

## 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

主任研究者名 国立成育医療研究センター  
ゲノム医療部・部長  
要 匡

(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) に着目しつつ、1) 新生児、小児における胆汁うっ滞または肝障害をきたす患児の検体および臨床情報の収集、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し、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。

## 1. 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。

近年、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、新生児などで早期での診断に関しては、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するため、海外においても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、解決を図る。

また、FPGA 活用とともに以下の項目を実施する。

1. 新生児、小児における胆汁うっ滞または肝障害をきたす患児の検体および臨床情報の収集
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

これらにより、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	臓器移植センター
伊藤玲子	総合診療部
義岡孝子	病理診断部

研究協力者 所属施設  
柳久美子 国立成育医療研究センター  
磯まなみ ゲノム医療研究部  
坂本秀樹 ゲノム医療研究部

松井 陽 聖路加国際病院  
我那覇章 宮崎大学耳鼻科

### 3. 研究成果

(1) 新生児、小児における胆汁うっ滞または肝障害をきたす患児の検体および臨床情報の収集

国立成育医療研究センターでは H17 年 10 月から肝移植医療を開始し、H28 年 12 月末まで 443 例に様々な肝移植医療を提供してきた。H28 年度小児肝移植症例数は 60 例で、本邦小児肝移植症例約 100 例を鑑みると、60%が当センターで肝移植医療を受けていることになる。年間小児生体肝移植症例数は世界最多であり、移植後生存率 92%と全国平均を上回り、世界的な小児移植施設として認知されている。また H22 年度小児脳死肝移植施設、H23 年度小腸移植施設認定を受け、小児脳死肝移植・小児脳死分割肝移植においても国内最多症例を有するに至った。H25 年にヒト肝細胞移植、H26 年生体間ドミノ移植を世界で初めて成功裏に実施し、国際的な評価を得た。

H29 年度の肝移植症例は 52 例でそのうち胆道閉鎖症を含む胆汁鬱滞性肝疾患は 21 例で移植後の生存率は 100%であった。

肝障害、胆汁鬱滞、肝不全という症状を呈し、診断がつかない疾患、症例は数多くあり、

病理学的検討については、新規に解析した症例は以下の通りであった。

新生児期に肝障害を来す疾患として、ミトコンドリア呼吸鎖異常症やミトコンドリア枯渇症候群があげられる。病理検体が提出されている 10 症例について、病理学的に再検討を行った。既存の特殊染色、免疫染色では新しい知見は得られないため、遺伝子解析中である。また、電

子顕微鏡所見の結果との比較、文献上、新しい抗体等の検索をおこなっているところである。

今年度、胆汁うっ滞または肝障害をきたした 27 例の患児について、詳細な臨床情報等の収集が得られ、うち 3 例についてゲノム解析により原因遺伝子バリエントが確認できた (2 の項参照)

他、治療前の免疫状態、感染因子などのチェックを行い、肝組織の評価  
肝組織のミトコンドリア呼吸鎖活性測定を行った。

(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 遺伝子のパネルおよび、同 Agilent 社の SureSelect をベースとした whole exon capture kit (v6) を用い、v6 については、シーケンス後、該当遺伝子領域のバリエント抽出を in silico で行うことで比較を行った。また、実際の患児についてゲノム解析を行った。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。

実際の患児ゲノム解析にて、*ABCB4*, *ATP6B*, *DCDC2*, *LARS*, *PHKA2*, *NBAS* 遺伝子の病的バリエントを見出した。

(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

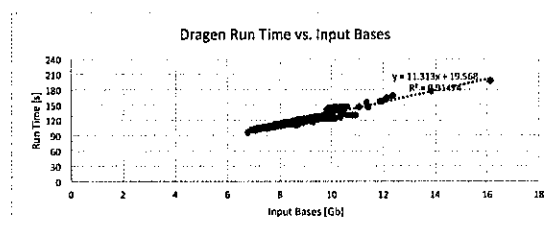
次世代シーケンサより得られた FASTQ データを FPGA 超高速データ解析機器により、マッピング (bam ファイル) SNP, indel 等のコーリング (vcf ファイル) を行い、リファレンス配列をもとに、バリエントタイプ、バリエントの集団中の頻度情報などのアノテーションを行うパイプラインを構築した。

通常のマッピングアルゴリズム、BWA-MEM との比較において、Indel に関しては、BWA (haplotype caller は使用せ

ず)が平均約 50bp 程度までの indel 検出が可能であったのに対し、DRAGEN では、100bp 程度の indel も検出されるなど検出精度は高いと思われた。SNPs については、一致率が 92%で、コールされるバリエーションは DRAGEN が多かった。しかしながら、5 例でのデータ解析では、クオリティ、絞り込み過程でほぼ同じバリエーション結果となり、検出可能精度は大きく異ならないと思われた。

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は、HaloPlex データで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。全エクソーム解析も含め、FASTQ データ量と所要時間を検討した結果、の表 1 (一部を示す)の通りとなった。

表 1 :  
FASTQ データ量とマッピング所要時間



#### (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、低浸透圧法により DNA 抽出を行い、所要時間、ゲノム DNA 品質の検討を行った。

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。もっとも簡便で短時間で行える低浸透圧法が最適と考えられた。従来、カラム法が一般的であり、30 分~の操作が必要であったが、本手法では、数分で可能であり、迅速化が可能となった。

#### (5) 小児再発性肝障害の解析

Long-PCR を利用した解析系の構築を行った。本手法は、既存の広く行われているキャプチャー法等と比べて、エクソン以外の重要なバリエーションの検出、従来の手法で検出できない、中程度の欠失・挿入等も検出できる利点があり、より確実な遺伝子バリエーション検出法と考えられる。具体的には、Long-PCR による濃縮による NBAS 遺伝子全長解析できる系を構築した。全長約 250kb の遺伝子領域について、約 10kb 単位で long-PCR primer セットを構築し、それぞれ条件設定を行い、long-PCR による濃縮系を立ち上げた。

#### (6) NBAS 遺伝子機能解析

ゲノム解析で確認された NBAS 遺伝子病的バリエーションについて、マウスへ変異導入を行い、ナンセンス変異を導入したマウス 4 系統を樹立した。

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において、それぞれの、項目について結果がられた。パネル解析においては、更なる比較検討と、実践が必要であると思われた。FPGA による迅速診断システムについては、従来法と遜色無く使用可能と思われ、今後の迅速化に必須と考えられた。

血液検体からの迅速 DNA 抽出に関しては、カラム法、煮沸法、低浸透圧法いずれも、PCR には使用可能であったが、定量 PCR ならびにその後の高精度融解曲線分析を行う際に、ヘモグロビン等の蛍光が分析を阻害することも判明しており、蛍光の影響を減じる固定法の検討が必要と考えられた。

NBAS 遺伝子機能解析については、病的バリエーション導入マウスの表現型解析が重要と思われた。

#### 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った。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た。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た。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した。

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った。

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を受けて行った。