

求められる。本検査の実施においては、採血後血漿中の遊離 DNA の割合が不安定であること、海外での検査機関への搬送に長時間必要なこと、海外での検査機関の精度保証について国際的な枠組みでの運用評価が必要なことなど技術的な検討課題がある。

一般に遺伝子関連検査の精度は測定前プロセス特に検体の品質に大きく左右される。本検査では、測定の再現性など分析的妥当性を確保する上で、血漿の検体品質の確保が必要となる。EDTA採血の場合、血漿中の胎児由来DNAの割合は8時間まで安定で、その後、低下するとされる。このため、検体処理まで保存や搬送時間により検体の品質が劣化し測定信頼性が低下する懸念がある。

特に、本検査の利用では、国外（米国）の検査機関（米国シーケノム分子センター）に検体を搬送して測定実施するため、検体の品質確保は重要な課題である。本検査を受託する米国の当該検査センターでは、検体の精度保証について米国臨床検査室改善法

(Clinical Laboratory Improvement Amendments : CLIA) に準拠し、検査の精度保証を行う能力を有すると評価された米国病理医協会 (College of American Pathologists : CAP) による認定施設であることが文書証明されている。CAP 認定施設としての要件を満たす過程において、検体の品質を確保するため、検体の取り扱いに関する工夫がなされている。まず、検体採取にあたり、EDTA 採血に替わり、ヌクレアーゼ阻害剤と保存剤入りの特殊採血管を採用している。専用の採血管にて、過度の陰圧による細胞破壊の影響を避けるため、採取法など手順

が明確化されている。米国の検査機関への搬送は、集荷から配達まで検体温度管理が確保された専用輸送箱にて行われる。休日等の関係で搬送が所定時間（72 時間）を超える場合は都内の施設（登録衛生検査所）にて分離・凍結（-80℃）を行う。血漿分離の作業は、当該検査センターの提示する標準作業書に従って実施される。

検査の精度保証を確認する上で、新たな技術であるための課題がある。すなわち、独自開発の検査について特異的な標準物質、精度管理、技能試験、監査の方法は開発されていない。今後、NIPT は複数の検査機関から独自に開発した方法にて受託が行われると想定される。また、性染色体検査など検査サービス提供の対象が拡大する可能性がある。新たな遺伝学的検査サービスの開始において、国内外における精度保証の取り組みや標準化の活動を踏まえて、一定の精度保証のもとで適切な実施と利用が望まれる。

## 2) 品質の確保を指標とした評価とは？

品質のマネジメントと品質レベルとの関係では、標準規格やガイドラインがベースラインの基準となり、そのコンプライアンスに基づき、物理的要件、プロセス要件、アウトカム要件を満たすことで品質レベルが向上する。品質レベルのさらなる向上に向けて、品質サーベイランス（サービスプロバイダーのパフォーマンス、データ・フィードバック、介入）を踏まえた PDSA サイクルに基づき、継続的改善へと進む。物理的要件は規制やインセンティブやケース監査、ピアレビューにて審査され、後者（プロセス要件以降）は施

設認証や認定の対象となる。

測定が複雑で、専門的技術・知識、解釈・判断、教育トレーニングを必要とする遺伝学的検査では、品質を確保する上で、品質マネジメントさらに技術的要求事項を満たすことまでをカバーすることが望まれている。具体的には、後者について「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」で述べられた項目を検討する必要がある。

海外においては、質確保を指標とした一定の施設要件を満たす検査機関には、その段階（品質管理、品質マネジメントさらに技術的要求事項）によって、認可、認証、認定のしくみがある。検査機関の施設認定には、米国での CAP（米国病理医協会）の施設認定があり、国際規格として「臨床検査室としての検査を行う能力に関する特定要求事項」を規定した ISO15189 に基づく施設認定がある。新たに遺伝学的検査に関する事項が盛り込まれた改定版 ISO15189:2012 が 2012 年 11 月に発行され、2013 年 4 月邦訳版が発行された。

一方、本邦では、質確保を目的とした国としての監督指導は十分整備されていない。検査機関の認証・認定取得は任意である。

### 3) 保険診療外の遺伝学的検査サービスの品質の確保

新たな遺伝学的検査サービスの開始において、国内外における精度保証の取り組みや標準化の活動を踏まえて、一定の精度保証のもとで適切な実施と利用が望まれる。特に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の提供は、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べきである。

単一遺伝子疾患や保因者診断、発症前診断、出生前診断、親子鑑定や移植における個人識別等の検査サービスにおいては、必要に応じて登録衛生検査所登録に加え、大手の検査機関のように、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。

また、ヘルスケアや健診で利用される他の体質検査や簡易な測定（試薬キット、自動測定：薬事承認・未承認検査法）において、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の精度確保に関する取り組みの情報公開が望まれる。

### 4) 大学などの研究室での検査の品質管理

大学などの研究室で取り扱う遺伝学的検査は、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継続的な検査実施と結果報告が求められる。実際には、多くの遺伝学的検査において、試薬キットや自動測定システムなど製品は利用できる状態でない。一方、大学などの研究室では、上記 1) 2) の体制整備の短期的な実現は困難である。そこで、最低限レベルの品質を確保するため、物理的要件を満たすことから開始することが望まれる。物理的要件には、環境、組織、専門家、

文書記録保持が含まれる。環境、組織に関しては、検査実施のための環境整備(安全確保)、設備設置、組織構築や人員配置が必要である。専門家として、指導者と測定技術者の両者にて、一定の素養・資格を有することが求められる。文書記録保持には、検査開始前の準備として、検査の分析的妥当性、臨床的妥当性(さらには臨床的有用性)の評価に関する文書、標準作業書(SOP: standard operating procedure)の整備が必要となる。分析的性能評価は、正確性、精密度、基準範囲、報告範囲、分析的感度、分析的特異度、および測定性能を確保する上で重要な指標(検体安定性、試薬安定性、直線性、キャリーオーバー・クロスコンタミネーションなど)を含む。臨床的性能評価は、臨床的感度、臨床的特異度、陽性・陰性予測値、臨床的有用性を含む。検体取扱い(採取、搬送、保存)、検査依頼(依頼書式)、検体受付、前処理、測定、報告(報告書式)、精度管理の手順は文書化(SOP)し、関連スタッフが作業場で利用できるよう整備し、教育プログラムとして(再)訓練・評価に利用する。

大学などの研究室における遺伝子診断においては、上記の要求事項に関して、段階的に取り組みに関する文書化を行う。希少な疾患の遺伝学的検査での具体的な取り組みは、「稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査を実施する際のベストプラクティス・ガイドライン、日本人類遺伝学会「遺伝学的検査標準化準備委員会」を参照する。これらの文書化された記録は、指導的立場の者にてレビューされ、検査結果を報告する上での要件を満たしていることを確認する。

上記の検査サービスとしての品質確保を求める努力とともに、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への対応に関する情報公開が望まれる。

#### D. 考察

24年度厚生労働科学研究費補助金「難治性疾患等克服研究事業「遺伝学的手法における診断の効果的な実施体制に関する研究」において、現行の保険医療制度の中で、遺伝学的検査の質確保と継続的な実施体制に向けて具体的な提言を行った。そこでは、品質の確保を指標とした評価を保険償還に組み込む上で、診断薬(製品)とサービスのそれぞれで品質保証の指標を設定する必要があるとした。特に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提供される場合、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。

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は、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に関する情報公開が望まれる。

大学などの研究室で研究検査として行われている遺伝学的検査の中で、臨床的有用性

が明らかで、医療機関はじめヘルスケアの枠組みで行われる場合は、上記のごとく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。一方、大学などの研究室では、上記の体制整備の短期的な実現は困難である。そこで、最低限レベルの品質を確保するため、物理的要件を満たすことから開始することが望まれるとした。

大学などの研究室での検査に関して、品質確保と継続的な実施体制の両立のための選択肢として、同じ施設（医療機関）の臨床検査室との連携が挙げられる。これは、技術移転や結果解釈等の連携においてより現実的である。また、検体検査管理加算など施設加算を運用することで、検査実施の財政的、人的な基盤が確保可能である。

将来的には、検査（サービス）の品質確保を指標とした一定の施設要件を満たす検査機関に対して、認可、認証、認定のしくみが必要で、また保険医療制度の中での規制や保険診療上の報酬等のインセンティブと連動することが望まれる。

国のリーダーシップのもと、産官学が連携して、現行の保険医療制度の中で、品質確保と継続的な実施体制の両立のための施策を推進することが望まれる。

## E. 結論

近年、遺伝子関連検査は、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、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。さらに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。このような状況を鑑み、本研究では、医療・ヘルスケアで利用される遺伝子関連検査の品質確保に向けた考え方を整理し、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. 特に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提供される場合及びは、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、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は、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。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表 なし

I. 論文発表

1. Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Kigasawa H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Excess treatment reduction including anthracyclines results in, higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid, leukemia in children. *Leukemia* 27, 2013; 2413-16.

2. Tanaka Y, Matsushita H, Tanaka Y, Maruki Y, Hayashi F, Kondo T, Asai S, Miyachi H. Elimination of interference by lipids in the low WBC mode in the automated hematology analyzer XN-2000. *Intern J Lab Hematol* (2014, in press)

3. Tanaka Y, Matsushita H, Tanaka Y, Maruki Y, Kondo T, Asai S, Miyachi H. Evaluation of the body fluid mode of automated hematology analyzer XN-Series

for extremely low peripheral White Blood Cell Counts. *Intern J Lab Hematol* (2014, in press).

4. Tanaka Y, Tanaka Y, Gondo K, Maruki Y, Kondo T, Asai S, Matsushita H, Miyachi H. Performance evaluation of platelet counting by novel fluorescent dye staining in the automated hematology analyzers XN-series. *J Clin Lab Analysis* (2014, in press)

5. Asai S, Okami K, Nakamura N, Shiraishi S, Sugimoto R, Damdinsuren A, Sato S, Matsushita H, Suzuki Y, Miyachi H. Localized or diffuse lesions of the submandibular glands in IgG4-related disease in association with differential organ involvement. *J Ultrasound Med* 2013;32 : 731-736.

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

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

細胞遺伝学的検査の提供体制の研究

研究分担者 福嶋義光 信州大学医学部 遺伝医学・予防医学講座 教授

研究要旨

遺伝学的検査の実施拠点の在り方のうち、細胞遺伝学の立場からみた技術的課題、および全ゲノムを対象に実施する遺伝学的検査における倫理的課題を中心に検討した。マイクロアレイ染色体検査で検出されるコピー数変化は、塩基配列解析において検出される変異と同様、それが病的な変異か、症状に影響しない多型か、症状との関連を現時点で確定できないものかについて専門家の判断を必要とする。先進諸外国においては、マイクロアレイ染色体検査がすでに臨床検査として実施されており、これにより得られるCNVs (copy number variations) データが、蓄積され、結果解釈の評価法についても検討が進んでいる。CNVsデータは、今後全ゲノムを対象に実施する次世代シーケンサーを用いた遺伝学的検査の結果解釈にも必要となる。偶発的所見を検出しうることにしても共通する課題がある。次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析、全ゲノム解析の体制整備だけではなく、マイクロアレイ染色体検査を含めた包括的な遺伝学的検査の体制整備について考えておく必要がある。

研究協力者

大橋博文・清水健司（埼玉県立小児医療センター）、倉橋浩樹（藤田保健衛生大学）、黒澤健司（神奈川県立こども医療センター）、小崎健次郎（慶応大学）、小崎里華（国立医療研究センター）、後藤雄一・井上健（国立精神・神経医療研究センター）、原田直樹（三菱化学メディエンス）、山本俊至（東京女子医科大学）、涌井敬子（信州大学）

A. 研究目的

先進諸外国において遺伝学的検査は、遺伝生化学的検査、細胞遺伝学的検査、および分子遺伝学的検査を包含した体制のもとで実施されている。遺伝子全体を含む領域のコピー数変化（Copy number variations; CNVs）や、サイズの大きい挿入・欠失変異など、構造変異として分類される変異もDNA variants のひとつである。諸外国ではすでに、マイクロアレイ染色体検査（cytogenomic microarray）が臨床検査として実施されている。

遺伝学的検査の実施拠点の在り方のうち、細胞遺伝学の立場からみた技術的課題、および

全ゲノムを対象に実施する遺伝学的検査における倫理的課題を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 先進諸外国の細胞遺伝学的検査体制

マイクロアレイ染色体検査を含めた細胞遺伝学的検査の診療への導入の状況等について、2013年6月にパリで開催された欧州人類遺伝学会（European Human Genetics Conference 2013）、および同10月にボストンで開催された米国人類遺伝学会（The American Society of Human Genetics）第63回大会における講演、一般発表、企業セミナー、機器展示など、およびマイクロアレイ染色体検査の国際コンソーシアムとして活動しているISCA（International Standard Cytogenomic Array Consortium）が提供している情報、その他インターネットに掲載されている細胞遺伝学的検査に関する情報、さらに国内外の細胞遺伝学的研究者との私信等により情報収集を行った。

(2) わが国の細胞遺伝学的検査に関する検討

2013年12月14日（土）に、マイクロアレイ染色体検査を実施している主な施設の責任者等が集まり、細胞遺伝学的検査、特にマイクロアレイ染色体検査の提供体制を中心に、課題と解決方法について討議した。

#### （倫理面への配慮）

本研究は、遺伝学的検査の実施体制のあり方について検討することを目的とする研究である。各種倫理指針を遵守した上で実施した。

### C. 研究結果、および D. 考察

#### (1) 細胞遺伝学的検査体制について

先進諸外国ではマイクロアレイ染色体検査は、原因不明の先天異常患者に対して実施すべき最初の遺伝学的検査として普及しており、従来の染色体検査は臨床診断可能な異数性異常の確認や、マイクロアレイで検出されたコピー数異常に伴う構造変化の確認、マイクロアレイでは検出が困難な均衡型構造異常やモザイクの確認などの目的のため補完的に用いられる傾向が強くなっていることがわかった。

マイクロアレイ染色体検査で病的な CNVs を認めなかった原因不明の先天異常患者に対し、次世代シーケンサー（Next Generation Sequencing; NGS）を用いた全エクソーム解析（Whole Exome Sequencing; WES）を実施した研究発表が増えており、米国 Baylor 医科大学においては、臨床検査としての WES も開始されていた。英国においても、遺伝学的検査は他の臨床検査と同様、National Health Service の Genetic Services として、基幹施設の遺伝学的検査室において、従来の染色体検査からマイクロアレイ染色体検査、NGS を用いた WES 解析までを総合的に実施している。すなわち遺伝学的検査は国際的に、遺伝生化学的検査、細胞遺伝学的検査、分子遺伝学的検査を総合的に実施する体制が整備されている。

各遺伝学的検査費用は、米国では日本のように材料費のみでなく、解析精度を保証するための精度管理費、解析担当者の人件費、さらに結果解釈も重要であるため、結果解釈を含む報告書作成の責任を担う専門家の人件費も含まれている。わが国では、従来の染色体検査および36種の単一遺伝性疾患についての遺伝学的検査が保険適用となっているが、結果解釈にかかる費用は考慮されていないこともあり、診療報酬は米国で提示されている費用

より大幅に低い。わが国の遺伝学的検査の診療報酬に、結果解釈に相応の費用も考慮される必要がある。NGSを用いたWES解析、およびマイクロアレイ染色体検査においても、臨床検査として実施する際には、既知の病的変異以外の変異が検出された場合の結果の解釈が最大の課題となり、その責任を担う専門家の育成が求められる。

わが国においてもマイクロアレイ染色体検査を臨床検査として実施できるようにするため、検査を実施している主な施設の責任者等で、正常日本人のCNVsデータベース情報の共有、解析方法・結果解釈についての標準化ガイドライン作成、専門家育成、実施施設の要件について検討を進め、一部具体化にむけた準備を開始している。

#### (2) マイクロアレイ染色体検査の課題 結果解釈

マイクロアレイ染色体検査で課題となっていることのひとつが、検出されたCNVsが、患者の疾患や症状と関連している（pathogenic CNVs: pCNVs）か、関連がない（benign CNVs: bCNVs）か、現時点では明らかでない（Variants of Unknown Clinical Significance; VOUS）かの判断が必要ということがある。DGV (Database of Genomic Variants), DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources), ISCAなどの海外のデータベースに解析症例のデータが蓄積されてきており、各CNVsの結果解釈の評価法についても検討が進んでいる（ER Riggs et al. Towards an evidence-based process for the clinical interpretation of copy number variation. Clin Genet 81:403-12, 2012 など）。ISCAはこれまでマイクロアレイ解析で得られたCNVsを登録対象としていたが、International Collaboration for Clinical Genomics (ICCG) として、シーケンズレベルの変異も含めた DNA variation を登録する体制に移行した。この動きは、例えばDuchenne 型/ Becker型Muscular Dystrophy症のようにDMD遺伝子内あるいは周辺遺伝子も含むゲノムコピー数異常でもDMD遺伝子の塩基置換でも発症する疾患の診断に有用となり、新規の原因遺伝子探索研究への応用も期待される。

NGSによるWES解析で検出される塩基置換などの変異に、人種差があることが報告されているが、CNVsにおいても同様であり、さらなるデータ蓄積が必要である。

当施設でこれまでマイクロアレイ染色体解析した症状のない患者の親等健常成人約100名、他施設の約50名の解析結果を、国内で先天異常患者の診断目的にマイクロアレイ染色体検査を実施している主な8施設間で、領域情報について共有する試みを開始した。現在推奨されている条件で当施設で解析したデータの概要は、ひとりにつき5~10個のCNVsが検出され、集計すると185領域にCNVsを検出し、そのうち5名以上に検出された領域が約11%、約75%は1例のみに検出したCNVsであった。2010年時のDGVとの比較では、85領域の約40%が類似の登録がない領域だった。また、185領域のうち70%以上が既知の遺伝子とオーバーラップしており、そのうち23領域（全体の12.4%）は疾患との関連について報告のある遺伝子を含む領域であった。2013年11月に追加・公表されたHuman Genetic Variation Database (HGVD)の1,208名の健常日本人のWES結果からも日本人特有なSNPsが多数あることが示されたように、CNVsでも同様のことが示唆され、健常日本人CNVsのデータベースもSNPsデータベースと関連して構築することが求められる。

#### 偶発的所見

全ゲノムを対象として実施する遺伝学的検査において検出される可能性のある偶発的所見 (Incidental Findings; IF) に関する議論は、2013年に米国から Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues として公表された「Anticipate and Communicate. Ethical Management of Incidental and Secondary Findings in the Clinical, Research and Direct-to-Consumer Context. Presidential Commission for the Study of Bioethical Issues」をはじめ、ESHG や ASHG で議論が活発になってきている。

IFについては、2013年3月に米国臨床遺伝・ゲノム学会米国臨床遺伝・ゲノム学会 (American College of Medical Genetics and Genomics; ACMG) のワーキンググループが、臨床検査として実施される WES 解析において、被験者にその結果を開示すべき 24 疾患、56 遺伝子を公表した (Green RC et al, 2013)。

主な疾患としては、遺伝性乳がん卵巣癌症候群 (HBOC) などの遺伝性腫瘍 (16 疾患)、Marfan 症候群や遺伝性不整脈などの循環器疾患 (7 疾患) および悪性高熱症が含まれている。主に NGS を用いた解析を想定しているが、マイクロアレイ染色体検査で検出される疾患もあり、同様に留意する必要がある。これらの疾患・遺伝子は、変異が明らかになった場合には、浸透率が高くほぼ間違いなくその疾患に罹患すること、および診断された場合に、治療法・予防法があり、被験者・血縁者にとって健康上のメリットがあることから、IF が見出される可能性をあらかじめ認識しておくことと、被験者への十分な情報提供と意思疎通を行うことが必要としている。

しかしながら、この ACMG ガイドラインには、検査サイドに過度の負担がかかること、拒否する権利が認められていないこと、子どもの人権が守られていないこと、結果報告が健康の保持に役立つという根拠が十分ではないことなどの批判があり、ACMG では再度、会員に対してアンケート調査を行っているところである。

わが国においても、早急に偶発的所見についての対応策についての議論を深化させておく必要がある。

#### 臨床応用

現在最も汎用されている次世代シーケンサーは、100-150bp 程度の短い断片の塩基配列決定を基本としているため、遺伝子全体を含む CNVs や、サイズの大きい欠失や挿入などゲノム構造の変化を伴う変異の検出は困難である。DGV は、健常者について 50bp 以上の DNA 断片のゲノム変異を登録・公開しているが、現時点で 22300 を超えるゲノムから 250 万以上登録されたゲノム変異の断片の大きさは 50bp から 3Mb におよび、44%は数十 kb 以上の CNVs 検出を目的とするマイクロアレイ解析による結果であることが示されている。この結果は、特に小児の原因不明の遺伝性難治疾患の原因遺伝子探索に際しては、WES 解析の前にマイクロアレイ染色体解析により pCNVs を否定しておくことが現時点では有用であることを示している。

また、英国 Sanger 研究所では、Deciphering Developmental Disorders (DDD) study として、発達障害患者の診断と医療対応の向上を目的に、患者とその両親に研究参加を呼びかけ、



12000 トリオについてマイクロアレイ染色体検査と WES 解析を実施し、得られた情報を DECIPHER に登録するプロジェクトを進めている。このプロジェクトを通じて得られる正常成人としての両親のデータの蓄積の重要性も大きい。

マイクロアレイ染色体検査が従来の分染法と大きく異なるところは、マイクロアレイ染色体検査の結果が、サイズは大きいがシーケンススペースで示されることである。NGS のデータから CNVs を検出する解析ソフトも開発されつつあり、将来的には CNVs の検出も NGS により解析可能となるであろうこと、諸外国で遺伝学的検査が総合的に実施されていることを考慮すると、マイクロアレイ染色体検査の実施体制は NGS を用いた塩基配列決定解析とともに体制整備されることが望まれる。臨床的に確定診断が困難な小児の先天異常疾患においては、全ゲノムを対象としたマイクロアレイ染色体検査が広く普及しており、わが国でも早急にこの解析法を遺伝学的検査として実施できる体制を構築する必要がある。

日本人ゲノムに固有の CNVs も多くあり、健康日本人集団で観察される CNVs、疾患に関連して観察される CNVs についてデータベースを構築し、症的に NGS 解析による遺伝学的検査の解釈にも繋がる情報基盤として整備を進める必要がある。

これまでにマイクロアレイ染色体解析および網羅的エクソーム解析を実施したものの VUS という評価で原因の特定に至らなかった症例については、さらなる症例の蓄積と症状の再評価が求められる。各患者の臨床データと CNVs/SNPs データを融合させたデータベースがますます重要となると考えた。

原因不明の先天異常患者への応用に際しては、さまざまなデータベースを参照しながら、疾患との関連性の高い変異を絞り込む作業を担当する専門家、当該疾患の診療と変異による評価を判断する専門家の関与が必要なことは、NGS 解析と共通している。CNVs 領域の解析結果の解釈には、さらに染色体転座などゲノムワイドな構造変化を考慮できる臨床細胞遺伝学の専門知識と技術も不可欠であり、人材育成も大きな課題である。

## E. 結論

マイクロアレイ染色体検査により得られる CNVs データは DNA variants のひとつであり、

CNVs データおよび結果解釈データの蓄積は、今後の NGS の結果解釈にも必要となる。偶発的所見を検出する課題も共通する。遺伝学的検査は、分子遺伝学的検査による塩基配列決定だけでなく、マイクロアレイ染色体検査を含む細胞遺伝学的検査も総合的に実施される必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

①Narumi Y, Min BJ, Shimizu K, Kazukawa I, Sameshima K, Nakamura K, Kosho T, Rhee Y, Chung YS, Kim OH, Fukushima Y, Park WY, Nishimura G. Clinical consequences in truncating mutations in exon 34 of NOTCH2: report of six patients with Hajdu-Cheney syndrome and a patient with serpentine fibula polycystic kidney syndrome. *Am J Med Genet A*, 161A:518-526, 2013

②Kosho T, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet A*. 161A:1221-1237, 2013

③Tanaka K, Sekijima Y, Yoshida K, Tamai M, Kosho T, Sakurai A, Wakui K, Ikeda S, Fukushima Y. Follow-up nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset hereditary neurological diseases in Japan. *J Hum Genet*, 58: 560-563, 2013

④Nishi E, Takamizawa S, Iio K, Yamada Y, Yoshizawa K, Hatata T, Hiroma T, Mizuno S, Kawame H, Fukushima Y, Nakamura T, Kosho T. Surgical intervention for esophageal atresia in patients with trisomy 18. *Am J*

Med Genet A, 164A: 324-330, 2014

⑤Shimizu K, Wakui K, Kosho T, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, Hattori S, Nishio K, Samura O, Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oh-Ishi T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H, Fukushima Y. Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. Am J Med Genet A, 164(3): 597-609, 2014

## 2. 学会発表

①涌井敬子, 古庄知己, 鳴海洋子, 福嶋義光.  
CGHアレイ解析のピットフォールー稀な benign CNV の影響で正確な欠失/重複範囲の特定ができない場合があるー日本小児遺伝学会学術集会第36回日本小児遺伝学会学術集会, 2013年4月, 広島

②Nishi E, Mizuno S, Aoki Y, Saito Y, Fukushima Y, Matsubara Y, Kosho T. A Novel MEK1 Mutation in a Patient with LEOPARD Syndrome. 欧州人類遺伝学会 2013, 2013年6月, パリ

③涌井敬子, 古庄知己, 福嶋義光. マイクロアレイ染色体検査結果解釈の留意点ーゲノムコピー数変化の結果のみから正確な染色体再構成が確定できない染色体異常例ー. 第20回日本遺伝子診療学会大会, 2013年7月, 浜松

④涌井敬子, 山口智美, 古庄知己, 福嶋義光.  
マイクロアレイ染色体解析により検出された日本人成人のゲノムコピー数変化(CNVs). 次世代シーケンサー現場の会第三回研究会, 2013年9月, 神戸

⑤Nishi E, Takasugi M, Hiroma T, Nakamura T, Fukushima Y, Kosho T. Neonatal Management of Trisomy 13: Clinical Details of 12 Patients Receiving Intensive Treatment. 米国人類遺伝学会 2013, 2013年10月, ボストン

⑥Narumi Y, Nishina S, Tokimitsu M, Aoki Y, Kosaki R, Kosho T, Murata T, Takada F, Fukushima Y. Missense mutation of MAF in

a Japanese family with congenital cataract. 米国人類遺伝学会 2013, 2013年10月, ボストン

⑦涌井敬子, 水野 誠司, 佐村修, 古庄知己, 大橋 博文, 清水 健司, 福嶋 義光. 異なる2種類の4番染色体短腕構造異常のモザイクが認められた Wolf-Hirschhorn(4p-)症候群の2例, 日本人類遺伝学会第58回大会, 2013年11月, 仙台

H. 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  
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

家族性腫瘍の遺伝学的検査の提供体制の研究

研究分担者 古川 洋一 東京大学医科学研究所教授

研究要旨

家族性腫瘍の遺伝子検査は、その必要性は高いが保険収載されているものはまだない。リンチ症候群や家族性大腸腺腫症などの遺伝性大腸がん、遺伝性乳がん卵巣がん症候群、家族性甲状腺がんや多発性内分泌腺腫症などの遺伝子検査は企業により提供されている。しかしその結果の解釈について、まだ十分な体制が整っているわけではない。また検査の感度が十分とは言えないものもある。家族性大腸腺腫症 (FAP) は、約7~8の患者に原因遺伝子 *APC* に異常が認められるが、異常が認められない患者もいる。そこで我々は、*APC* に異常を認めない家族性大腸腺腫症の全ゲノム解析を行い、病気の原因となる変異が同定できるかどうか試みた。

A. 研究目的

現在、家族性腫瘍に対する遺伝学的検査は、企業あるいは大学の研究室等により提供されている。これらの検査は、それぞれの疾患の原因遺伝子に絞って、主にPCRダイレクトシーケンス法などで塩基配列を調べるものである。しかし次世代シーケンス解析装置の出現により、一度に全ての遺伝子について調べることが可能となった。全ゲノム解析やエクソーム解析により、これまで原因遺伝子に異常が見つからない家族性腫瘍の原因が明らかとなる可能性が高い。

家族性大腸腺腫症は、大腸を中心に多数のポリープが発生する遺伝性の疾患である。原因遺伝子として *APC* 遺伝子が同定され、患者の7~8割に病気の原因となる異常が存在するが、*APC* に異常を認めない例も存在する。さらに *APC* 以外の原因遺伝子として、*MUTYH* や *POLD1*、*POLE* 遺伝子の異常も報告されている。したがって、*APC* 遺伝子に異常を認めなかった場合には、これらの原因遺伝子の検査も必要であるとともに、未同定の新たな原因遺伝子異常が関与する可能性がある。そこで我々は、PCRダイレクトシーケンス法で *APC* に異常を認めなかった家族性大腸腺腫症の患者のDNAを用いて、全ゲノム解析を行い、病気の原因となる変異の同定を試みた。

本研究は、これまでの原因遺伝子のみを調べる遺伝子検査で同定できない、家族性腫瘍の原因を明らかにするための解析方法の基盤を構築することを目的としている。

B. 研究方法

共同研究機関で治療を受けた家族性大腸腺腫症患者のうち、遺伝カウンセリングを受けて遺伝子検査の説明と同意を得、PCRダイレクトシーケンス法による解析で *APC* 遺伝子に異常を認めない患者1名を対象とした。

血液から抽出したDNAを用いて、illumina HiSeq 2000により全ゲノム解析(WGS)を行った。得られたデータは、本研究所ヒトゲノム解析センターのDNA情報解析分野にてMappingを行い、さらにヒトゲノム標準配列と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は、共同研究施設および当研究所の倫理審査委員会の承認のもとに行われた。研究参加者には、ゲノム解析を含む研究の説明を行い、研究参加の任意性などを説明し、インフォームドコンセントを得て行われた。連結可能匿名化後に、試料を受領し解析が行われた。

C. 研究結果

1. 変異の同定  
今回の解析では、約400万か所の変異を同定した。これらの変異の中で、エクソンおよびスプライスサイトの変異は約3万か所であった。
2. 原因となる変異の同定  
まず、*APC* 遺伝子に着目してエクソン内の変異の検討を行った。その結果8つの single

nucleotide variants (SNVs)が同定された。このうち、7つはPCRダイレクトシーケンス (Sanger法)でも同定されていた。残る1つは同定されていなかった。この変異の頻度は6/50 (12%)であった。

3. Deep Sequencingによる変異アレルの検討  
上記変異について再度Sanger法により変異を確認したが、変異とは判定不可能であった。そこで変異のある細胞頻度が少ない可能性を考え、IonPGMシーケンサーを用いて変異頻度を検討した結果、coverage=3726にて12%の変異を認めた。

#### D. 考察

上記APC遺伝子の変異は、ナンセンス変異でありタンパクの機能を喪失する変異であった。しかし、血液細胞から抽出したDNAの中で約12%であったため、体細胞モザイクの状態が強く疑われた。体細胞モザイクでは、臓器毎にその変異細胞の割合が異なる可能性がある。他の正常臓器（特に大腸）での変異の検出が必要である。また両親の血液を調べ、変異の有無を検討することが望まれる。本症例では両親がポリポーシスではないことが分かっているため、患者受精卵に起こった*De novo*変異である可能性は十分に考えられる。

#### E. 結論

本研究ではAPC以外の遺伝子の病的変異を予想して研究を行ったが、予想に反してSanger法のシーケンスでは同定できないAPC変異を同定した。本変異が受精卵に起こった新生変異であること、病気の原因となっていることを確認する必要があるが、次世代シーケンサーによる解析法が、感

度の点で従来の検査法より優れていることを示唆するものである。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, and Tsuji K. Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome. *Leukemia & Lymphoma*, 54(9): 2068-9, 2013.
  - Shigeyasu K, Tanakaya K, Nagasaka T, Aoki H, Fujiwara T, Sugano K, Ishikawa H, Yoshida T, Moriya Y, Furukawa Y, Goel A, Takeuchi H. Early detection of metachronous bile duct cancer in Lynch syndrome: report of a case. *Surg Today*. Jul 31, Epub, 2013.

#### 2. 学会発表

次世代シーケンサーがもたらす近未来の医療  
(第19回日本家族性腫瘍学会学術集会 2013年7月27日 大分)

#### 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

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班  
分担研究報告書

遺伝性疾患の遺伝学的検査の提供体制に関する研究

研究分担者 難波 栄二<sup>1) 2) 3)</sup>

研究協力者 足立 香織<sup>1)</sup>

- 1) 鳥取大学生命機能研究支援センター、2) 鳥取大学医学部附属病院 遺伝子診療科  
3) 鳥取大学医学部附属病院 次世代高度医療推進センターゲノム医療部門

研究要旨： 小児神経疾患を中心に、より多くの遺伝性疾患の遺伝学的検査に対応できるよう、その解析体制について検討した。従来のキャピラリーシークエンサーを用いた遺伝子解析に加え、次世代シークエンサーを用いた遺伝子解析についても検討を行った。

鳥取大学医学部附属病院 次世代高度医療推進センターを窓口とし、院内・院外の遺伝学的検査の依頼に対応可能となった。

A. 研究目的

遺伝性疾患は数千種類を超えるが、現在、保険収載されている遺伝性疾患の遺伝学的検査は、そのうちわずか 35 疾患にとどまっている。また、これら疾患の中には、物理的に臨床検査会社では実施不可能なものもあり、依然、研究ベースで実施されている場合が多い。

遺伝学的検査を実施する新たな体制の構築を検討するため、より多くの疾患に対応できる体制の検討を行った。

B. 研究方法

遺伝子診断体制の効率化を図るため、以下を実施した。

1) 検査依頼窓口の設置

鳥取大学医学部附属病院次世代高度医療推進センターを受付窓口とし、院内・院外すべての受付を一本化した。検体は「遺伝学的検査に関するガイドライン」に従って

採取し、受け付けた。

2) キャピラリーシークエンサーによる遺伝子解析

独自に PCR プライマー設計を行って PCR を実施した後、ABI Genetic Analyzer 3130xl で泳動を行った。データ解析には Variant reporter ソフトウェア (ABI)、Sequence Scanner (ABI)、Genetyx ソフトウェアを使用した。また、見つかった変異については HGMD (The Human Genome Mutation Database, <https://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi>(有料版))、dbSNP (NCBI)、PolyPhen (prediction of functional effect of human nsSNPs) <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> 等による解析結果も参考として報告書に記載した。

### 3) 遺伝学的診断の体制

鳥取大学生命機能研究支援センター遺伝子探索分野では、遺伝学的診断を含めた遺伝子解析を臨床遺伝専門医・指導医 1 名、助教 1 名、8 時間非常勤職員 2 名、6 時間非常勤職員 2 名、アルバイト職員 3 名の体制で構築した。

また、鳥取大学医学部附属病院次世代高度医療推進センターでは認定遺伝カウンセラー 1 名、6 時間非常勤職員 2 名を配置し、院内・院外の遺伝学的検査の依頼に対応した。

各疾患の遺伝子解析は、DNA 分離、PCR、DNA シークエンス、データ分析、報告書作成、など各ステップに分け、それぞれのステップごとに担当者を決める体制を構築した。情報はオンライン上でファイルを共有し、データの蓄積にはオンラインストレージを利用した。

### 4) 次世代シーケンサー利用の検討

本年度、生命機能研究支援センターに設置された次世代シーケンサー (Illumina Miseq、Life Technologies Ion PGM、Ion Proton) を遺伝子診断に使用できるよう、検討を開始した。従来法で既に変異が見つかっている検体及び市販の Human Genomic DNA (タカラバイオ) を用いて、遺伝性疾患パネルによる解析を行った。

(倫理面への配慮)

次世代シーケンサーを用いたヒト単一遺伝子病の原因遺伝子探索システム構築の研究は、鳥取大学医学部倫理委員会の審査を経て、承認を得てから開始した。(承認番号 G138)

### C. 研究結果

本年度はキャピラリーシーケンサーを用いて、下記 25 疾患 35 遺伝子、97 件の遺伝学的検査を実施した。

疾患名	遺伝子	件数
Myotonic Dystrophy	<i>DMPK</i>	28
Niemann-Pick Disease type C	<i>NPC1</i>	20
Gaucher disease	<i>GBA</i>	9
Fabry disease	<i>GLA</i>	4
Porphyria	<i>PPOX, AIP</i>	4
Enlarged Parietal Foramina	<i>ALX4, MSX2</i>	3
GM1 gangliosidosis	<i>GLB1</i>	3
Mowat-Wilson syndrome	<i>ZEB2</i>	3
Von Hippel-Lindau disease	<i>VHL</i>	3
Duchenne muscular dystrophy	<i>DMD</i>	2
Greig cephalopolydactyly syndrome	<i>GLI3</i>	2
Joubert syndrome	<i>AHI1</i>	2
小児良性腫瘍	<i>GNAS, CDC73</i>	2
Benign hereditary chorea	<i>NKX2-1</i>	1
Galactosialidosis	<i>CTSA</i>	1
Gardner's syndrome	<i>AXIN1</i>	1
Gelatinous drop-like corneal dystrophy	<i>TACSTD2</i>	1
Melanoma	<i>CDKN2A</i>	1
Metachromatic Leukodystoropy	<i>ARSA</i>	1
Niemann-Pick disease, type C2	<i>NPC2</i>	1
Rett syndrome/MECP2-Related Disorders	<i>MECP2</i>	1

Sialidosis	<i>NEU1</i>	1
Spinal muscular atrophy	<i>SMN1</i>	1
Tay-Sachs disease	<i>HEXA</i>	1
Tuberous sclerosis	<i>TSC1, TSC2</i>	1

#### D. 考察

キャピラリーシーケンサーを用いた遺伝子解析では、工程を細分化し、担当者を割り振ることにより、多くの遺伝子解析に対応した。

原因遺伝子（解析エクソン数）が多数ある疾患については、PCR シークエンス法では限界があり、次世代シーケンサーでの解析システムの構築を開始した。メーカー等から解析ソフトウェアが提供されているものの、現状ではデータ解析に詳しい者が必須となっており、鳥取大学では技術部の協力を得ながらシステム構築を進めている。

検体受付及び結果返却の窓口を鳥取大学医学部附属病院次世代高度医療推進センターへ一本化し、院内のみならず、院外からの遺伝学的検査の依頼に対応した。料金体系についても整備を行ったが、混合診療の問題が課題として残っており、引き続き今後の検討が必要である。

#### E. 結論

1. 効率的な遺伝学的検査の方法について検討した。
2. DNA 分離、PCR、DNA シークエンス、データ分析、報告書作成、など各ステップに分け、それぞれのステップごとに担当者を定める体制を構築し、効率化を図った。
3. 次世代シーケンサーを用いた解析システムの構築を開始した。
4. 受付窓口を一本化し、院内・院外の遺伝学的検査に対応できる体制を整えた。混合診療の問題については、引き続き

の検討が必要と思われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Adachi K. Expansion of Genetic Testing in the Division of Functional Genomics, Research Center for Bioscience and Technology, Tottori University from 2000 to 2013. *Yonago Acta Med.* in press.
2. Chiba Y, Komori H, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Kawamura N, Adachi K, Nanba E, Hosokawa M, Enokido Y, Kouchi Z, Yoshida F, Shimada A. Niemann-Pick disease type C1 predominantly involving the frontotemporal region, with cortical and brainstem Lewy bodies: An autopsy case. *Neuropathology.* 2014 Feb;34(1):49-57.
3. Fujimoto S, Manabe Y, Fujii D, Kozai Y, Matsuzono K, Takahashi Y, Narai H, Omori N, Adachi K, Nanba E, Nishino I, Abe K. A novel mutation of the GAA gene in a patient with adult-onset Pompe disease lacking a disease-specific pathology. *Intern Med.* 2013;52(21):2461-4.
4. Sekijima Y, Nakamura K, Kishida D, Narita A, Adachi K, Ohno K, Nanba E, Ikeda S. Clinical and serial MRI findings of a sialidosis type I patient with a novel missense mutation in the NEU1 gene. *Intern Med.* 2013;52(1):119-24.

2. 学会発表

足立香織、難波栄二. 日本における遺伝子診断システムのモデル構築. 日本人類遺伝学会第58回大会 2013年11月20日-23日、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  
分担研究報告書

遺伝学的検査の実施拠点の在り方に関する研究

研究分担者 秋山 真志 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚病態学分野

**研究要旨：** 本研究の目的は、我が国において最適な遺伝性皮膚疾患の遺伝子診断体制の提供と、皮膚科領域における遺伝学的検査の実施拠点の在り方についての提言を行うことである。本研究班会議において、他診療科領域の研究分担者との連携を形成し、皮膚科領域の遺伝性疾患に対する遺伝学的検査の実施拠点の在り方と、次世代シーケンサーの実用化についての、検討課題の具体化を図ってきた。本研究では、皮膚科領域における遺伝学的検査実施拠点の在り方を明らかにし、本邦での皮膚科領域での次世代シーケンサーの実用化のための施策の検討を行った。次世代シーケンサーによるゲノム解析拠点は、皮膚科領域でも高度なゲノム解析技術を担う役割を果たす必要がある。皮膚疾患についても、診断確定のために、遺伝子検査、特に、複数の遺伝子を対象としたクリニカルシーケンシングの必要性が医療現場で高まってきている。クリニカルシーケンシングにおいて、網羅的な遺伝子解析が必須となっていており、次世代シーケンサーの持つ役割は大きくなっている。

**A. 研究目的**

本研究の目的は、我が国において最適な遺伝性皮膚疾患の遺伝子診断体制の提供と、遺伝学的検査の実施拠点の在り方についての提言を行うことである。本年度においては、皮膚科領域の遺伝性疾患に対する遺伝学的検査の実施拠点の在り方と、次世代シーケンサーの実用化について、我が国の現状を把握し、適切な遺伝学的検査の提供体制についての提言を行い、方策を具体化することを目標として研究を行った。

**B. 研究方法**

本研究班会議において、他診療科領域の研究分担者との連携を形成し、皮膚科領域の遺伝性疾患に対

する遺伝学的検査の実施拠点の在り方と、次世代シーケンサーの実用化についての、検討課題の具体化を図ってきた。本研究では、皮膚科領域における遺伝学的検査実施拠点の在り方を明らかにし、本邦での皮膚科領域での遺伝学的検査提供体制の整備と次世代シーケンサーの実用化のための施策の検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヒト遺伝子解析結果等の情報を含む可能性があるため、倫理的配慮と研究対象者に対する十分なインフォームドコンセントの下、施行した。

**C. 研究結果**

皮膚科領域においても次世代シーケンサーによ

るゲノム解析、解析拠点の必要性を再認識した。次世代シーケンサーによるゲノム解析拠点は、皮膚科領域でも高度なゲノム解析技術を担う役割を果たす必要がある。皮膚科領域でも、臨床シーケンシングにおいて、網羅的な遺伝子解析が必須となってきたおり、次世代シーケンサーの持つ役割は大きくなっている。また、皮膚科領域でも、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析においては、ゲノムインフォマティクスの持つ役割が飛躍的に増大してきていることが、明らかとなった。さらに、皮膚疾患についても、診断確定のために、遺伝子検査、特に、複数の遺伝子を対象とした臨床シーケンシングの必要性が医療現場で高まってきている。

#### D. 考察

皮膚科領域において、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析は、診断確定のために、非常に強力なツールであり、臨床シーケンシングとして、診療において必須のものとなってきた。従って、次世代シーケンサーを用いた解析拠点の整備、充実は皮膚科領域でも、喫緊の課題となっている。皮膚疾患に対する臨床シーケンシングとしての次世代シーケンシングの過程においては、次世代シーケンサーから産生される膨大な変異データをいかに適切に解釈するか、という点が最大の課題であり、この機能は、皮膚科領域においても、次世代シーケンサーの解析拠点の機能として強化する必要がある。

#### E. 結論

皮膚科領域での次世代シーケンサーを用いた臨床シーケンシングの実施に向けて、検討すべき課題を抽出し、実施体制について具体的な提言を行った。稀少難治性皮膚疾患調査研究班を始めとして、難病研究班との連携による臨床シーケンシング実施体制のネットワーク化を、皮

膚科領域においても、今後目指す。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

論文 1) Sugiura K, Takemoto A, Yamaguchi M, Takahashi H, Shoda Y, Mitsuma T, Tsuda K, Nishida E, Togawa Y, Nakajima K, Sakakibara A, Kawachi S, Shimizu M, Ito Y, Takeichi T, Kono M, Ogawa Y, Muro Y, Ishida-Yamamoto A, Sano S, Matsue H, Morita A, Mizutani H, Iizuka H, Muto M, **Akiyama M.**

The majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist.

**J Invest Dermatol** 133: 2514-2521, 2013.

論文 2) Kono M, Sugiura K, Sukanuma M, Hayashi M, Takama H, Suzuki T, Matsunaga K, Tomita Y, **Akiyama M.**

Whole-exome sequencing identifies ADAM10 mutations as a cause of reticulate acropigmentation of Kitamura, a clinical entity distinct from Dowling-Degos disease.

**Hum Mol Genet** 22: 3524-3533, 2013.

論文 3) Ogawa Y, Takeichi T, Kono M, Hamajima N, Yamamoto T, Sugiura K, **Akiyama M.**

Revertant mutation releases confined lethal mutation, opening Pandora's box: a novel genetic pathogenesis.

**PLoS Genetics** (in press)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し。

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

## 遺伝学的検査による難聴の分子病態の解明

研究分担者 野口 佳裕 東京医科歯科大学耳鼻咽喉科 講師

### 研究要旨

頻度の高い内耳奇形である前庭水管拡大症では、難聴の変動や反復性めまい発作が特徴とされてきた。前庭水管拡大症に伴う *SLC26A4* 変異例、*ATP6V1B1* 変異例、*SIX1* 変異例の検討では、これらの特徴は前庭水管拡大という形態的特徴ではなく内リンパ pH ホメオスタシスの破綻が関与する可能性が考えられた。一方、常染色体優性遺伝性難聴家系において日本人初の *DFNA5* 変異を同定し、その変異が東アジアにおける創始者変異であることが示唆された。

### A.研究目的

難聴は、生活の質を著しく低下させる感覚器障害である。難聴は先天性もしくは後天性に発症するが、先天性難聴においては早期発見と早期療育が児の将来的なコミュニケーション能力の獲得を左右する。先天性難聴の半数以上がメンデル遺伝病としての遺伝性難聴であるため、早期診断や難聴病態解明のための遺伝学的検査の重要性は高い。本研究では、前庭水管拡大症 (enlargement of the vestibular aqueduct、以下 EVA) を合併する遺伝性難聴例における genotype-phenotype correlation、日本人常染色体優性遺伝性難聴における *DFNA5* 変異を明らかとすることを目的とした。

### B.研究方法

当施設を受診した遺伝性難聴家系に対して、表現型と遺伝型との関連を解析する。

(倫理面への配慮)

難聴の遺伝学的検査は、当施設の倫理審査委員会の承認のもと文書による同意取得の後に行っ

### C.研究結果

#### (1) EVA における genotype-phenotype correlation

EVA は頻度の高い内耳奇形であり、*DFNB4/Pendred* 症候群、*BOR/BO* 症候群、遠位尿管性アシドーシスなどの多彩な疾患群に合併しうる。今回われわれは、前庭水管拡大症に伴う *SLC26A4* 変異 5 例、*ATP6V1B1* 変異 1 例、*SIX1* 変異 2 例の聴平衡覚所見を検討した。これまで EVA の臨床的特徴として、難聴の進行や変動、反復性の発作性回転性めまいが報告されてきた。しかし、難聴の変動や反復性めまい発作は *SIX1* 変異例にのみ認められなかった。

#### (2) 日本人常染色体優性遺伝性難聴における *DFNA5* 変異

*DFNA5* は常染色体優性の非症候群性遺伝性難聴の原因遺伝子であり、現在までに 4 つの異なる変異が報告されている。このうち、3 塩基欠失変異 (c.991-15\_991-13 del) は中国人と韓国人の常染色体優性の非症候群性遺伝性難聴家系に同定さ

れている。今回の研究では、常染色体優性の非症候群性遺伝性難聴を有する日本人患者 65 人に対して、*DFNA5* のイントロン 6 からエクソン 9 までの範囲における変異検索を行い、前述の 3 塩基欠失変異を 2 人に同定した。さらに、変異を認めた日本人家系にハプロタイプ解析を行い、過去の報告にある中国人および韓国家系のハプロタイプと比較したところ、41,874 塩基に及ぶ共有領域が認められた。

#### D. 考察

EVA において、*SLC26A4* 変異例、*ATP6V1B1* 変異例が呈した難聴の変動や反復性めまいは *SIX1* 変異例では認められなかった。*SIX1* は転写因子であり内耳発生に関与する。一方、*SLC26A4* がコードする pendrin は  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換体として働き、*ATP6V1B1* は  $\text{H}^+$ -ATPase のサブユニットの 1 つをコードする。EVA における難聴の変動やめまいは前庭水管拡大という解剖学的特徴に起因するのではなく、*SLC26A4* や *ATP6V1B1* が担う内リンパ pH ホメオスタシスの破綻に関与する可能性が考えられた。

常染色体優性遺伝性難聴において、我々は日本人で初めての *DFNA5* 変異家系を同定した。同定された 3 塩基欠失変異は中国人と韓国家系で認められている既知の変異であり、本変異が東アジアにおける創始者変異である可能性が考えられた。

#### E. 結論

難聴の遺伝学的検査は、難聴の分子病態の解明に有用であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nishio A, Noguchi Y, Sato T, Naruse TK,

Kimura A, Kitamura K. A *DFNA5* mutation identified in Japanese families with autosomal dominant hereditary hearing loss. *Ann Hum Genet* 78: 83-91, 2014.

- 2) 野口佳裕、伊藤 卓、川島慶之、西尾綾子、本田圭司、喜多村 健：前庭水管拡大症を伴う *SLC26A4*、*ATP6V1B1*、*SIX1* 変異例の聴平衡覚所見の検討. *Equilibrium Research* 72 : 97-106, 2013.

#### 2. 学会発表

- 1) Kitamura K, Sato T, Noguchi Y, Ayako N, Naruse T, Kimura A, Takagi A. Round Table 8 “Congenital risk factors in sensorineural hearing loss and autoimmune hearing loss” A *DFNA5* Mutation in two Japanese families with autosomal dominant hereditary hearing loss. 29th Politzer Society Meeting, Antalya, 2013.11
- 2) 野口佳裕、西尾綾子、武田憲昭、島田亜紀、千田いづみ、喜多村 健：常染色体優性遺伝形式の Auditory neuropathy spectrum disorder の 1 家系. 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 札幌, 2013.5
- 3) Kato T, Noguchi Y, Kimura Y, Kitamura K: Comprehensive analyses for mitochondrial DNA in patients with hereditary hearing loss. Thirteenth Triennial Meeting The International Otopathology Society, Boston, 2013.6

#### 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