

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19年度 総括・分担研究報告書

平成20(2008)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治療法の標準化と 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	9
3. 遺伝子変異診断法の精度管理に関する研究 池川 志郎	13
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	15
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	18
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	21
7. 難治性先天異常症の遺伝子診断の支払い意思額 (willingness to pay値) に関わる検討 新保 卓郎	26
8. 遺伝カウンセリング体制の基盤の整備についての研究 小杉 眞司	33
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 －臨床診断と診断研究の整理の必要性和現状－ 掛江 直子	36

III. 研究成果の刊行物・別刷	43
------------------	----

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に関する研究

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、インプリンティング疾患の迅速診断法の開発、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：成育疾患遺伝子医療システムの構築（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。そして、成育疾患遺伝子医療システムと命名したインターネットサイトを成育医療センター内に設置した。これにより、ネットワークシステム構築の基盤が確立した。

2. 遺伝子診断チップの作製

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2）。これを使って、PTPN11変異が診断できることを新規患者において確認した。

3. インプリンティング疾患迅速診断法の開発：

現在判明しているインプリンティング領域から、メチル化可変領域（DMR）を同定し、27のDMRにおいてBio-COBRAという方法を用いて迅速診断法を開発した。そして、インプリンティング疾患の代表であるシルバーラッセル症候群患者60例を解析し、20例においてH19-DMRの低メチル化を見出した。さらに、個々のクロームのシーケンス(bisulfite sequencing)により、Bio-COBRA法による判定が正確なものであることを確認した。

4. 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プレート法による高速遺伝子変異スクリーニング法を、平成18年度に計30遺伝子、平成19年度に計30遺伝子において示した。さらに、この診断法により、「生殖細胞レベルで起きた遺伝異常」のみならず、「体細胞レベルで起きた異常（体細胞モザイク）」の検出を可能とするプロトコルを確立し、臨床応用した。そして、生殖細胞におけるモザイク率を明らかにすることに

5. 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、その最適化を行なった。すなわち、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。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。これにより、遺伝子診断初心者の技量評価が可能となった。

6. 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) 検査企業未対応のものを中心に、昨年度の20疾患に加え、本年度で合わせて30疾患のプローブを準備した。これらのプローブを用いての症例解析の累積実績177例の中で、陽性所見(欠失)を28例に認めた。3) 各疾患の臨床情報データシートを作成し、臨床情報をまとめる基礎を作製した。

7. 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
本邦において検査体制の整っていない希少な小児固形腫瘍に対するキメラ遺伝子検出の検査技術を整備し、特に小児腎臓がんについてその有用性を確認した。この結果、小児難治性固形腫瘍のほとんどの疾患に対する遺伝子診断技術が整備された。症例数が多い疾患については、すでに中央遺伝子診断体制が整備されているが、今後は希少な小児固形腫瘍疾患の遺伝子診断に対して今回整備した検査技術を実際に活用していく体制構築を目指す。

8. 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
これまでに行われた急性骨髄性白血病(AML)のAML99プロトコールにおける遺伝子解析結果をさらに詳細に解析し、臨床像との関係を検討した。既に開始さ

れたAML-05プロトコールでは遺伝子解析システムが確立し、前方視的研究が可能となり、形態、マーカー、染色体、遺伝子の中央診断を立ち上げた。今回は*FLT3*、*KIT*、*MLL*、*RAS*遺伝子以外に*nucleo phosphin*遺伝子と*BRAF*遺伝子の解析結果と予後との関係を明らかにし、治療成績の向上に役立てている。

9. 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
難治性先天異常症の診断のための遺伝子診断技術に関して、医療経済的検討を行うために、一般健常成人118名を対象として、contingent valuation methodにより、willingness to pay (WTP) 値を測定した。多発奇形症候群・骨系統疾患を診断する遺伝子検査と、小児白血病の治療支援のための遺伝子検査の価値(便益)を求めたところ、利用可能性(オプション価値)の測定では、WTP値はそれぞれ年間629円、854円であった。診療現場での利用に関わるWTP値は、それぞれ24.7万円、28.0万円であった。

10. 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上で、必須となっている遺伝カウンセリング体制の基盤整備のために、本分担研究では、日本国内における遺伝カウンセリング体制の基盤の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。

11. 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. 成育疾患遺伝子医療システムの構築
この設置は、臨床診断と遺伝子診断に大きく寄与し、全国の患者および医師に有用な情報を発信する拠点となる。今後、

関連学会と密接な連携を組、このシステムを円滑に運営することが重要である。

2. 遺伝子診断法の開発

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。インプリンティング疾患の迅速診断法は、インプリンティング疾患の概念が確立されてきたことに対応するものであり、さらに、生殖補助医療がインプリンティング疾患発症のリスク因子と考えられることから、今後ますます重要な診断法になると考えられる。環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、体細胞変が同定されたことは、今後、腫瘍性疾患への応用が期待される。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。これらの診断法において、種々の遺伝子変異を解析法の標準化のコントロールとして、整理できたことは、遺伝子診断初心者の方の技量評価などを介して、遺伝子診断の標準化に大きく貢献する。

3. 腫瘍性疾患の遺伝子診断整備

比較的症例数が多い主な固形腫瘍

(Ewing肉腫、横紋筋肉腫、神経芽腫、Wilms腫瘍等)については治療研究グループの主導によって国内における遺伝子中央診断体制が整備されているが、希少な小児固形腫瘍については疾患登録の制度もいまだ確立されていない。今回行った希少な小児固形腫瘍に対するキメラ遺伝子検出技術の整備により、既知の小児固形腫瘍の遺伝子診断についてはそのほとんどを成育医療センターで実施可能となった。

今回、小児のAML99プロトコールにおいて、t(8;21)-AMLのみならず全体としてもKIT遺伝子変異は予後不良因子であることが明らかになった。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、陽性例は造血幹細胞移植の対象となったが、KIT遺伝子はAML-05では付随研究として前方視的に研究し、その結果によって治療の層別化に用いるように考えている。成人では予後と相関するとする報告が多いが、治療の層別化はまだ行われていない。

4. 遺伝子診断の支持基盤の整備

医療経済的評価において、CVM法を用いて、多発奇形症候群・骨系統疾患を診断する遺伝子検査と、小児白血病の治療支援のための遺伝子検査のWTP値を求めた。今回は予備調査であるが、これらの医療技術のWTP値や予想されるB/C比は、他の重要な医療技術と同様の水準である可能性が考えられた。ただ、収入との相関が小さい点など妥当性についての懸念はある。また初期値バイアスが認められ、これらの問題点を踏まえた今後の調査を考慮する必要がある。

遺伝カウンセリングでは、現在、遺伝子診療部門を設置している医療施設が増加しており、臨床遺伝専門医の研修に必要な要件を満たす医療機関も60近く存在する。しかし、臨床遺伝専門医ならびに遺伝子診療部門担当の看護師などは、ほとんどの施設では、専任ではなく兼任であることから、遺伝子医療の進歩に伴い増加が予想される遺伝カウンセリングなどの遺伝医療には時間的な制約等から対応が困難となるものと考えられる。この事態に対応すべく、各地で認定遺伝カウンセラーの養成が進められているが、受け入れ側の医療施設としても、チーム医療としての遺伝カウンセリング体制を整え、明確な役割分担を行う中で認定遺伝カウンセラーが十分に活動を行える環境を整備することが望まれる。

倫理基盤では、代諾が主なる小児領域における問題や同胞発症などに配慮した書式の整備が必要である。

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、成育疾患遺伝子医療システムの構築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。

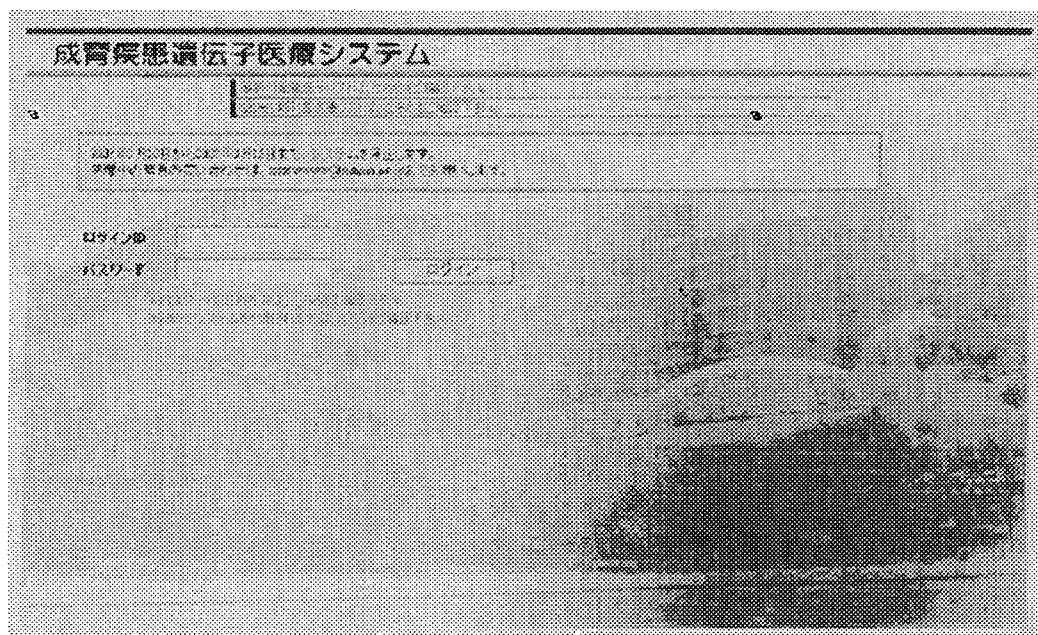


図1. 成育疾患遺伝子医療システムのホームページ

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、以下のことを行った。第1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、遺伝子解析を開始したことである。第2は、インプリンティング疾患の解析が重要と考えられるため、発現パターンと密接に関連するメチル化可変領域（DMR）のメチル化パターン解析法を27のインプリンティング領域を対象として開発を開始し、既に大多数の領域において終了したことである。第3は、成育疾患遺伝子医療システムと命名した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成育医療センター内に設置したことである。

A. 研究目的

（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開発する。（2）インプリンティング疾患の迅速診断法を開発する。（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。

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、易腫瘍発症製を有する先天奇形症候群であり、かつ、変異のほぼ全てがミスセンスタイプであり、遺伝子診断チップで診断できない欠失・挿入変異ではないことが判明している疾患を対象とする。インプリンティング疾患の迅速診断法では、インプリンティング遺伝子の発現パターンと密接に関連するメチル化可変領域（DMR）の定量的判定法を開発する。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、成育医療センター内に設置する方向としたを。

（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：易腫瘍発症製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）。これを使って、PTPN11変異が診断できることを新規患者において確認した。

2. インプリンティング疾患迅速診断法の開発：現在判明しているインプリンティング領域から、メチル化可変領域（DMR）を同定し、27のDMRにおいてBio-COBRAという方法を用いて迅速診断法を開発した。そして、インプリンティング疾患の代表であるシルバーラッセル症候群患者60例を解析し、20例においてH19-DMRの低メチル化を見出した。さらに、個々のクローンのシークエンス(bisulfite sequencing)により、Bio-COBRA法による判定が正確なものであることを確認した（図2）。

3. インターネットサイトの構築：成育疾患遺伝子医療システムと命名した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成育医療センター内に設置した。これにより、ネットワークシステム構築の基盤が確立した。

D. 考察

遺伝子診断チップの作製およびインプリンティング疾患の迅速診断法の開発は、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。成育疾患遺伝子医療システムの構築は、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

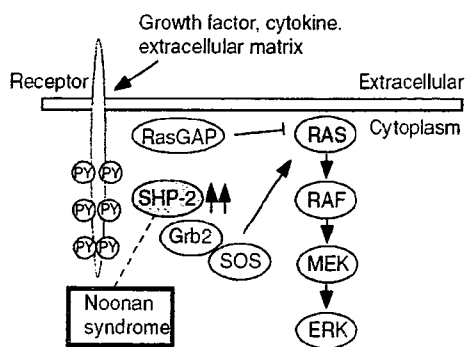
ヌーナン症候群および類縁疾患を対象として19遺伝子を解析できるチップを完成させ、遺伝子解析を開始した。インプリンティング疾患の迅速診断法を開発した。成育疾患遺伝子医療システムと命名した全国の小児内分泌医師、小児遺伝医師、小児泌尿器医師を対象として、臨床診断および遺伝子診断のディスカッションができるインターネットサイトを成育医療センター内に設置した。

F. 研究発表

1. 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* 156 (2):167–171, 2007.
2. 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 α gene in male genital and reproductive abnormalities. *Human Reproduction* 22(5):1279–1284, 2007.
3. 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* 24 (4): 131–136, 2007.
4. Ogata T, Tanaka T, Kagami M. Target height and target range for the Japanese children: revisited. *Clinical Pediatric Endocrinology* 16 (4): 85–87, 2007.
5. Yamamoto K, Yoshida R, Ogata T. *KRAS* analysis in 34 *PTPN11* mutation negative Noonan syndrome patients. *Clinical Pediatric Endocrinology* 16 (4): 99–101, 2007.
6. Seishima M, Mizutani Y, Shibuya Y, Arakawa C, Yoshida R, Ogata T. Malignant melanoma in a female with LEOPARD syndrome: identification of a germline *PTPN11* mutation of and a somatic *BRAF* mutation. *British Journal of Dermatology* 157 (6): 1297–1299, 2007.
7. Suzuki K, Haraguchi R, Ogata T, Barbieri O, Alegria O, Vieux-Rochas M, Nakagata N, Ito M, Mills A, Kurita T, Levi G, Yamada G. Abnormal urethra formation as a model for hypospadias of the split-hand-foot malformation (SHFM). *European Journal of Human Genetics* 16 (1): 36–44, 2008.
8. Yamazawa K, Kagami M, Ogawa M, Horikawa R, Ogata T. Placental hypoplasia in maternal uniparental disomy for chromosome 7. *American Journal of Medical Genetics A* 146 (4): 514–516, 2008.
9. Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Tanaka Y, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaki K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T. Deletions and epimutations affecting the human chromosome 14q32.2 imprinted region: implications for the phenotypic development in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Nature Genetics* 40 (2): 237–242, 2008.
10. Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka N, Hino T, Ogura A, Ogata T, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Suzuki-Migishima R, Takashi Kohda Essential role of *Rtl1* in the fetomaternal interface of mouse placenta. *Nature Genetics* 40 (2): 243–248, 2008.
11. Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F, Katsumata N, Baba T, Morohashi K, Laporte J, Kitagawa M, Ogata T. *CXorf6* (*MAMRI*: mastermind-related 1) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the target sequence for SF-1. *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5525–5532.
12. Yoshida R, Ogata T, Masawa N, Nagai T. Hepatoblastoma in a patient with *PTPN11* mutation positive Noonan

- syndrome. *Pediatric Blood & Cancer* (in press).
13. Sugawa F, Wada Y, Okada M, Maruyama T, Uchida H, Arase T, Hamada N, Ishizuka B, Ogata T. Premature ovarian failure and androgen receptor gene CAG repeat lengths weighted by X chromosome inactivation patterns. *Fertility and Sterility* (in press).
 14. Fukami M, Dateki S, Kato F, Hasegawa Y, Mochizuki H, Horikawa R, Ogata T. Identification and characterization of cryptic *SHOX* intragenic deletions in three patients with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Journal of Human Genetics* (in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況
本年度は該当なし



PTPN11
Grb2
SOS1,2
N,H,E, KRA
S
A,B,CRAF
MEK1,2
ERK1,2

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

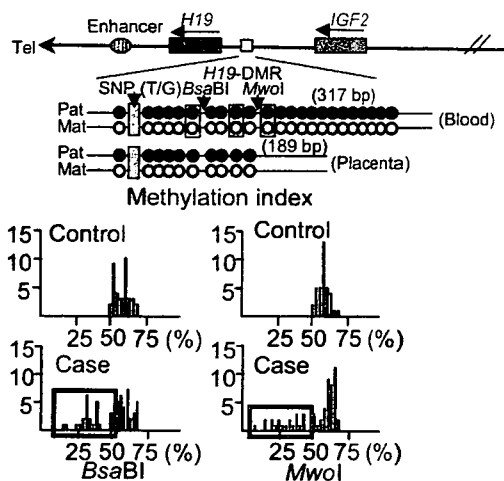


図2. シルバーラッセル症候群におけるH19-DMRのメチル化パターン解析。患者60例中、赤で示す20例のメチル化パターンは、正常対象の範囲よりも低い。

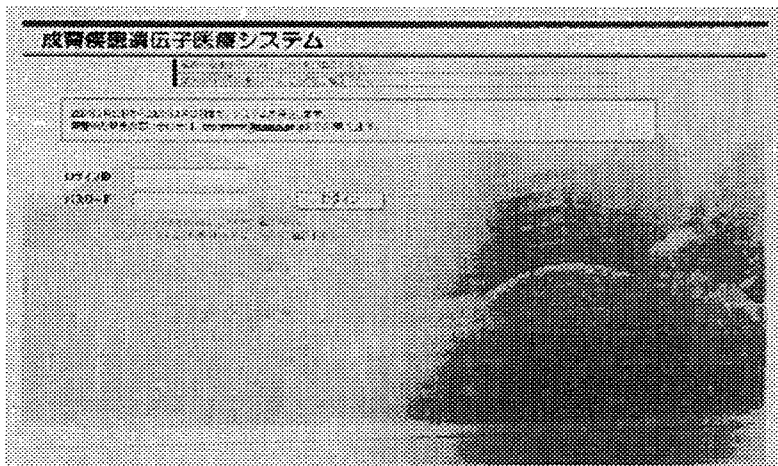


図2. 成育疾患遺伝子医療システムのホームページ

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

難治性先天異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究

分担研究者 小崎 健次郎
慶應義塾大学小児科学教室 准教授

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。今年度は、疾患可能な疾患のレパートリーを拡大した。当該検査手法を用いる場合、「生殖細胞レベルで起きた遺伝異常」は検出し得るが、「体細胞レベルで起きた異常（体細胞モザイク）」の検出が可能かどうか十分な検討は行われていない。本研究でわれわれは、体細胞モザイクを検出するプロトコルを確立し、臨床応用した。

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おり、検査が可能な疾患を増やすことが課題となっていた。

また、当該検査手法を用いる場合、「生殖細胞レベルで起きた遺伝異常」は検出し得るが、「体細胞レベルで起きた異常（体細胞モザイク）」の検出が可能かどうか十分な検討は行われていないことも課題となっていた。

本研究でわれわれは、分子レベルでのハプロタイプ解析を応用して、「体細胞レベルで起きた異常（体細胞モザイク）」を検出するプロトコルを確立し、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

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。

また、遺伝子検査のコストの低減のために、自動分注器の使用を推進した。これまでの研究により、PCR反応以降のステップはほぼ自動化されたが、PCR反応のセットアップは技師が手動的に実施していた。今年度の研究では、one-head typeの自動分注器を導入し、当該ステップの自動化・効率化を図った。

② 体細胞モザイクの検出

- i) 同定された変異の近傍にSNPを同定し、変異とSNPを同時に増幅するPCRプライマーを設計する。
ii) PCR産物をサブクローニングし、各クローンの遺伝子配列を決定する。

3種類以上のハプロタイプに相当するクローンが検出されれば、体細胞モザイクであったことが明らかとなる。

③ 遺伝子検査の感度に関するレビュー

診療利用を前提として遺伝子検査をおこなう際に、感度・特異度に関する情報を患者や主治医に渡すことは重要である。国内外の最新の文献を検討し、主たる先天性奇形症候群の感度・特異度に関する情報について検討した。

(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、個人情報を厳重に管理した。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、先天異常症候群を中心に下記の10 遺伝子についてのCOPPERプレート群を開発した。

- ・ EVC (Ellis-van Creveld症候群)
- ・ LMNA (Progeria)
- ・ ALDH3A2 (Sjogren-Larsson症候群)
- ・ SGOL1
- ・ RAD21
- ・ MRPL23
- ・ RSK2 (Coffin-Lowry症候群)
- ・ FGF10 (LADD症候群)
- ・ ENG (遺伝性毛細血管拡張症)
- ・ ACVRL1 (遺伝性毛細血管拡張症)

② 体細胞モザイク症例の検出

EEC症候群についてのP63遺伝子の体細胞モザイクの症例(世界初例)を同定し、報告した。当該症例では、体細胞にモザイクが存在するばかりでなく、

精子細胞にもモザイクが存在することが明らかになった。

精子細胞におけるモザイク率を明らかにすることにより、次子の発症リスクについてより正確な予測を行うことが可能になった。

③ 遺伝子検査の感度に関するレビュー

主たる先天性奇形症候群の感度・特異度に関する情報をについて検討し、添付の表に要約した。

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。

「単一エクソンの大きさより小さな質的な遺伝子異常」の検出において、PCR反応の調整と反応的分注>PCR>DHPLC>判定のステップにしたがって検査が進められる。今年度は、プログラム可能な自動分注器の利用により、検査の全プロセスの自動化が実現した。解析コストの低減を通じて、遺伝子検査の臨床応用に貢献するものと期待される。

子が常染色体優性遺伝性疾患で、両親に症状がないとき、一般には次子のリスクは低いと予測される、しかし、両親のどちらかが体細胞モザイクを有しているとき、無視できないリスクが存在する。今回示した方法によれば、体細胞モザイクの有無を評価することが可能になる。

昨今、特定の遺伝子に関する遺伝子検査が、研究を目的とするものであるか、診療を目的とするものであるかを区別する必要がある。研究を目的とすると考えられる場合、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針(以下ゲノム指針)に基づく倫理委員会による審査が必要となるからである。しかし、両者を厳密に区別することは困難である。ゲノム指針に関する倫理指針Q&A(平成17年3月18日)というウェブサイト由政府による想定質問と公的見解が記載されている。

(<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/genome/0504qa.html>)

「Q:『医学的に確立されている臨床検査』は本指

針の対象とならないとされていますが、『医学的に確立』とは、どのような基準で判断すればよいのでしょうか」

これに自問自答する形で

「A: 『医学的に確立』されているとは、例えば医療保険適用となっている、学会においてガイドラインで示されているなど、一般的に当該検査の妥当性が認められている場合であり、探求的な位置づけで行われるものはこれには該当しません。このような当該検査の社会的評価及び位置づけを踏まえ、総合的に判断するものと考えます」

と記載されている。

ここで、医療保険適用となっている遺伝子検査は現在のところごく僅かであることから、学会等でガイドラインを発行して行くことが必要と思われる。本研究で示した如き、感度・特異度に関する情報は、ガイドラインを策定する上で有用な情報となると期待される。

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

Izumi K, Yamashita Y, Aramaki M, Kosaki R, Hosokai N, Takahashi T, Kosaki K. Neocentromere marker chromosome of distal 3q mimicking dup(3q) syndrome phenotype. *American Journal of Medical Genetics* in press.

Izumi K, Nakano M, Kosaki K, Kosaki R, Hosokai N, Matsumoto H, Hasegawa T, Takahashi T, Kosaki K. Two distinctive mechanisms leading to disruption of the SHOX transcription unit in a single family. *American Journal of Medical Genetics* 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 11:216-27, 2007

Naito Y, Higuchi M, Koinuma G, Aramaki M, Takahashi T, Kosaki K. Upper airway obstruction in neonates and infants with CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 143:1815-1820, 2007

Kosaki R, Fujimaru R, Samejima H, Yamada H, Izumi K, Iijima K, Kosaki K. Wide phenotypic variations within a family with SALL1 mutations: Isolated external ear abnormalities to Goldenhar syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 143: 1087-90. 2007

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* 36:258-260, 2007

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* 47:49-52, 2007

Kosaki R, Okuyama T, Tanaka T, Migita O, Kosaki K. Monozygotic twins of Smith-Magenis syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 143:768-769. 2007

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*, 143:721-726, 2007

2. 学会発表

Izumi K, Morinishi Y, Hattori M, Kosaki K. Hypomethylation of H19 differentially methylated region in a patient with a 46,XX,t(8;11)(q24.1;p15.4)pat karyotype and a Silver-Russell syndrome phenotype. The 57th American Society of Human Genetics, October 2007, San Diego, California.

Kosaki R, Uno M, Mizuguchi K, Abe Y, Nagasawa T, Migita O, Tanaka T, Okuyama T, Kosaki K, Oka A. Cerebral infarction in a 3-year-old patient with progeria. The 57th American Society of Human Genetics, October 2007, San Diego, California.

Yoshihashi H, Takamura L, Yokoyama T, Furuya N, Kurosawa K, Izumi K, Kosaki K. A Japanese infant with ARC syndrome and tracheobronchomalacia. The 57th American Society of Human Genetics, October 2007, San Diego, California.

Kosaki K., Izumi K, Aramaki M, Kosaki R. Neocentromere marker chromosome of distal 3q mimicking dup(3q) syndrome phenotype. The 57th American Society of Human Genetics, October 2007, San Diego, California.

Silao, CLT, Samejima H, Torii C, Padilla C, Kosaki K, Matsuo M. Maple syrup urine disease: Mutation analysis in Filipino patients using the COPPER plate system. The 57th American Society of Human Genetics, October 2007, San Diego, California.

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

難治性先天異常症の克服に向けた包括的遺伝子医療体制の確立に関する研究

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。その結果でき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

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）、先天性化骨性筋炎、蝸牛様骨盤異形成症（Schneckenbecken dysplasia）などの疾患遺伝子が既知、又は未知の骨系統疾患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。その結果でき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日文部科学省・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の疾患遺伝子SBDSや先天性化骨性筋炎の疾患遺伝子ACVR1の変異を同定した。

2. 致死性の骨系統疾患である蝸牛様骨盤異形成症の原因遺伝子SLC35D1(solute carrier 35D1)を世界に先駆けて発見した。

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

適応できる。

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

1. Hiraoka S, Furuichi T, Nishimura G, Shibata S, Yanagishita M, Rimoin DL, Superti-Furga A, Nikkels PG, Ogawa M, Katsuyama K, Toyoda H, Kinoshita-Toyoda A, Ishida N, Isono K, Sanai Y, Cohn DH, Koseki H, Ikegawa S: Nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human, *Nat Med* 13(11):1363-7, 2007.
2. 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: The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome gene mutations cause a neonatal form of spondylometaphyseal dysplasia (SMD) resembling SMD Sedaghatian type. *J Med Genet* 44(4):e73, 2007.
3. Miyamoto Y, Matsuda T, Kitoh H, Haga N, Ohashi H, Nishimura G, Ikegawa S: A recurrent mutation in type

II collagen gene causes Legg-Calve-Perthes disease in a Japanese family. *Hum Genet* 121(5):625-9, 2007.

4. Yabuki S, Kikuchi S, Ikegawa S: Spinal extradural arachnoid cysts as sociated with distichiasis and lymphedema. *Am J Med Genet A* 143(8):884-7, 2007.

2. 学会発表

1. Ikegawa S, GDF5 and OA-of Human and of Mouse, 8th Meeting of the International Skeletal Dysplasia Society, France, July 2007. 2. Ikegawa S, Phenotypic extension of SBDS mutations, 8th Meeting of the International Skeletal Dysplasia Society, France, July 2007.

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に関する研究

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診断体制の整備のために、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（76疾患・遺伝子座）、代表的疾患のプローブ調整を進めてきた。検査企業未対応のものを中心に、昨年度の20疾患に加え、本年度で合わせて30疾患のプローブを準備した。これらのプローブを用いての症例解析の累積実績177例の中で、陽性所見（欠失）を28例に認めた。その疾患は、Alagille症候群、WAGR症候群、Langer-Giedion症候群、神経線維腫症I型、Sotos症候群、Tiez症候群、Gorlin症候群、全前脳胞症、多発性骨癒合症候群、Leri-Weil症候群であった。これらの陽性例の蓄積は陽性コントロールとして今後の解析の精度管理にも寄与するものである。今後は本班のシステムによる国内からの診断ニーズへの対応へと進みたい。

A. 研究目的

先天性・遺伝性疾患が染色体微細欠失を原因として発症する場合がある。LCR (low copy repeat) に基づく欠失はその成り立ちから疾患の原因に占める欠失の割合が概ね高い。これらいわゆる染色体微細欠失症候群と称し、検査企業ベースでの診断体制が整えられている。しかしながら、LCRに惹起されない（すなわち通常は遺伝子内変異が主体であって、欠失を原因とする割合が高くない）疾患であっても、ハプロ不全をその発症機序とする疾患は染色体欠失に伴って発症している可能性がある。その場合、遺伝子内のエクソン単位のシーケンスでは異常が検出されず、責任遺伝子領域を含むクローンを用いたFISH解析がその診断に有効である。本研究は、これらのハプロ不全疾患についての包括的なFISH診断体制の構築を目指すものである。昨年度、このハプロ不全で発症し得る常染色体優性遺伝性疾患として76疾患・遺伝子座をリストアップし、その代表的疾患についての診断プローブの調製を20疾患について行な

った。本年度は更に対応疾患を拡充するとともに、実際の症例の解析を通しての診断実績を積みあげる。

B. 研究方法

- 1) リストアップしたハプロ不全疾患のリストから既にプローブを調製した20疾患に加え、更に10疾患を選択し責任遺伝子領域を含むクローンを診断プローブとして調製する。
- 2) これらの計30疾患について、実際に症例におけるFISH解析を進めていく。

（倫理面への配慮）

染色体・FISH解析にあたっては埼玉県立小児医療センター倫理委員会で承認を受けた書式によるインフォームドコンセントに基づいて行なっている。

C 研究結果

1) 新たに調製した10疾患を加え、現在までに診断プローブを準備している30疾患は下記である。

Van der Woude症候群：

IRF6(1q32-q41)；Mowat-Wilson症候群：ZFHX1B(2q22)；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)；Brachmann-De Lange症候群：NIPBL(5p13)；Sotos症候群：NSD1(5q35)；Weaver症候群：NSD1(5q36)；Cleidocranial dysostosis：RUNX2(6p21)；Pallister-Hall 症候群：GLI3(7p13)；Saethre-Chatzen症候群：TWIST(7p21-p22)；CHARGE症候群：CDH7(8q12.1)；Melnick-Fraser症候群：EYA1(8q13.3)；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)；Gorlin症候群：PCTH(9q22.3-q31)；多発性外骨腫II型：EXT2(11p11-p12)；WAGR症候群：WT1(11p13)/PAX6(11p13)；Stickler症候群/先天性脊椎骨端異形成症：COL2A1(12q13)；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)；Waardenburg症候群IV型：SOX10(22q13)；Leri-Weill Dyschondrosteosis：SHOX(Yp/Xp)。

2) これらのプローブを用いての症例解析：FISH解析の累積実績（臨床診断確定例のみではなく疑診例の解析を含む）は177例で、そのうち陽性所見（欠失）を28例に認めた。その疾患は、Alagille症候群（8例中3例が陽性）、無虹彩症（18例中8例：WAGR症候群）、Langer-Giedion症候群（2例中2例）、神経線維腫症I型（82例中6例）、Sotos症候群（27例中3例）、Tiez症候群（2例中1例）、Gorlin症候群（1例中1例）、全前脳胞症（3例中1例：SIX3欠失）、多発性骨癒合症候群（1例中1例）、Leri-Weill症候群（16例中2例）であった。

これらの陽性例の蓄積は陽性コントロールとして今後の解析の精度管理にも寄与するものである。

D. 考察

ハプロ不全疾患について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。更に、今後FISHでは検出困難であって、定量PCRやMLPA法あるいはarray-CGHによってのみ同定しうる、エクソン単位レベルの欠失の解析も合わせてシステム化することによってハプロ不全発症疾患の高精度な診断システムの構築が期待できる。従来から保険適応であるところの染色体異常症の染色体検査の精度（確定診断率）の向上によって、診断不明が故の多くの（不必要な）検査の回避と、早期からの適切な医療介入が期待できる。

E. 結論

FISH解析対象疾患リストから合計30疾患・遺伝子座の診断プローブを準備した。これらの疾患（疑い例も含む）の患児177例の解析において陽性所見（欠失）を28例に認めた。今後は本班のシステムによる国内からの診断ニーズへの対応へと進みたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hachiya R, Ohashi Y, Kamei Y, Suganami T, Mochizuki H, Mitsui N, Saitoh M, Sakuragi M, Nishimura G, Ohashi H, Hasegawa T, Ogawa Y.: Intact kinase homology domain of natriuretic peptide receptor-B is essential for skeletal development. J Clin Endocrinol Metab 92:4009-14, 2007

2) Sakazume S, Okamoto N, Yamamoto T, Kurosawa K, Numabe H, Ohashi Y, Kako Y, Nagai T, Ohashi H. GPC3 mutations in seven patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. Am J Med Genet A143:1703-7, 2007

3) Shimizu R, Mitsui N, Mori Y, Cho S, Yamamori S, Osawa M, Ohashi H.: Cryptic 17q22 deletion in a boy with a t(10;17)(p15.3;q22) translocation, multiple synostosis syndrome 1, and hypogonadotropic hypogonadism. Am J Med Genet A (in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況