

200822004A・B

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～20年度 総合研究報告書

平成20年度 総括・分担報告書

平成21(2009)年 3月

研究代表者 緒方 勤

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～20年度 総合研究報告書

平成20年度 総括・分担報告書

平成21(2009)年 3月

研究代表者 緒方 勤

目 次

I 総合研究報告

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 平成18年度～20年度 まとめ

研究代表者 国立成育医療センター研究所 緒方勤

II 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 平成20年度 まとめ

研究代表者 国立成育医療センター研究所 緒方勤

III 研究分担報告

- 1 高速遺伝子変異スクリーニング法の開発に関する研究

慶應義塾大学 小崎健次郎

- 2 遺伝子変異診断法の精度管理に関する研究

理化学研究所 池川志郎

- 3 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

埼玉県立小児医療センター 大橋博文

- 4 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精度管理に関する研究

国立成育医療センター研究所 清河 信敬

- 5 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に関する研究

群馬県立小児医療センター 林 泰秀

- 6 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) に関わる研究

国立国際医療センター研究所 新保卓郎

- 7 遺伝カウンセリング体制の基盤の整備についての研究

京都大学 小杉真司

8	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 —小児稀少遺伝性疾患の診療情報ネットワークにおける個人情報保護に関する研究—	48
	国立成育医療センター研究所 掛江直子	
9	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	52
	国立成育医療センター研究所 緒方勤	
IV	研究成果の刊行一覧表	55
V	研究成果の刊行物・別刷り	63

總 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

研究代表者 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応用、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、小児遺伝学会および小児内分泌学会における遺伝子診断委員会の設置、NPO法人オーファンネットジャパンとの連携、遺伝カウンセラーの実態調査、医療経済的基盤の検討、成育疾患遺伝子医療システムの構築が行われた。

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。また、関連学会と連携し、臨床診断コンサクタントとして活動する専門医の登録を開始した。

2. 遺伝子診断チップの作製

易腫瘍発症型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。これを使って、PTPN11変異が診断できることを多くの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、様々な疾患を解析する過程で、世界初的全染色体母親性ダイソミー患者と、世界で6例目となる全染色体父親性ダイソミー患者を同定した。

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開発し、約100件の遺伝子検査を実施した。検体の收受・検査前後の遺伝カウンセリングも含め、実施に際して特段の問題は発生していない。そして、平成20年12月に、厚生労働省に対して先進医療としての認可を申請した。その後、記載内容について修正すべき点についての指摘を受け、現在、修正を行っているところである。

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。

また、この過程において、複数の疾患において新規変異の同定がなされた。

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)、昨年度までに代表的疾患として30疾患のプローブを調整した。本年度はこれにCurrarino症候群(HLXB9)のプローブも追加した。さらに、染色体端部(サブテロメア)領域の微細構造異常スクリーニングの精度管理も検討した。原因不明の発達障害・多発奇形の46例中6例(13%)にサブテロメア領域の不均衡を検出した。しかし、そのうちの少なくとも2例は正常変異であると判定した。サブテロメア領域の微細異常スクリーニングはあくまで一次スクリーニングであり、BAC-FISH・CGH-arrayでの異常領域の範囲評価に加え、CNVデータベース参照と両親

の解析を含めた総合判断が診断精度管理上必須であることが示された。

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。ほとんどの小児固形腫瘍疾患に対するキメラ遺伝子検出の検査技術が整い、症例数が多い主要疾患については、実際に中央診断が実施されている。

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。現在進行しているAML-05プロトコールでは遺伝子解析システムが確立し、我々がみ出した*FIT3-ITD*の有無で治療の層別化を行なっている。さらに前方視的研究として形態、マーカー、染色体、遺伝子解析結果を用いた中央診断を立ち上げこれまでに100例以上の検討を行なっている。今回はさらに*WT1*遺伝子の発現と変異および*NPM1*遺伝子変異解析の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遺伝子診断技術に関して、医療経済的検討は従来から十分には行われていない。本調査ではwillingness to pay (WTP)法を用いて、難治性先天異常症を診断する遺伝子検査の価値(便益)を求めた。一般健康成人324名を対象として、contingent valuation method法によりWTP値を測定した。初期提示額を1,000円、10,000円、100,000円とするダブルバウンド法を用いた。合わせて比較のために他の医療技術についてもWTP値も求めた。WTP値は頭きり裾きり平均値で、約38万円であった。年収との相関もあり、妥当性は昨年度のパイロット調査時より改善していた。

さらに、解析コスト負担の窓口として、本年8月から稼働しているNPO法人オープンネットジャパンと連携することを確認した。

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、遺伝カウンセリング登録施設が存在しない県が10存在することが判明した。今後、楽器横断型の実態調査と、遺伝カウンセラーリストの公開が必須と考えられた。

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。

12. 関連学会との連携

小児遺伝学会と連携して遺伝子診断委員会を、小児内分泌学会と連携して性分化委員会、遺伝子診断予備委員会、希少疾患研究予備委員会を設置した。これにより、学会と協調して臨床的遺伝子診断を進める基盤が整備された。また、委員会として、学会指針の原案を提出した。

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み、このシステムを円滑に運営することが重要である。そのための基盤整備が進んでいると考えられる。

2. 遺伝子診断法の開発

遺伝子診断チップの作製、インプリンティング疾患の解析、高速変異スクリーニング法の開発、FISHプローブの開発、腫瘍性疾患の診断法の開発など、この領域は初期の目標を凌駕する成果が挙げら

れたと考えられる。また、精度管理の体制も確立したと考えられる。

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、昨年よりも正確なデータが得られ、このコストは現実の遺伝子診断を進めるうえで充分維持可能なものである。また、NPO法人オーファンネットジャパンとの連携は、具体的なコスト負担への窓口として期待される。

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、遺伝カウンセリング登録施設が存在しない県が10存在する大きなばらつきが存在が明確となってきた。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、遺伝カウンセラーリストの公開が必要であると考えられる。

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。

学会との連携が進み、試案を提出できたことは、今後の全国規模の遺伝子診断を大きく推進すると期待される。

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、学会とノの連携により進められた。

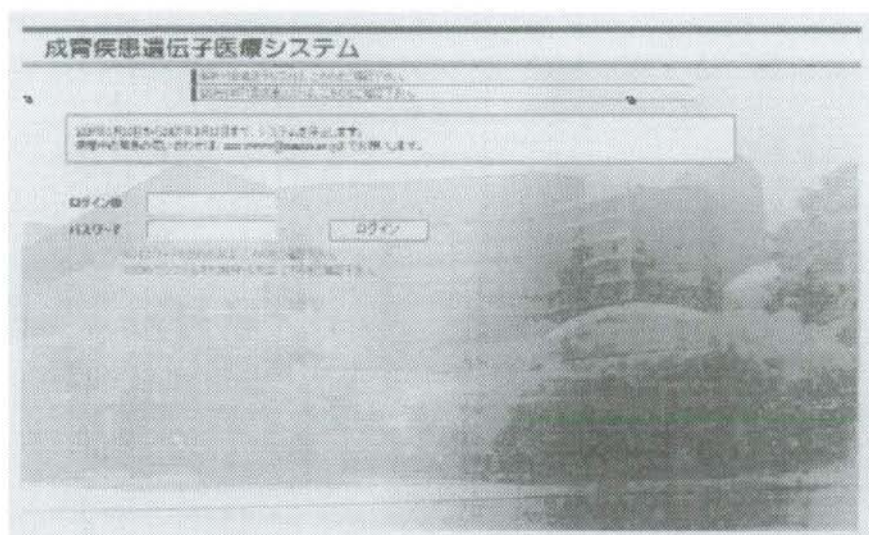


図1. 成人疾患遺伝子医療システムのホームページ

研 究 分 担 報 告

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

研究分担者 小崎 健次郎 慶應義塾大学小児科学教室 准教授

研究要旨

ゲノム科学の成果を医療に応用する場合の最も直接的な用途は稀少遺伝性疾患の遺伝子検査である。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検査も可能である。本年度も、熱変性高速液体クロマトグラフィーの利用により 100 件余の遺伝子検査を実施した。検査前後のカウンセリングも含めて問題なく検査を実施した。技術的な側面からは遺伝子診断の臨床応用の準備は整ったと考えられる。並行して稀少遺伝性疾患の遺伝子検査を安定的に提供する「持続可能なシステム」を構築するための方法について検討した。まず、マルファン症候群の遺伝子検査について、先進医療としての申請準備をおこなった。次に、米国における、遺伝子診断の臨床応用に対する国家的補助事業である CETT プログラム (Collaboration and Education in Test Translation) の現況と問題点について検討した。CETT プログラムからの補助金の交付条件に「当該遺伝子の遺伝子検査の実施について患者団体から希望がある」「遺伝子変異と臨床症状の関連についての情報をデータベースとして公開すること」が含まれている。わが国においても、臨床的な遺伝子検査システムを構築・運営・拡張する上で、重要な概念であると思われた。今後は、各種遺伝子検査の実施を先進医療としての申請を進めるとともに、NPO 等の行政・企業以外の団体による遺伝子検査支援活動を利用して、遺伝子検査の普及を図って行くことが望まれる。

A. 研究目的

ゲノム科学の成果を医療に応用する場合の最も直接的な用途は稀少遺伝性疾患の遺伝子検査である。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検査も可能である。しかし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る。本研究の分担研究者は、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) を利用することにより、遺伝子診断を幅広く臨床応用する可

能性を示した。検査が可能な稀少遺伝性疾患の種類は未だ少なく、より多くの疾患について標準的な遺伝子検査のプロトコルを決める作業が必要である。

上述のごとく、技術的な側面からは遺伝子診断の臨床応用の準備は整ったが、稀少遺伝性疾患の遺伝子検査の診療現場への導入は進んでいない。稀少遺伝性疾患の遺伝子検査の潜在的な供給者である臨床検査会社と大学病院等の検査施設が抱える問題点は以下の通りである。臨床検査会社が、稀少な疾患の検査系を新たに立ち上げるには高額な初期投資が必要となる。ところが稀少遺伝性疾患の各疾患の発症頻度は極めて低いために、検査の依頼件数は限定さ

れる。すなわち稀少遺伝性疾患の遺伝子検査の実施は臨床検査会社にとって費用対効果が低い。

大学病院などの検査施設の場合には、すでに幾つかの疾患について検査系を確立しており高額な初期投資は必要とならない。しかし同一の遺伝子の検査を長期にわたって安定供給する人的資源・経済的資源がない。現行のシステムでは検査を実施するための財源は研究補助金に限られている。一般にある疾患の疾患遺伝子が明らかにされると、その疾患に対する研究内容が細胞生物学的な分析に移行したり、研究の対象が検査実施が別の疾患に変更されうるなどの理由により、患者を対象とした遺伝子変異解析は余り行われなくなるのが現状である。また、新たに稀少遺伝性疾患について検査系を立ち上げようとする場合には、前述の臨床検査会社と同様の課題が存在する。

本研究では、DHPLC-COPPER プレート法による遺伝子検査法の開発を継続するとともに、検査施設による遺伝子検査の安定的に供給させるための方法を検討する。

B. 研究方法

i) 遺伝子検査システムの開発

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。

ii) 先進医療をもちいた遺伝子診断の実施体

制の整備

検査施設が臨床検査として遺伝子検査を安定的に提供できるシステムを維持するための方策の一つとして、マルファン症候群の遺伝子検査について、先進医療としての申請準備をおこなった。分担研究者の所属施設は心臓血管外科の大動脈手術や整形外科の側弯症手術の件数が多く、これらの疾患を主要合併症とするマルファン症候群の患者の受診者数が多い。これらの患者・家族の多くが遺伝子検査を希望している。また患者・家族の会にも遺伝子検査の実施の要望が強い。1991年にマルファン症候群の原因遺伝子としてフィブリリン 1 遺伝子が同定され、臨床診断基準によらず、遺伝子診断によってマルファン症候群を確定診断することが可能になった。しかしフィブリリン 1 遺伝子の遺伝子サイズは大きく、一般的な遺伝子診断法である全エクソン・シーケンシング法によれば遺伝子診断の実施に多額のコストがかかることが問題となっていた。本研究を通じて、熱変性高速液体クロマトグラフィーを用いた方法により、検査の感度を損なうことなくコストの低減を図りうることが示した成果を受け、先進医療の枠組みを用いて有料で遺伝子検査を提供する事を計画した。分担研究者の所属施設の倫理委員会に承認を得て、厚生労働省へ先進医療として申請中した。

iii) 米国における遺伝子検査提供の枠組み

米国においても、臨床応用を前提とした遺伝子検査システムの確立に向けて、NIH を主導とした様々な試みが行われている。遺伝子検査の臨床応用というテーマは純粋に学術的なテーマとは云えず、学術集会では情報を収集することが容易ではない。そこで米国の臨床遺伝専門医の職能団体 American College of Medical Genetics を通じて、NIH を中心とする米国政府の取り組みについて情報収集を行った。

(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

i) 遺伝子検査システムの開発

DHPLC-COPPER プレート法による、稀少遺伝性疾患遺伝子診断の解析法を整備し、約 100 件の遺伝子検査を実施した。検体の収受・検査前後の遺伝カウンセリングも含め、実施に際して特段の問題は発生していない。

ii) 先進医療をもちいた遺伝子診断の実施体制の整備

受益者負担の原則にしたがって遺伝子診断を実施するための体制の実現にむけ、マルファン症候群の遺伝子診断の実施について、厚生労働省へ先進医療としての申請をおこなった。申請が承認されれば、マルファン症候群の患者が遺伝子診断を希望する際に、分担研究者の所属する施設を受診し、必要な実費を支払えば遺伝子検査を受けられるようになる。

検査の実施について分担研究者の所属施設の倫理委員会に上申した。本件の倫理申請においては、当該検査の実施計画が「臨床研究計画」あるいは「医療計画」のいずれに該当するか検討がなされた。「臨床研究計画」に該当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) に基づく検査の実施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。海外ではマルファン症候群の遺伝子検査は臨床検査として提供されていることに鑑み、とくに、臨床的有用性が確立された遺伝子診断を収載している NIH のウェブサイト GeneReview に掲載されていることから、『医学的に確立』されていると考えて良いと判断される。

平成 20 年 12 月に、厚生労働省に対して先進医療としての認可を申請した。その後、記載内容について修正すべき点についての指摘を受け、現在、修正を行っているところである。

iii) 米国 NIH の取り組み

稀少遺伝性疾患 Ultrarare or orphan genetic disorder の遺伝子解析を研究から精度の高い臨床検査へ移行させる場合に障害があることは米国では 1994 年頃から認識され 1994 年頃から検討が行われている。NIH ではこの問題の解決を「Office of Rare Diseases (以下 ORD)」が担当をしている。なお、米国における稀少遺伝性疾患の定義は米国内で患者総数が 2000 人未満の疾患とされており、わが国と米国の人口比率を考慮すると、わが国ならば、

患者総数が1000人未満の疾患と位置づけられよう。

ORDは遺伝子検査の臨床応用が遅れている状況の解決と臨床検査に移行する場合の品質の保証を目的として、2006年に多年度事業としてCETTプログラム(Collaboration and Education in Test Translation)事業を立ち上げた。具体的には、幾つかの稀少遺伝性疾患を公募し、その原因遺伝子の標準的な検査系を立ち上げるための補助金を支給している。補助金支給額は1エクソンあたり約10万円であり、遺伝子の大きさに応じて支給額が増額される。

CETTプログラムでは補助金の交付の可否を判定する際に幾つかの条件を設定している。①検査対象となる遺伝子が、疾患の主要な原因遺伝子であり、しかも変異陽性率が高い。②当該遺伝子の遺伝子検査の実施について患者団体から希望がある。③遺伝子変異と臨床症状の関連についての情報をデータベースとして公開する。

補助の申請は随時受け付けられ、審査は毎月おこなわれている。申請後、2~3ヶ月の間に採用の可否が通知されている。2007年までの1年間で30件の応募があり、27件が認められた。臨床検査会社も補助を申請することができる。なお、一つの遺伝性疾患については単一の検査施設(Central Laboratoryと称する)のみに補助金を与えている。多数の検査施設が稀少遺伝性疾患の検査を担当する場合には、各検査施設が取り扱う検査件数が少なくなりすぎ、検査の品質管理に問題が生じることを懸念した考え方である。

補助金が認可された場合には、最低でも5年間の検査の提供が義務づけられている。さらに、検査に関する情報提供が適切なものであるかどうかを要求している。すなわち変異陽性率や検査の限界に関する情報をできるだけ正確に依頼医や患者に伝達することを求めている。

CETTプログラムの補助金を受けた大学や臨床検査会社のネットワークが確立し、稀少疾患の遺伝子検査が事業として成立するようにな

った。現在中心となって検査を実施しているCentral Laboratoryは下記のNational Laboratory Networkの検査施設である。私立大学・小児病院の検査施設を中心としている。また、稀少疾患の遺伝子診断に特化した臨床検査会社(GeneDx)が含まれていることも特徴である。

Baylor College of Medicine, Houston, TX
Emory University School of Medicine,
Atlanta, GA

GeneDx, Inc., Gaithersburg, MD
Hospital for Sick Children, Toronto,
Ontario, CA

UCLA Health System, Los Angeles, CA
University of Chicago, Chicago, IL

D. 考察

本分担研究の開始時点では、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存在していなかった。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。初年度から第3年度に遺伝子診断プロトコルの標準化を進め、技術的な側面からは①~③の問題を解決することができた。

従来、遺伝子検査の大部分が研究を目的として実施されてきた。今後は「医学的に確立した」遺伝子検査については、受益者負担の原則に従い、検査が実施されるものとする。このような状況を鑑みて、特定の遺伝子の解析について「医学的に確立」したものであるかどうか。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。分担研究者が所属する日本小児遺伝学会では、主任研究者および分担研究者が担当者となりガイドライン案を纏めている。

ガイドライン案では米国 NIH により運営されている遺伝子検査に関するガイドライン集である GeneReview に掲載されている疾患については「臨床的意義が確立している」疾患として認められるとの立場を取っている。

わが国においても遺伝子検査の臨床応用の促進を図るために米国の CETT プログラムのような民間の検査機関の支援プログラムの実施が待たれる。稀少遺伝性疾患の原因遺伝子の中には40から50のエクソンをもつ巨大なものも少なくなく、標準的な検査系の樹立を困難なものにしている。われわれの検討でも、遺伝子検査システムの開発には1エクソン当たり10万円程度の資金(プライマーの料金や陽性対象となる患者検体を用いたバリデーション等の費用)が必要であったことから、CETT プログラムは必要資金の満額を補助している。

CETT プログラム補助金の交付条件に「当該遺伝子の遺伝子検査の実施について患者団体から希望がある」ことが挙げられており、研究者側のニーズではなく患者のニーズに立った支援を行う立場を取っている。また、補助金の交付条件として、「遺伝子変異と臨床症状の関連についての情報をデータベースとして公開すること」が挙げられている事は特筆すべきであろう。このようなデータベースは、検査で同定された遺伝子の変化(sequence variant)が真に病的変異であるのか単なる遺伝子多型であるのかを判断する上で極めて有用な情報であり、一旦検査システムが確立した後に検査の精度を高めて行く上で必須である。このようなデータの収集は、一見、研究行為のように見えるが、検査結果を適切に解釈し、正確な情報を患者に提供するという観点から患者の利益に直結するものである。今後の検査の質の向上を目指すために、単純な「研究」「臨床」の切り分けではなく、表現型と遺伝子型に関するデータを集積する努力が必要と考えられる。

CETT プログラム補助金の交付条件に「遺伝子検査の実施が治療方針の決定に直結するかどうか」は含まれていない。これは「遺伝子診

断の結果が治療方針に大きく関わる疾患については、先進医療の実施が認められるが、遺伝子診断の結果が治療方針に影響を与えない疾患の場合には、先進医療として認めることが難しい」との見解を厚生労働省の担当官の立場と異なるものである。しかし「遺伝子検査の実施が治療方針の決定に直結しない疾患」についても患者・家族からの遺伝子診断の実施の要望が強い。このような疾患に対して、先進医療以外にどのような仕組みを用いて遺伝子検査を提供するかは今後の解決課題である。一つの解決策は行政・企業以外の団体による事業運営である。例えばNPOによる事業運営がありうる。各検査施設が、依頼医からコストを徴収したり検体を収集することには人的資源を要するので、そのような検査の実施以外の作業を仲介する団体の関与が望まれる。このような目的で東北大学びよび分担研究者らによりNPOが設立された(オーファンネット)。分担研究者はオーファンネットの求めに応じて遺伝子検査を実施する計画について慶應義塾大学医学部倫理委員会に審査を求めた。倫理委員会での検討の結果、遺伝子検査の一部については研究のための解析から診療のための検査であることが承認され、個人情報の保護について留意すること・適切な遺伝カウンセリングが実施されることを条件に、課金検査を実施することの妥当性が認められた。わが国の遺伝医療を推進させる新たな一歩と考えている。

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。今後の課題は、検査施設が臨床検査として遺伝子検査を安定的に供給可能な「システム」を維持するための基盤の実現である。米国 NIH の CETT プログラムと同様の支援制度の設立、先進医療制度の活用、NPO 等行政・企業以外の団体による検査事業の運営などが解決策として挙げられる。

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
研究分担報告書

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

研究分担者 池川 志郎
理化学研究所・ゲノム医科学研究センター
骨関節疾患研究チーム・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、その最適化を行なった。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

Diastrophic dysplasia sulfate transporter (*DTDST*) 遺伝子異常症、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、その最適化を行なった。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・遺伝子解析研究に関する倫理指針（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. *DTDST* 遺伝子の新規の変異による新しい表現型を同定した。

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) の新たな変異を発見した。

3. 亜鉛トランスポーター *Slc39a13/Zip13* の変異による新たな疾患を発見した。

4. 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。

5. 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

1. Miyake A, Nishimura G, Futami T, Ohashi H, Chiba K, Toyama Y, Furuichi T, Ikegawa S.

A compound heterozygote of novel and recurrent DTDST mutations results in a novel intermediate phenotype of Desbuquois dysplasia, diastrophic dysplasia, and recessive form of multiple epiphyseal dysplasia.

J Hum Genet 53(8):764-8, 2008.

2. 池川志郎、古関明彦、古市達哉、平岡秀一：糖ヌクレオチド輸送体 SLC35D1 は骨格形成に必須である。実験医学 vol26: 913-916 (2008)
3. 池川志郎、古市達哉、西村玄：骨系統疾患と遺伝子異常-蝸牛様骨盤異形成症の原因遺伝子 SLC35D1 の発見-。最新医学 63: 2211-2217 (2008)

2. 学会発表

1. 古市達哉、平岡秀一、古関明彦、池川志郎：糖ヌクレオチド輸送体 SLC35D1 は軟骨組織におけるコンドロイチン硫酸合成に必須であり、その機能欠損は重度な骨格形成不全を引き起こす。第2回 Bone Research Seminar (2008年2月29日-3月1日、東京)
2. 古市達哉、西村玄、平岡秀一、古関明彦、池川志郎：蝸牛様骨盤異形成症の責任遺伝子 SLC35D1 の同定。第20回日本整形外科学会骨系統疾患研究会 (2008年12月12日、東京)
3. 深田俊幸、古市達哉、下田信治、美島健二、東山浩之、伊平弥生、朝田芳

信、北村浩、山崎哲、北條慎太郎、中山学、小原収、古関明彦、池川志郎、平野俊夫：亜鉛トランスポーター SLC39a13/Zip13 の結合組織における機能解析。第31回日本分子生物学会 (2008年12月9日-12日、神戸)

4. 三宅敦、西村玄、二見徹、大橋博文、澤井英明、前田公一、千葉一裕、戸山芳昭、古市達哉、池川志郎：Diastrophic dysplasia sulfate transporter 遺伝子 (DTDST) の新規の変異による新しい表現型 第20回日本整形外科学会骨系統疾患研究会 (2008年12月12日、東京)
5. Shiro Ikegawa: From Human, from Mouse: Integrated approach of human and mouse genetics toward the gene for bone and joint diseases. Symposium on developmental genomics & skeletal research (2008.5.5, Hong Kong)
6. Shiro Ikegawa, Genetic analysis of bone and joint diseases; From human, from mouse. 5th Bone Biology Forum (2008.8.22, Shizuoka)
7. Shiro Ikegawa, From genome to bone and joint diseases. APLAR 2008 JCR Clinical Course Lecture (2008.9.26, Yokohama)
8. Shiro Ikegawa, Genetic Study of Bone and Joint Diseases: from Bedside to Bench, from Genome to Patient The University of Hong Kong Li Ka Shing Faculty of Medicine (2008.10.20, Hong Kong)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

研究分担者 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)、昨年度までに代表的疾患として 30 疾患のプローブを調整した。本年度はこれに Currarino 症候群 (HLXB9) のプローブも追加した。さらに、染色体端部(サブテロメア)領域の微細構造異常スクリーニングの精度管理も検討した。原因不明の発達障害・多発奇形の 46 例中 6 例(13%) にサブテロメア領域の不均衡を検出した。しかし、そのうちの少なくとも 2 例は正常変異であると判定した。サブテロメア領域の微細異常スクリーニングはあくまで一次スクリーニングであり、BAC-FISH・CGH-array での異常領域の範囲評価に加え、CNV データベース参照と両親の解析を含めた総合判断が診断精度管理上必須であることが示された。

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。これらを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、遺伝子内のエキ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。一昨年度に、このハプロ不全で発症し得る 76 疾患をリストアップし、昨年度までにその代表的疾患 30 疾患の診断プローブを調製し、実際の症例の解析での診断実績を検討した。本年度は Currarino 症候群を対応疾患に追加するとともに、近年注目されている染色体端部(サブテロメア)領域の潜在性微細構造異常スクリーニングの効果と診断の精度管理についても検討を加えた。

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 30 疾患に加え、Currarino 症候群の診断プローブを追加。
- 2) 原因不明の発達障害・多発奇形の 46 例についてサブテロメア領域のプローブを用いた FISH スクリーニングを行う。異常を検出した場合には、その異常範囲の決定とともに CNV との鑑別を検討する。

(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) Currarino 症候群の FISH 診断プローブとして疾患責任遺伝子 HLXB9 (座位; 7q36) を含む BAC を選択してプローブ調整した。
- 2) サブテロメア FISH スクリーニングによって原因不明の発達障害・多発奇形の 46 例を解析した結果、6 例(13%) にサブテロメア領域の不均衡を検出した。その内訳は、4q deletion/10p duplication, 1p deletion, 7p dim, 4q deletion, 6qdeletion/1q duplication, 18q deletion 各々 1 例ずつであった。このうち以下の 2 例は正常変

異と判定された。

<7p dim> 7q サブテロメア FISH のシグナルが完全欠損ではないまでも明らかに減弱していた。隣接する BAC-clone 解析で欠失は 100 kb レベルと判断された。CNV データベースの参照により、同欠失領域の範囲は CNV としての報告があった。両親の解析で母に児と同じ 7q dim があることを確認した。

<4q deletion> 4q サブテロメア FISH シグナルが欠損していた。近隣の BAC-clone 解析で欠失は 200 kb レベルと判断した。CNV データベースの参照により、同欠失領域の範囲は CNV としての報告があった。両親の解析で父に同じ 4q の欠失があることを確認した。

D. 考察

染色体の微細構想異常の診断システムの構築のために本研究班ではハプロ不全で発症する優性遺伝性疾患をリストアップし、その代表的疾患 3 1 疾患についての FISH 診断体制を整えた。昨年度の研究報告で述べたように、リストアップした疾患を対象とした解析経験では約 15% の症例で微細欠失の検出による確定診断が得られている。また、近年注目されている染色体端部のサブテロメア領域の微細構造異常についても本年度実際の症例解析を行なってその診断精度を検討した。46 例中 6 例 (13%) に異常を検出した。しかしながら、その後の詳細な解析 (近隣の BAC clone による欠失範囲の同定、CNV データベースの参照、両親の解析) によって 6 例中少なくとも 2 例は正常変異であることが判明した。これは、サブテロメア FISH スクリーニングで異常が見られたからといって、即座に病因と診断してはならないことを示す。ちなみに、現在最も汎用されているサブテロメア FISH スクリーニングのプロープセットのうち、確認しえた 30 座位の中で少なくとも 16 座位のプロープは CNV に一部が重なり、8 座位はプロープ全体が CNV に完全に含まれるものだった。CNV との鑑別のためには、少なくとも、1) 近隣の BAC clone を用いた FISH 解析や CGH-array 解析による異常領域の範囲決定、2) CNV データベースの参照、3) 両親の解析 が考慮されなければならない。また、サブテロメアスクリーニングを行う際には、検査前に異常が見出された場合に慎重な結果解釈と追加解析の必要性について説明してお

くことが重要である。サブテロメアスクリーニングはあくまで“スクリーニング”であり、これはハプロ不全で発症する常染色体優性遺伝性疾患の FISH 解析が予め臨床症状から異常が想定される染色体領域を解析していることとの大きな差異である。このような診断の精度管理に留意した上で、ハプロ不全発症疾患の高精度な診断システムの構築とともに、サブテロメア領域ならびに全ゲノムを対象とした FISH あるいは CGH-array によるスクリーニング解析を運用することが望まれる。

E. 結論

FISH 解析対象疾患リストから既に調整した合計 30 疾患・遺伝子座の診断プロープに本年度は Currarino 症候群 (HBX9) のプロープを追加した。また、発達障害・多発奇形症例の 46 例にサブテロメア FISH スクリーニングを行なったところ 6 例 (13%) にサブテロメア領域の不均衡を検出した。しかしながら、このうちの 2 例はその後の精査で正常変異と判定された。分子細胞遺伝学的解析は微細なゲノム不均衡を検出することがメリットであるが、それが病因か否かについての慎重な判断が重要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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 146A:1458-61, 2008

2) Sakazume S, Yoshinari S, Oguma E, Utsuno E, Ishii T, Narumi Y, Ohashi H. A patient with early onset Huntington disease and severe cerebellar atrophy. Am J Med Genet A (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得・実用新案登録
なし。

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精度管理研究

研究分担者 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

本研究の成果により、ほとんどの小児固形腫瘍疾患に対するキメラ遺伝子検出の検査技術が整い、症例数が多い主要疾患については、実際に中央診断が実施されている。さらに、現在、稀少な小児固形腫瘍疾患の中央遺伝子診断を実際に行うための体制整備を進めている。また、小児 B 前駆細胞性急性リンパ球性白血病の網羅的なゲノム構造解析によって、今後診断への有用性が期待される候補遺伝子が多数同定され、今後はさらに Wilms 腫瘍等の固形腫瘍について、同様の検討を行っていく。

A. 研究目的

本研究の目的は、固形腫瘍を中心とする小児難治性腫瘍疾患に対す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実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目的とした。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、将来的に、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。

固形腫瘍を中心とした小児難治性腫瘍疾患は、一般に組織形態学的な特徴に乏しく、病理診断が困難な症例が多い。しかし、Ewing 肉腫や、胞巣型横紋筋肉腫を代表とする多くの腫瘍には特異的な染色体転座によって発現するキメラ遺伝子の存在が明らかになっており、これらのキメラ遺伝子の検出が診断の決め手になる場合が少なくないため、その診断的意義は極めて高い。しかし、症例数の少ない稀少腫瘍については、検査法が十分確定されておらず、本邦における症例登録や、中央診断のシステムは全く整備されていない。一方、神経芽腫における MYCN 遺伝子の増幅のように予後と直結した遺伝子異常も明らかにされており、その検出は治療法選択や長期予後判定に不可欠である。しかも、これらの遺伝子異常は各腫瘍の発症病態に直接関係していると考えられる。

そこで本研究では、従来から行われている検査方法

の標準化を図り、精度管理された中央診断を行うことによって正確で迅速な確定診断が可能なシステムを整備するとともに、稀少腫瘍疾患に対するキメラ遺伝子検出を含む中央診断のシステム整備を目的とする。また、最新の技術を駆使した詳細かつ網羅的な遺伝子解析を行い、その成果を新たな診断や予後判定に有用な因子の発見に結びつけることを目指す。本研究の成果によって、新規治療法開発にも応用できる可能性が期待される。

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。過去に報告されている情報により、各腫瘍に特徴的なキメラ遺伝子の塩基配列に基づいて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 等を用いた。

患者検体から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。得られた結果は東京大学小川誠司博士らが開発した専用のアルゴリズム "CNAG" を用いて解析した。ヒトゲノム遺伝子データベースにアクセスし、同