

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2019A-4

課題名：周産期精密医療のための体系的症例収集体制構築とクリニカルシーケンス・クリニカルメタゲノミクス基盤整備に関する研究

主任研究者（所属施設） 国立研究開発法人国立成育医療研究センター
（所属・職名 氏名）周産期病態研究部・部長 秦 健一郎

(研究成果の要約)

周産期の疾患を、センター病院と研究所が連携して体系的組織的に症例収集し、オミックス解析など多方面からのアプローチによる診断・管理を試みた。本年度は、初年度に続き、周産期の原因不明症例を体系的にリクルートし、生体試料や臨床情報を蓄積すると共に、通常の臨床検査では得られない高度なゲノム解析などの解析支援を行い、実際に、原因不明未診断症例の確定診断に成功した。

1. 研究目的

わが国では周産期領域の疾患を中心に体系的な生体試料収集を行っている施設はない。当センターはバイオバンクを併設しているため、個々の医師が疾患ごとに独自に症例収集と保管体制を構築するよりも、本計画のように連携して体系的に収集体制を構築することで、格段に低いコストで運用が可能である。またバイオバンクを利用することで、製薬企業等への分譲の際に要求される厳密な品質管理がなされ、個々の医師が収集するよりも高い付加価値を生む。海外では、孤発例、非症候性の胎児異常に共通の遺伝子異常を見出した報告もあり(N Engl J Med 2017)、本邦の周産期分野でも同様のアプローチが有用と考えられるが、そのためには体系的な臨床情報・生体試料収集体制が必要である。現時点で具体的に標的とする疾患は、胎児胸水、胎児水腫、その他の非症候性胎児異常、切迫早産、不妊・不育症等である。これらの疾患の原因遺伝子は未同定あるいは一部候補遺伝子が報告されている状況であるが、遺伝学的病態が解明されるには至っていない。また、産科異常における妊婦細菌叢の異常を解析するために必須の日本人正常妊婦細菌叢変化のデータベースは存在しない。そこで本研究計画では、周産期の包括的・体系的な生体試料と臨床情報の収集を行い、また、診療方針決定に資するクリニカルシーケンス・クリニカルメタゲノミクス基盤を整

備し、周産期精密医療の実現に向けた研究体制を構築する。非症候性・散発例の多い周産期の異常症例を、個々の疾患毎に収集保管体制あるいは解析体制を構築するのは非効率的である。当センターの特長を生かして貴重症例の収集体制を共同運用することで、効率化も期待される。

2. 研究組織

| 研究者 | 所属施設 |
|-------|--------------|
| 秦 健一郎 | 国立成育医療研究センター |
| 小澤 克典 | 国立成育医療研究センター |
| 鈴木 朋 | 国立成育医療研究センター |

3. 研究成果

本年度の研究は、周産期クリニカルシーケンス：初年度から継続的定期的、病院周産期センター全体と打ち合わせを行い、解析を行う症例の選定と、周産期関連疾患の同意取得と生体試料回収保管を連携して一括で請け負う体制を構築運用している。

シングルセルシーケンス：先行研究ですでに母体血中の胎児有核赤血球を濃縮する技術を確立しているが、同手法を発展的に展開し、分子バーコードによりゲノム断片の由来を区別する「疑似シングルセル全ゲノム解析」の開発を進めた。

系統的な症例資料収集の体制を本研究班で構築し、分担研究者らの選別した症例を中心に、本年度は27例の同意取得を行った。

下図は確定診断に至った一例である。

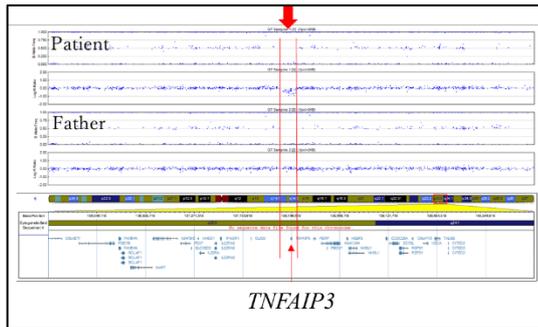


図1 乳児期からの超早期発症の炎症性腸疾患症例を両親とともにトリオ解析し、エクソーム解析結果から TNFAIP3 欠失を疑い、その後 SNP アレイを用いて構造多型解析による再検証を行った症例。TNFAIP3 遺伝子欠失による A20 ハプロ不全症と確定診断した (*Hum Genome Var.* 2021;8:1)。

また、モデル生物を用いて、環境因子暴露の影響がエピゲノム変化を引き起こし、エピゲノム変化によるゲノム機能班かが世代間で伝搬する現象、すなわち、「環境の影響が世代を超えて遺伝する現象」の一端を解明した (*Epigenetics Chromatin.* 2020;13:53. 図2, 3参照)。

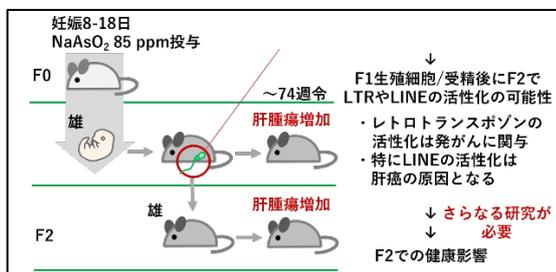


図2 胎仔期にヒ素曝露すると、出生仔の肝腫瘍発生が増加する。その次の世代でも、肝腫瘍発生が増加する。

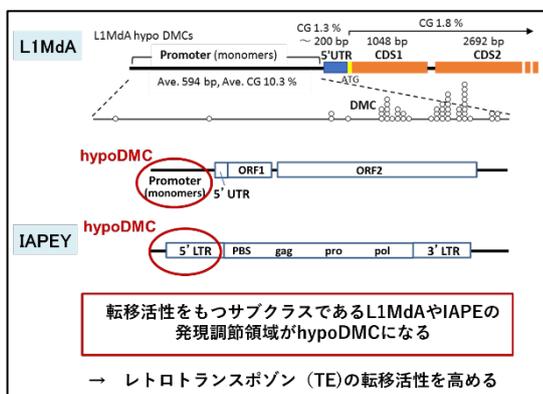


図3 胎仔期にヒ素曝露されたオスの精子

では、本来 DNA メチル化によって強固に抑制されているレトロトランスポゾンが低 DNA メチル化状態に変化し、転移活性が高まっているため、発がんしやすい状態になっていたと考えられた。

本研究計画では、これまで、Gバンド法などの細胞遺伝学的手技では病因同定に至らなかったような症例を、主に全エクソン配列解析によって検証している。図1に示した症例は、全エクソン配列解析では病的な変異（1塩基置換や100bp前後の欠失・挿入変異）は見つからなかったが、臨床像から推定される候補因子について詳しく検証することで、TNFAIP3の欠失を疑った。全エクソン配列解析では、本症例のような150bpを超える欠失があり、残った対立遺伝子が野生型（正常配列）である場合、ただちに異常として捉えることが困難である。本症例の場合、候補因子遺伝子の詳細を再検証したところ、TNFAIP3のリード数（次世代シーケンサーで得られたTNFAIP3遺伝子領域のシーケンスデータ量）が少ないことから、同領域のももとのDNA量が少ない、すなわち、ヘテロの欠失変異であることを疑った。さらにSNPアレイを用いて構造多型を解析し、全エクソン配列解析結果からの推定通り、TNFAIP3遺伝子領域が欠失していることを確認できた。現在、標準的な全エクソン配列解析では1~100bp程度の欠失/挿入が同定でき、SNPアレイ等では100kb~程度の欠失/挿入が同定できるが、その中間の数百bp~数十kb程度の欠失/挿入変異は見逃されやすい。数百bp~数十kbは、1個のエクソンや1個の遺伝子程度のサイズに相当し、単一遺伝子疾患の病因変異となりうる。今後、これらのサイズの効率的かつ安価なスクリーニング法の開発も重要であることが改めて浮き彫りとなった。分担小澤らは、胎児形態異常の原因解明と臨床予後予測因子の検討を行った。

2019年から当院で原発性胎児胸水と診断された症例を対象として、生理学的データと胎児と両親のゲノム情報、胎児治療を実施した妊娠週数、分娩週数、胎児皮下浮腫の有無、胎児治療前と胎児治療後1日目の総心拍出量 (CCO) と、胎盤循環を表す臍静脈血流量 (UVFV)、および肺のサイズ (LT

ratio、o/e LHR)、新生児生存・死亡、胎児死亡の有無を収集し、比較した。

その結果、登録された17例が登録され、胸腔穿刺後1日目に胎児死亡した1例を除いた16例では、TAS後1日目のCCOとUVFVはそれぞれ、 332 ± 105 ml/min/kg、 99 ± 60 ml/min/kgであり、やや増加した。心四腔断面における肺の面積は、右側o/e LHR $58 \pm 18\%$ 、左側o/e LHR $61 \pm 14\%$ 、両側肺面積と胸腔面積の比(L/T ratio)は $29.9 \pm 8.0\%$ と、肺のサイズはTAS前よりも若干増加していた(図4, 5)。また、遺伝子解析によって現在8例の遺伝子変異が同定され、RASopathyが3例、ムコ多糖VII型(Sly病)が2例含まれている。

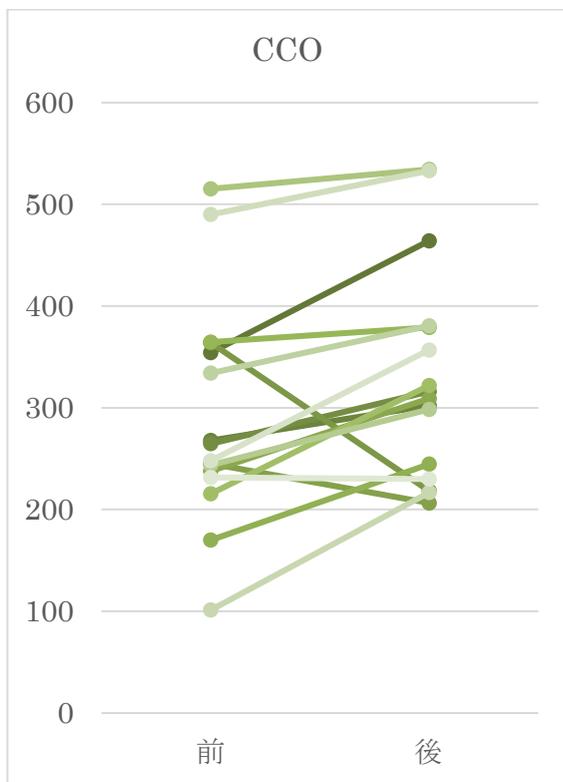


図4 胎児治療 (TAS) 前後の CCO

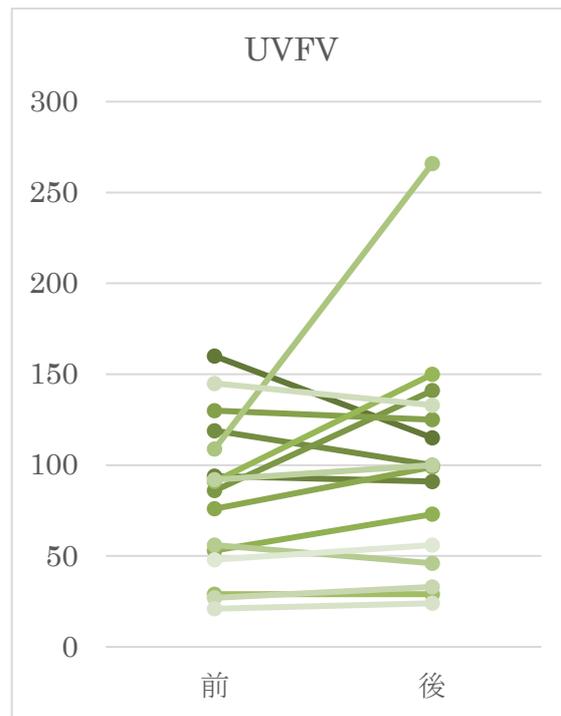


図5 胎児治療 (TAS) 前後の UVFV

今回の比較解析から、胎児治療 (TAS) によって胸水が減少することで、胎児の肺のサイズが増加する例が多いことが分かった。また全体として、心拍出量、および胎盤循環血液量はやや改善する可能性が示唆された。胎児水腫例のゲノム解析では、米国や英国の報告では RASopathy が 30~45%、ライソゾーム病などの代謝疾患が 10~15%見られている。日本ではまだ報告がなく、ぜひ本邦初の報告として遺伝子多型による疾患亜分類、自然史の解明、適切な管理方法の探索に向けて本研究を発展させたい。分担鈴木らは、子宮頸管長短縮例と炎症の関連及び、プロゲステロン膣錠による臨床試験を目指した pilot study を行った。具体的には、早産ハイリスク症例 (早産既往症例、子宮頸部手術後症例など) を管理する専門外来、頸管長短縮症状を認める産科外来受診者を早産ハイリスク症例、合併症のない産科外来受診妊婦をローリスク妊娠症例のリクルートを行い、それらの症例に対するプロゲステロン膣錠使用については保険未収載であるためメリットデメリットについて説明し、治療希望の意志について確認した上で投与した。その後の妊婦健診、産科的診療は、通常の診療に準じて行った。膣分泌物は、妊娠初期 (~妊娠 14 週)、中期 (妊娠 15-24 週)、中後期 (妊娠 25-33 週)、

後期（妊娠 34-37 週）、産褥（～産後 6 週）に専用キットに採取し、速やかに-80 度に冷凍保管した。2020 年 3 月末までに早産ハイリスク症例を 49 例リクルートし、28 例が分娩完了している。またローリスク症例は 2 例リクルートし、いずれもまだ妊娠管理中である。プロゲステロン膣錠は 2019 年から使用開始し、2020 年 3 月末までに 37 例に使用を行っており、31 例が分娩完了した。100 例程度をめどに検体が集まった時点で、膣内菌叢の構成について次世代シーケンサーを用いた 16sRNA メタ解析を行い、菌叢組成比を解析する。

4. 研究内容の倫理面への配慮

研究提案者は本研究遂行に必要な倫理手続きを終了しており（倫理委員会承認番号 234, 406, 625, 630, 1816）、関連指針を順守して解析を進めている