータ量が多いため、最も効率よく行うためには一度により多くの検体を解析することが求められ、サンガーシーケンスに比較した場合、少数検体の場合は解析費用の面で不利とされる。そこで、開発した解析方法と通常サンガーシーケンスを、解析に必要なプライマーペアの数とシーケンスランにかかる試薬代から試算すると、おおむね、30 反応あたりを界に開発した解析プロトコルでの解析が優位になることが判明した。サンガーシーケンスでは 500~600 bp ごとにプライマー作製費が必然的に加算されるが、開発した Long-PCR によるライブラリ調製では、複数のエクソンを含む領域を 1 つのプライマーペアで増

幅可能なため、プライマー作製費が3分の1程度に抑えることができることに因るところが大きく、Long-PCRによる対費用効果が示された。シーケンスラン自体にかかる費用は、サンガーシーケンス受託解析の価格を参考にすると96サンプル1プレートでの解析では6万円程度、一方、ベンチトップ型次世代シーケンサーでのシーケンスラン試薬代は1解析約5.5万円である（最小取得データ量300Mbの場合）。以上を踏まえた解析単価（1PCR反応あたり）を考えると、プライマー設計費用、シーケンスラン試薬代ともにおおむね、30反応あたりを界にベンチトップ型次世代シーケンサーでの解析が優位になる。2~3遺伝子を解析すると、エクソン領域はおおむね30くらいに達するので、数個の遺伝子を解析したい場合はサンガーシーケンスに比較して、ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた開発プロトコルはむしろ経済的な解析法と考える。

解析所要時間はライブラリ調製からシーケンス解析まで最短2.5日、ハンズオンタイムは実質9時間程度であった。シーケンスデータ（Fastq）からマッピング、バリエーションコール等のファイル（vcf、bam、baiファイル）作出を自動化することで、ハンズオン解析時間のより一層の短縮化と作業の効率化が図られた。作業自体は分子生物学的実験の技術を有する研究補助員で問題なくこなせた。

本研究で社会実装に十分応用可能な疾患原因遺伝子解析法の技術的基盤を開発することができたと考える。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成20年12月改訂、文部科学省・厚生労働省・経済産業省）及び「臨床研究に関する倫理指針」（平成21年4月、厚生労働省）に沿って実施する