

総 括 研 究 報 告 書

課題番号：27-14

課題名：次世代シーケンサーを用いた小児遺伝性疾患の診断システムの開発

主任研究者名 小崎 里華

国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 遺伝診療科 医長

(研究成果の要約)

多くの成育疾患が単一遺伝子の変異によって発症し、診断のための客観的な基準として遺伝子診断が極めて有用である。しかし、わが国には遺伝子診断を安定的に提供可能な施設は殆どない。本研究では、1) 院内各科の遺伝子診断の要請に速やかに対応可能な網羅的遺伝子診断体制を確立し、2) さらに全国に普及するためのプロトタイプを呈示し、疾患エクソーム解析の臨床的有用性を評価した。本年度は初年度から引き続き、患者をリクルートし、疾患エクソーム解析を計 393 名において実施した。遺伝子変異が同定された者は 192 名で、陽性率は 51.8%であった。全エクソーム解析と同等以上の診断率は、疾患エクソームの有用性の意義を示すことができた。確定診断できたことによる治療指針、長期フォロー体制確立、患者家族の疾患受容にとって臨床的意義は大きい。小児慢性疾患・特定難病対象は約 57%であり、医療行政に貢献できる可能性を示すことが出来た。変異陰性例については、症例を選び、全エクソーム解析を実施し、あらたに遺伝子変異を同定した。解析にあたり、解析パイプライン構築を改良し、診断率のさらなる向上に繋げた。

計画通り、疾患エクソーム解析において、表現型を加味した解析パイプラインの構築を進め、高い診断率を上げ、臨床的有用性を示すことができた。

1. 研究目的

成育疾患のうち「難病・稀少疾病」に分類される多くの疾患が単一遺伝子の変異によって発症している。これらの疾患の診断のための客観的な基準として遺伝子診断が極めて有用である。しかし、わが国では遺伝性疾患の遺伝子診断を臨床検査として安定的に提供可能な施設は殆どないのが現状である。この状況をふまえると、幅広い疾患に対して遺伝子診断を実施しうる体制を提案・実装することは、当センターの担うべき使命である。さらには当センターが国内の他の小児専門医療機関の遺伝子診断を支援する体制を準備することも必要である。これらの使命を果たすため、本研究では、① 院内各科からの遺伝子診断の要請に速やかな対応を可能とする網羅的な遺伝子診断

体制を実装し、② 網羅的遺伝子診断の全国普及のためのプロトタイプを呈示することを目的とし、疾患エクソーム解析・全エクソーム解析の臨床的有用性を評価する。

2. 研究組織

小崎 里華

国立成育医療研究センター 遺伝診療科

久保田 雅也

国立成育医療研究センター 神経内科

要 匡

国立成育医療研究センター 研究所

ゲノム医療研究部

小崎 健次郎

慶應義塾大学医学部 臨床遺伝学センター

3. 研究成果

(1) 患者のリクルート状況

院内からの遺伝性疾患患者のリクルートは、研究開始から2018年3月31日までで約393名である。初年度より目標にしていた症例数(100名)を満了し、順調にリクルートは進んだ。受検者数の年齢分布においては、0-5才代が1/2(47.5%)、0-10才までで75.1%を占めた(表1)。男女比は、3:2で、男児(性)が多かった。より、乳幼児期における、早期での検査希望や診断確定の需要が多いことが推察される。

(2) 診断率

現在(2018年3月31日時点)、疾患エクソーム解析を実施し、解析終了した患者は370名(94.1%)である。遺伝子変異が同定された者は192名、陽性率は51.8%であった。同定した変異について、主治医向け報告書を順次取りまとめた。

本研究において実施された疾患エクソーム法は、ヒト疾患原因遺伝子約5,000のみを対象としている。全エクソーム解析はヒト全25,000遺伝子のタンパク翻訳領域を対象としているのに対し、解析対象を臨床的意義に限定しているのが特徴である(図1)。本研究における疾患エクソーム解析陽性率は、従来の全エクソーム変異陽性率(30-40%)より、有意に高いことは、特筆すべきことである。当センター専門診療科医による卓越した臨床診断の高さを反映していると考えられ、確定診断により、①全症例において、自然歴の予測、次世代の罹患確率の予測が可能、②臨床診断の変更とそれに伴う治療方針の変更、③侵襲的検査(筋生検、外科的手術)の回避、④腫瘍などの合併症のサーベイランスの開始が可能となる症例を認めた(表2)。これらは、長期フォロー体制の確立、患者家族の疾患受容、遺伝カウンセリングにおいて臨床的意義は大きい。疾患エクソーム法は、臨床に適したプラットフォームと考えられる。

確定診断された疾患の分布は極めて多様であった(表3)。

同定した疾患遺伝子数は118遺伝子であり、遺伝子変異の種類は、ナンセンス、ミスセンス、欠失、重複、スプライシング変異を認めた(図2)

遺伝様式は、常染色体優性遺伝様式

(AD)が2/3を占めた(表4)。

このような臨床現場のニーズに応えるためには、特定の疾患群に偏ることなく、対応が可能な診断システムを準備することの重要性が示唆され、疾患エクソーム法は、スクリーニングとして、優れた方法であることが示された。本研究の研究分担者 久保田の専門とする小児神経学の領域で、疾患エクソームの有用性が特に高い。変異陰性例については、症例を選択しながら、全エクソーム解析を実施した結果、あらたに遺伝子変異を同定できた。

小児慢性疾患・特定難病対象は陽性例192症例中110症例(57%)であり、医療行政に貢献できる可能性を示すことが出来た。

当初、費用対効果においては、従来法と比較し、疾患エクソーム法でのコストの総計は、1/2-3程度に抑えられることが示された。本解析は、小児科領域における遺伝子診断への臨床応用にむけた切り札となると考える。ただし、近年、全エクソームの受託価格が低下している。疾患エクソーム解析の長所は、ヒト疾患特異的、データ量の少なさ、短期間の解析日数である。今後は、目的・用途により、両者の使い分けが必要となるであろう。

(3) 解析

①多型頻度検索 次世代シーケンサー解析データの解釈や確認・検証に必要な集団での遺伝子多型頻度を簡便に算出するシステムを開発した。公共の多型データベース(dbSNP等)に登録されていないバリエーションの集団中の頻度情報を得るため、地域集団pooled DNAを用いた多型頻度検索が行える系を構築し、遺伝子多型頻度を算出するシステムを開発した。

②遺伝子変異の傾向に基づく、効率の良い確認・検証システムの構築 NGS(ターゲットリシーケンス解析を含む)解析により検出されたバリエーションにおいて、Sangerシーケンス解析による検証、HRM法による特定のバリエーション検証を実施し、有効性が示された。今後も一定の精度を満たす場合、正確性の担保が示唆された。NGS解析後の解釈や検証のため、今後もNGS解析ならびに簡便かつ効果的な多型検出・頻度検索法の開発は重要である

(4) 解析パイプラインの構築・改良

GATKのペストプラクティスに沿った次

世代シーケンサーのパイプラインを計画通りに構築した。

本プロジェクトでは、バリエーションをリストアップするための標準的なファイルフォーマットである VCF ファイルに対して、各種の追加計算処理を行い、点変異以外の情報が得られるように解析パイプラインの拡張と最適化を行った。

①ネアンデルタール人・デニソバ人ゲノムなど、人類進化に関するデータの臨床応用

②HPO により構造化された臨床情報をゲノムデータの解釈に用いるためのソフトウェア Exomiser の実装。多数の変異（バリエーション）について優先順序を加味して評価を行うことが可能となった。

③体細胞モザイクの検出方法の実装した。Homozygosity を検出する方法を応用し、ホモ接合体が連続する部分を統計的に検出し領域ファイル (bed ファイル) として出力させた。

④NGS データからの微細欠失の検出の方法を実装。染色体コピー数の計数に使用するアルゴリズムを応用した。

⑤片親性ダイソミーの検出 uniparental heterodisomy・isodysomy を系統的に検出することが可能となった。その結果、網羅的遺伝子解析のプロセスに、患者の表現型・症状を反映させることができた。

本研究は小児における先天性の遺伝性疾患における疾患エクソームの有用性について評価を行った。当初の計画通り、患者をリクルートし、表現型を加味した解析パイプラインの構築を進め、高い診断率を上げ、臨床的有用性を評価することが出来た。確定診断できたことによる治療指針、長期フォロー体制確立、患者家族の疾患受容にとって臨床的意義は大きい。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究ではヒト由来細胞を用いた研究を予定していることから、ヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理指針をはじめとした関連する法令・指針を遵守し、各研究者が倫理審査委員会の審査を受け、施設の長

の承認を得て研究を遂行した。また、臨床検体については、患者らから検体提供を受ける際には、患者ならびにその保護者に対し当該研究の意義を含め十分な説明を行ったうえでインフォームドコンセントを得た。さらに偶発的所見（セカンダリーファインディング）などの必要に応じ、遺伝カウンセリングによる適切な支援を提供する等、被験者に対する倫理的配慮を行った。

過去に承認された関連研究課題に加え、本研究実施につき、センター倫理審査委員会において承認をいただいた。

「アレイ CGH 法を用いた発達遅滞患者における微細な染色体構造異常の同定」(受付番号 361)

「先天奇形症候群における遺伝的要因の探索」(受付番号 518)

「染色体または遺伝子に変化を伴う疾患群の包括的遺伝子診断システムの構築」(受付番号: 970)

図 1

疾患エクソーム (Medical exome)

既知ヒト疾患原因遺伝子の網羅的解析を疾患エクソームと称し、臨床応用が海外小児病院等で進展。



表 1 年齢分布

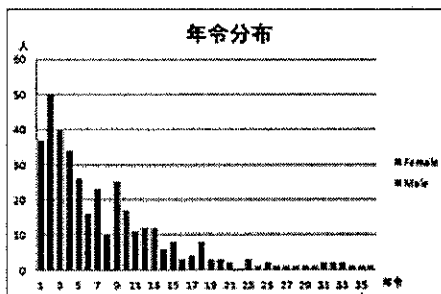


表2 遺伝子診断の有用性(症例一部 提示)

- ①全症例において、自然歴の予測、次世代の罹患確率の予測が可能
- ②臨床診断の変更とそれに伴う治療方針の変更
 Calori 病疑い→STING synd (*TMEM173*)
 慢性肺疾患・脳梗塞→多系統平滑筋機能不全 (*ACTA2*)
 NF-1, 大腸ポリープ→Turcot synd (*MSH2*)
 Metachondromatosis→ Hereditary multiple exostoses 等
- ③侵襲的検査(筋生検、外科的手術)の回避
 進行性骨化性線維異形成症→ 外傷・医療的介入、筋注の回避
 先天性筋ジストロフィー、新生児肝内胆汁うっ滞症→肝生検回避 等
- ④腫瘍などの合併症のサーベイランス
 Tatton-Brown-Rahman synd, Jourbert synd, Peutz-Jegers synd, Ehlers - Danlos synd , 家族性腫瘍、Rothmund-Thomson 症候群, CFC/Costello synd, PTEN 過誤種、もやもや病、悪性高熱 等

表3 Medical Exome 陽性症例 疾患分類

疾患分類	陽性症例数	陽性率 (%)
Congenital anomalies/dysmorphic features	141	60.2
Neurometabolic disorders	148	41.8
Skeletal dysplasia, Connective tissue disorder	33	72.7
Gastrointestinal, hepatic	17	11.7
Hereditary tumor	6	66.6
Skin disease	11	54.5
Vascular disease	8	62.5
Renal disease	5	60
Immune disease	1	100

図2 遺伝子変異の種類

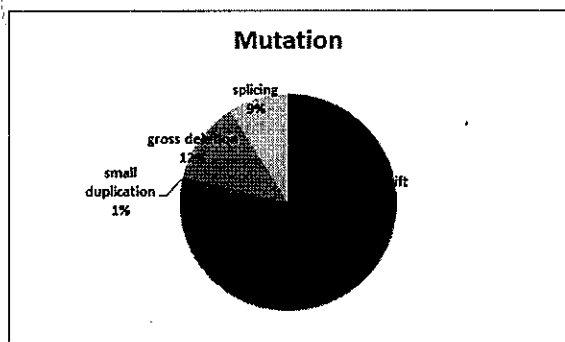


表4 遺伝様式

遺伝様式	陽性症例数	陽性率 (%)
AD	134	69.70%
AR	37	19.2%
XL	21	10.9%