

# 厚生労働科学研究費補助金

子ども家庭総合研究事業

小児先天性疾患および難治性疾患における

遺伝子診断法の標準化と

国内実施施設の整備に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

平成19（2007）年 3月

主任研究者 緒方 勤

# 目 次

I. 総括研究報告		
小児先天性疾患および難治性疾患における遺伝子診断法の標準化と国内実施施設の整備に関する研究	緒方 勤	--- 1
II. 分担研究報告		
1. 小児先天性疾患遺伝子診断チップの開発と標準的遺伝子診断法の確立に関する研究	緒方 勤	--- 5
2. 高速遺伝子変異スクリーニング法の開発に関する研究	小崎 健次郎	--- 8
3. 遺伝子変異診断法の精度管理に関する研究	池川 志郎	--- 11
4. 分子細胞遺伝学的診断に必要なプローブの開発と精度管理に関する研究	大橋 博文	--- 13
5. 小児固形腫瘍および腫瘍関連先天性疾患における遺伝子診断法の標準化と制度管理に関する研究	清河 信敬	--- 15
6. 小児血液系腫瘍における遺伝子診断法の標準化と精度管理	林 泰秀	--- 18
7. 遺伝子診断における費用対効果の評価と医療経済的支援体制の確立	新保 卓郎	--- 23
8. 遺伝子診断の拠点化に必要な全国的遺伝カウンセリング体制の整備	小杉 眞司	--- 25
9. 遺伝子診断の拠点化に伴う倫理的基盤の確立に関する研究(1) - 遺伝子診断ならびに遺伝子解析研究におけるインフォームド・コンセントの検討 -	掛江 直子	--- 28
10. 遺伝子診断の拠点化に伴う倫理的基盤の確立に関する研究(2) - 診断コンサルテーション・システムの検討 -	掛江 直子	--- 39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	42
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	50

# 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
総括研究報告書

小児先天性疾患および難治性疾患における遺伝子診断法の標準化と国内実施施設の整備

主任研究者 緒方 勤  
国立成育医療センター研究所

### 研究要旨

遺伝子検査は、多くの小児先天性疾患や難治性疾患の診断・治療を行う上で重要な役割を果たしているが、その臨床的基盤は極めて脆弱である。本研究では、新しい変異検出技術を取り入れた標準的遺伝子診断法の確立と、長期的に遺伝子診断を継続できる国内中核施設の拠点化により、遺伝子診断研究の成果を医療に還元する体制を整備する。また、その遂行に必要な遺伝カウンセリング、倫理基盤、医療経済的支援体制の確立を目指す。本年度では、遺伝子診断チップの開発、高速変異スクリーニング法の開発、遺伝子診断プローブの作製、標準化のための変異パターン同定、腫瘍性疾患の解析システム、多施設でしうできる同意書雛形、遺伝カウンセラーの育成、医療経済的基盤の検討が行われた。

#### A. 研究目的

遺伝子検査は、多くの小児先天性疾患や難治性疾患の診断・治療を行う上で重要な役割を果たしているが、その臨床的基盤は極めて脆弱である。本研究の目的は、新しい変異検出技術を取り入れた標準的遺伝子診断法の確立と、長期的に遺伝子診断を継続できる国内中核施設の拠点化により、遺伝子診断研究の成果を医療に還元する体制を整備することである。

#### B. 研究方法および結果

##### 1. 診断拠点の整備：インターネットサイトの構築（図1）。

全国の小児内分泌医師、小児遺伝医師、小児泌尿器医師を対象として、臨床診断および遺伝子診断のディスカッションができるインターネットサイトの設計を、セキュリティ、利便性、将来の臨床および研究への波及効果を勘案しながら、小児内分泌学会、小児遺伝学会、小児泌尿器科学会との連携の下に設計をすすめた。現在、臨床診断および遺伝子診断の専門家、臨床情報データベース、同意書などを掲載し、また、DNA検体データベースの作製も視野に入れて、設計を進めている。

##### 2. 遺伝子診断チップの作製

遺伝的異質性に富む疾患のなかで、易腫瘍発症を有する先天奇形症候群、治療可能であると共にゴナドトロピン分泌不全を

ともなうときに次世代へ変異遺伝子伝達リスクを伴うか衰退疾患、medical emergencyである性分化異常症を選択し、既知および候補遺伝子のコード領域、プロモーター領域、エンハンサー領域のデータを集積した。そして、易腫瘍発症を有する先天奇形症候群、治療可能であると共にゴナドトロピン分泌不全をとともなうときに次世代へ変異遺伝子伝達リスクを伴う下垂体疾患、medical emergencyである性分化異常症を選択し、既知および候補遺伝子のコード領域、プロモーター領域、エンハンサー領域のデータを集積した。

易腫瘍発症を有する先天奇形症候群であるヌーナン症候群およびその類縁疾患を対象として、遺伝子診断チップを作製した。また、下垂体疾患および性分化異常症において設計を終了した。

##### 3. 高速遺伝子変異スクリーニング法の開発

熱変性高速液体クロマトグラフィーを応用したDHPLC-COPPERプレート法により、遺伝子診断の幅広い医療応用が可能であることを30以上の遺伝子において示した。さらに、当該検査手法を用いる場合、「単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常」は検出し得るが、「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」は検出し得ないなどの問題点が残されている。本研究でわれわれは、15個の疾患原因遺伝子について「単一エクソンの大きさより小さな質的な

遺伝子異常」を検出するプロトコルを確立した。並行して3個の遺伝子について、「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」を検出するプロトコルを確立し、検査精度の向上とその実用化を図った標準的な遺伝子検査結果報告書が満たすべき要件を検討して明文化したのち、自施設において、実際に使用して問題点についても検討した。

4. 遺伝子変異診断法の精度管理  
難治性先天異常症の包括的遺伝子医療体制の確立のために、骨格系における代表的な難治性先天異常症である骨系統疾患について、遺伝子診断の基盤を構築した。疾患遺伝子の変異をスクリーニングするシステムを設計し、その至適化を行なった。その結果で上がったシステムを用いて、実際の患者サンプルを用いて、当該疾患の遺伝子変異を検索した。その結果、数多くの未知、既知の遺伝子変異の同定に成功した。その過程で、遺伝子診断の条件設定、標準的な遺伝子の変異解析技術の評価法を開発した。

5. 分子細胞遺伝学的診断に必要なプローブの開発と精度管理  
遺伝性疾患における染色体微細欠失の包括的なFISH診断体制を整えるために、本年度の研究として以下の3点を行なった。1) ハプロ不全で発症する可能性があるFISH診断対象疾患をリストアップした(76疾患・遺伝子座)。2) そのうち現在までに約20疾患のプローブを調整した。3) 臨床情報の把握、蓄積、解析のための疾患データシート中原案作成を進めた。

6. 小児固形腫瘍および腫瘍関連先天性疾患における遺伝子診断法の標準化と制度管理  
固形腫瘍を中心とした小児難治性腫瘍疾患のうち、遺伝子解析が診断や治療に有用なものを選定した。このうち、主要な疾患については、その解析法を確立し、実際に遺伝子中央診断/検体保存施設として活動した他、一部の疾患について今後遺伝子中央診断を実施する体制を整えた。新規遺伝子診断法開発を目的として、一部の小児難治性腫瘍疾患のゲノム構造解析に着手した。

7. 小児血液系腫瘍における遺伝子診断法

の標準化と精度管理  
これまでに小児血液の染色体・遺伝子解析の専門家により分子細胞遺伝学的診断の基準の作成を行ってきたが、本研究においては、これまでに行われた急性骨髄性白血病(AML)のAML99プロトコルにおける遺伝子解析を通じて、全国統一プロトコルの遺伝子解析システムを確立し、これから始まるAML-05プロトコルには前方視的研究を可能とした。実際の*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*、*JAK2*遺伝子の解析結果と予後の相関を検討して、治療の層別化に用いる遺伝子を抽出した。また、一部でその精度管理を検討した。

8. 遺伝子診断における費用対効果の評価と医療経済的支援体制の確立  
難治性先天異常症における遺伝子診断技術に関して、医療経済的検討を行った。本年度は、WTP法(CVM法)により遺伝子診断技術の価値を計るための質問票を作成し、一般人を対象としてパイロット調査を行った。これは、患者家族を対象とした調査まで進めていく基礎となる。

9. 遺伝子診断の拠点化に必要な全国的遺伝カウンセリング体制の整備  
小児先天性疾患および難治性疾患における遺伝子診断を実施するにあたって必須となる遺伝カウンセリング体制の基盤整備状況に関して調査を行った。その結果、遺伝子診療部門を設置する医療施設ならびに臨床遺伝専門医の増加、ならびに認定遺伝カウンセラー養成施設の増加が見られたが、実際の遺伝カウンセリングの需要に対応するためには更なるチーム医療体制の整備が必要となると考えられた。

10. 遺伝子診断の拠点化に伴う倫理的基盤の確立  
IRBが存在しない施設も含めて、多施設が使用できる遺伝子診断同意書の雛形を、患者本人、保護者、同胞を対象として作製した。

C. 考察  
1. インターネットサイトの構築は、臨床診断と遺伝子診断に大きく寄与し、前駆この患者および医師に有用な情報を発信する拠点となる。

2. 診断システムおよび技術の向上  
遺伝子診断チップの作製は、包括的遺伝子解析を可能とすると共に、新規遺伝子同定など、厚生労働行政のみならず医学的にも大きな発展が期待できるものである。高速変異スクリーニング法は、巨大な遺伝子を解析する上で極めて有効である。また、

「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」は遺伝子異常全体の25%程度を占めるとされ、重要な位置を占める。これらの異常はサザンブロット法やFISH法により検出が可能であるが、いずれも自動化の困難な方法であり、研究には用いられていても、臨床検査としては一般的には実施されていないのが現状である。DHPLC法により「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」の検査の自動化・高効率化に成功すれば、遺伝子検査の感度は現行の60~65%から85~90%に向上すると期待される。

ゲノムDNAを用いて、PCRと直接シーケンス法により変異をスクリーニングするシステムにより、多くの遺伝子変異が同定され、このシステムの有用性が証明された。疾患名、遺伝子名が異なっても、システムの基本は同一なので、このシステムは、他の骨系統疾患、更には難治性先天異常症全体に適用できる。また、これらの変異パターンのサンプルは、解析担当者の技術管理に応用できる。FISHプローブの開発は、当該責任遺伝子を含む微細欠失などの染色体構造異常の同定および新たな隣接遺伝子症候群発見も期待される。

### 3. 腫瘍性疾患の遺伝子診断整備

小児の固形腫瘍では、比較的症例数が多い主な疾患については国内における遺伝子中央診断の拠点化ならびに標準的遺伝子診断法の確立や精度管理の体制はほぼ整ったと考えられる。今後は、症例数が少ない希少な固形腫瘍についての遺伝子解析方法を確立するとともに、これらの症例の情報や検体を拠点施設に集約する方法について検討が必要と考えられる。また、小児のAML99プロトコールにおいて*FLT3*-ITDは約14%を占め、予後不良因子であることを明ら

かにした。このデータに基いて、次に始まるAML-05プロトコールでは、*FLT3*-ITDは予後因子として層別化に用いられることになり、陽性例はAML99では造血幹細胞移植の対象となった。D835MtはAML99では予後と関連しなかった。成人では予後と相関するとする報告が多く、今後のAML-05症例についても前方視的検討が行なわれる予定である。

### 4. 遺伝子診断の支持基盤の整備

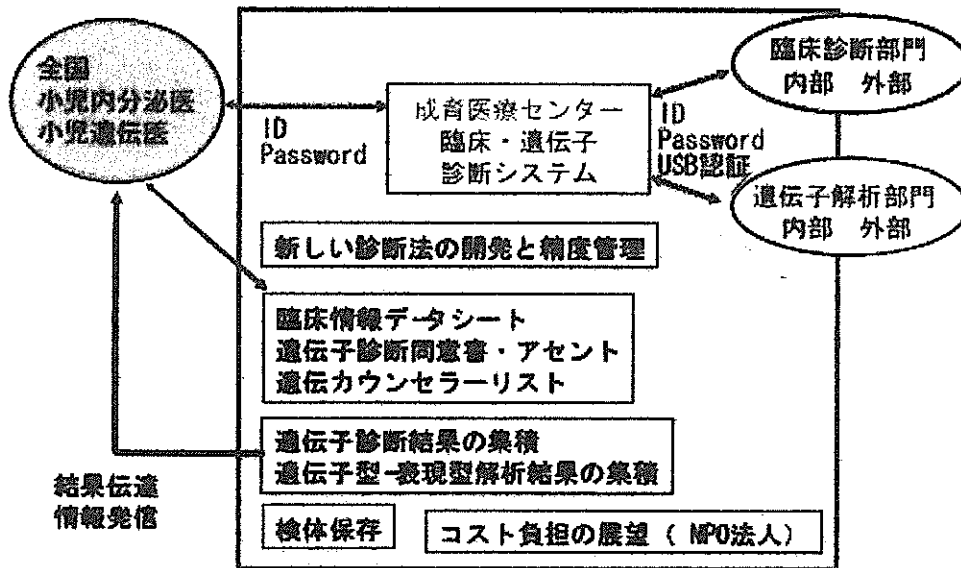
遺伝子診断にかかわるコストの見積もりおよび患者家族へのアンケートは、今後の医療コストの算定やNPO法人設立に必須である。倫理基盤の確立やカウンセリング制度の確立は、遺伝子診断の拠点化および標準化に欠かせないものである。

### D. 結論

新しい変異検出技術を取り入れた標準的遺伝子診断法の確立と、長期的に遺伝子診断を継続できる国内中核施設の拠点化により、遺伝子診断研究の成果を医療に還元する体制を整備する基盤が、遺伝子診断チップの開発、高速変異スクリーニング法の開発、遺伝子診断プローブの作製、標準化のための変異パターン同定、腫瘍性疾患の解析システム、多施設で使用できる同意書雛形、遺伝カウンセラーの育成、医療経済的基盤の検討により進められた。

## 遺伝子診断および医療連携システムの整備

内分泌疾患（成長・成熟・性分化異常症）および先天奇形症候群における包括的遺伝子診療システムの構築



小児内分泌学会、小児遺伝学会、小児泌尿器学会と連携

図1. インターネットサイトの概念図

# 分 担 研 究 報 告



厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

小児先天性疾患遺伝子診断チップの開発と標準的遺伝子診断法の確立

分担研究者 緒方 勤  
国立成育医療センター研究所

研究要旨 当該年度においては、以下の2つのことを行った。第1は、遺伝子診断チップの開発である。これは、遺伝的異質性に富む疾患を対象として、関連する遺伝子を網羅的に解析することを目的として作成した。具体的には、ヌーナン症候群および類縁疾患を対象として19遺伝子を解析できるチップを完成させ、さらに下垂体疾患および性分化異常症においてチップの設計を終了した。第2は、全国の小児内分泌医師、小児遺伝医師、小児泌尿器医師を対象として、臨床診断および遺伝子診断のディスカッションができるインターネットサイトの設計を関連学会との連携のもとにほぼ終了した。

A. 研究目的

以下の2つである。（1）遺伝的異質性に富む疾患を対象として、関連する遺伝子を網羅的に解析できる遺伝子診断チップを歩開発すること、（2）全国の小児内分泌医師、小児遺伝医師、小児泌尿器医師を対象として、臨床診断および遺伝子診断のディスカッションができるインターネットサイトを構築すること。

B. 研究方法

遺伝子診断チップの開発においては、遺伝的異質性に富む疾患のなかで、易腫瘍発症を有する先天奇形症候群、治療可能であると共にゴナドトロピン分泌湯不全をとまうときに次世代へ変異遺伝子伝達リスクを伴うか衰退疾患、medical emergencyである性分化異常症を選択し、既知および候補遺伝子のコード領域、プロモーター領域、エンハンサー領域のデータを集積した。インターネットサイトの構築においては、セキュリティ、利便性、将来の臨床および研究への波及効果を勘案しながら、小児内分泌学会、小児遺伝学会、小児泌尿器科学会との連携の下に設計をすすめた。

（倫理面への配慮）

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従っている。検体の収集を含めた研究計画については、国立成育医療センター、および各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

C. 研究結果

1. 遺伝子診断チップの開発：易腫瘍発症を有する先天奇形症候群であるヌーナン症候群およびその類縁疾患を対象として、遺伝子診断チップを作製した（図1）。また、下垂体疾患および性分化異常症において設計を終了した。

2. インターネットサイトの構築：その概念を関連学会に説明し連携を確認した（図2）そして、その詳細な設計に入っている。ここでは、臨床診断および遺伝子診断の専門家、臨床情報データベース、同意書などを掲載し、また、DNA検体データベースの作製も視野に入れている。

D. 考察

遺伝子診断チップの作製は、包括的遺伝子解析を可能とすると共に、新規遺伝子同定など、厚生労働行政のみならず医学的にも大きな発展が期待できるものである。インターネットサイトの構築は、臨床診断と遺伝子診断に大きく寄与し、前駆この患者および医師に有用な情報を発信する拠点となる。

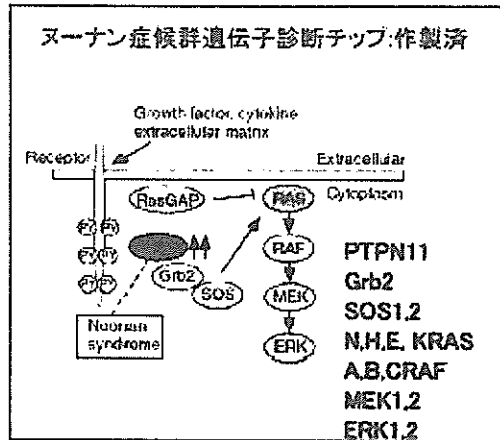
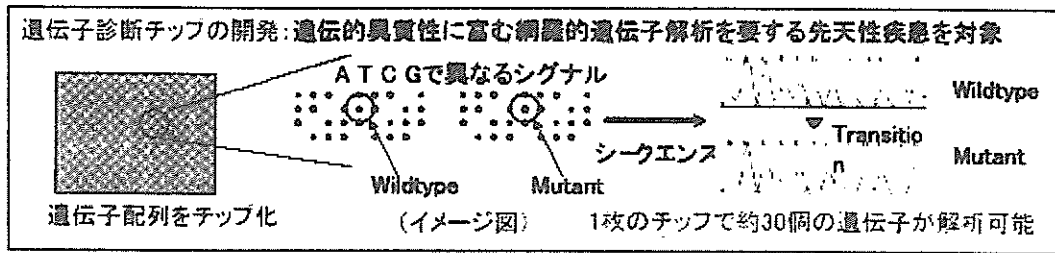
E. 結論

ヌーナン症候群およびその類縁疾患を対象として、遺伝子診断チップを作製した。臨床診断および遺伝子診断のディスカッションができるインターネットサイトの設計を関連学会との連携のもとにほぼ終了した。

F. 研究発表

1. Wada Y, Okada M, Fukami M, Sasagawa I, Ogata T. Association of cryptorchidism with Gly146Ala polymorphism in the gene for steroidogenic factor-1. *Fertility and Sterility* 85 (3): 787–790, 2006. IF=3.114
  2. Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R, Ohashi T, Nishimura G, Homma K, Ogata T. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and/or aromatase deficiency. *Pediatric Research* 59 (2): 276–280, 2006. IF=2.875
  3. Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. Transactivation function of a ~800 bp evolutionally conserved sequence at the *SHOX* 3' region: implication for the downstream enhancer. *American Journal of Human Genetics* 78 (1): 167–170, 2006. IF=12.65
  4. Sato N, Ohyama K, Fukami M, Okada M, Ogata T. Somatic and germline mutations of the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a mother and the son: implication for apparently mutation negative Kallmann syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (4): 1415–1418, 2006. IF=5.778
  5. Goto M, Nishimura G, Nagai T, Yamazawa K, Ogata T. Familial Klippel-Feil anomaly and t(5;8)(q35.1;p21.1) translocation. *American Journal of Medical Genetics A* 140 (9): 1013–1015, 2006. IF=1.913
  6. Homma K, Hasegawa T, Nagai T, Adachi M, Horikawa R, Fujiwara I, Tajima T, Takeda R, Fukami M, Ogata T. Urine steroid hormone profile analysis in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: implication for the backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (7): 2643–2649, 2006. IF=5.778
  7. Watanabe M, Yoshida R, Ueoka K, Aoki K, Sasagawa I, Hasegawa T, Sueoka K, Kamitsuji S, Kamatani N, Yoshimura Y, Ogata T. Haplotype analysis of the estrogen receptor  $\alpha$  gene in male genital and reproductive abnormalities. *Human Reproduction* (in press). IF=3.669
  8. Ogata T, Udaka T, Fujiwara I, Ogawa E, Sato N, Kosaki K. Kallmann syndrome phenotype in a female patient with CHARGE syndrome and *CHD7* mutation. *Endocrine Journal* (in press). IF=1.037
  9. Yamazawa K, Wada Y, Sasagawa I, Aoki K, Ueoka K, Ogata T. Mutation and polymorphism analyses of *INSL3* and *LGR8/GREAT* in 62 Japanese patients with cryptorchidism. *Hormone Research* 67 (2): 73–76, 2006. IF=1.386
  10. Kagami M, Nagai T, Fukami M, Kazuki Yamazawa K, Ogata T. Silver-Russell syndrome in a girl born after *in vitro* fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of *PEG1/MEST*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (in press). IF=0.889
  11. Fukami M, Wada Y, Miyabayashi K, Nishino I, Hasegawa T, Camerino G, Kretz C, Buj-Bello A, Laporte J, Yamada G, Morohashi K, Ogata T. *CXorf6* is a causative gene for hypospadias. *Nature Genetics* 38(12):1369–1371, 2006. IF=25.8
  12. Sato N, Kamachi Y, Kondoh H, Shima Y, Morohashi K, Horikawa R, Ogata T. Hypogonadotropic hypogonadism in an adult female with heterozygous hypomorphic mutation of *SOX2*. *European Journal of Endocrinology* (in press). IF=2.962
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 尿道下裂および他のストロゲン依存性疾患発症のリスクとエストロゲン製剤効果の評価法としてのエストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子のSNP解析法の開発 (2006年4月7日、国立成育医療センター職務発明認定)
  2. 新規性分化異常症責任遺伝子MHX (*Cxor6*)によるNotchリポーター遺伝子転写活性化の同定 (2006年4月7日、国立成育医療センター職務発明認定)

新しい診断法の開発



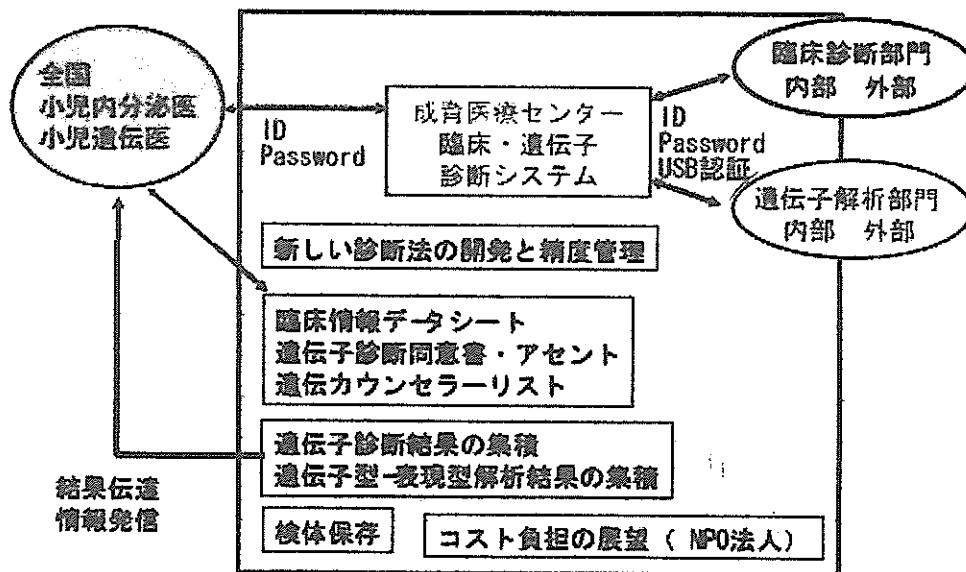
下垂体機能障害: 設計済、作製中  
 Prop1, Pit1, LHX3, LHX4, SOX2, SOX3  
 など

性分化異常症: 設計中  
 CXorf0, AR, SF1, LHX9, SRD5A2,  
 など

図1. ヌーナン症候群および類縁疾患の遺伝子診断チップ

遺伝子診断および医療連携システムの整備

内分泌疾患（成長・成熟・性分化異常症）および先天奇形症候群における包括的遺伝子診療システムの構築



小児内分泌学会、小児遺伝学会、小児泌尿器学会と連携

図2. インターネットサイトの概念図

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

高速遺伝子変異スクリーニング法の開発

分担研究者 小崎 健次郎 慶應義塾大学小児科学教室 助教授

研究要旨

申請者は、これまでの研究により熱変性高速液体クロマトグラフィーを応用したCondition-oriented primer pre-embedded reactor plate (DHPLC-COPPERプレート法)を応用することにより、遺伝子診断の幅広い医療応用が可能であることを示した。しかし、当該検査方法により解析し得る遺伝子の種類が未だ限られていること、当該検査手法を用いる場合、「単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常」は検出し得るが、「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」は検出し得ないなどの問題点が残されている。本研究でわれわれは、15個の疾患原因遺伝子について「単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常」を検出するプロトコルを確立した。並行して3個の遺伝子について、「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」を検出するプロトコルを確立し、検査精度の向上とその実用化を図った標準的な遺伝子検査結果報告書が満たすべき要件を検討して明文化したのち、自施設において、実際に使用して問題点についても検討した。

研究協力者

小崎里華 (国立成育医療センター遺伝診療科)

A. 研究目的

ゲノム科学の成果を医療に応用する最も直接的な用途は、メンデル遺伝病の遺伝子診断である。ヒトゲノムの全塩基配列が決定された現在、理論的にはいかなる遺伝子の遺伝子診断も可能であるが、従来の直接シーケンシングによる方法を使用する限りは、人的資源・経済的資源の制限から、遺伝子診断の利用範囲は極めて限定されてしまう。申請者は、これまでの研究により熱変性高速液体クロマトグラフィーを応用したCondition-oriented primer pre-embedded reactor plate (DHPLC-COPPERプレート法)を応用することにより、遺伝子診断の幅広い医療応用が可能であることを示した。しかし、当該検査方法により解析し得る遺伝子の種類が未だ限られていること、当該検査手法を用いる場合、「単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常」は検出し得るが、「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」は検出し得ないなどの問題点が残されている。本研究でわ

れわれは、20個の疾患原因遺伝子について「単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常」を検出するプロトコルを確立した。並行して2個の遺伝子について、「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」を検出するプロトコルを確立し、検査精度の向上とその実用化を図った。

B. 研究方法

① 単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常の検出

システムとしてDHPLC-COPPERプレート法により遺伝子の全エクソンを同時増幅し、単回の分析で遺伝子の全翻訳領域内の遺伝子変異の有無をスクリーニングした。まず、96穴形式のPCRプレートの各穴に各エクソンを増幅するためのPCRプライマーを分注しておいた。この際に全プライマー対が同一のPCR条件で増幅するように配慮してプライマーを設計した。患者の末梢血よりゲノムDNAを抽出し、PCR増幅を行い、増幅終了後にプレートをDHPLC解析システムに移してあらかじめ決めておいた至適

条件下で解析を進めた。最後に、DHPLC解析により異常が認められたエクソンについて、シーケンシングを行い、変異の種類と性質を決定した。開発したプロトコルについて、分担研究者が保守・管理するウェブサイト、<http://www.dhplc.jp>に掲載した。

## ② 複数エクソンにわたる遺伝子欠失・挿入の検出

疾患原因遺伝子の各エクソンを増幅するPCRプライマー対の組み合わせを設計した。これらのプライマー対をPCR増幅したのち、DNA分離用クロマトグラフィークラムで分離し、分離後に蛍光色素（SYBRグリーン）を加えたのち、蛍光検出器により定量した。正常対照検体の信号強度と患者由来検体の信号強度を比較して、各エクソンのコピー数を決定した。

## ③ 遺伝子検査の結果報告書の標準化

標準的な遺伝子検査結果報告書が満たすべき要件について検討を行った。まず、米国の臨床遺伝学専門医の団体であるAmerican College of Medical Geneticsがこれまでに発表した遺伝子検査に関わる3種類のガイドラインのうち、結果の報告にかかわる部分を統合・整理し、英語および英語のプロトタイプを作成した(付録参照)。次に、当該プロトタイプを自施設において、実際に使用し、問題点について検討した。

3種類のガイドラインは

1) ACMG Laboratory Practice Committee Working Group: Recommendations for Standards for Interpretation of Sequence Variations. *Genetics in Medicine* 2000; 2: 302-303.

2) Maddalena A, Bale S, Das S, Grody W, Richards S; the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Technical standards and guidelines: molecular genetic testing for ultra-rare disorders. *Genet Med.* 2005, 7:571-83.

(倫理面への配慮)

患者検体の解析について慶應義塾大学医学部倫理委員会から承認済みである。書面を用いて患者への説明を行い、インフォームド・コンセントを得たのち、採血を行った。申請者がNTTデータと共同開発し市販されている匿名化ソフトウェア「SecureName」を利用して、個人情報厳重に管理した。また、匿名化された遺伝子情報を授受する際には、暗号化された通信(SSL)を用いた。遺伝子検査の前後に遺伝カウンセリングを行った。

## C. 研究結果

### ① 単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常の検出

本研究では、先天異常症候群のバイブル「Inborn Errors of Morphogenesis」に掲載されている比較的頻度の高い疾患を中心に15遺伝子についてのCOPPERプレート群を開発した。Alagille症候群の第2の原因遺伝子NOTCH2(Torii et al)やNoonan症候群関連疾患の第2の原因遺伝子、de Lange症候群の第2の原因遺伝子SMCL1などが含まれる。

### ② 複数エクソンにわたる遺伝子欠失・挿入の検出

Rubinstein-Taybi症候群およびCHARGE症候群について複数エクソンにわたる遺伝子欠失・挿入を検出するシステムを完成した。Rubinstein-Taybi症候群については4例(Udaka et al)、CHARGE症候群については1例(Udaka et al、世界初例)の複数エクソンにわたる遺伝子欠失を同定し、報告した。

### ③ 遺伝子検査の結果報告書の標準化

診療利用を前提とした遺伝子検査の報告書の記載方法について、英文および和文のプロトタイプを作成した。

実際の塩基置換を正確に明記するために、Genbankに登録された遺伝子配列を参照したうえで、塩基置換の位置を標準命名法に従って記載した。

ここで、Mutationという単語は、発症の原因となりうるような異常を指す一方、Variationという単語は発症の原因となり得るかどうかが、いかに関わらず正常配列と異なるものを指す。Variationが遺伝子に与える影響について変異を5つのカテゴリーに分けて記載することが有効であった。i) 既報告のmutationであり、疾患の原因とである。ii) 既報告のvariationであり、疾患の原因とはならない。iii) 未報告のvariationであるが、疾患の原因であると考えられる。iv) 未報告であり、また疾患の原因となるかどうかは判定できない。v) 未報告のvariationであるが、おそらく疾患の原因とは考えられない。

## D. 考察

包括的に多種の先天異常症候群の遺伝子診断を提供するセンター機能を担う施設は欧米を含めて存在しない。その背景として、①研究者の多くは基礎分野に属し、各施設で単一の遺伝子に集中した研究が行われている、②基礎系施設では原因遺伝子の同定後には患者検体の解析が行われなくなる傾向がある、③各施設間・疾患毎に検査プロトコルが異なっている、などの問題が挙げられる。本研究で例示した標準化プロトコルの開発とは①～③の問題の解決に結びつくと期待される。

「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」は遺伝

子異常全体の25%程度を占めるとされ、重要な位置を占める。これらの異常はサザンブロット法やFISH法により検出が可能であるが、いずれも自動化の困難な方法であり、研究には用いられていても、臨床検査としては一般的には実施されていないのが現状である。DHPLC法により「複数エクソンにわたる量的な遺伝子異常」の検査の自動化・高効率化に成功すれば、遺伝子検査の感度は現行の60~65%から85~90%に向上すると期待される。

「単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常」の検出や「複数エクソンにわたる遺伝子欠失・挿入の検出」のいずれにおいても、PCR反応の調整と反発的の分注>PCR>DHPLC>判定のステップにしたがって検査が進められるが、現在のところ最初のステップは自動化されていない。今後、プログラム可能な自動分注器を利用して、検査の全プロセスを自動化する必要がある。

## E. 結論

先天異常症候群の検査プロトコルの標準化方法を開発し、検査施設の負荷を最小限にして解析対象疾患数を増加しつつ、検査の感度を高めることができた。当該技術は、先天異常症候群以外の稀少疾患にも応用できると期待される。包括的な稀少疾患の遺伝子診断システムを完成すれば、各疾患の研究を展開するために十分な数の患者検体を国内外から集積することが可能になる。多種類の小児科領域の稀少疾患の研究を通じて疾患原因遺伝子のさらなる生物学的役割を明らかにしつつ、多くの稀少疾患患者に対して遺伝子検査を提供と可能するシステムを確立してゆく必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Udaka T, Kurosawa K, Izumi K, Yoshida S, Tsukahara M, Okamoto N, Torii C, Kosaki R, Masuno M, Hosokai N, Takahashi T, Kosaki K. Screening for partial deletions of CREBBP locus in Rubinstein-Taybi Syndrome patients using multiplex PCR / Liquid chromatography, *Genetic Testing*, 2006; 10:265-71.

Aramaki M, Udaka T, Torii C, Samejima H, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Comprehensive screening of CHD7 mutations among patients with CHARGE Syndrome using denaturing high-performance liquid chromatography, *Genetic Testing*, 2006; 10:244-251.

Ogata T, Fujiwara I, Ogawa E, Sato N, Udaka T, Kosaki K. Kallmann Syndrome Phenotype in a Female Patient

with CHARGE Syndrome and CHD7 Mutation. *Endocrine Journal*, 2006; 53:741-743.

Udaka T, Okamoto N, Aramaki M, Torii C, Kosaki R, Hosokai N, Hayakawa T, Takahata N, Takahashi T, Kosaki K. An Alu retrotransposition-mediated deletion of CHD7 in a patient with CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, in press.

Izumi K, Kosaki K, Benirschke K, Jones KL. Umbilical cord length in urinary tract abnormalities associated with oligohydramnios: Evidence regarding developmental pathogenesis. *Fetal and Pediatric Pathology*, in press.

Kosaki R, Okuyama T, Tanaka T, Migita O, Kosaki K. Monozygotic twins of Smith-Magenis syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, in press.

Torii C, Izumi K, Nakajima H, Takahashi T, Kosaki K. EFNB1 mutation at the ephrin ligand - ephrin receptor dimerization interface in a patient with craniofrontonasal syndrome, *Congenital Anomalies*, in press.

Izumi K, Kuratsuji G, Ikeda K, Takahashi T, Kosaki K. Partial deletion of LIS1: A pitfall in molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome. *Pediatric Neurology*, in press.

Samejima H, Torii C, Kosaki R, Kurosawa K, Yoshihashi H, Muroya K, Okamoto N, Watanabe Y, Kosho T, Kubota M, Matsuda O, Goto M, Izumi K, Takahashi T, Kosaki K. Screening for Alagille syndrome mutations in the JAG1 and NOTCH2 genes using denaturing high-performance liquid chromatography. *Genetic Testing*, in press.

### 2. 学会発表

Kosaki K, Kosaki R, Samejima H, Torii C, Fujimaru R, Yamada H, Iijima K. Extreme phenotypic variations within a family with SALL1 mutations: Isolated preaxial polydactyly to Goldenhar syndrome-like phenotype. Townes-Brocks syndrome (TBS) is a genetic disorder caused by mutations in SALL1. The 56th American Society of Human Genetics, October 2006, New Orleans, Louisiana.

Kosaki R, Okuyama T, Tanaka T, Migita O, Kosaki K. Monozygotic twins of Smith-Magenis syndrome. The 56th American Society of Human Genetics, October 2006, New Orleans, Louisiana.

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特記すべき事なし。

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

遺伝子変異診断法の精度管理

分担研究者 池川 志郎  
理化学研究所・遺伝子多型研究センター  
変形性関節症関連遺伝子研究チーム・チームリーダー

研究要旨 難治性先天異常症の包括的遺伝子医療体制の確立のために、骨格系における代表的な難治性先天異常症である骨系統疾患について、遺伝子診断の基盤を構築した。疾患遺伝子の変異をスクリーニングするシステムを設計し、その至適化を行なった。その結果で上がったシステムを用いて、実際の患者サンプルを用いて、当該疾患の遺伝子変異を検索した。その結果、数多くの未知、既知の遺伝子変異の同定に成功した。その過程で、遺伝子診断の条件設定、標準的な遺伝子の変異解析技術の評価法を開発した。

A. 研究目的

骨系統疾患を例として、包括的遺伝子医療体制の確立のために、遺伝子変異の同定、並びに標準的遺伝子変異解析技術の評価法の開発、遺伝子診断の条件設定を行なうこと。

B. 研究方法

Camurati-Engelmann病、spondylometaphyseal dysplasia Sedaghatian type、II型コラーゲン異常症（先天性脊椎骨端異形成症、軟骨低発生症、Kniest異形成症）、毛髪軟骨異形成症、先天性化骨性筋炎などの骨系統疾患で既知の疾患遺伝子の包括的解析を行なった。公共データベースの遺伝子配列を基に、これらの疾患の疾患遺伝子に対し、ゲノムDNAを用いて、PCRと直接シーケンス法により変異をスクリーニングするシステムを設計し、その至適化を行なった。その結果で上がったシステムを用いて、当該疾患患者の遺伝子変異を検索した。

（倫理面への配慮）

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従っている。検体の収集を含めた研究計画については、理化学研究所、及び各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

C. 研究結果

1. spondylometaphyseal dysplasia Sedaghatian typeで、未知の疾患遺伝子、SBDSに変異を同定した。
2. Camurati-Engelmann病、II型コラーゲン異常

症、毛髪軟骨異形成症、先天性化骨性筋炎で既知の疾患遺伝子の変異を同定した。

3. これらの骨系統疾患の疾患遺伝子の包括的解析の過程で得られた PCR primer、sequence primer、PCR反応条件をデータベース化した。

4. 同定した各種の遺伝子変異（ナンセンス、ミスセンス、フレームシフトなど）を解析法の標準化のコントロールとして、整理・確認した。

D. 考察

ゲノムDNAを用いて、PCRと直接シーケンス法により変異をスクリーニングするシステムにより、多くの遺伝子変異が同定され、このシステムの有用性が証明された。疾患名、遺伝子名が異なっても、システムの基本は同一なので、このシステムは、他の骨系統疾患、更には難治性先天異常症全体に適用できる。

E. 結論

骨系統疾患の遺伝子変異を同定した。その遺伝子診断の基盤的解析技術の開発に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mayranpaa MK, Ikegawa S, Marttinen E, Kroger H, Makiitie O. Bone biopsy and densitometry findings in a child with Camurati-Engelmann disease. Clin Rheumatol 2007 [Epub ahead of print]

Walter K, Tansek M, Tobias ES, Ikegawa S, Coucke P, Hyland J, Mortier G, Iwaya T, Nishimura G, Superti-Furga A, Unger S. COL2A1-related skeletal dysplasias with predominant metaphyseal involvement. *Am J Med Genet A* 2007 [Epub ahead of print]

Nishimura G, Nakashima E, Hirose Y, Cole T, Cox P, Cohn DH, Rimoin DL, Lachman RS, Miyamoto Y, Kerr B, Unger S, Ohashi H, Superti-Furga A, Ikegawa S. SBDS mutations cause a neonatal form of spondylometaphyseal dysplasia (SMD) resembling SMD Sedaghatian type. *J Med Genet* (in press)

Yabuki S, Kikuchi S, Ikegawa S. Autosomal dominant spinal extradural arachnoid cyst associated with distichiasis and lymphedema. *Am J Med Genet A* (in press)

Nakajima M, Kazuharu Haga N, Takikawa K, Nishimura G, Ikegawa S. The *ACVRI* 617G>A mutation is also recurrent in Japanese patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Hum Genet* (in press)

2. 学会発表  
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

分子細胞遺伝学的診断に必要なプローブの開発と精度管理

分担研究者 大橋 博文 埼玉県立小児医療センター 遺伝科科長

研究要旨 遺伝性疾患における染色体微細欠失の包括的なFISH診断体制を整えるために、本年度の研究として以下の3点を行なった。1) ハプロ不全で発症する可能性があるFISH診断対象疾患をリストアップした(76疾患・遺伝子座)。2) そのうち現在までに約20疾患のプローブを調整した。3) 臨床情報の把握、蓄積、解析のための疾患データシート中原案作成を進めた。今後さらに、診断プローブの整備をすすめ、広く国内からの診断ニーズに対応すべく本班のシステムとしての運用を進めたい。

#### A. 研究目的

染色体微細欠失が高頻度に認められる先天性疾患（染色体微細欠失症候群）が存在する。これらの疾患については責任遺伝子領域を含んだプローブを用いたFISH解析が診断に有用であり、代表的な疾患については検査企業ベースで対応されている。しかし、通常は遺伝子内変異で発症すると考えられる単一遺伝子病においても、ハプロ不全で生じる優性遺伝病では微細欠失などの染色体構造異常に伴って発症する場合も決してまれではないことが予想される。しかし遺伝子内のエクソンを対象としたシーケンスではその欠失診断は難しい。これらのハプロ不全疾患について包括的なFISH診断体制の構築を目指す。

#### B. 研究方法

- 1) FISH診断の候補となる常染色体優性遺伝性疾患のリストアップ。Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation 6th editionに記載の原因遺伝子が判明している常染色体優性遺伝性疾患から、The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in CardiffとOMIMで、gross deletionあるいはnonsense変異が報告されているものを抽出した。
- 2) リスト中の疾患を中心に、検査企業未対応のものとして、順次診断用BACプローブを調整する。
- 3) 今後全国からの解析依頼を受けるにあたって、疾患についてのデータシートを準備する。

#### （倫理面への配慮）

本年度は実際に患者・家族の検査を行なう前の準備段階であったため倫理面での問題は生じていない。

#### C 研究結果

- 1) ハプロ不全で発症する可能性があるFISH診断対象疾患をリストアップした(76疾患・遺伝子座)。
- 2) 検査企業未対応のものとして、現在までに下記のように約20疾患のプローブを調整した。Van der Woude症候群：IRF6(1q32-q41)；全前脳胞症：SIX3(2p21)、GLI2(2q14)、SHH(7q35)、PITCH(9q22.3)、ZIC2(13q32)、TGIF(18p11.3)；Waardenburg症候群-type IIA：MITF(3p14.1-p12.3)、Blepharophimosis-Ptosis-Epicanthus Inversus症候群：FOXL2(3q23)；Sotos症候群：NSD1(5q35)；Weaver症候群：NSD1(5q36)；Saethre-Chatzen症候群：TWIST(7p21-p22)；多発性外骨腫症-type I：EXT1(8q23-q24)；Tricho-Rhino-Phalangeal症候群-I：TRPS1(8q24.12)；Tricho-Rhino-Phalangeal症候群-III：TRPS1(8q24.12)；Langer-Giedion症候群：EXT1(8q24.11-q24.13)

/TRPS1 (8q24.12) ; WAGR症候群 : WT1 (11p13)  
/PAX6 (11p13) ; Rubinstein-Taybi症候群 : CBP  
(16p13.3) ; Townes-Brocks症候群 : SALL1  
(16q12.1) ; 神経線維腫症 I 型 : NF1 (17q11.2)  
; 多発性骨癒合症 : NOG (17q21-q22) ; Campomelic  
Dysplasia : SOX9 (17q24.3-q25.1) ; Alagille症候  
群 : JAG1 (20p12) ; Leri-Weill Dys-  
chondro-steosis : SHOX (Yp/Xp) .

3) 患者臨床情報の把握、蓄積、解析に供するため  
疾患データシートの活用を考え、データシート原案  
作成を進めた。

#### D. 考察

ハプロ不全で発症しうる常染色体優性遺伝病の確定  
診断上、遺伝子内変異の解析だけでは不十分の場合  
があり、当該責任遺伝子を含む微細欠失などの染色  
体構造異常への注意も必要である。これらのハプロ  
不全疾患について包括的なFISH診断体制を作り、疾  
患の病因分類の解明と、微細欠失を病因とする場合  
の症状特性を検討することによる新たな隣接遺伝子  
症候群発見も期待される。

#### E. 結論

FISH解析対象疾患をリストアップし、診断プローブ  
の調整に着手した。今後さらに、診断プローブの整  
備をすすめ、広く国内からの診断ニーズに対応する  
本班のシステムへの位置づけをめざしたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 大橋博文、坂爪悟、大橋裕子、加古結子. 先天  
異常症候群における染色体微細欠失のFISH診断. 日  
本小児科学会. 平成18年4月21日 (金沢) .

2) 加古結子、坂爪悟、大橋裕子、大橋博文. MITF  
遺伝子欠失を伴う3番染色体短腕内欠失  
del(3)(p13p14.2)の一例. 日本小児遺伝学会. 平成  
18年10月21日 (米子) .

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

小児固形腫瘍および腫瘍関連先天性疾患における遺伝子診断法の標準化と制度管理

分担研究者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 部長

研究要旨：固形腫瘍を中心とした小児難治性腫瘍疾患のうち、遺伝子解析が診断や治療に有用なものを選定した。このうち、主要な疾患については、その解析法を確立し、実際に遺伝子中央診断/検体保存施設として活動した他、一部の疾患について今後遺伝子中央診断を実施する体制を整えた。新規遺伝子診断法開発を目的として、一部の小児難治性腫瘍疾患のゲノム構造解析に着手した。

研究協力者

大喜多肇、中里恵子、宮川世志幸  
（国立成育医療センター研究所  
発生・分化研究部 機能分化研究室）  
中島英規  
（同 副所長室）

A. 研究目的

本研究の目的は、小児難治性腫瘍疾患における標準的遺伝子診断法の確立と国内実施施設の拠点化を行い、遺伝子診断研究の成果を医療に還元すると共に、将来にわたって医療上必要とされる遺伝子診断の継続的实施を可能とすることである。このために、拠点施設の設定や機能整備、診断法の標準化や制度管理法の確立を行う。さらに、貴重な臨床症例検体の研究的な分子解析を通じて、小児難治性腫瘍疾患の治療上有用性の高い、新たな遺伝子診断法の開発を目指す。

B. 研究方法

小児腫瘍のOCT包埋凍結組織を薄切して回収し、RNeasyキット(QIAGEN社)を用いてtotal RNAを抽出後、1st strand cDNA合成キット(Amersham社)によってcDNAを合成した。各腫瘍に特徴的なキメラ遺伝子の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いて、PCR法によって各キメラ遺伝子cDNAを増幅、検出した。陽性コントロールとして各腫瘍の培養細胞株から調整したcDNAを用いた。

分離した白血病およびリンパ腫細胞、腫瘍細胞組織からDNeasyキット(QIAGEN社)を用いてゲノムDNAを抽出し、GeneChip Mapping 500K Array(Affimetrix社)による網羅的なゲノム構造解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は原則的に体細胞変異を対象としたものであり、ヒトゲノム・遺伝子研究には該当しないが、三省合同のヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針に準拠して、当該研究機関の倫理委員会の承認を得た上で研究を行っている。腫瘍細胞および組織の臨床検体については、インフォームドコンセントを得た上で、匿名化して保存し、遺伝子解析に用いている。

C. 研究結果

対象疾患の選定：固形腫瘍を中心とした小児難治性腫瘍疾患のうち、遺伝子解析が診断確定、治療法選択、長期予後判定、合併症予測に直結するもの、あるいは将来的にその可能性があるもの、およびこれらの疾患で対象となる遺伝子異常を、文献的に選定した(表1)。このうち、症例数が比較的多い固形腫瘍、横紋筋肉腫、Ewing肉腫、Wilms腫瘍については、すでに各腫瘍の治療研究グループと連携し、それぞれの遺伝子中央診断と検体保存を担当、実施しており、H18年は、それぞれ18例、6例、10例の診断を行った。また、それぞれの遺伝子診断に関して、解析方法の実施手順を決定した他、精度管理法についても検討した。一方、神経芽腫については、遺伝子中央診断と検体保存の実施に向けた準備を行って

いる。また、リンパ腫については、すでに検体保存および中央病理/免疫診断の実施設として活動を行っており、H18年は37例の検体保存を行った。また、未分化大細胞性リンパ腫(ALCL)に関してその特異的キメラ遺伝子であるNPM-ALKのPCRによる検出方法につい

表1 遺伝子解析が診断治療に有用な小児腫瘍とその遺伝子異常

			診断 予後 研究
異型大細胞性リンパ腫	t(2;5)(p23;q35)	NPM-ALK	○
Ewing/PNET腫瘍群	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	○
	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	○
	t(7;22)(p24;q12)	EWS-ETV1	○
	t(17;22)(q12;q12)	EWS-E1AF	○
神経芽腫群腫瘍	t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV	○
	ploidy		○
	2p24	MYCN	○
胎果型横紋筋肉腫	1p36欠失		○
	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FKHR	○
胎児型横紋筋肉腫	t(1;13)(p36;q12)	PAX7-FKHR	○
	第8染色体 trisomy		○
Wilms腫瘍	11p15.5のLOH		○
	WT1の異常		○
	11p13の欠失		○
先天性繊維肉腫	11p15の欠失	H19, IGF2	○
先天性間葉芽腎	t(12;15)(p13;q25)	TEL-TRKC	○
繊維形成小細胞腫瘍	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3	○
	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1	○
巨細胞性繊維芽細胞腫	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	○
隆起性皮膚繊維肉腫	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	○
乳児繊維肉腫	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3	○
滑膜肉腫	t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX1	○
明細胞肉腫	t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX2	○
	t(12;22)(q13;q12)	EWS-ATF1	○
胎果状軟部肉腫	t(X;17)(p11;q12)	ASPL-TFE3	○

て条件検討、標準化を行い、中央診断の実施設体制の準備を完了した。

また、新規遺伝子診断法開発に応用するため、マイクロアレイを用いた腫瘍細胞の網羅的ゲノム構造解析に着手し、難を含む急性リンパ球性白血病について解析を開始し、本年度内に80例の解析を終了する予定である。また、Wilms腫瘍についても同様の解析に着手した。

一方、多数のキメラ遺伝子の発現の有無について、一挙に解析する新たな方法として、マスマスペクトロメトリーに着目している。これは、MALDI-TOF/MSによる質量分析を利用して、各キメラ遺伝子産物である融合蛋白を検出するもので、分子量に基づいた解析であることから特異的なプローブを必要とせず、多数のキメラ遺伝子産物を同時に解析可能であり、実用化に向けた準備実験を開始した。

#### D. 考察

小児の固形腫瘍では、比較的症例数が多い主な疾患については国内における遺伝子中央診断の拠点化ならびに標準的遺伝子診断法の確立や精度管理の体制はほぼ整った

と考えられる。今後は、症例数が少ない稀少な固形腫瘍についての遺伝子解析方法を確立するとともに、これらの症例の情報や検体を拠点施設に集約する方法について検討が必要と考えられる。また、マイクロアレイを用いた網羅的なゲノム構造解析は、これまでの検討でも、従来の染色対分析やアレイCGHと比較してはるかに解像度の高い解析が可能で、微細な欠失や増幅を検出できる。今後解析が進展することによって、新たな診断法開発に結びつくことが期待される。一方、マスマスペクトロメトリーを用いたキメラ遺伝子産物蛋白の検出は、これまでの遺伝子診断法とは異なり、各キメラ遺伝子に対する特異的なプローブを必要とせず、蛋白の分子情報さえあれば多数の異常について一挙に解析することが可能であり、今後その実用化に向けてさらに検討を行っていく。

#### E. 結論

小児難治性固形腫瘍のうち、主要な疾患に対する遺伝子中央診断・検体保存の体制を整備した。次年度以降は、稀少疾患の遺伝子診断に対応する体制構築について検討して行くとともに、新規遺伝子診断法開発をめざした研究を行っていく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Itagaki M, Shiozawa Y, Suzuki K, Sakaguchi S, Ktagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N.: Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in pro-B-cell development. *Exp Hematol* 34:508-518, 2006.

塩沢裕介, 北村紀子, 竹野内寿美, 田口智子, 大喜多肇, 林泰秀, 小原明, 花田良二, 土田昌宏, 藤本純一郎, 清河信敬. 4カラーデジタルフローサイトメトリーを用いた小児白血病マーカー中央診断の試み. *Cytometry Research* 16:11-17, 2006.

Suzuki K, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi T, Saito M, Shimizu T, Okita H, Fujimoto J. Characterization of monocyte-macrophage lineage cells induced from CD34<sup>+</sup> bone marrow cells in vitro. *Int J Hematology* (in press).