

Ⅲ 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等克服研究事業）
遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究

分担研究報告書

国立高度専門医療研究センターにおける遺伝学的検査提供に関する検討

研究分担者 松原 洋一 国立成育医療研究センター研究所長

研究要旨

遺伝性疾患に対する遺伝子検査を継続的に提供する研究機関として、国立高度専門医療研究センターを候補の一つに挙げることができる。本年度の分担研究では、小児・周産期医療を担う国立成育医療研究センターにおける遺伝子検査の実態について調査を行った。

A. 研究目的

遺伝性疾患の診療においては、その診断確定や治療方針の決定、さらに家族への遺伝カウンセリングをおこなうために、遺伝学的検査が重要である。しかしながらわが国ではその提供体制が整備されていない。本研究班ではわが国全体を俯瞰する視点から、遺伝学的検査の実施拠点の在り方について検討がなされているが、その実施拠点の候補の一つとして国立高度専門医療研究センターがあげられている。

国立高度専門医療研究センターは、厚生労働省の施設等機関であった国立高度専門医療センター（略称：ナショナルセンター）の各組織が独立行政法人に移行したもので、6法人が存在している（国立がん研究センター、国立循環器病研究センター、国立精神・神経医療研究センター、国立国際医療研究センター、国立成育医療研究センター、国立長寿医療研究センター）。各法人は、国民の健康に重大な影響のある特定の疾患等に係る医療に関して、調査、研究及び技術の開発並びにこれらの業務に密接に関連する医療の提供、技術者の研修等を行うことを目的としている。

今年度の分担研究では、小児・周産期医療を担う国立成育医療研究センターにおける遺伝学的

検査の実施／提供の現状を把握するために調査を行った。

B. 研究方法

国立成育医療研究センターの病院各診療科及び研究所各研究部に調査質問票を配布し、回収された質問票について集計をおこなった。回答のない部署に対しては個別に直接依頼をし、最終的な回収率は100%であった。

（倫理面への配慮）

本研究は直接遺伝子解析を行うものではなく、遺伝子解析関連の各種ガイドラインには抵触しない。

C. 研究結果

調査結果の集計を表1に示す。

のべ250項目の遺伝学的検査が実施されていた。疾患名の重複があるものについてサンプル調査をしたところ、複教科で互いの連絡がなくそれぞれ独自に遺伝学的検査を実施（依頼）しているものが認められた。

各検査の年間の検体数はごく一部を除き極めて少数（10以下）であった。小児・産科領域における遺伝学的検査の多くは希少疾患対象であり、

種類が多く数が少ないということを裏付けるものであった。

検査の実施場所については病院の診療科では研究所関連部門への依頼またはセンター外部への委託が多く、一方、研究所では自らの研究室で実施するものがほとんどであった。病院各診療科と研究所の連携については、内分泌疾患、血液腫瘍、周産期胎児異常、感染症などでは緊密な研究連携が行われていたが、その他の疾患では交流が乏しかった。

センター外部への遺伝子検査提供については、分子内分泌による内分泌疾患・インプリンティング疾患、周産期病態研究部による周産期疾患のほか、臨床検査部によるリソソーム病などについて行われていた。

D. 考察

本調査により、国立成育医療研究センターでは研究的な側面を有する一部の疾患について遺伝学的検査を実施しており、施設内外への検査提供を行っていることが明らかにされた。次世代シーケンサーの研究拠点としてエクソーム解析の提供も行っている。これらのサービス提供にあたっては、様々な研究費が財政基盤となっていた。一方、相当数の検査については検査提供側ではなくむしろユーザーとして外部への依頼／委託も行っていた。その理由としては、遺伝学的検査の提供を主とする部門がセンター内に存在せず、個々の診療／研究部門が、研究の一環として実施している項目についてのみ検査を実施していることがあげられる。部門相互の連携も十分ではなく、同じ検査を各部門で異なる施設に依頼しているケースもみられた。

現時点でセンターがある程度の遺伝学的検査を実施し施設内外に提供していることが明らかにされたものの、遺伝学的検査の実施拠点として全国的に広くサービスを提供することは難しいと考えられる。今後、センター内での部門相互連携を進めるとともに、研究的遺伝学的検査への依存度を減らし、臨床サービスのための遺伝子検査部門を設立して運営を行い、検査項目の拡充を図

ることが望まれる。また、このような検査提供を継続的に行うためには、人員配置と予算確保が必要である。国からの運営交付金が毎年10%削減されていく中でこの費用をセンター内部で賄うことは不可能であり、何らかの別の財源が求められる。

E. 結論

小児科・産科医療における国立高度専門医療研究センターの役割を担う国立成育医療研究センターでの遺伝学的検査の実態を調査した。今後、国内医療機関への遺伝学的検査を継続的に提供するためには、センター内での抜本的な体制構築と整備、また財政基盤の確立が必要と思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A, Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: A novel source for hepatocytes. *Liver Transpl.* 2013 Nov 23. doi: 10.1002/lt.23800. [Epub ahead of print]

2) Sekiguchi K, Maeda T, Suenobu S, Kunisaki N, Shimizu M, Kiyota K, Handa YS, Akiyoshi K, Korematsu S, Aoki Y, Matsubara Y, Izumi T. A transient myelodysplastic/myeloproliferative neoplasm in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome and a germline BRAF mutation. *Am J Med Genet A.* 161(10):2600-3, 2013.

3) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T,

Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 161(9):2234-43, 2013.

4) Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-function mutations in *RIT1* cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome. *Am J Hum Genet* 93(1):173-80, 2013.

5) Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet*. 58(5):259-66, 2013.

6) Aoki Y, Matsubara Y. Ras/MAPK syndromes and childhood hemato-oncological diseases. *Int J Hematol*. 97(1):30-6, 2013.

7) Asano M, Fujimura T, Wakusawa C, Aoki Y, Matsubara Y, Aiba S. A case of almost unilateral focal dermal hypoplasia resulting from a novel mutation in the PORCN gene. *Acta Derm Venereol*. 93(1):120-1, 2013.

8) Ninomiya M, Kondo Y, Niihori T, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Sequential analysis of amino acid substitutions with hepatitis B virus in association with nucleos(t)ide analogue treatment detecting by deep sequencing. *Hepatol Res*. 2013 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) 松原洋一 次世代シーケンサーによる遺伝性疾患研究・診療のパラダイムシフト 日本人類遺伝学会第58回大会、仙台、平成25年11月

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 |

表1 国立成育医療研究センターで行われている遺伝学的検査

(*) 実施場所：1. 自分の研究室で 2. センター内の他の部署に依頼 3. 検査会社

4. 外部（国内）の学術機関・医療施設 5. 海外の検査会社・学術機関

＜病院＞			
所属	疾患名（または遺伝子名）	年間検査数	実施場所（*）
肝臓内科	Alagille 症候群（JAG1, Notch2）	1～2	4
	PFIC(FIC, BSEP)	1～2	
	胆汁酸代謝異常	<1	
	Wilson 病	<1	
	ヘモクロマトーシス	<1	
総合診療部	血友病 A(第Ⅷ因子)	7	4
	血友病 B（第Ⅸ因子）	5	
	DBA(ダイヤモンドブラックファン貧血)	1	
総合診療部	ブラダーウィリー症候群		2
	RAS/MAPK 症候群 など		
循環器科	マルファン症候群	1～2	4
消化器科	Gilbert 症候群	1	2, 4
	Alagille 症候群	1～2	
	PFIC	1～2	
呼吸器科	間質性肺炎	1	4
	細胞たんぱく症	1	
神経内科	大田原症候群	10～20	4
	West 症候群		
	乳児重症ミオクロニーてんかん		
	Charcot-Marie-Tooth 病		
	無痛無汗症		
	発作性運動誘発性ジスキネジア		
	DYT1(ジストニア)		
	瀬川病		
	急性脳症		
	ミトコンドリア病		
	Rett 症候群		
Kabuki 症候群			
腎・リウマチ科	先天性ネフローゼ	10	2, 4, 5
	補体異常症		
	のう胞性腎疾患		
遺伝診療科	21-hydroxylase deficiency (210HD)	15	1, 2, 4
	Achondroplasia	5	
	ADULT syndrome	1	

Alagille syndrome	6
Adrenoleukodystrophy (ALD)	5
alveolar capillary dysplasia	1
Beckwith-Wiedemann syndrome	1
CHARGE	2
CHILD syndrome	2
chondroplasia punctata	5
CPS1 欠損症	3
EEC syndrome	1
Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMS)	8
Focal dermal hypoplasia	1
Fraser syndrome	3
Freeman-Sheldon	1
Gorlin syndrome	2
Galen 静脈瘤	1
Kabuki syndrome	4
LEOPARD syndrome	1
MCT8 (<i>SLC16A2</i>)	5
Metachondromatosis	3
Metachromatic leukodystrophy (MLD)	1
Nager syndrome	1
NICCD	2
oculocutaneous albinism (OCA)	3
Osteogenesis imperfect (OI)	5
Pfeiffer syndrome type 3	1
PFIC	1
polydactyly	4
Prader-Willi syndrome (PWS)	2
Rapp-Hodgkin syndrome	1
Russell-Silver syndrome (RSS)	3
Spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD)	1
SGS	1
split hand/foot malformation (SHFM)	3
Stickler syndrome	1
Tay-Sachs disease	4
Trichorhinophalangeal Syndrome (TRPS)	1
Wiscott-Aldrich syndrome	1
X-linked hydrocephaly	5
X-linked severe combined immunodeficiency (XSCID)	2
Wilson disease	3

1, 2, 4

	グルタル酸尿症Ⅱ型	2	
	周期性発熱	2	
	先天性巨趾症	2	
	プロテインC欠乏症	4	
	右 Peters 奇形、左小眼球	3	
	無虹彩症	2	
内分泌代謝科	性分化疾患	30~50	1, 2, 4
	成長障害		
	奇形症候群		
	代謝性疾患 (CPS1, MMA など)		
	糖尿病		
	低血糖症		
	副腎疾患		
	甲状腺疾患		
ホルモン受容体異常症			
アレルギー科	アトピー性皮膚炎 (フィラグリンおよびプレオマイシン水 解酵素関連遺伝子)	10	3, 4
感染症科	微生物のリアルタイムPCRを用いた検出 対象は 42 種類の病原体 (各種病原ウイルスおよび培養困難 な細菌や真菌)	1,000	1
臓器運動器病態外科	先天性多発性外骨種症	10~20	2
	指列誘導障害 (裂手症)	5~10	
脳神経外科	先天性水頭症、		2, 4
	頭蓋骨縫合早期癒合症		
	脳腫瘍		
整形外科	Leri-Weill dyschondrosteosis		2
	Hereditary multiple exostosis		
	Metachondromatosis		
耳鼻咽喉科	難聴遺伝子検査 (おもに GJB2 遺伝子、SLC26A4、ミトコン ドリア 1555A→G)	75	4
眼科	先天性網膜形成異常	10	1, 2, 3, 4
	Leber 先天黒内障	5	
	第一次硝子体過形成遺残 大家系	1	
	無虹彩症	5	
	先天性白内障	10	
	先天性緑内障	5	
	視神経形成異常	10	
	小眼球症	5	
皮膚科	先天性皮膚形成異常 (先天性魚鱗癬、先天性毛髪疾患など)	25	2, 4
	色素性乾皮症	1	

手術・集中治療部	白皮症	1	4
	肥厚性皮膚骨膜炎	4	
	Congenital central hypoventilation syndrome (PHOX2B)	1~2	
集中治療科	代謝異常症の原因診断として高アンモニア血症、 高尿酸値症など		2, 4
周産期センター	Duchenne muscular dystrophy (DMD)	5	2, 4
	Spinal muscular atrophy (SMA)	5	
	FMD	5	
	21-hydroxylase deficiency (21OHD)	2~3	
	その他	5	
新生児科	多発奇形	20	2, 3
	Small for date の児		
臓器移植センター (移植外科)	Alagille syndrome	10	2, 4, 5
	FIC-1,2	3	
	Mitochondria dysfunction	10	
	胆汁酸異常	3	
	メチルマロン酸血症 (MMA)	3	
	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 (OTCD)	5	
	CPSI	3	
	プロピオン酸血症 (PA)	2	
	Oxalosis	1~2	
放射線診療部	中枢神経系血管奇形	0~2	4
	endoglin		
	ACVRL1		
	RASA1 など		
臨床検査部	ムコ多糖症 I 型	3	1
	ムコ多糖症 II 型	10	
	ムコ多糖症 III 型	1	
	ムコ多糖症 IV 型	2	
	ムコ多糖症 VI 型	1	
	ゴーシェ病	3	
	ファブリ病	50	
	テイサックス病	1	
	ボンベ病	50	
	フェニルケトン尿症	0-1	
	オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	0-1	
	カルバミルリン酸合成酵素欠損症	0-1	
	N アセチルグルタミン酸酵素欠損症	0-1	
	メチルマロン酸血症	0-1	

	イソ吉草酸血症	0-1	
	メチルクロトニルグリシン尿症 (3-メチルクロトニル CoA カルボキシラーゼ欠損症)	0-1	
	プロピオン酸血症	0-1	
	MCAD 欠損症	0-1	
	VLCAD 欠損症	0-1	
	副腎白質ジストロフィー	3	
	異染色性白質変性症	0-1	1
	I-Cell 病(ムコリピドーシス II 型)	3	
	グルタル酸尿症 II 型	0-1	
	ニーマンピック病 C 型	2	
	軟骨無形成症 Achondroplasia	3	
	軟骨低形成症 Hypochondroplasia	0-1	
	Apert 症候群	0-1	
	Pfeiffer 症候群	0-1	
病理診断部	小児がん：横紋筋肉腫	40	2, 5
	神経芽腫		
	Ewing 肉腫		
	Burkitt リンパ腫		
	髄芽腫		
教育研修部	Diamond-Blackfan anemia	1~3	4
	Fanconi anemia	1~2	
	Transient myeloproliferative syndrome (TAM)	2~3	
	Thalassemia	1~2	
	先天性血小板異常症	1~3	
< 研究所 >			
周産期病態研究部	原因不明流産・死産 (センター他)	190	1
	早産 (センター他)	500	
	妊娠糖尿病 (センター他)	200	
	妊娠高血圧症候群 (センター他)	20	
	原因不明胎児異常・先天奇形・精神発達遅延 (センター他)	180	
	家族性早発閉経 (他施設)	20	
	他エピゲノム解析等	100	
	眼形成異常	6	
	家族性腎疾患	10	
	胆道閉鎖症兄弟例	6	
	先天性免疫異常	7	

	ベクター挿入部位固定	5	
	遺伝子治療用レトロウイルス	6	
	非定形的EBV感染症	15	
	小児白血病	100	
	川崎病	20	
	腎腫瘍	24	
	先天異常	20	
	先天性免疫異常	3	
	アレルギー疾患	3	
	肝細胞	8	
	サイトメガロウイルス	2	
	モデルマウス	2	
	iPS細胞	200	
	先天奇形症候群	70	
小児血液・腫瘍研究部	急性リンパ芽球性白血病	30	1
分子内分泌研究部①	小児内分泌疾患	533	1
	先天性奇形症候群		
	成長障害		
	インプリンティング疾患（疑い例を含む）		
（ゲノムコピー数異常解析）	四肢短縮型低身長	（上記の内訳）	
	Campomelic dysplasia		
	Silver Russell 症候群		
	女性化乳房症・乳がん		
	性成熟疾患		
	NSIADH		
	対象遺伝子不明の疾患		
	レリーワイル症候群		
	先天性副腎過形成		
	性成熟疾患		
	下垂体機能低下症・眼球形成異常		
	性分化疾患		
（変異スクリーニング）	先天性甲状腺機能低下症		
	成長障害		
	性成熟疾患		
	非閉塞性精子形成障害		
	1型糖尿病		
	性分化疾患		
	性成熟疾患		
	成長障害		

	性分化疾患		
	1型糖尿病		
	POR欠損症		
	偽性副甲状腺機能低下症		
	エクソーム解析 (対象遺伝子不明の疾患)		
	既知遺伝子が決定された単一遺伝子疾患 (多種類)		
分子内分泌研究部②	Transient neonatal diabetes mellitus (TNDM)	100	1
	Beckwith-Wiedemann syndrome		
	Russell-Silver syndrome (RSS)		
	14番染色体父親性ダイソミー症候群		
	14番染色体母親性ダイソミー症候群		
	Prader-Willi syndrome (PWS)		
	Angelman syndrome (AS)		
	PHP		
	原因不明成長障害		
	IMAGe syndrome		
	染色体異常症		
分子内分泌研究部③	先天性副腎機能低下症	25	1
	先天性甲状腺機能低下症	2	
成育遺伝研究部	無原発性免疫不全症 (Wiskot-Aldrich)	10~15	1, 2
	慢性肉芽腫症		
	分類不能型免疫不全		
	X連鎖重症複合免疫不全など...		
	次世代シーケンス	1~2	1, 2
母子感染研究部	(a)乾燥臍帯におけるサイトメガロウイルスゲノムの有無に関する解析	20	1, 4
	(b)先天性サイトメガロウイルス感染児における自然免疫関連遺伝子の遺伝子多型に関する解析	5~10	1, 4
成育社会医学研究部	オキシトシン受容体関連遺伝子	300	2, 4

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究
分担研究報告書

小児希少遺伝性難病に対する遺伝学的検査の開発と全国展開

研究分担者 奥山虎之¹

1) 国立成育医療研究センター臨床検査部

小児希少難病、特に先天代謝異常症の中には発症前あるいは発症早期に治療を導入しない限り、望ましい効果は期待できない疾患が多く存在し、積極的な依頼を促せるような簡便で安価な診断法の確立が必要である。我々は、ライソゾーム病の中でも特に早期発見・早期治療が必須であるポンペ病を対象として、乾燥ろ紙血検体を用いた酸性グルコシダーゼ活性測定による遺伝学的検査の全国展開を開始した。2013年1月から2013年12月までに何らかのポンペ病症状を有する疑い患者288症例を対象に、酸性 α グルコシダーゼ活性の測定を行った結果、3例（1.04%）のポンペ病患者を診断した。また pseudodeficiency（偽欠損）を19例（6.6%）で認めた。乾燥ろ紙血を用いた酵素活性定量による診断法は、ポンペ病や他のライソゾーム病の早期診断として有用な遺伝学的検査と考えられる。

A.研究目的

早期診断、早期治療が、予後を劇的に改善する先天代謝異常症としてライソゾーム病が注目されている。酵素補充療法により全身症状の改善が達成できるが、さらに中枢神経症状に有効性が期待できる遺伝子治療、髄腔内酵素補充療法、ケミカルシャペロン療法などの開発が進み、その有効性が報告されている。しかし、どんなに優れた治療法が開発されても、発症前あるいは発症早期に治療を導入しない限り、望ましい効果は期待できない。上記の事情を考慮し、本研究ではライソゾーム病の早期あるいは発症前診断を可能にする乾燥ろ紙血サンプルを用いた遺伝学的検査を開発、臨床応用しその有用性を検証する。

B.研究方法

ポンペ病は、ライソゾーム酵素のひとつである酸性 α グルコシダーゼの先天性欠損を原因とする常染色体劣性遺伝病であり、乳児型の心筋肥大や小児・成人期の近位筋の筋力低下、呼吸筋の障害

で発症する。本病は、発症前もしくは早期に酵素補充療法を開始することにより、生命予後やQOLの改善が期待できる。本年度は、ライソゾーム病の中でも、特に早期発見が重要なポンペ病について、乾燥ろ紙血を用いた遺伝学的検査法を開発、全国展開によるポンペ病の早期診断を試みた。

1. 遺伝学的検査法の確立

採取や輸送が簡便で侵襲の少ない乾燥ろ紙血検体を用いて酸性 α グルコシダーゼ活性を測定する方法を確立した。蛍光人工基質としては、4メチルウンベリフェリルグルコシドを用いた。その際、非特異的なグルコシダーゼの活性を除去するために、アカルボースを反応液に添加することにより、ポンペ病の欠損酵素である酸性 α グルコシダーゼ活性を特異的に検出できる方法が確立した。

2. ポンペ病診断の実践

上記の診断技術に関連学会等を通じて全国的に周知して、原因不明の心筋肥大や筋力低下を呈する症例でポンペ病の可能性が指摘された症例の検査を受託した。なお、活性低値を呈した症例については、pseudodeficiency (偽欠損) の可能性を考慮して、G576S 多型の検出するための遺伝子検査も同時に施行した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を受けて行った。

C.研究結果

288 症例の解析から、3 例の新しいポンペ病患者を同定しえた。また、G576S 多型を有する pseudodeficiency は 19 名で全体の 6.6%であった。

D.考察

ポンペ病は、従来、筋生検による病理学的診断や皮膚線維芽細胞を用いた酵素活性測定により診断されてきた。しかし、いずれの方法も侵襲を伴う検査であり、検査の適応が限られてきたため、非侵襲的な検査による診断が望まれてきた。

今回、我々は、乾燥ろ紙血検体を用いた遺伝学的検査でポンペ病を生化学的に診断し、血中の白血球を用いた遺伝子検査で確定診断する方法を確立した。これにより、筋生検や皮膚生検という侵襲的な検査をすることなく、ポンペ病が診断できるようになった。また、検査に要する時間が短縮され、費用も削減できることにより、医師が検査を積極的にオーダーするようになり、ポンペ病と診断される患者が増加した。同様の方法は、他の多くのライソゾーム病の診断に応用可能であり、今後ライソゾーム病の診断目的での遺伝学的検査として開発し全国展開する予定である。

E.結論

乾燥ろ紙血を用いた遺伝学的検査は、ライソゾー

ム病の早期発見に有用である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. Okuyama T, Yotsumoto J, Funato Y. Survey of second-trimester maternal serum screening in Japan. J Obstet Gynaecol Res. 39:942-947, 2013.
2. Tajima G, Sakura N, Kosuga M, Okuyama T, Kobayashi M. Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. Mol Genet Metab. 108: 172-177, 2013.
3. Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J. The novel SLC02A1 heterozygous missense mutation p.E427K and nonsense mutation p.R603* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype. Br J Dermatol. doi:10.1111/bjd.12790. 2013 Dec 16.
4. 後藤由紀、柿島裕樹、藤直子、渡辺靖、小関満、松林守、木田和宏、小須賀基通、奥山虎之. ポンペ病を対象とした新生児マススクリーニングの運用, 日本マススクリーニング学会誌、23:51-55, 2013.

2.学会発表

1. Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Hamazaki T, Kosuga M, Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S : EFFICACY OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY VERSUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON

- BRAIN INVOLVEMENT IN MPS II, 12th
International Congress of Inborn Errors of
Metabolism, Barcelona, Spain, September. 4.
2013.
2. M. Kosuga, K. Kida, H. Nakajima, J. Fujimoto, T. Okuyama: Development of a new method for diagnosis of adrenoleukodystrophy using liquid chromatography-mass spectrometry. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, September. 4. 2013.
 3. 奥山虎之: 患者登録と新規治療の開発法(シンポジウム: 先天性希少疾患の治療の進歩と患者会の役割). 第116回日本小児科学会学術集会学会、広島、2013. 4. 19.
 4. 小須賀基通、木田和宏、藤直子、奥山虎之: 5つのライソゾーム酵素同時測定によるライソゾーム病の新たなスクリーニング法. 第116回日本小児科学会学術集会学会、広島、2013. 4. 19.
 5. 田中あけみ、鈴木健、奥山虎之、濱崎孝史、藤川研人、坂口知子、小田絵里、藤直子、斎藤三佳、澤田智、北川照男: 三施設共同によるライソゾーム病スクリーニング・パイロットスタディ2年6か月のまとめ. 第40回日本マス・スクリーニング学会学術集会、大阪、2013. 8. 24.
 6. 奥山虎之: ライソゾーム病に対する新生児マス・スクリーニングの現状と今後の課題(シンポジウム). 第40回日本マス・スクリーニング学会学術集会、大阪、2013. 8. 24.
 7. M. Kosuga, H. Nakajima, K. Kida, J. Fujimoto, T. Okuyama. Diagnosis of adrenoleukodystrophy using liquid chromatography-mass spectrometry. American Society of Human Genetics 63rd Annual meeting. Boston, USA. 2013, October 24.
 8. Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Hamazaki T, Kosuga M. Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S. EFFICACY OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY VERSUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON BRAIN INVOLVEMENT IN MPS II. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Maihama, Chiba, 2013. Nov. 27.
 9. A. Wakiyama, Y. Oda, Y. Yamada, H. Fujisawa, M. Yotsuya, H. Tsuda, M. Furujo, T. Kubo, T. Okuyama. Application of clinical path in enzyme therapy for uniformization of nurse operations. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Maihama, Chiba, 2013. Nov. 28.
 10. 田中あけみ、濱崎孝史、桜庭均、斎藤静司、鈴木健、奥山虎之、門野千穂、坂口知子、工藤聡志、藤川研人、小田絵里、藤直子、澤田智、斎藤三佳、北川照男
Iduronate-2-sulfatase の pseudodeficiency allele は意外に多く存在する? 日本人類遺伝学会第58回大会、仙台市、2013. 11. 23.
- H.知的所有権の取得状況(予定を含む)**
特になし。

厚生労働科学研究費補助金
 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
 遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究
 分担研究報告書

Leigh 脳症 64 例における原因遺伝子の検討

分担研究者 後藤 雄一 国立精神・神経センター神経研究所 部長

Leigh 脳症 64 例の原因遺伝子を検討した。ミトコンドリア遺伝子変異を約 30%（過去に報告のある病的変異 18 例（28%），新規変異あるいは病的意義が不明の変異 9 例（14%））に同定し、核遺伝子では PDHC 遺伝子変異を 6%（PDHA1 変異 3 例（5%），PDHX 変異 1 例（1%））に認めた。Leigh 脳症では筋病理の異常所見に乏しい例が多く、原因の検索にはミトコンドリア遺伝子の全周シーケンス法による全塩基配列決定とともに、核遺伝子解析をスクリーニングとして行える体制を早急に整備する必要がある。

A. 研究目的

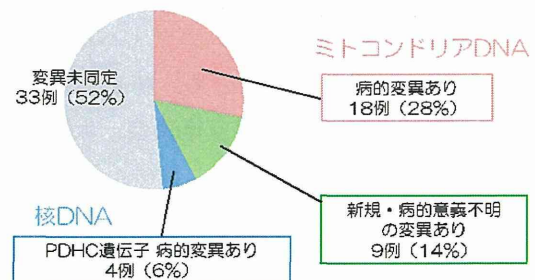
Leigh 脳症は、幼児期以前に発症する進行性の知的・運動発達の障害、血中・髄液の乳酸・ピルビン酸高値、大脳基底核・脳幹の両側対称性の壊死性病変を特徴とする。原因には、ミトコンドリア遺伝子変異、核遺伝子変異がある。Leigh 脳症における原因遺伝子を検討する。

認めた。また、PDHA1 変異を 3 例（5%）、PDHX 変異を 1 例（1%）に認めた。筋病理では、ミトコンドリアと関連する異常を 6 例（9%）（COX 欠損 3 例、SSV2 例、SDH 欠損 1 例）に認めた。

B. 研究方法

対象は、2006～2013 年に遺伝子解析を行った Leigh 脳症患者 64 例（男性 30 例、女性 34 例、検査時年齢 1 ヶ月～13 歳 4 ヶ月）。血液または筋からミトコンドリア DNA を抽出し、long PCR 法、サザンブロット法、全周シーケンス法による解析を行った。ピルビン酸脱水素酵素複合体（PDHC）欠損症を疑った 16 例は、さらに血液ゲノム DNA を用いて PDHA1、PDXB、PDHX のシーケンス解析を行った。50 例では筋病理の検討も行った。

Leigh 脳症 64 例の遺伝子検査の内訳



PDHC 遺伝子

< 病的変異 4 例, 5 変異 >

遺伝子	変異	アミノ酸
PDHA1	c.514C>A	p.P172T
PDHA1	c.508C>T	p.Q170*
PDHA1	c.787C>G	p.R263G
PDHX	c.1336C>T	p.R466*
	c.690_696dupGTCCAGA	p.P233Vfs*279

C. 研究結果

long PCR 法、サザンブロット法で欠失を認めた例はいなかった。全周シーケンス法では、過去に報告のある病的変異を 18 例（28%）、新規変異あるいは病的意義が不明の変異を 9 例（14%）に

D. 考察

Leigh 脳症の原因として、ミトコンドリア遺伝子変異を約 30%に同定し、好発部位だけでなく全周シーケンス法による全塩基配列決定が重要であった。一方で新規変異の病的意義の確定には、生化学検査などの更なる追及が必要であった。また、PDHC 遺伝子変異による Leigh 脳症が 6%を占めた。Leigh 脳症では筋病理の異常所見に乏しい例が多く、原因の検索にはスクリーニングとしてミトコンドリア遺伝子および PDHC 遺伝子をはじめとする核遺伝子解析が必要であった。

E. 結論

Leigh 脳症の原因としてミトコンドリア遺伝子変異が同定されるのは約 30%であり、核遺伝子解析をスクリーニングとして行える体制を早急に整備する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Goto M, Komaki H, Saito T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nishino I, Goto Y. MELAS phenotype associated with m.3302A>G mutation in mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. Brain Dev. 36:180-182, 2014

(著書)

後藤雄一：ミトコンドリア病, 2339 -2342 (内科学、第 10 版、朝倉書店、東京) 2013

(総説)

後藤雄一：ミトコンドリア病の診断と治療. 内分泌・糖尿病・代謝内科 37:481-486, 2013

2. 学会発表

(国際学会)

Takeshita E, Mimaki M, Ishii T, Awazu M, Shinjoh M, Hasegawa T, Miki J, Hidaka Y, Motobayashi M, Kumagai E, Goto Y. Novel

mitochondrial point mutation (m.9155A>G) in two patients with chronic renal failure caused by focal glomerular sclerosis. International Congress of Pediatrics 2013, the 27th Congress of the International Pediatric Association, Melbourne, Australia, 8.24-29, 2013

(国内学会)

根岸豊、服部文子、竹下絵里、安藤直樹、伊藤哲也、後藤雄一、齋藤伸治：ミトコンドリア DNA3697G>A ホモプラスミー変異を認めた Leigh 脳症の 3 同胞例. 第 58 回日本人類遺伝学会大会. 11.23, 2013, 仙台

三宅紀子、矢野正三、後藤雄一、松本直通. UQCR2 ホモ接合性変異による新規ミトコンドリア呼吸鎖複合体Ⅲ欠損症. 第 58 回日本人類遺伝学会大会. 11.23, 2013, 仙台

竹下絵里、三牧正和、吉田寿美子、西野一三、後藤雄一. Leigh 脳症 64 例における原因遺伝子の検討. 第 58 回日本人類遺伝学会大会. 11.23, 2013, 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究班
分担研究報告書

遺伝性神経筋疾患におけるゲノム解析研究

研究分担者 齋藤加代子^{1) 2)}

研究協力者 北村裕梨^{1) 2)}, 近藤恵里¹⁾, 青木亮子¹⁾ 浦野真理¹⁾

- 1) 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター
2) 東京女子医科大学大学院先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野

研究要旨

Genetic heterogeneity が存在する遺伝性神経筋疾患に対して、次世代シーケンサー (SOLiD, Ion Torrent ; ABI 社) を用いたターゲット遺伝子群の網羅的な解析により、従来の遺伝子解析にて原因遺伝子が未確定の症例 31 例中 14 例 (45%) で、迅速かつ効率的に原因遺伝子を確定できた。原因遺伝子が同定できなかった症例に対しては、エクソーム解析の検討、候補遺伝子群の新たなプラットフォームの構築も検討し、さらなる診断能力の向上を目指す。

A. 研究目的

先天性ミオパチー、先天性筋ジストロフィーなど、Genetic heterogeneity が存在する遺伝性神経筋疾患に対して、次世代シーケンサーを用いたターゲット遺伝子群の迅速かつ網羅的な解析により、効果的に原因遺伝子を同定し、確定診断を実現する。

B. 研究方法

対象)

従来の遺伝子解析検査にて原因遺伝子が未確定、あるいは候補病型が多数のため解析に時間を要し、確定診断が滞っている症例、計 31 症例。

(先天性ミオパチー ; 7 例、SMA ; 6 例、FCMD ; 5 例、CMD ; 5 例、メロシン欠損症 2 例、BMD/LGMD ; 5 例、Pena Shokeir 症候群 ; 1 例)
方法)

次世代シーケンサー (ABI 社 ; SOLiD) によるターゲット遺伝子 (筋ジストロフィー関連 : 4 種類、先天性筋ジストロフィー : 10 種類、肢帯型筋ジストロフィー関連 : 10 種類、脊髄性筋萎縮症 : 1 種類、先天

性ミオパチー関連 : 17 種類) 計 42 種類、さらにこれらのターゲット遺伝子の網羅的解析にて遺伝子変異が検出されなかった症例のうち、floppy infant の臨床症状を示す 8 例において、新たに 15 種類の floppy infant を呈する遺伝子群 (筋ジストロフィー : 1 種類、先天性筋ジストロフィー関連 : 5 種類、先天性ミオパチー関連 : 4 種類、脊髄性筋萎縮症関連 : 2 種類、先天性筋無力症 : 2 種類、CMT : 1 種類) について、次世代シーケンサー (ABI 社 ; Ion Torrent) を用いて網羅的解析を行った。

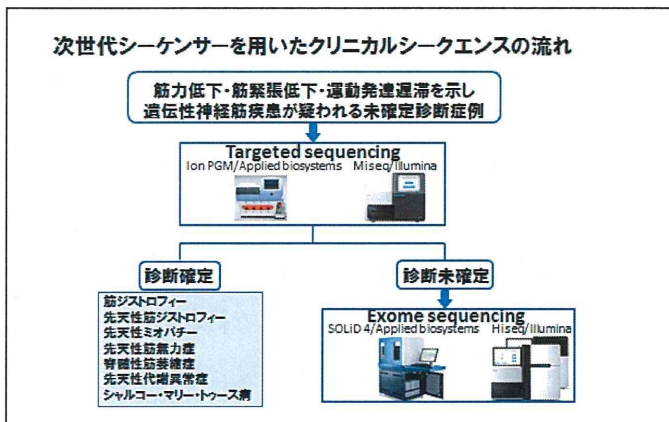
C. 研究結果

case	age	sex	clinical diagnosis	sequence results			genetic diagnosis
				gene	mutation	mutation	
1	0y8m	M	FCMD	<i>FKTN</i>	c.547+2084G>T	(SVA)	FCMD
2	3y0m	M	FCMD	<i>FKTN</i>	p.R47X	(SVA)	FCMD
5	6y6m	M	FCMD	<i>FKTN</i>	p.H172R	(SVA)	FCMD
6	4y7m	F	メロシン欠損症	<i>LAMA2</i>	p.R1350X	p.R1350X (homo)	MDC1A
7	13y7m	M	メロシン欠損症	<i>LAMA2</i>	p.R1549X		MDC1A
12	16y11m	F	CMD	<i>POMT2</i>	p.Y141S	p.L187F	LGMD2N (MDDGC2)
13	2y6m	M	BMD/LGMD	<i>POMT2</i>	p.D380A	p.H416Q	LGMD
14	5y5m	M	BMD+FCMD?	<i>FKTN</i>	R47X, splicing mosaic	mRNAで124bp挿入 +BMD exon45-53欠失	BMD+FCMD
15	9y8m	M	BMD/LGMD	<i>DMD</i>	p.R3345X, somatic mosaic		DMD somatic mosaic * NEM by RYR1 mutations
18	2y1m	M	ネマリシミアパチー	<i>RYR1</i>	p.1673 P>L	p.2829 D>N	
19	13y0m	M	ネマリシミアパチー	<i>NEB</i>	p.D497R fs X2	?	NEM2
21	2y6m	M	先天性ミオパチー	<i>CCDC78</i>	p.R103X		CNM4
29	1y6m	M	SMA-like	<i>ISPD</i>	p.L407S	?	MDDG A7
31	3y1m	M	Pena Shokeir 症候群	<i>RAPSN</i>	p.A246V	p.I335S	CMS

SOLiDにより 11 例 (*FKTN*; 3 例、*DMD*; 1 例、*LAMA2*; 2 例、*POMT2*; 2 例、*RYR1*; 1 例、*DMD+FKTN*; 1 例、*NEB*; 1 例)、Ion Torrent により 3 例 (*RAPSN*; 1 例、*CCDC78*; 1 例、*ISPD*; 1 例) 合計 14 例において変異を同定し、臨床情報と併せて診断を確定、あるいはインシリコ解析により原因遺伝子である可能性が高いと判断した。

D. 考察

臨床的・病理学的に共通性を有する遺伝性神経筋疾患において、次世代シーケンサーを用いたターゲット遺伝子解析により、迅速に遺伝子変異同定が可能になってきた。今回の解析で原因遺伝子が同定されなかった症例においては、エクソーム解析の検討、候補遺伝子群の新たなプラットフォームの構築も検討し、さらなる診断能力の向上を目指す。



E. 結論

Genetic heterogeneity を示す遺伝性神経筋疾患において、従来の遺伝子解析にて原因遺伝子が未確定の症例 31 例中 14 例 (45%) で、次世代シーケンサーを用いた原因遺伝子の網羅的解析を行うことにより、迅速かつ効率的に原因遺伝子を確定できた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kondo E, Nishimura T, Kosho T, Inaba Y, Matsuhashi S, Ishida T, Baba A, Koike K, Nishino

I, Nonaka I, Furukawa T, Saito K. Recessive *RYR1* Mutations in a Patient With Severe Congenital Nemaline Myopathy With Ophthalmoplegia Identified Through Massively Parallel Sequencing. *Am J Med Genet A* 2012;158(A): 772-778.

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
難知性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究
分担研究報告書

大学などの研究室で行う遺伝学的検査の品質管理に関する課題

研究分担者 東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 宮地勇人

研究要旨

本研究では、遺伝学的検査の継続的な実施体制と質保証の確保の両立を目指して、関連する情報を収集、整理し、それに基づき、医療・ヘルスケアさらに大学などの研究室における検査（サービス）の品質確保のための方策を検討することを目的とした。検査実施に関する提言を以下のごとくまとめた。

1. 単一遺伝子疾患の確定、発症前、保因者、出生前の遺伝学的検査が、医療機関はじめヘルスケアの枠組みで行われる場合は、日本臨床検査標準化協議会「遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン」（2012年）に添って、質保証システム、施設技能試験、結果の報告の質、検査施設要員の教育と訓練の基準を満たすことを前提とする。検査機関は、必要に応じて登録衛生検査所登録に加え、品質マネジメントと技術的要求事項を満たす国際標準規格 ISO15189 等の第三者認定が望まれる。
2. 大学などの研究室を含めて、その他の遺伝子関連検査については、上記の精度確保を求める努力とともに、医療機関はじめヘルスケアの枠組みで行われる場合、利用者が安心して利用できるよう、検査機関における検査精度と要求事項に対する対応に関する情報公開が望まれる。
3. 新しい技術を用いた遺伝学的検査では外部精度調査や第三者評価のしくみが十分に整っていない。この場合は、その精度確保の確認は、上記2つに加え、臨床遺伝学や臨床検査の専門家の指導のもと実施することが望まれる。
4. 検査データ蓄積に基づく、臨床的妥当性、臨床的有用性の評価および適正利用には、検査実施・データの情報共有化が必要なため、データ登録および管理のしくみが構築され、その管理の継続性が確保できるよう、国レベルのネットワークが整備されることが望まれる。

A. 研究目的

近年、遺伝学的検査は、保険診療への導入に加え、保険診療外の医療またはヘルスケアの領域、すなわち自由診療、健診、DTC/OTCにおいても検査サービスが開始され、社会浸透が見られる。日本医学会は、遺伝医学の専

門医を介さない遺伝子検査により、体質や子どもの能力や適性などを調べる「遺伝子検査ビジネス」の拡大を懸念して、国として監視・監督する体制の確立と法整備を求める提言を2012年に発表した。その一方、検査サ

ービスの提供と利用は拡大を続け、その対象は、肥満遺伝子など体質検査に加え、生活習慣病やがん等に対する疾患感受性さらには単一遺伝子疾患の遺伝学的検査にまで及ぶようになった。しかしながら、これら保険診療外の医療またはヘルスケアの領域における検査サービスにおいて、精度確保や適正利用に関して、規制や監督指導、第三者評価の義務づけはない。

希少疾患の検査は、大学などの研究室で行われていることが多い。そのような研究検査において、臨床的有用性が明らかで、その結果が患者診療に用いられる場合、一定の品質確保の体制のもとでの検査実施と結果報告が求められる。遺伝学的検査が適正に利用され普及するには、実践可能な検査の継続的な実施体制を前提として質保証の確保を可能とするしくみが必要である。また、遺伝学的検査の実施体制の中核となる実施拠点の構築において、新たな技術応用と分子病態診断で大きな役割を担う大学などの研究室における検査の質確保が重要となる。そこで、25年度の「遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究」分担研究では、大学などの研究室で行う遺伝学的検査の品質管理に関する課題について検討し、具体的な提案を行うことを目的とした。

B. 研究方法

2013年から国内での検査提供が開始された無侵襲的出生前遺伝学的検査における精度保証の取り組みについて調査し、課題を整理した。

遺伝学的検査の利用拡大における精度保

証における精度保証の取り組みについて国内の状況を調査し、課題を整理した。

大学など研究室で行う遺伝学的検査について、継続的な実施体制を前提として、質確保のための具体的な方策について提言としてまとめた。

C. 研究結果

1) 無侵襲的出生前遺伝学的検査における精度保証の取り組み

次世代シーケンサーを始めとする近年の技術革新の結果、遺伝学的検査のサービスの新たな分野が次々と登場している。その1つとして、出生前遺伝学的検査の開発と実用化は急速な展開を示している。近年、妊婦の末梢血（母体血）を用いた出生前遺伝学的検査が開発され、海外に続き、わが国においても利用が開始された。無侵襲的出生前遺伝学的検査（Non-invasive prenatal genetic testing: NIPT）は、採血のみで検査が受けられるなどアクセスが容易であるため、急速な普及が予想され、そこで十分な理解をもちずに実施される懸念など倫理的課題が指摘されている。日本医学会をはじめとする関係5団体による協議の結果、NIPTには倫理的に考慮されるべき点のあること、試料を分析する検査会社が未だ国内にはないこと、わが国独自の解析経験とデータの蓄積が存在しないなどから、その検査の利用実施は、まず臨床研究として、認定・登録された施設において開始されることとなった（2013年）。その実施においては、他の遺伝子関連検査と同様に、施設によらず良質な診療の遂行のために、検査の精度保証に基づく適正な利用が