

本研究では腫瘍細胞における遺伝子異常を対象として解析しており、臨床研究の指針に準拠して研究を行った。また、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た。

### C. 研究結果

Ewing 肉腫のホルマリン固定パラフィン包埋切片 17 例(10 $\mu$ m 厚 1 枚～3 枚)より High Pure FFPE RNA micro kit を用いて RNA を抽出したところ 300ng～5 $\mu$ g 程度の RNA が抽出可能であった。まず～500ng の RNA と random primer を用い Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。コントロールとして  $\beta$  アクチンに特異的なプライマーを用いて PCR を行ったところ 17 例全例で 35 サイクルの PCR で増幅を得た。しかしながら検体によっては検出限界ぎりぎりであり、RNA の品質にばらつきがあると考えられた。次に EWS exon 7 FLI1 exon 6 に特異的な RT-PCR を行い EWS-FLI1 type 1(EWS exon 7-FLI1 exon 6), type2(EWS exon 7-FLI1 exon 5)に対する RT-PCR を行ったところ EWS-FLI1 type 1 は 8 例中 4 例、type 2 は 3 例中 1 例で、融合遺伝子のバンドを検出することが、可能であった。ホルマリン固定パラフィン切片を用いた RT-PCR 法により融合遺伝子を検出することが可能であったが、感度・特異度の点で改善の余地があると考えられた。EWS-FLI1 type 2 の場合、より大きな PCR 産物を増幅することになるため、検出感度が低下する可能性もあると思われる。

遺伝子解析施設機能拡充の一環として、より稀な腫瘍特異的融合遺伝子解析系を検討した。Ewing 肉腫類似の小円形細胞肉腫における CIC-DUX4、間葉性軟骨肉腫における EWS-NR4A3, TAF15-NR4A3、低悪性度線維粘液性肉腫 FUS-CREB3L2、脂肪芽腫の PLAG3 関連融合遺伝子、Ewing 肉腫の FUS-ERG, FUS-FEV、横紋筋肉腫における PAX3-AFX, PAX3-NCOA1, PAX3-NCOA2 を RT-PCR 法によって解析する系を立ち上げた。

### D. 考察

ホルマリン固定パラフィン包埋切片から RT-PCR を行いすべての検体で、ハウスキーピング・ジーンである  $\beta$  アクチンの発現を同定することができ、過去に保存されたフ

ォルマリン固定パラフィン包埋切片でも発現量の非常に多い遺伝子は十分、検出可能と考えられた。一方で融合遺伝子は、EWS-FLI1 type 1, type 2 ともにそれに比較すると発現が低いと考えられ、RT-PCR での検出も十分な感度とは言えない。プライマーや用いる試薬、反応系の最適化により、さらに、感度・特異度を向上させられる可能性もあるが、パラフィン包埋組織作成過程や保管過程で RNA が分解するという問題があるため、今後、十分に感度の良い他の方法も追求していく必要がある。パラフィン包埋組織から融合遺伝子を検出する方法としては FISH 法があり、この方法にても染色体転座に由来する遺伝子再構成を検出することが 100%ではないまでも可能である。しかしながら FISH 法は RT-PCR 法よりも煩雑であり、一度の解析では転座先の遺伝子が検出できない、Ewing 肉腫のように融合点の異なる融合遺伝子のサブタイプを検出できない等の問題点がある。これらのことを考えると現時点では、FISH 法と RT-PCR 法を組み合わせで行うのが現実的と考えられた。

### E. 結論

小児固形腫瘍の分子診断としてパラフィン包埋切片から RT-PCR 法によって腫瘍特異的融合遺伝子を検出する方法を検討した。パラフィン包埋切片から抽出された RNA は高度に分解しているものの、適した cDNA 合成、PCR 条件下では、融合遺伝子を検出することが可能であったが、感度等の改善の余地がある。また、遺伝子解析施設の機能拡充の一環として、小児固形腫瘍のなかでも稀な組織型の融合遺伝子を検出する系を準備した。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) 大喜多肇, 瀧本哲也, 中澤温子, 藤本純一郎, 原純一, 小児固形腫瘍観察研究, 小児外科, 2011; 43(11): 1238-1242.

#### 2. 学会発表

1) 大喜多 肇, 秦 順一, 柴田 理恵, 高田 礼子, 菊池

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

春人, 藤本 純一郎, 金子 安比古, 堀江 弘, 田中 祐吉, 福澤 正洋, 清河 信敬, 日本における WT1 遺伝子変異を有するウィルムス腫瘍の臨床病理学的検討, 第 100 回日本病理学会総会, 横浜, 4 月 28 日-30 日, 2011

2) 大喜多 肇, 近森 穰, 宮川 世志幸, 秋元 信吾, 小林 健一郎, 藤本 純一郎, 秦 順一, 清河 信敬, ユーイング肉腫ファミリー腫瘍における Dickkopf ファミリー分子の発現制御とその意義, 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日

3) 越智 琢司, 元山 華穂子, 加賀 文彩, 椿 英春, 豊田 彰史, 林 美佳智, 中村こずえ, 小山 隆之, 小川 富雄, 清河 信敬, 大喜多 肇, 中澤 温子, 菊地 陽, 貧血・血小板減少にて発症した原発巣不明の胞巣型横紋筋肉腫の一例, 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 11 月 25 日-27 日

4) 上野 瞳, 大喜多 肇, 清河 信敬, 小児腎肉腫における DNA メチル化解析, 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13 日-16 日

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## 小児先天性疾患および難治性疾患における臨床的遺伝子診断の基盤整備 倫理基盤の確立

研究分担者 福嶋義光 信州大学遺伝医学・予防医学講座 教授

### 研究要旨

小児先天性疾患および難治性疾患における臨床的遺伝子診断の基盤整備の一環として、1) 本研究班で作成した「臨床的遺伝子診断のための同意文書（案）」の普及、2) 「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」の周知活動、3) 倫理基盤の基礎となる教育ツールの普及、4) 細胞遺伝学的診断の精度向上などの取組みを行った。

### 共同研究者

涌井 敬子(信州大学遺伝医学・予防医学講座)

### A. 研究目的

ヒトゲノム解析研究の爆発的進展により、数多くの疾患の発症に関連する遺伝子が単離され、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断を含む種々の遺伝学的検査が可能になった。これらの遺伝学的検査は、難治疾患の確定診断、予後予測、早期発見と早期対応等に極めて有用な検査であるが、一方では、この遺伝学的検査により明らかにされる遺伝情報は、1) 生涯変化しない情報(不変性)、2) 将来を予測し得る情報(予測性)、3) 血縁者も関与し得る情報(共有性)、であるため、新たな倫理的問題が提起され、通常の臨床情報とは異なる慎重な対応が求められている。本研究の目的は、倫理的な問題を解決しつつ、遺伝学的検査が医療の場で広く用いられるようにするための具体的な方法を明らかにすることである。

### B. 研究方法

(1) 臨床的遺伝子診断のための同意文書の作成と臨床的遺伝子診断と遺伝子解析研究との連携についての検討

本研究班で作成した臨床的遺伝子診断のための同意文書(案)についての普及活動を行った。

(2) 「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」の作成と普及

2011年2月に公表された「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」の周知活動を行った。

(3) 倫理基盤の基礎となる遺伝医学系統講義の教育ツールの作成とe-learning システムの構築

遺伝子診断を臨床の場で適切に行っていくためには、これに関与する者が急速に進展している遺伝医学を系統的に学ぶ必要がある。日本人類遺伝学会および全国遺伝子医療部門連絡会議の協力を得て、18項目にわたる遺伝医学系統講義の教育ツールを作成するとともに、広く利用できるように e-learning システムを構築し、利用促進を図った。

(4) 細胞遺伝学的診断の精度向上

染色体異常症の診断を目的に開発されたマイクロアレイ法(Cytogenetic Array法)は、G分染法の約100倍の精度で微細なゲノムコピー数異常を検出できる新たな細胞遺伝学的解析法であるが、copy number variation(CNV)という新たなヒトの多型の存在が明らかとなり、それが臨床的な影響を伴わないbenign CNVが臨床的遺伝子診断法として応用する際の課題となっている。Cytogenetic Array法で検出されたゲノムコピー数異常が臨床的に意味があるかどうかを評価には、公開されたデータベースのデータに加え、日本人のbenign CNVデータベースが必要であり、本研究において昨年に引き続き日本人一般成

人（おもに協力の得られた患者の両親）について解析を追加し、現時点までに100例についてデータを評価した。また、ゲノムコピー数異常が検出された症例および両親の一部に対して、当該染色体領域のBACクローンをを用いたFISH解析を行い、染色体再構成を細胞遺伝学的に確認した。

#### （倫理面への配慮）

本研究は主に遺伝学的検査に関係する倫理的問題を解決するために行われるものであり、種々の検討が直接倫理問題を生ずることはないと考えられる。検査精度の向上のために行われる取組みの中で、患者検体を用いる場合は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、倫理委員会の承認を得た上で、匿名化するなど個人情報保護に十分留意して実施する。

#### C. 研究結果

##### (1) 臨床的遺伝子診断のための同意文書の作成と臨床的遺伝子診断と遺伝子解析研究との連携についての検討

現在、わが国では、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断のために行われる遺伝学的検査の多くが、研究の一環として行われている。遺伝学的検査が有用であると考えた主治医が、その疾患の遺伝子解析を行っている国内の施設に検査を依頼する際に用いられることを想定し、本研究班において、「遺伝学的検査の実施」と「試料の保存および研究使用」についての同意書・説明書（案）を作成し、全国遺伝子医療部門連絡会議、日本小児遺伝学会等を通じて、必要な場合には利用できるように広報した。

##### (2) 「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」の作成と普及

2011年2月に公表された「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」には、昨年度、本研究班で提案した以下の内容がすべて記載された。HP上での公表および英文化について協力した。

・ 遺伝学的検査・診断に関与する医師・医療者は、遺伝医学の系統的知識をもち、遺伝情報の特性に配慮した対応が求められる。

・ 遺伝学的検査・診断が行われる場面を 1)すでに発症している患者の診断を目的とする場合と 2)患者ではない者を対象とした保因者診断・発症前診断・出生前診断を目的とする場合とに明確に分類した。1)の場合には、主治医が診療の流れの中で、臨床的有用性がある場合には、積極的に遺伝学的検査・診断の意義を説明し、患者からインフォームドコンセントを得た上で実施すべきである。一方、2)の場合には、事前に適切な遺伝カウンセリングを行い、遺伝的問題の解決のための選択肢の一つとして実施する。

・ 薬理遺伝学検査は生殖細胞系列の遺伝情報ではあるが、診療には必須の情報でもあるので、通常の診療情報と同様に扱う。

・ 多因子疾患を対象とした易罹患性診断については、分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性などの科学的根拠を明確にした上で実施する。

・ 患者の診断を目的として行われた遺伝学的検査の結果は、原則として、他の臨床検査の結果と同様に、患者の診療に関係する医療者が共有する情報として診療録に記載する。

・ 遺伝カウンセリングは、情報提供だけではなく、患者・被検者等の自律的選択が可能となるような心理的社会的支援が重要であることから、当該疾患の診療経験が豊富な医師と遺伝カウンセリングに習熟した者が協力し、チーム医療として実施する。

##### (3) 倫理基盤の基礎となる遺伝医学系統講義の教育ツールの作成とe-learning システムの構築

日本人類遺伝学会および全国遺伝子医療部門連絡会議の協力を得て遺伝医学系統講義DVDを作成し、HP上で視聴できるe-learningシステムを構築した。

- |                    |       |
|--------------------|-------|
| 1. 遺伝医学の過去・現在・未来   | 鎌谷直之  |
| 2. 遺伝医学総論          | 福嶋義光  |
| 3. ヒトゲノム・遺伝子の構造と機能 | 松本直通  |
| 4. 染色体異常症と細胞遺伝学    | 玉置知子  |
| 5. 単一遺伝子疾患とメンデル遺伝学 | 小杉眞司  |
| 6. 多因子疾患の遺伝学       | 羽田明   |
| 7. 個別化遺伝医療と薬理遺伝学   | 鎌谷直之  |
| 8. エピジェネティクス       | 久保田健夫 |
| 9. 生化学遺伝学          | 松原洋一  |

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

10. 集団遺伝学	徳永勝士
11. 遺伝性疾患の分子遺伝学的理解	高田史男
12. 遺伝学的検査	野村文夫
13. ミトコンドリア遺伝	後藤雄一
14. 発生遺伝学と先天異常	小崎健次郎
15. 出生前診断	平原史樹
16. 腫瘍遺伝学	稲澤譲治
17. 遺伝性疾患の治療	櫻井晃洋
18. 遺伝カウンセリング	斎藤加代子

欠失なのか、それとも転座由来であって他の染色体端部の重複を伴う不均衡転座なのか、そして不均衡転座の場合、突然変異なのか親のどちらかが均衡型転座野を有するのか、を評価をすることは、各家系への遺伝カウンセリングに大変重要である。さらに、15q11.2を切断点とする染色体構造異常症例に、15q11.2に264kbのコピー数増加を認めたが、この領域は15qに設定されたプローブの最も近位部領域であり、転座に伴う重複なのか、benign CNVなのかの評価にも metaphase FISH 法による染色体再構成の確認が必要であった。

#### (4) 細胞遺伝学的診断の精度向上

染色体異常症の診断を目的に開発されたマイクロアレイ法(Cytogenetic Array 法)を用いて、日本人一般成人について解析し、現在までに100例についてデータを評価したところ、136箇所コピー数異常が検出された。そのうち昨年度明らかにした9領域(1q44, 6p25.3, 7q36.2, 8p11.23, 12p13.31, 16p12.1, 19p12, Xp22.33, Xq28)に加え、さらに9領域(5q35.3, 7p22.3, 8p23.2 [244kb], 8p23.2 [2.2Mb], 8p11.1, 8q11.1, 10q11.22, 10q26.3, 12q24.11)については各5名以上が蓄積され確実な日本人 benign CNV と考えた。また、現時点で3~4名蓄積されたのが4領域、2名の蓄積は14領域あり、他は単独の異常であった。コピー数増加として検出された benign CNV で最も大きかったのは8p23.2に認めた2.2Mb、コピー数減少では7q34に認めた452kbであった。200kb以上のゲノムコピー数減少(染色体欠失)、あるいは400kb以上のゲノムコピー数増加(染色体重複)は患者の臨床症状に影響している可能性が高いと考えられているが、本研究の一般成人の解析結果において、単独の検出も含めると200kb以上のゲノムコピー数減少が10領域、400kb以上のゲノムコピー数増加が8領域に検出されたことは、まだまだ一般成人のデータ蓄積が必要と考えられた。

また、コピー数増加として検出された7p22.3と10q26.3は、我々の用いているアレイで7pと10qに設定されたプローブの最も端部(サブテロメア)領域に相当するため、患者に検出された場合には、必ず当該領域のDNAクローンをプローブとして metaphase FISH 法による確認が必要なコピー数異常であることが判明した。特に、患者に他染色体端部の欠失を認めていた場合、それが純粋な端部

#### D. 考察

小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断を目的とした遺伝学的検査は、欧米先進諸国においては、2000種類以上の疾患について臨床検査としての実施が可能である。しかし、わが国においては、現在、染色体検査を除けば、15疾患の遺伝病的検査が保険診療として認められているのみである。遺伝学的検査により確定診断がなされることは、適切な医療提供のために極めて有用であり、患者・家族の受けるメリットは計り知れないが、わが国においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の成果が十分活かすことのできる社会環境が整っているとはいえない。

この閉塞的な状況を改善するための取組みの一つとして、小児先天性疾患および難治性疾患の遺伝子解析研究を行っている施設に、確定診断を必要としている患者の主治医が遺伝学的検査を依頼する際に用いることのできる同意文書・説明文書(案)を作成した。現在、わが国では、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断のために行われる遺伝学的検査の多くが、研究の一環として行われていることを考慮し、「遺伝学的検査の実施」についてだけでなく、研究推進のための「試料の保存および研究使用」についての同意書・説明書の試案も作成した。これらの文書(案)について、昨年度、全国遺伝子医療部門連絡会議に所属する臨床遺伝専門医などの有識者から意見聴取を行ったところ、全く異論はなく、適切なものと判断されたので、今年度は、研究班HPに掲載するなど公表に努め、広く利用を促した。主治医と遺伝子解析担当者との交流が円滑に進み、多くの患者・家族に有用な情報を

提供することができるようになるとともに、研究推進に役立つことを期待している。

2003年に公表された遺伝医学関連10学会「遺伝学的検査に関するガイドライン」（10学会指針）の問題点を解決し、広く一般の診療において、遺伝学的検査が有効に利用されるようにするために、2011年2月に、「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」が公表された。このガイドラインには昨年度、本研究班で指摘した記載すべき内容がすべて取り上げられている。遺伝学的検査が行われる疾患（群）、領域、診療科は多様であり、それぞれに固有の留意点が存在するが、さまざまな領域における遺伝学的検査においても遵守すべき基本的事項・原則としてこのガイドラインが広く利用されることを願っている。

遺伝情報を適切に扱うためには、遺伝医学（病気に関係する遺伝継承と多様性の科学）を系統的に学ぶ必要があるが、わが国の医学教育において、遺伝医学を系統的に教育している大学は極めて少ないのが現状である。今回作成した遺伝医学系統講義 e-learning システムは、インターネットを介して、登録した者はだれでもどこでも学習を進めることができるので、遺伝子診断の倫理基盤の確立だけでなく、今後、わが国の遺伝医療の発展の基礎となるものと確信している。

本研究において、細胞遺伝学的診断の精度向上を目的として日本人一般成人100例のCytogenetic Array解析結果を蓄積した。ゲノムコピー解析技術の普及によって、欧米ではCytogenetic Array解析が臨床的に確定診断が困難な染色体異常を疑う小児先天性疾患患者に実施すべき最初のスクリーニング検査にCytogenetic Array法が行われるようになってきており、わが国においてもその方向性が求められている現状において、今後さらなる日本人benign CNVのデータ蓄積が必要と考えた。

また、遺伝カウンセリングには、患者のゲノムコピー数異常の検討に引き続き、患者や両親の染色体再構成の確認が必要で、そのためには座位の確認されているDNAクローンをを用いたmetaphase FISH解析の実施体制を整える必要がある。

## E. 結論

小児先天性疾患および難治性疾患における臨床的遺伝子診断の基盤整備の一環として、1) 臨床的遺伝子診断のための同意文書（案）の普及、2) 「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」の作成と周知、3) 倫理基盤の基礎となる教育ツールの作成と公表、4) 細胞遺伝学的診断の精度向上などの取組みを行った。

F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

福嶋義光：遺伝医療の基盤整備・均てん化。（遺伝医療と社会 Vol. 4）. 医学のあゆみ. 237(7):803-805, 2011

福嶋義光：遺伝子研究・診断・治療の倫理（特集：糖尿病と遺伝子）. 月刊糖尿病 3(4):114-119, 2011

福嶋義光：臨床遺伝医療. BIO Clinica 26:271-275, 2011

### 2. 学会発表

涌井敬子, 古庄知己, 高田史男, 福嶋義光. 染色体端部欠失患者の両親のメタフェーズ解析の必要性—染色体端部欠失パターンを示す患者の親に認められた均衡型構造異常からの考察—. 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 横浜

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 清水健司, 大橋博文, 福嶋義光. Cytogenetic Array解析により検出された一般成人のゲノムコピー数変化. 遺伝医学合同学術集会 2011（第35回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 第18回日本遺伝子診療学会大会, 第17回日本家族性腫瘍学会学術集会）, 京都

涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 大橋博文, 清水健司, 岡本伸彦, 水野誠司, 黒澤健司, 高田史男, 川目裕, 福嶋義光. 染色体構造異常およびMCA/MR患者を対象としたマイクロアレイ染色体検査とmetaphase FISH法による臨床細胞遺伝学的解析結果, 日本人類遺伝学会第56回大会, 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

小児先天性疾患および難治性疾患の遺伝カウンセリング体制の実態調査  
研究分担者 斎藤加代子 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター 所長・教授

### 研究要旨

我が国における小児先天性疾患および難治性疾患の遺伝カウンセリングの実態を調査する目的で、遺伝子診療実施施設、小児先天性疾患および難治性疾患の関連学会の役員を対象としてアンケート調査を行い、40%の回収率で回答を得た。被検者が未成年の場合に、本人にも何らかの説明をすると回答したのは27%、理解度に応じた説明と同意を得ると回答したのは36%であったが、11%は本人には説明をせず両親からのみ同意を得ると回答していた。18%は両親から口頭でのみしか同意を取得していなかった。遺伝学的検査が診療において拡がっている現状から、小児の先天性疾患・難治性疾患の医療において遺伝カウンセリングは重要な位置づけであり、両親からのインフォームドコンセントおよび本人からのインフォームドアセントを合わせて取得する体制を整えることが重要であると考えられる。

### 共同研究者

松尾真理、浦野真理

東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

### A. 研究目的

我が国における小児先天性疾患および難治性疾患の遺伝カウンセリングの実態を調査する目的で、遺伝子診療実施施設、小児先天性疾患および難治性疾患の関連学会の役員を対象としてアンケート調査を行い、結果から現在の問題点を抽出する。

### B. 研究方法

全国から500名の小児先天性疾患・難治性疾患の診療に当たる医師を抽出して、遺伝カウンセリングに関するアンケートによる実態調査を実施し、40%の回収率で回答を得て分析した。調査結果を詳細に検討し、現状での問題点を抽出した。

（倫理面への配慮）

本研究におけるアンケート調査では、先天性疾患・難治性疾患の小児の個人情報扱わず、倫理的に特に問題は無いと判断した。アンケート調査は記名式にて回答を得た。

### C. 研究結果

本アンケート調査は500通投函し、201通を回収、1通

は白紙にて200通が有効であり、回収率40%であった。

遺伝学的検査は87%で実施されていたが、遺伝カウンセリングを実施しているのは49%にとどまり、47%では実施されていなかった。被検者が未成年の場合に、本人にも何らかの説明をすると回答したのは27%、理解度に応じた説明と同意を得ると回答したのは36%（年齢条件あり13%、年齢条件なし23%）であったが、11%は本人には説明をせず両親またはその他の親権者や未成年後見人からのみ同意を得ると回答していた。被検者の年齢については、口頭で同意を得る年齢の下限は5歳から18歳（中央値12歳）、書面で同意を得る年齢の下限は6歳から20歳（中央値15歳）であった。代諾を得る際には、両親または親権者あるいは未成年後見人から同意を得ているのは63%で、片親のみの同意としている場合が18%、親権者ではない親戚から同意を得ている場合も1%あった。同意を取得する方法は、書面で確認するが66%、口頭で確認するが18%であった。遺伝学的検査の結果を説明する相手は、母親のみが8%、両親揃ってまたは親権者あるいは未成年後見人が55%で、本人は3%であった。

### D. 考察

本研究では、小児先天性疾患および難治性疾患を扱う可能性がある施設を抽出してアンケート調査を実施した。被検者が未成年の場合に本人からの同意を得ると回答したのは全体の36%に過ぎず、日本の小児遺伝医療の現

場では、子どもの権利が必ずしも守られていない現状が明らかとなった。成年に達していない子どもにはその未熟さから、同意能力がないと考えられており、最終的な決定は親（親は子どもの最善の利益を計る決定を下すと想定される）に委ねられている。しかし未成年であっても成熟度に応じた理解力・判断力を備えているため、子どもが理解できる言葉で説明を受けることは、子どもの権利である。1989年に採択された「子どもの権利条約」では、意思を表明する主体としての子どもの権利が明記されており、アメリカ小児科学会ではインフォームドコンセントの適応を15歳以上とし、7～14歳では親の許可に同意するインフォームドアセントが必要であるとしている（Pediatrics. 1995; 95:314-7）。しかし本邦ではインフォームドコンセントあるいはインフォームドアセントについての統一した適応基準はない。今回の調査の結果からも、施設ごとに疾患毎あるいは症例毎の判断をしている現状がうかがえた。本邦では、民法 818 条に「成年に達しない子は父母の親権に服する」とあり、判例上は20歳までは家族からも同意を得るべきとされているため、未成年者からインフォームドコンセントを取得することは現実的ではないかもしれない。このため、両親から書面でインフォームドコンセントを得たうえで、さらに、個々の子どもの成熟度に合わせたインフォームドアセントを得ることが望ましいと考えられる。何歳以上をインフォームドアセントの適応とするか、口頭でよいのか書面で署名を求めたほうが良いのか等については、更なる議論が必要である。

また、遺伝学的検査の結果の報告は、殆どの場合両親にされており、本人が医師から直接検査結果を説明されることは非常に稀であることが判明した。検査結果を最終的に本人が認識することは、自身の疾患を正しく理解するために重要なことである。しかし、子どもの理解度や疾患の種類によっては、検査を受けた時機にすぐ結果を聞くことが相応しくない場合がある。このため、両親の意向もふまえて、本人に結果報告をするのかどうか、するのであればどのようなタイミングで伝えるのかについて、事前に相談しておく必要があると考えられる。

#### E. 結論

小児先天性疾患・難治性疾患の診療に当たる医師を抽出し、遺伝カウンセリングに関するアンケートによる実

態調査を実施し、40%の回収率で回答を得て分析した。被検者が未成年の場合、本人に対する説明と同意が得られていない場合があり、何歳からどのような形で本人の同意を得るかについては、施設毎の判断に委ねられている現状が判明した。また一部の施設では、両親から書面でインフォームドコンセントを取得していない状況であった。遺伝学的検査が日常診療の中で拡がっている現状から、未成年者における遺伝学的検査の実施の際には遺伝カウンセリングを実施し、両親からのインフォームドコンセントおよび本人からのインフォームドアセントを合わせて取得する体制を整えることが重要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特に問題なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 宮下俊之、桐生麻衣子、斎藤加代子、杉田克生、遠藤真美子、藤井克則、見逃してはいけない家族性腫瘍：本邦における母斑基底細胞癌症候群の遺伝子変異と臨床的特徴。家族性腫瘍 2011; 11(1): 14-18.

2. Takahashi Y, Hosoki K, Matsushita M, Funatsuka M, Saito K, Kanazawa H, Goto Y, Saitoh S. A Loss-of-Function Mutation in the SLC9A6 Gene Causes X-Linked Mental Retardation Resembling Angelman Syndrome. American journal of medical genetics 2011; Part B 156(7): 799-807.

##### 2. 学会発表

1. 浦瀬香子、戸塚恭一、福井由理子、寺村正尚、田口啓子、三原祥子、松寄英士、斎藤加代子。医学部2年次医療面接ロールプレイ実習において患者役になる意義。第43回日本医学教育学会大会 2011.

2. 山内あけみ、斎藤加代子。小児科の立場から。第2回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー神経線維腫症1型(レックリングハウゼン病) 2011:25-28.

3. 浦野真理、斎藤加代子。NF1の遺伝カウンセリング。第2回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー神経線維腫症1型(レックリングハウゼン病) 2011:29-32.

4. 岩崎直子、滝澤美保、藤巻理沙、中村新子、尾形真規子、富岡光枝、斎藤加代子、内潟安子。Mutation



screening of the insulin gene for subjects with early-onset diabetes mellitus. 日本人類遺伝学会第56回大会・第11回東アジア人類遺伝学会 2011:163.

5. 秋澤叔香、西村玄、浦野真理、相楽有規子、長谷川奉延、高木優樹、木崎尚子、牧田千恵、小林藍子、鷺尾洋介、三谷穰、内山温、牧野康男、楠田聡、松田義雄、松井英雄、斎藤加代子. 出生前に3次元CTで診断したThanatophoric Dysplasia type Iの2例. 日本人類遺伝学会第56回大会・第11回東アジア人類遺伝学会 2011:176.

6. 松尾真理、浦野真理、斎藤加代子. 16qモノソミーモザイクの一男児例. 日本人類遺伝学会第56回大会・第11回東アジア人類遺伝学会 2011:191.

7. 近藤恵里、西村貴文、稲葉雄二、古庄知己、西野一三、埜中征哉、古川徹、斎藤加代子. 先天性ミオパチー原因遺伝子の包括的スクリーニング解析にて診断し得たRYR1 遺伝子変異による乳児重症型ネマリンミオパチーの1例. 日本人類遺伝学会第56回大会・第11回東アジア人類遺伝学会 2011:197.

8. 斎藤加代子. 研究における遺伝情報の開示について. 遺伝情報の取扱いの研究会第3回 2012.

9. 斎藤加代子. Gorlin 症候群の臨床 4)カウンセリング. 第2回 Gorlin 症候群シンポジウム 2012.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 遺伝子診断の臨床提供のための遺伝子検査ネットワーク構築の研究

研究分担者 松原洋一 東北大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

稀少遺伝性疾患にたいする遺伝子検査の多くはすでに臨床的に有用な検査として位置付けられているが、わが国で保険診療として認められている検査は極めて数少ない。臨床検査室や商業的な検査センターでの検査提供はなされておらず、遺伝性疾患の遺伝子検査を研究の一環として提供してきた大学研究室が個々に検査を実施しているのが現状である。このようなわが国における遺伝子診断提供体制を整備することを目的に設立されたNPO法人「オーファンネットジャパン」では、全国の研究室を結ぶ遺伝子診断ネットワークを構築し運営している。本分担研究では、この遺伝子診断ネットワークシステムについて検討を行った。今後、このシステムにさらに多くの遺伝子検査項目を順次追加していくことにより、効率的かつ経済的な遺伝子検査提供が可能と考えられる。

### 共同研究者

小原 収(かずさDNA研究所) 遺伝子解析

### A. 研究目的

稀少遺伝性疾患の診療においては、遺伝子検査によって診断を確定することにより、その後の治療方針の決定、療育計画、家族への遺伝カウンセリングをおこなうことが必要である。遺伝子診断が可能な疾患は急増しており、すでに欧米では2千種類をこえる遺伝子検査が臨床で活用されている。臨床検査の一つとして診療のツールへ移行しつつある。

稀少遺伝性疾患にたいする遺伝子検査の多くはすでに臨床的に有用な検査として位置付けられているが、わが国で保険診療として認められている検査はその1%にも満たない。そのため、臨床検査室や商業的な検査センターでの検査提供はなされていない。現状では、遺伝性疾患の遺伝子検査を研究の一環として提供してきた大学研究室が検査を実施しているが、その提供体制は整備されていない。そのため、実際に遺伝学的検査が必要となった場合には、当該する遺伝学的検査を行なっている研究室を探し出すことが困難である。また、検査の費用については、保険未収載のため従来は各研究室が研

究の一環として無償提供してきた。しかしながら、財政的・人支援がないため、診断サービスの維持が困難となりつつある。この経済的基盤の欠如は、医療としての遺伝子検査の普及に大きな足枷となっている。

本研究の目的は、わが国において遺伝性疾患に対する遺伝子検査を医療として継続的に提供していくためのサポート体制について検討を加えるとともに、システムをデザインして実際に運用することにある。そのモデルとして、わが国における遺伝子診断提供体制を整備することを目的に設立されたNPO法人「オーファンネットジャパン」が存在し、全国の研究室を結ぶ遺伝子診断ネットワークを構築し運営している。今年度はハブ組織としてのオーファンネットジャパンの運用状況を検討し、より効率的で経済的な遺伝子検査提供体制を模索した。

### B. 研究方法

稀少遺伝性疾患に対する遺伝子検査提供ネットワーク「オーファンネットジャパン」の運営状況について検討した。

#### （倫理面への配慮）

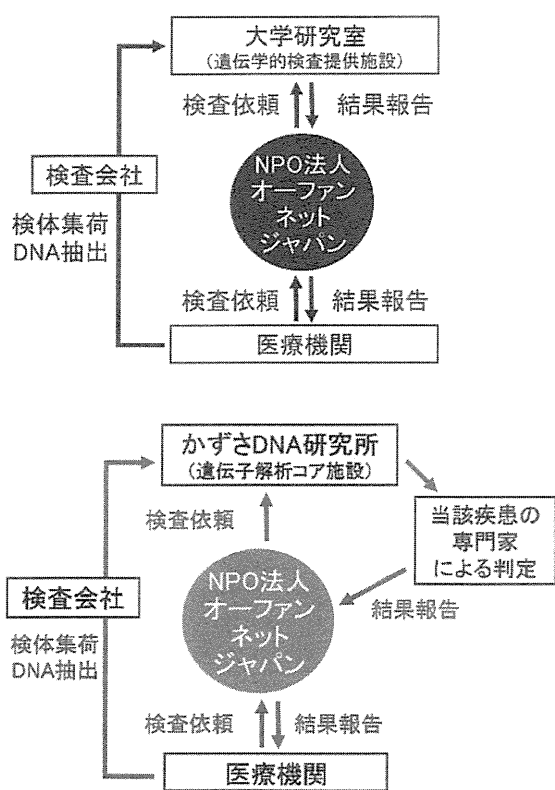
遺伝子解析に際しては、遺伝医学関連10学会に

より策定された「遺伝学的検査に関するガイドライン」（平成 15 年 8 月）および厚生労働省により策定された「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」（平成 16 年 12 月 24 日）を遵守して実施した。

### C. 研究結果

#### （1）遺伝子検査のフロー

オーファンネットジャパンで構築している遺伝子診断ネットワークを図 1 に示す。



<図 1 遺伝子診断ネットワーク>

上段のネットワークは、大学研究室自体が遺伝子解析を行い結果判定までを担当しているケース、下段のネットワークは遺伝子解析を「かずさ DNA 研究所」で実施し、結果判定のみを大学研究室の専門家がやっているケースである。

オーファンネットジャパンが医療機関より遺伝子検査の依頼を受けた際には、検査会社であるエスアールエル社に委託して、検体集荷、DNA 抽出、検体搬送をおこなう。オーファンネットジャパンが検

査を受理した段階でその検体に対して ONJ 番号が発行され、病院からエスアールエル社に血液検体が渡される時点ではすでに匿名化されている。

抽出された DNA が大学研究室に送られた場合は、当該研究室内で遺伝子解析と結果判定を行い、遺伝子検査結果報告書を作成する。この報告書はオーファンネット事務局に送付され、さらに本分担研究者である松原によって最終的な校正が行われる。

かずさ DNA 研究所に移送されて解析される場合には、同研究所のオーファンネット解析チームによって当該遺伝子のシーケンス解析が行われる。解析が終了した段階で、そのデータを当該疾患の専門家がインターネットを通じて閲覧することができる。機密保持のため、ログイン ID とパスワードはその都度専門家に通知される。各疾患の専門家は、この結果と既知変異データベース（その多くは未公開で個人的に収集されたもの）を比較することによって、遺伝子検査結果報告書を作成する。この報告書はオーファンネット事務局に送付され、さらに本分担研究者である松原によって最終的な校正が行われる。

国内で検査が提供されていないものについては、ベルギーの遺伝子検査会社である GENDIA に有料で委託して解析を行うことになっている。

#### （2）検査費用

検査費用については、医療機関から実費をオーファンネットジャパンが徴収し、大学研究室、遺伝子解析コア施設、検査会社に支払う形をとっている。

#### （3）オーファンネットジャパンにおける遺伝子検査受入状況（2011 年 1 月～12 月）

2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災が、オーファンネットジャパン事務局のある仙台市を直撃したため、数か月間の活動休止を余儀なくされた。総検体数は 34 件で、以下の検査を受け入れた。

- カルニチンパルミトイル基転移酵素 II (CPT2) 欠損症 6 件、家族検索 2 件
- プロピオン酸血症 1 件
- デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー 4 件
- 鎖骨頭蓋骨異形成 RUNX2 1 件

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

Lafora 病 NHLRC1 (EPM2B) 1 件  
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症 1 件  
Sotos 症候群 5 件  
メチルマロン酸血症 (cblc 型) 3 件  
メチルマロン酸血症 (mut 型) 1 件  
糖原病 I a 型 1 件  
糖原病 I b 型 1 件  
若年性ポリポーシス症候群 BMPR1A  
若年性ポリポーシス症候群 SMAD4 2 件  
ENG と ALK1 のシークエンスと MLPA 検査 1 件  
ENG 遺伝子異常の家族検索 1 件  
Holt-Dram 症候群 (TBX5) 1 件  
Pfeiffer 症候群 (FGFR2 及び FGFR1 の主要エクソン解析) 1 件  
家族性筋委縮性側索硬化症 SOD1 遺伝子 1 件

(4) 新しい検査項目の追加

本年度は、眼科疾患の遺伝子検査として以下の検査項目について登録を希望する研究室があった。現在、検査提供を開始するための準備中である。

網膜色素変性（常染色体優性遺伝）  
網膜色素変性（X連鎖劣性遺伝）  
RHO 遺伝子変異による網膜変性  
PRPH2 遺伝子変異による網膜変性  
ABCA4 遺伝子変異による網膜変性  
クリスタリン網膜症  
小口病  
眼底白点症  
白点状網膜炎  
若年網膜分離症

D. 考察

オーファンネットジャパンが中心となって遺伝子検査を行うシステムは、2011年3月11日の東日本大震災による中断があったものの、順調に運営が再開され遺伝子検査を提供することができた。大規模ゲノム解析施設として知られる「かずさDNA研究所」をパートナーとした、新たな遺伝子診断提供体制も順調に運用することができた。費用的には、デュシェンヌ型筋ジストロフィー全エクソンのシ

ークエンスを10万5千円という世界で最も安価な価格で提供できていることは、昨今の驚異的な円高を考えると特筆すべきであろう。

研究から臨床サービスへの移行が進みつつあるなか、本年度は眼科疾患遺伝子検査10項目について検査登録申し込みがあった。この他にも、黄疸関連の遺伝性疾患や、てんかん関連の遺伝子診断についても登録依頼があり現在協議中である。今後、検査項目を順次追加していくことによって稀少遺伝性疾患の遺伝子検査体制を充実していくことが可能と考えられる。

E. 結論

わが国における稀少遺伝性疾患の遺伝子検査提供において、オーファンネットジャパンをハブとした遺伝子検査ネットワークが順調に運用されている。登録希望検査室が増加しつつあり、本システムの有用性が裏付けられているものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. Mol Genet Metab. 2012 Jan 8. [Epub ahead of print]

2) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. Hum Mol Genet. 2011 Dec 30. [Epub ahead of print]

3) Miyatake S, Miyake N, Touho H,

- Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of Moyamoya disease. *Neurology* (in press)
- 4) Auerbach AD, Burn J, Cassiman JJ, Claustres M, Cotton RG, Cutting G, den Dunnen JT, El-Ruby M, Vargas AF, Greenblatt MS, Macrae F, Matsubara Y, Rimoin DL, Vihinen M, Van Broeckhoven C. Mutation (variation) databases and registries: a rationale for coordination of efforts. *Nature Rev Genet.* 12(12):881, 2011.
- 5) Wakabayashi Y, Yamazaki K, Narumi Y, Fuseya S, Horigome M, Wakui K, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T. Implantable cardioverter defibrillator for progressive hypertrophic cardiomyopathy in a patient with LEOPARD syndrome and a novel PTPN11 mutation Gln510His. *Am J Med Genet A.* 155A(10):2529-33, 2011
- Adachi M, Abe Y, Aoki Y, Matsubara Y. Epilepsy in RAS/MAPK syndrome: Two cases of cardio-facio-cutaneous syndrome with epileptic encephalopathy and a literature review. *Seizure.* 2011 [Epub ahead of print]
- 6) Niihori T, Aoki Y, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Kawame H, Inazawa J, Ohura T, Arai H, Nabatame S, Kikuchi K, Kuroki Y, Miura M, Tanaka T, Ohtake A, Omori I, Ihara K, Mabe H, Watanabe K, Niihori T, Okano E, Numabe H, Matsubara Y. HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome. *J Hum Genet.* 56(10):707-15, 2011
- 7) Tamaki Y, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Honda M, Muroi Y, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Association between Cancer Risk and Drug-metabolizing Enzyme Gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) Polymorphisms in Cases of Lung Cancer in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26(5):516-22, 2011
- Honda M, Muroi Y, Tamaki Y, Saigusa D, Suzuki N, Tomioka Y, Matsubara Y, Oda A, Hirasawa N, Hiratsuka M. Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of antimalarial artemether. *Drug Metab Dispos.* 39(10):1860-5, 2011
- 8) Tamaki Y, Honda M, Muroi Y, Arai T, Sugimura H, Matsubara Y, Kanno S, Ishikawa M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Novel Single Nucleotide Polymorphism of the CYP2A13 Gene in Japanese Individuals. *Drug Metab Pharmacokinet.* 26(5):544-7, 2011
- 9) Ohashi H, Suzumori K, Chisaka Y, Sonta S, Kobayashi T, Aoki Y, Matsubara Y, Sone M, Shaffer LG. Implications of prenatal diagnosis of the fetus with both interstitial deletion and a small marker ring originating from chromosome 5. *Am J Med Genet A.* 155A(1):192-6, 2011
- 10) Watanabe Y, Yano S, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Yoshino M, Matsuishi T. A familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder. *Brain Dev.* 33(7):576-9, 2011
- 11) Kamada F, Aoki Y, Narisawa A, Abe Y, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Kanno J, Niihori T, Ono M, Ishii N, Owada Y, Fujimura M, Mashimo Y, Suzuki Y, Hata A, Tsuchiya S, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet.* 56(1):34-40, 2011
2. 学会発表  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

なし	なし
1. 特許取得	3. その他
なし	なし
2. 実用新案登録	

## 先天性疾患の臨床的遺伝子診断

研究分担者 国立成育医療研究センター研究所 部長 深見真紀

### 研究要旨

先天性疾患の臨床的遺伝子診断に関し、下記の成果を挙げた。第1に、POR 異常症、SHOX 異常症の迅速変異スクリーニング法を開発した。このようなシステムは、他の疾患における臨床遺伝子診断のモデルとなる。第2に、従来法で変異が同定されなかったアロマトラーゼ過剰症などの先天性内分泌疾患患者を対象に、アレイ comparative genomic hybridization (CGH) を行い、翻訳領域外ゲノム微細構造異常を同定した。これにより、臨床遺伝子診断におけるアレイ CGH の有用性が明確となった。第3に、性分化異常症においては既知遺伝子変異の関与が少ないことを明確とし、次世代シーケンサー解析によるターゲット領域解析の有用性の検討を開始した。

### 共同研究者

なし

### 他の厚生労働省研究班との連携

本研究は、難治性疾患克服研究事業（性分化疾患における診断法の確立と治療指針の作成）（レリーワイル症候群の診断法確立と治療指針作成）、および、「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化事業（小児科・産科領域の大規模遺伝子配列解析による病因解明とゲノム解析拠点整備）」と連携して研究を推進した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、先天性疾患の確実な遺伝子解析法を開発し、臨床的遺伝子診断の全国整備に貢献することである。本研究では、従来法とマイクロアレイや次世代シーケンサーを含む最新の遺伝子解析技術を用いた効率的変異システムについて検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 遺伝子診断システムの構築

本研究では、遺伝子解析のモデルとして、複数の先天性内分泌疾患、先天奇形症候群の効率的変異スクリーニング法について検討を行った。とくに、サンガー法直接シーケンサー、MLPA、FISH、および下記のアレイ comparative genomic hybridization (CGH) などについてその有用性を検討した。

#### 2. アレイ CGH の臨床的遺伝子診断への応用

近年急速に普及してきたアレイ CGH は、全ゲノム領域もしくは染色体特定ゲノム領域のコピー数異常を解析する方法である。本研究では、既知遺伝子の変異が同定されなかった先天性内分泌疾患患者を対象に、当該遺伝子周辺のアレイ CGH を行い、その有用性について検討した。

#### 3. 次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子解析法の検討

次世代シーケンサーは、一度に多数の検体の塩基配列決定を行うことが可能である。本研究では、この方法の臨床遺伝子診断における有用性について検討した。

### （倫理面への配慮）

本研究の遺伝子解析は、国立成育医療研究センター倫理委員会における承認を得たのちに行った。本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守して施行した。すべての検体は、書面でインフォームドコンセントを得た後に採取され、各医療機関で匿名化された。

### C. 研究結果

#### 1. 遺伝子診断システムの構築

①POR 異常症:42 例の POR 異常症患者の遺伝子解析

の結果、本邦においては、80%以上の患者が日本人特異的創始者変異 (R457H) を有することが明らかとなった。これに基づき、制限酵素処理後の PCR 産物を電気泳動で解析する迅速スクリーニング法を開発した。この方法では、検体採取から24時間以内にR457H変異の有無を確実に同定することが可能である。同時に患者がR457H変異のホモ接合体であるかヘテロ接合体であるかを明確とすることができる。なお、この方法とエクソン12の塩基配列決定を組み合わせることによって、これまで同定されたすべての日本人患者において、少なくとも一方のアリルの変異が同定可能であった。

②SHOX 異常症: 正常核型 SHOX 異常症患者の70%は、翻訳領域もしくは下流エンハンサー領域を包含する微小欠失を有することが明らかとなっている。本研究班では、複数の方法で欠失解析を行い、結果を比較した。その結果、SHOX 全翻訳領域は FISH 法および MLPA 両者で同定可能であるが、遺伝子内微小欠失とエンハンサー領域に局限した欠失は MLPA でのみ検出可能であることが見出された。この成績は、MLPA が本症の遺伝子診断にきわめて有効であることを示唆する。一方、下記のアレイ CGH の結果から、SHOX 異常症患者の一部には、MLPA で同定不可能な欠失が存在し、その同定にはアレイ CGH が有用であることが見出された。

### ③ 性分化疾患

尿道下裂・停留精巣を有する男性患者 60 例におけるアンドロゲン受容体遺伝子 (AR)、5 $\alpha$ 還元酵素、MAMLD1 の変異解析を行った。2 例において既報の AR 変異、1 例において既報の 5 $\alpha$ 還元酵素変異を同定した。他の患者ではこれらの遺伝子は正常であった。この成績は、性分化疾患患者の中でこれらの既知遺伝子変異陽性患者の占める割合が低いことを示唆する。

## 2. アレイ CGH の臨床的遺伝子診断への応用:

①POR 異常症: サンガー法で遺伝子内変異が同定されなかった POR 異常症患者 3 例を対象として、POR 遺伝子を包含する領域のカスタム CGH アレイを作成し、コピー数解析を行った。その結果、全例において微小欠失が同定された。症例 1 では非翻訳エクソン 1 を包含する 2,487 bp の領域、症例 2 と 3 ではエクソン 1 および翻訳領域であるエクソン 2 を包含する 49,604 bp の領域がヘテロ接合性に欠失していた。症例 1 の欠失範囲の解析により、エク

ソン 1 周辺の異種間相同配列が、高い転写活性化能を有することが見出された。

②SHOX 異常症: 翻訳領域塩基配列決定および MLPA で異常が同定されなかった 4 家系について、SHOX 遺伝子周辺のアレイ解析を行った。その結果、1 家系で SHOX 遺伝子から 300 kb 以上離れた領域の微小欠失が同定された。これは、従来知られているエンハンサー領域と重複していなかった。

③アロマターゼ過剰症: エストロゲン過剰症状を呈するが、エストロゲン産生酵素遺伝子 (CYP19A1) に変異を有さない男性患者 6 家系を対象として、アレイ CGH を行った。その結果、全例において翻訳領域外のゲノム微細構造異常が同定された。家系 A と B では、CYP19A1 プロモーター領域を包含するタンDEM重複が、家系 C では隣接遺伝子 GLDN と DMXL2 の一部を包含する微小欠失が、家系 D-F では DMXL2 の一部のみを包含する微小欠失が同定された。重複陽性例では機能性プロモーターの数の増加、欠失陽性例では広範囲発現遺伝子 DMXL2 のプロモーターと CYP19A1 との結合が CYP19A1 過剰発現を招いたと推測される。

3. 次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子解析法の検討: 性分化疾患を対象として、ターゲットエンリッチメントおよびアンプリコンシーケンスによるターゲットリシーケンスについて検討した。その結果、ターゲットリシーケンスを用いることにより、多数の検体を対象とした比較的少数の遺伝子解析が迅速かつ低コストで可能になることが明らかとなった。一方、10 以上の遺伝子の解析には、ターゲットエンリッチメントが有効であることが見出された。現在、これらの方法の解析結果の正確性について検証を開始している。

## D. 考察

### 1. 遺伝子診断システムの構築:

POR 異常症、SHOX 異常症をモデルとして、迅速変異スクリーニング法を構築した。これは、実際の臨床の現場において有用であると考えられる。とくに、POR 異常症は男女に共通する外性器異常を招く疾患であり、新生児期における社会的性の決定に難渋することがある。本症の診断はこのような社会的緊急性を有する場合にとくに役立つと予想される。また、遺伝子変異の情報は、POR 異常



症の疾患重症度の一部が残存活性に相関することから、患者の予後予測にきわめて有用である。

一方、尿道下裂・停留精巣を有する男性患者における代表的既知遺伝子の解析では、これらの変異陽性患者が比較的少数であり、他の未知の遺伝子変異の関与が大きいことが明確となった。このような疾患に関しては、下記の次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子解析法などが有効であると推測される。

## 2. アレイ CGH の臨床的遺伝子診断への応用:

従来法で遺伝子変異が同定されなかった POR 異常症、SHOX 異常症、アロマターゼ過剰症患者を対象とした CGH 解析では、翻訳領域外の新たなゲノム微細構造異常が同定された。このような重複や欠失は、遺伝子発現調節を介して、遺伝子内点変異と同等の臨床症状を招くと推測される。アレイ CGH は再現性が高く、技術的に比較的容易である。この成績は、アレイ CGH が、先天性疾患の遺伝子診断において、きわめて有用である可能性を示唆する。

## 3. 次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子解析法の検討

次世代シーケンサーは、従来のサンガー法に比べて大量のサンプルの処理を行う機能を有している。これにより従来法では実施が困難な多数の検体を対象とした複数の遺伝子解析が可能となる。今後、結果の正確性が確認されれば、次世代シーケンサーを臨床遺伝子診断に応用することが可能であると推測される。一方、エクソーム解析など、未知の遺伝子変異を同定する可能性がある方法に関しては、今後倫理面での議論が必要である。

## E. 結論

臨床遺伝子診断のモデルとして、先天性内分泌疾患、先天奇形症候群の迅速変異スクリーニング法を開発した。また、臨床遺伝子診断におけるアレイ CGH の有用性を明確とした。今後、新たな技術の導入により、より確実で効率的な遺伝子診断システムが構築されると期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Kato F, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T. GATA3 abnormalities in six patients with HDR syndrome. *Endocr. J.* 58(2):117–121, 2011.
2. Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T. Identification of chromosome 15q26 terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis. *Endocr J.* 58(3):155–159, 2011.
3. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase Excess Syndrome: Identification of Cryptic Duplications and Deletions Leading to Gain-of-Function of CYP19A1 and Assessment of Phenotypic Determinants. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(6):E1035–1043, 2011
4. Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado M, Nonomura K, Ogata T: *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS ONE* 6(4):e19123, 2011
5. Brandão MP, Costa EM, Fukami M, Gerdulo M, Pereira NP, Domenice S, Ogata T, Mendonca BB. MAMLD1 (Mastermind-Like Domain Containing 1) Homozygous Gain-of-Function Missense Mutation Causing 46,XX Disorder of Sex Development in a Virilized Female. *Adv Exp Med Biol.* 707:129–131, 2011.
6. Soneda S, Yazawa T, Fukami M, Adachi M, Mizota M, Fujieda K, Miyamoto K, Ogata T. Proximal Promoter of the Cytochrome P450 Oxidoreductase Gene: Identification of Microdeletions Involving the Untranslated Exon 1 and Critical Function of the SP1 Binding Sites. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(11):E1881–1887, 2011.
7. Ayabe T, Ishizuka B, Maruyama T, Fukami M, Yoshida R, Uchida H, Yoshimura Y, Nagai T, Ogata T. Association of Primary Ovarian Insufficiency with a Specific Human Leukocyte Antigen Haplotype (A\*24:02-C\*03:03-B\*35:01) in Japanese Women. *Sex Dev.* 5 (5): 235–240, 2011.
8. Kalfa N, Cassorla F, Audran F, Oulad Abdennabi I, Philibert P, Bérout C, Guys JM, Reynaud R, Alessandrini P, Wagner K, Bréaud J, Valla JS, Morisson Lacombe G, Daures JP, Baskin L, Fukami M, Ogata T, Sultan C. Polymorphisms of MAMLD1 gene in hypospadias. *J Pediatr Urol* 7(6):585–91 2011
9. Fukami M, Shozu M, Ogata T. Molecular Bases and Phenotypic Determinants of Aromatase Excess Syndrome. *Int J Endocrinol.* 2011 (in press)
10. 深見真紀、伊達木澄人、緒方勤. 目で見える生殖内分泌疾患の診断と治療. 中枢性性腺機能低下症. *Hormone Frontier in Gynecology.* 17(2): 100–104, 2010.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

11. 深見真紀. 最近話題の遺伝子異常による内分泌および類縁疾患. 性分化疾患. ホルモンと臨床. 58 (7): 31-36 2011.
12. 伊達木澄人, 深見真紀, 室谷浩二, 安達昌功, 小坂喜太郎, 長谷川高誠, 田中弘之, 田島敏広, 本村克明, 木下英一, 森内浩幸, 緒方勤. OTX2 遺伝子異常症の臨床的・分子遺伝学的解析. ホルモンと臨床.(印刷中)2011.
13. 深見真紀, 緒方勤. 小児内分泌疾患とゲノムコピー数異常 生体の科学(印刷中)2011.
14. 深見真紀, 曾根田瞬, 加藤芙弥子, 花木啓一, 神崎晋, 大山建司, 佐野友昭, 西垣敏紀, 稲垣朱実, 高木博史, Gerhard binder, 横谷進, 堀川玲子, 生水真紀夫, 緒方勤. 遺伝性女性化乳房症 6 家系における疾患成立機序と臨床像の解明. 臨床内分泌 Update proceedings.(印刷中)2011.

ESPE meeting, 25-28 September, 2011, Glasgow

2.. 講演・シンポジウム

1. 深見真紀. PORD Update. スプリングセミナー2011. 2011年5月27-29日、大阪
2. 深見真紀. 先天性内分泌異常症を招くゲノム微細構造異常:CGH 解析による新たな疾患成立機序の解明。アジレントゲノミクスフォーラム2011年6月14日、東京
3. 深見真紀. 小児内分泌疾患診療に役立つ分子遺伝学の知識 第45回 小児内分泌学会学術集会教育セミナー 2011年10月6日、大宮
4. 深見真紀. 小児内分泌疾患の分子遺伝学:最近の進歩と今後の展望 静岡県小児内分泌学術講演会2011年12月1日、浜松
5. 深見真紀. チトクロームP450 オキシドレダクターゼ (POR) 異常症の分子基盤: POR 遺伝子発現制御機構の解明 第16回生殖内分泌学会学術集会シンポジウム 2011年11月19日、東京
6. 深見真紀. SHOX の基礎と臨床 第29回 小児代謝性骨疾患研究会 2011年12月3日、東京
7. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase Excess Syndrome Caused by Cryptic Duplications and Deletions Leading to Gain-of-Function of CYP19A1. ENDO annual meeting, June 4-7, 2011, Boston
8. Soneda S, Fukami M, Ogata T. Identification of the Promoter Region for Cytochrome P450 Oxidoreductase Gene. ENDO annual meeting, June 4-7, 2011, Boston
9. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of CYP19A1 and assessment of phenotypic determinants. 50<sup>th</sup> annual ESPE meeting, 25-28 September, 2011, Glasgow
10. Ogata T, Soneda S, Fukami M. Identification and characterization of the promoter region for cytochrome P450 oxidoreductase gene. 50<sup>th</sup> annual

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukami M*, Shozu M, Ogata T	Molecular bases and phenotypic determinants of aromatase excess syndrome.	Int J Endocrinol		in press.	2011
Kagami M, Kato F, Ogata T, et al.	Paternal uniparental disomy 14 syndrome: relative frequency of underlying genetic factors.	Eur J Hum Genet.		in press.	2011
Fuke-Sato T, Yamazawa K, Ogata T, et al.	Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the placenta.	Am J Med Genet A.		accepted.	2011
Soneda S, Yazawa T, Ogata T, et al.	Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding site.	J Clin Endocrinol Metab.	96 (11)	E1881–1887	2011
Matsubara K, Murakami N, Ogata T, et al.	Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors.	J Hum Genet.	56 (8)	566–71	2011
Nakamura M, Fukami M, Ogata T, et al.	Mamld1 knockdown reduces testosterone production and Cyp17a1 expression in mouse Leydig tumor cells.	PLoS ONE.	6 (4)	e19123	2011
Fukami M, Shozu M, Ogata T, et al.	Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of CYP19A1 and assessment of phenotypic determinants.	J Clin Endocrinol Metab.	96 (6)	E1035–1043	2011