

(別紙1)

総括研究報告書

(一行分あける)

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

(一行分あける)

主任研究者名 (所属施設) 国立成育医療研究センター

(所属・職名) ゲノム医療研究部・部長

(一行分あける)

(研究成果の要約) 本研究開発では、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、診断治療法を目的とし、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、引き続き各項目について結果が得られた。平成30年度終了まで550例の肝移植を実施し、臨床情報を収集するとともに12症例でのゲノム解析を実施した結果、NBAS など新規病的バリエーションの同定や、肝障害、胆汁鬱滞、肝不全症状を呈し、1例として診断がつかない症例で、ゲノム解析により先天性 CBL 異常症 (Noonan 様症候群) と診断した。パネル解析の検討においては、PCR ベースの濃縮法が有利であると思われた。FPGA による迅速診断システムについては、精度が従来法と遜色無く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、低浸透圧法は、PCR による濃縮法に有効と思われた。

最終年度へ向け、これらを組み合わせた一連のシステムを構築する予定である。

1. 研究目的

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。本研究は、迅速診断システムを確立するとともに、国立成育医療研究センターで実施されすでに国際的に認知されている小児肝移植医療を基礎に、肝障害を来す疾患等の迅速ゲノム診断を実施し、また、病因解析も行い、胆汁鬱滞性肝疾患に対する新たな診断方法、治療方法を確立することを目指す。

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	国立成育医療研究センター 臓器移植センター
義岡 孝子	国立成育医療研究センター 病理診断部

伊藤 玲子 国立成育医療研究センター

3. 研究成果

1) 平成30年度終了まで550例の肝移植を実施し、臨床情報を収集するとともに12症例でのゲノム解析を実施した。NBAS など新規病的バリエーションの同定や、肝障害、胆汁鬱滞、肝不全症状を呈し、診断がつかない症例で、ゲノム解析により先天性 CBL 異常症 (Noonan 様症候群) と診断、血液疾患としてフォローすべき患児等の診断を行った。

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) 用での検出バリエーションの比較を行った。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*, *PHKA2*, *NBAS* 遺伝子の病的バリエーションを見出した。

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

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（データ量10Gb）においては数分（4-6分）、全ゲノム解析（90Gb）においても1-2時間と迅速化に非常に有効であった。また、マッピング精度についても、本システムは、バリエーションコールにおいて、広く使用されているBWA, GATK等とバージョンなど若干異なっていたが、コールされたクオリティの高いバリエーションは、ほぼ一致（98%以上）した。

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。

(4) 小児再発性肝障害の解析

NBAS 遺伝子全長解析が可能なlong-PCR濃縮系の構築および*CFTR* 遺伝子全長約200kbの濃縮系の構築を行い、*CFTR* については、20例について実施した。

(5) *NBAS* 遺伝子機能解析

ゲノム解析で確認された*NBAS* 遺伝子の2種類の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、ミスセンス変異を導入したマウスを樹立した。

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う。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る。

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る。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する。

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う。

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のもと行う。