

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：29-6

課題名：新生児期に肝障害をきたす疾患の病因・病態解明と迅速ゲノム診断の確立

主任研究者 (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・部長 要 匡

(研究成果の要約) 本研究開発では、次の2つを目的とする。1) 新生児期より胆汁うっ滞または肝障害を来す疾患の迅速ゲノム診断システムの構築、2) 小児期胆汁うっ滞または肝障害を来す疾患の原因および分子病態解明、疾患概念の確立、である。次世代シーケンサを活用した網羅的ゲノム解析による原因解明が実施されているが、出力されるデータが大量であるため、その後のデータ解析等に時間を要し、迅速化が困難な状況となっている。そこで、新しいタイプの超高速解析装置 (field-programmable gate array; FPGA) に着目し、1. 新生児期に肝障害をきたす疾患の概要調査とともに、2. 肝障害遺伝子解析パネルの構築と比較、3. FPGA 超高速データ解析機器の活用、4. 血液検体からの迅速 DNA 抽出法の検討、5. 小児再発性肝障害の解析、6. NBAS 遺伝子解析、を実施することで、次世代シーケンサを活用した原因遺伝子変異解析を実践するとともに、遺伝子関連肝疾患をターゲットとした迅速ゲノム診断法の確立へ向け、研究開発を行った。結果、肝障害をきたし、肝移植が行われた遺伝子関連疾患においては、Allagille 症候群、糖原病、ミトコンドリア病に加え、原因不明の肝硬変などが含まれることが分かった。また、迅速診断においては、FPGA の処理速度は従来の処理速度に比べて圧倒的に早く、かつ精度も高く、本装置を活用した診断システムのプロトタイプが構築できた。

1. 研究目的

本研究開発では、次の2つを目標としている。1) 新生児期より胆汁うっ滞または肝障害を来す疾患の迅速ゲノム診断システムの構築、2) 小児期胆汁うっ滞または肝障害を来す疾患の原因および分子病態解明、疾患概念の確立、である。最終的に本研究により新生児期における肝障害に対する医療の向上を目指す。

胆汁うっ滞または肝障害を来す疾患には、早期の手術が良い適応となる疾患、手術により予後不良となる疾患、肝不全には至らない疾患などさまざまである。これらを臨床症状のみで早期に診断する事は困難な事も多い。しかしながら、特に手術に関しては、早期施行が望ましく、新生児期における迅速診断は、臨床的にも重要となる。

そもそも、診断に関して、肝障害を来す患児がどのような (診断困難を含め) 疾患分布を示すかは把握されておらず、臨床の場における症例の分布を調査することも重要である。

また、近年、遺伝子関連疾患に関して、

多種類の疾患を対象として、次世代シーケンサを活用した網羅的ゲノム解析による原因解明が実施されているが、新生児などで早期の診断に関しては、次世代シーケンサから出力されるデータが大量であるため、その後のデータ解析等に時間を要し、海外においても問題となっており対策が検討されている。

そこで、臨床での肝障害を呈する患児の状況を把握するとともに、新しいタイプの超高速解析装置 (field-programmable gate array; FPGA) に着目し、解決を図る。

1. 新生児期に肝障害をきたす疾患の概要調査
2. 肝障害遺伝子解析パネルの構築と比較
3. FPGA 超高速データ解析機器の活用による迅速診断システムの構築
4. 血液検体からの迅速 DNA 抽出法の検討
5. 小児再発性肝障害の解析
6. NBAS 遺伝子機能解析

以上を実施し、特に対象とする疾患ある

いは病態、次世代シーケンサを活用した原因遺伝子変異解析を実践するとともに、遺伝子関連肝疾患を対象例とした迅速ゲノム診断法の確立へ向け、研究開発を行う。

2. 研究組織

研究者	所属施設
要 匡	国立成育医療研究センター ゲノム医療研究部
笠原 群生	国立成育医療研究センター 臓器移植センター
義岡 孝子	国立成育医療研究センター 病理診断部
伊藤 玲子	国立成育医療研究センター 総合診療部

研究協力者

佐藤 万仁	国立成育医療研究センター ゲノム医療研究部
柳 久美子	国立成育医療研究センター ゲノム医療研究部
我那覇 章	宮崎大学医学部
阪本靖介	国立成育医療研究センター
福田晃也	国立成育医療研究センター
内田孟	国立成育医療研究センター
柳 佑介	国立成育医療研究センター
清水誠一	国立成育医療研究センター
武田昌寛	国立成育医療研究センター
谷川 健	公立八女総合病院病理診断科
松井 陽	聖路加国際病院

3. 研究成果

(1) 新生児期に肝障害をきたす疾患の概要

肝障害より肝移植となった症例に関して、国立成育医療研究センターにて、肝移植の適応疾患は胆汁鬱滞性肝疾患が 48.0%、代謝性肝疾患 22.0%、急性肝不全 12.6%、肝腫瘍 5.6%、再移植 2.8%であった。このうち 16 例で、併存する腎機能障害で生体腎移植を実施した。57 例で呼吸器合併症を認めた。

遺伝子関連疾患として、Alagille 症候群、メチルマロン酸血症、糖原病、高シュウ酸尿症、プロピオン酸血症、MPV-17 遺伝子関連ミトコンドリア病に加え、原因不明の肝硬変も含まれていた。原因不明疾患については、網羅的ゲノム解析を行っている。

また、移植対象とならなかった遺伝子関連疾患として、糖原病 (IX 型など)、NBAS 異常症などあり、また原因不明の肝障害も含まれていた。これら原因不明肝障害についても網羅的解析を行っている。

(2) 肝障害遺伝子解析パネルの構築と比較

HaloPlex 法での肝障害関連遺伝子 57 遺伝子パネルおよび、同 Agilent 社の SureSelect をベースとした whole exon capture kit (v6) 用での検出バリエーションの比較を行った。結果、97%でカバー領域が一致した。HaloPlex 法では、57 遺伝子領域に濃縮 (on target 率 約 70%) されるため全体のカバレッジを 300x と厚くできることが利点であった。また、1 検体当たりのコストが v6 に比較して低く抑えられた。

しかしながら、HaloPlex 法は、次世代シーケンス用ライブラリ作製において制限酵素処理過程があるため、バリエーション判定が困難な領域が存在した。早期遺伝子解析のスクリーニングとしては、コスト等適合すると思われるが、コストと病的バリエーションの検出率 (検出精度) からはトレードオフの関係にあり、網羅性の高い検出を考えれば Agilent 社の方が有利であると思われた。

ただ、網羅性のみを考慮すると全ゲノム解析が優れており、コストも急速に下がりつつある現状では、後述の (3) の結果である解読後のドライ解析の大幅な効率化からも将来的に全ゲノム解析への移行が避けられないと思われる。

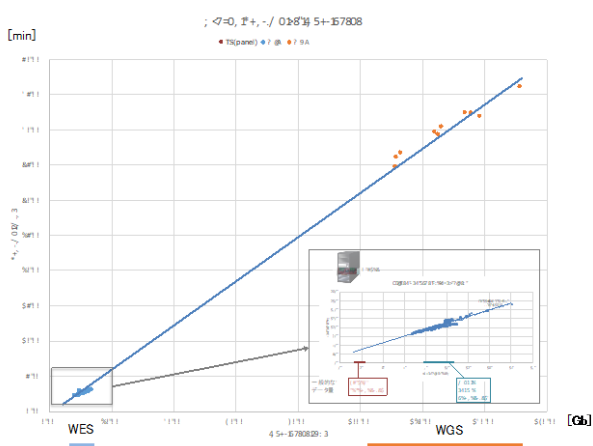
本年度の患児ゲノム解析にて、NBAS, CACT, 遺伝子の病的バリエーションを見出した。

(3) FPGA 超高速データ解析機器の活用による迅速診断システムの構築

FPGA 超高速データ解析機器を使用したマッピング所要時間について、パネル解析として HaloPlex データでのマッピング等の解析は、従来数時間であったのが 10 秒程度であることが何れの検体においても判明した。また、全エクソーム解析 (データ量 10Gb-15Gb) においては数分 (4-6 分)、全ゲノム解析 (100Gb-150Gb) においても 1 時間弱と迅速化に非常に有効であった。(図)

加えて、マッピング精度についても、本

システムは、バリエントコールにおいて、広く使用されている BWA, GATK 等とバージョンなど若干異なっていたが、コールされたバリエントの一致率は高く (98%以上)、バリエントのクオリティ、精度も高いことが判明した。さらに、indel の検出率も高く、NGS データの解析は、今後、FPGA 超高速データ解析機器が主流となりうると思われた。コストは一つの重要因子となるものの、(2) の結果と合わせて、今後の迅速診断のシステムとして、全ゲノム→FPGA 超高速データ解析→フィルタリング (3 次解析) →バリエント抽出という流れも選択肢となりうると思われた。



図：FPGA を活用した各種ゲノムデータのマッピング等処理時間

(4) 血液検体からの迅速 DNA 抽出法の検討

ろ紙血、微量血液よりカラム法、煮沸法、低浸透圧法による DNA 抽出について、PCR 増幅効率 (増幅の有無も含める) で検討した結果、いずれの手法においても、PCR 増幅が可能であった。低浸透圧法が最も簡便でかつ短時間で行えた。本手法では、数分で抽出が可能であり、迅速化が可能となった。本手法は PCR ベースの濃縮パネル、あるいは微量検体からの全ゲノムについて、活用可能で、これらの迅速化に有効と考えられた。

(5) 小児再発性肝障害の解析

NBAS 遺伝子全長解析が可能な long-PCR 濃縮系を用いて遺伝子全長解析を行った。エクソン領域のミスセンスバリエント、ナン

センスバリエントなどの検出に加え、イントロン領域のバリエント、欠失等の構造異常の検出も確認でき、ターゲットが絞られた遺伝子のバリエント検出の網羅性からは非常に高い結果となった。

再発性肝障害の解析により新規 NBAS バリエントを見出した。繰り返す肝障害の原因として一定の割合で NBAS 遺伝子異常が存在すると思える。

(6) NBAS 遺伝子機能解析

ゲノム解析で確認された NBAS 遺伝子の 2 種類の病的バリエントについて、変異導入マウスを用いて、症状解析を行った。変異ヘテロ接合マウスの明らかな外見的異常は、出生数が低い以外は認められず、長期においても、変化は認められなかった。

まとめ

新生児期に肝障害をきたす疾患については、肝移植の対象となるものは、胆汁うっ滞性疾患、先天代謝異常症が多く、また対象とならないものについても遺伝子関連疾患が多く、遺伝子解析は有効である。迅速診断に関して、本研究で得られた DNA 抽出、パネルシーケンス、FPGA を使用したデータ解析、フィルタリングを組み合わせることで、既知遺伝子バリエントであれば未診断状態 (診断不明状態) から 72 時間程度で検出が可能となるプロトタイプが構築される。今後は、迅速全ゲノム診断の確立について検討してゆくことが必要であり、本研究結果は重要な情報として活用できると思われる。

4. 研究内容の倫理面への配慮

研究等の対象となる個人の人権の擁護：検体の氏名は情報管理者のもと、匿名化したのちに管理される。本研究の結果を医学雑誌等に発表する場合、患者のプライバシー保護には十分な留意を行う。また同意による研究開始後も患者自らの意志により研究を中止することは可能であり、研究中止後も患者個人に対し一切の不利益を生じないように努める。

研究等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法：患者さんへの「説明書」を用いて説明を行い、書面にて同意を得ること

により統一された説明の施行と同意の承諾に努める。また保護者のみならず可能な限り患者本人にも説明を行い、ICH E-11 及びヘルシンキ宣言に則りインフォームドアセント(口頭又は文書)の取得も行う。おこりうる利益相反については十分に説明する。

本研究開発は、既知疾患でない場合、原因不明の疾患として解析も行うため、診断

不明の疾患に対する網羅的ゲノム解析に関する研究(承認番号:926)の一環として網羅的ゲノム解析に対する同意を得て行われる。

マウスを扱う実験に関しては、国際的倫理規範「3Rの原則」を遵守し、センター動物実験委員会の承認のもと行われる。