

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2020C-11

課題名：罹患児を有する健常両親の性線モザイク頻度解明を目指した大規模解析と遺伝カウンセリングに資する新たな解析フローの提案

主任研究者 国立成育医療研究センター  
ゲノム医療研究部・研究員 柳 久美子

(研究成果の要約) 遺伝性疾患罹患児の健常両親における性線モザイクの推定は、遺伝カウンセリングにとって解決すべき問題のひとつである。これまでは、罹患次子が罹患第一子と同じバリエントを有する場合に両親の性腺モザイクを疑い、解析が行われることがほとんどであった。また、罹患次子を持たなかった場合には解析の俎上にも上がらないため実態は不明である。このような理由から、遺伝カウンセリングでは経験に基づく一般的な説明に頼らざるをえないのが現状である。本研究では、両親の性線モザイク検出精度に重要な low level variant 検出法の技術的な問題点に対して改良を加え、*de novo* と考えられた遺伝性疾患症例の両親 (160 家系) を対象に解析を行い、その有用性を検討した。その結果、5 家系で両親いずれかの末梢血 genomic DNA 中に、罹患児に同定された病的アリルを検出した (モザイク率 0.8~31.8%)。さらに改良 low level variant 検出法を用いて体細胞モザイク検出や X chromosome inactivation の解析を試み、臨床診断につなげることができた。改良法は、孤発症例両親の性腺モザイク検出のみならず、極低頻度の体細胞モザイク検出や X chromosome inactivation 解析などにも有用な手段であることが示され、遺伝カウンセリングのさまざまな状況に科学的な根拠に基づく情報を提供すると期待される。

### 1. 研究目的

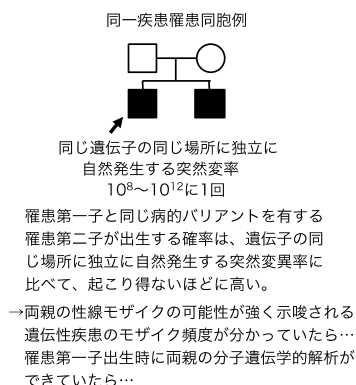
健常両親に遺伝性疾患罹患児が生まれた場合、親を含めて先祖に罹患者がいない時の次子の再発率は「極めて 0 に近くなるが、極稀に健常両親に性腺モザイクが存在するため完全に 0 とはいえない」という、きわめて曖昧な説明がなされる。検出技術の煩雑さなどから、罹患発端者と同一の病的バリエントを有する罹患次子が出生した場合以外で、両親の性腺モザイクの可能性を検討することがほとんどなく、情報が乏しいことが理由のひとつにあげられる。もし、罹患発端者の病的バリエントが同定された時点で両親の性線モザイクが推定されれば、遺伝カウンセリングの内容はより具体的になってくる (図 1)。

しかし両親の性腺モザイク推定には克服しなければならない課題が複数ある。1) 病的バリエントが同定されている必要があること、2) 解析が煩雑であること、3) ヒトでは性腺モザイクを直接検出することは事実上不可能であるため、採取可能な体細胞で感度良く Low-level variant を検出する

必要があること、などである。

本研究の目的は low-level variant 検出系を改良し、孤発例であっても両親の性腺モザイクを推定しうる解析フローを開発することで、遺伝性疾患罹患児を有するご家族の遺伝カウンセリングに科学的な根拠に基づく情報を提供できるようにすることである。成育医療における遺伝医療の向上を目指し、網羅的な遺伝学的解析後にシームレスに解析できるようなワークフローを提供することが目標である。

図1両親の性腺モザイクを疑う家系図の例



## 2. 研究組織

主任研究者

柳久美子 国立成育医療研究センター

研究協力者

要 匡 国立成育医療研究センター

小俣牧子 国立成育医療研究センター

小林奈々 国立成育医療研究センター

## 3. 研究成果

### (1) low-level variant 検出法の改良と解析フローの構築

low-level variant の検出には一般的に使用されている MiSeq (Illumina) を用いるが、MiSeq による検出では、シーケンス原理に基づく解析範囲の制限があった。そこで、ライブラリ調製の過程に制限酵素による消化を症例に応じて加えることで、解析範囲に関する制約の大幅な緩和をはかった。検出感度はこれまで 1% 程度であったが、ライブラリ調製および検出アルゴリズムの両面から見直した結果 0.7% までに改善することに成功した。

弊部では臨床的に診断がつかなかった症例について網羅的な遺伝学的解析を行い、臨床に解析結果を返却する支援活動を継続している。解析症例は年間 200 症例以上に及ぶ。そのうち全エクソーム解析で *de novo* と判断される症例は約 25% (50 症例) である。これらの症例で両親の性腺モザイクの可能性について解析を行うとすると年間 100 検体程度を調べることになるため、精度を担保しつつ、簡便に安価に解析する系の実装化が求められる。そこで、現行の解析プロトコールから派生させる形での解析フローを構築するとともにドライ解析過程の自動化をはかった。

### (2) 疾患に関与する両親の性腺モザイクの推定

疾患に関与する両親の性腺モザイクについて、これまでは罹患次子出生という症例に限って解析されていることがほとんど

であり、解析母集団に偏りがあることが前提となっている。本研究では *de novo* と考えられた 116 家系の両親、230 検体を対象に、改良 low-level variant 検出法を用いて解析を行い、5 家系で low-level variant 検出した (業績 2)。一般的な遺伝性希少疾患集団における両親の性腺モザイクの関与は約 4% であった。

### (3) 改良 low-level variant 検出法の応用

体細胞変異が原因となる単一遺伝子疾患には病的アレルの出現頻度が低頻度であるものが多い。そこで体細胞変異が疑われる症例について解析を試みたところ、Proteus syndrome、Sturge-Weber syndrom、Darier disease、Darie disease の遺伝学的診断につなげることができた (モザイク率 0.8~31.8%)。

女性では X 染色体上の遺伝子発現は X chromosome inactivation の影響を受けるため、網羅的な遺伝学的解析により絞り込まれたゲノムバリエントの病的意義の解釈は難しい。このような症例について、RT-PCR と改良 low-level variant 検出法を組み合わせることで発現アレルを半定量的に解析し、病的バリエントの同定に結びつけることができた (業績 1)。

## 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、人を対象とする医学研究に関する倫理指針、日本人類遺伝学会より提言されている『遺伝学的検査に関するガイドライン』に則って遂行した。成育医療研究センター内の倫理審査委員会で申請研究の倫理審査の承認 (『原因不明遺伝子関連疾患の全国横断的症例収集・バンキングと網羅的解析』、承認番号 926) を得ている。倫理講習会を受講し、人権保護、法令遵守についての理解し、本人、家族の同意については十分な説明にこころがけた。