

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2020B-17

課題名：先天性疾患のクリニカルシーケンス社会実装化

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) 分子内分泌研究部研究員 松原圭子

(研究成果の要約) 「クリニカルシーケンス (CS)」とは、次世代シーケンス技術 (NGS) を用いて患者の持つゲノム情報や疾患関連遺伝子を網羅的に解析し、検出されたゲノム配列の変化 (バリエント) の結果に臨床的な意味づけを行い、診断や治療法選択の一助とする検査法である。本研究では、先天性疾患における CS の社会実装化と精度向上を目的とし、CS における検査後プロセスから最終結果報告書作成までの過程の一部を自動化することで、先天性疾患の特徴を踏まえた CS を迅速かつ円滑に進めることのできるシステムの確立を目指す。2020 年度は (1). NGS データの取得、(2). データシェアリングシステム基盤の実装、(3). 解析報告書作成過程における自動化プログラム作成

(イ)解析報告書作成に必要な参照ファイルの作成 (各疾患の関連遺伝子群や遺伝形式リスト、結果報告書定型文テンプレート)、(ロ)疾患関連バリエント抽出と結果報告書作成過程における自動化プログラム作成、を行った。

1. 研究目的

「クリニカルシーケンス (CS)」とは、次世代シーケンス技術 (NGS) を用いて患者の持つゲノム情報や疾患関連遺伝子を網羅的に解析し、検出されたゲノム配列の変化 (バリエント) の結果に臨床的な意味づけを行い、診断や治療法選択の一助とする検査法である。先天性疾患患者の診療においても、ゲノム情報は診断や適切な治療法選択のみならず遺伝カウンセリングの観点でも有用であるため、先天性疾患を対象とした CS の普及が望まれる。先天性疾患はその遺伝形式が多様である (常染色体優性遺伝病、常染色体劣性遺伝病、X 連鎖性疾患、oligogenic disorder) ため、生殖細胞系列バリエントの病的意義の判断が困難である場合がある。本研究では、先天性疾患における CS の社会実装化と精度向上を目的とし、CS における検査後プロセスから最終結果報告書作成までの過程の一部を自動

化することで、先天性疾患の特徴を踏まえた CS を迅速かつ円滑に進めることのできるシステムの確立を目指す。

この目的を達成するために、当該年度で下記項目につき研究開発を行った。

(1). NGS データの取得

(2). データシェアリングシステム基盤の実装

(3). 解析報告書作成過程における自動化プログラム作成

(イ)解析報告書作成に必要な参照ファイルの作成 (各疾患の関連遺伝子群や遺伝形式リスト、結果報告書定型文テンプレート)

(ロ)疾患関連バリエント抽出と結果報告書作成過程における自動化プログラム作成

2. 研究組織

主任研究者

松原圭子

国立成育医療研究センター

分子内分泌研究部

分担研究者

岡村浩司

国立成育医療研究センター

システム発生・再生医学研究部

研究所組織工学研究室

3. 研究成果

(1). NGS データの取得

分子内分泌研究部で集積した先天性疾患の臨床検体 41 症例（成長障害 16 症例、性成熟異常症 10 症例、下垂体機能障害 4 症例、性分化異常症 8 症例、糖代謝異常症 3 症例）を対象として NGS パネル解析（8 疾患）を行った。ライブラリ作成とシークエンスデータの取得は、分子内分泌研究部および公益法人かずさ衛生検査所（かずさ DNA 研究所）で実施した。得られた NGS データに対し、分担研究者の管理運用する解析アルゴリズムを用いてバリエーションを抽出した。個々のバリエーションに対し、既報の確認、日本人一般集団におけるアレル頻度情報やタンパク機能予測結果に基づき、臨床的な意義づけを行えるよう「遺伝学的結果解釈フロー」を作成した。さらに臨床的意義に応じた報告書テンプレートを作成した。

得られた全てのバリエーションに対し、全症例において、「遺伝学的結果解釈フロー」に基づく臨床的意義づけを行った。さらに、臨床的意義に応じた適切な報告書文面テンプレートを用いて、各々の症例に対する報告書（word 形式）を作成した（図 1）。

図 1 遺伝子解析結果報告書例

遺伝子解析結果報告書

施設名: [REDACTED]
依頼医師: [REDACTED]
ご依頼いただきました下記患者様の遺伝子解析の結果を報告申し上げます。
貴院の検体番号(当施設における検体管理番号): [REDACTED]
検体到着日時: 2021/1/28
臨床診断: 肥満
解析方法: 次世代DNA研究所で、下記の遺伝子の翻訳領域を次世代シーケンシングパネルを用いて解析しました。
解析遺伝子:
ACAN, FGFR3, GH1, GHR, GHRHR, GHSR, IGF1, IGF1R, IGFALS, JAK2, NFR2, SHOX, STAT3B, ODNK1G, GNAS, IGF2
[なお、GH1 と ACAN exon 12 にはシークエンスしにくい部分があり、今回の解析では一部詳細できていない可能性があります。]
解析結果のまとめ:
解析対象の遺伝子の翻訳領域には、明らかに疾患に関与すると推測される変異は同定されませんでした。
解析結果の詳細:
IGFALS遺伝子にヘテロ接合性シノヌスバリエーション c.801Q>A (p.Ala267?) が検出されました。
このバリエーションは、dbSNPにrs3582885として登録されており、頻度は、ExAc_EAST 0.0573、ToMMo_8.3k 0.0448、gnomAD_EAST 0.0277884 であり、日本人におけるコモンバリエーションであると考えられます。
また、dbSNPにrs18969と登録されていることより、このバリエーションが疾患発症に関与する可能性は低いと考えられます。
また、SHOX遺伝子にc.670Q>C (p.Ala224Pro) が疑われましたが、データクオリティが低く、シーケンシングの可能性が高いです。
備考:
以上ご報告申し上げます。
次世代シーケンサーの変異検出率は100%ではないため、変異見落としの可能性もございます。また、タムコムに一部の詳細は行っていません。この結果を、診療以外の用途にお使いになる時はあらかじめご留意いただければ幸いです。
この解析は研究として行ったものであり、臨床検査の要件を満たしていませんので、結果の取り扱いにご配慮をお願いします。ご不明の点がありましたらお知らせください。
【用語】ExAc_EAST, gnomAD_EAST, ExAc および gnomAD に登録されている東アジア人の頻度情報
ToMMo_8.3k: 東北メディカル・メガバンク機構による全ゲノムリファレンスパネル (8.3k.jpN) に基づく頻度情報
HGMD: The Human Gene Mutation Database

(2). データシェアリングシステム基盤の実装

今までに分子内分泌研究部内で実施された約 200 名分の疾患パネル解析データ、whole exome シークエンスデータ (WES) などの raw data を、解析日時、ライブラリ名、シークエンス方法などの情報とともに一元的に保存するためのデータサーバを設置した。必要に応じ、本業務に関与する共同研究者がデータアクセスできるようなデータシェアシステム基盤を実装した（図 2）。

図 2 データベースサーバ外観



(3). 解析報告書作成過程における自動化プログラム作成

(イ)解析報告書作成に必要な参照ファイルの作成（各疾患の関連遺伝子群や遺伝形式リスト、結果報告書定型文テンプレート）
現在までに実施した約 200 例（2019 年度以前に実施されたシーケンスデータを含む）の疾患解析パネル解析結果を詳細に分析し、結果報告書作成のパターン解析を行う。その上で、疾患に関連する遺伝子群リスト、対象疾患の遺伝形式、および病原性の有無が明らかである既知の配列変化などの情報を含むファイル、結果報告書の雛形となる定型文リストを作成し、自動化プログラムで使用する参照ファイルを作成した。

(ロ)疾患関連バリエント抽出と結果報告書作成過程における自動化プログラム作成

当該年度においては、CS 実務担当者とともに

シーケンスデータの解析アルゴリズム、バリエント評価方法および病的意義判定の基準、報告書フォーマットの再評価を行い、下記のごとくプログラム作成の骨子を作成、マニュアルを作成した。

a. シーケンスデータの解析アルゴリズム

シーケンスデータ（fastq または bam 形式）に対し、すでに開発済みの in house の解析アルゴリズムを用いて vcf ファイルを作成し、アノテーション情報が付加されたバリエントを抽出する。

b. バリエント評価方法および病的意義判定の基準

ClinVar の登録の有無、一般集団における頻度（IRUD などの in house データ、ToMMo データ）、タンパク立体構造変化予測（Polyphen, SIFT）、過去の報告の有無（PubMed）などを検討し、バリエントを①解析対象遺伝子の翻訳領域には疾患に関与しうるバリエントは同定されなか

った、②疾患関連遺伝子に病的意義不明なバリエントが検出された、③疾患関連遺伝子に原因と考えられるバリエントが検出された、の 3 パターンに分類する。また、通常の遺伝子パネル解析のみではその病原性が判定しかねるバリエントに対し、必要に応じて DNA メチル化解析やアレイ CGH など他の方法による遺伝子解析を行う。

c. 報告書フォーマット

今までに作成した主治医などへの報告書を再評価し、現時点での実用に耐えうる報告書テンプレートを作成した。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究は、国立成育医療研究センター倫理審査委員会で承認されている各課題に基づき実施された解析結果をもとに実施されている。遺伝子解析はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守して実施する。同意は全て患者本人もしくは両親から書面で取得され、同意書および患者と匿名化番号の対応表は、個人情報管理者により厳重に保管されている。この規定の遵守については、毎年、外部委員の監査を受けている。患者データは疫学研究に関する倫理指針、独立行政法人等個人情報保護法を遵守して管理する。

<当センター倫理審査委員会において承認された研究課題>

- 1). 性分化疾患・性成熟疾患・生殖機能障害における遺伝的原因の探索（受付番号 512、平成 23 年 9 月 23 日承認）
- 2). 成長障害における遺伝的要因の探索（受付番号 519、平成 23 年 12 月 8 日承認）
- 3). 先天奇形症候群における遺伝的要因の探索（受付番号 518、平成 23 年 12 月 8 日承認）
- 4). 小児期発症 1 型糖尿病における遺伝的素因の探索（受付番号 564、平成 24 年 3

月 30 日承認)

5). SHOX 異常症の病態解明 (受付番号 1768、平成 30 年 3 月 19 日承認)

6). 『先天代謝異常症患者登録システム』の確立と推進に関する研究(受付番号 569、平成 24 年 5 月 8 日承認)

7). 『先天奇形症候群患者登録システム』の確立と推進に関する研究(受付番号 622、平成 24 年 11 月 6 日承認)

8). 『先天代謝異常症患者登録システム (JaSMIn)』の確立と推進に関する研究(受付番号 : 569、平成 24 年 5 月 8 日承認)

9). 『先天代謝異常症臨床情報バンク (MC-Bank)』の確立と推進に関する研究(受付番号 : 619、平成 24 年 11 月 6 日承認)

10). 『小児内分泌疾患患者登録システム』の確立と推進に関する研究(受付番号 637、平成 24 年 11 月 14 日承認)