

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あり方に関する研究

分担研究報告書

循環器領域への次世代型シーケンス遺伝学的検査導入に
かかる問題点に関する研究

研究分担者 森田 啓行¹⁾
研究協力者 山田 奈美恵²⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科健康医科学創造講座, 2) 同研究科総合研修センター

研究要旨

次世代シーケンサーにより全エクソーム・全ゲノム解析検査をおこなうと diagnostic result だけではなく、incidental findings (secondary findings) も得られる。本分担研究では、incidental findings をめぐる問題をメインテーマに、次世代シーケンサー遺伝学的検査を循環器領域の診療に導入する際の問題点に関して検討した。incidental findings が診療に与える影響、それらを解決するための方策を考察することにより、次世代シーケンサー遺伝学的検査を循環器領域の診療に実装する前には克服すべき課題が山積していることが確認された。遺伝子解析研究推進による変異データ確立は大前提である。さらに、結果解釈の確実性向上、告知をめぐる倫理的問題、告知後のコンサルテーション整備、説明される側への遺伝教育などに関しても方策を早急に議論すべきと考える。

A. 研究目的

次世代シーケンサー技術の飛躍的な進歩にとともに、診療において次世代シーケンサー遺伝学的検査を実施することが「技術的には」可能になった。本研究班では、「研究目的の次世代シーケンサー遺伝子解析」ではなく、「診療目的の次世代シーケンサー遺伝学的検査」に焦点をあて、その実装にあたって考慮すべき諸問題を挙げ、対応策を考察してきた。本分担研究では、次世代シーケンサー遺伝学的検査を循環器領域の診療に導入する際の問題点に関して検討した。

一般に、次世代シーケンサーにより全エクソーム・全ゲノム解析検査をおこなうと diagnostic result だけではなく、incidental findings (secondary findings) も得られる。診療において次世代シーケンサー遺伝学的検査をおこなった際に incidental findings を解釈して患者に告知すべき疾患・遺伝子のミニムリスト (ACMG56) が 2013 年に ACMG (The American College of Medical Genetics and Genomics) から提唱された [1] が、リストの中身は、がん関連遺伝子以外ほとんどが循環器疾患関連遺伝子で構成されている。循環器領域への次世代型シーケンサー遺伝学的検査導入にと

もない発生しうる問題、特に incidental findings の扱いなど倫理的問題に関して考察することは臨床的にきわめて有用と考えられる。

B. 研究方法

肥大型心筋症、拡張型心筋症、不整脈原性右室心筋症、QT 延長症候群、Brugada 症候群、Marfan 症候群などに関して、診療に次世代シーケンサー遺伝学的検査を導入する際の問題点を挙げ、対応策を考察した。

(倫理面への配慮)

本分担研究遂行において該当なし。

C. 研究結果

次世代シーケンサーによる遺伝学的検査に限らず、診療において遺伝学的検査をおこなう際の問題点として、「すべての変異が同定されているわけではない」、「変異が陽性だからといって必ずしも発症するわけではない (浸透率が低い)」、「private variant (他の家系にはみられない)/de novo variant (親から遺伝したわけではない、その個人に発生した)が多く、未報 variant の場合にはその variant の意義解釈にあたってデータベースやアルゴリズムに

頼ることになる。しかしながら、多くの場合、データベース・アルゴリズムは未整備なので因果関係確定が困難となり variant of unknown significance (VUS)にとどまることが多い、「曖昧な結果を患者に返してしまうと不必要な不安を煽る可能性がある」、「変異と予後・最適治療連関が確立していないのでたとえ変異がわかったとしても患者に適切な対策を指示できない」などがあり、それらに対する方策に関しては以前に議論したとおりである[2]。次世代シーケンサーによりターゲットになる遺伝子群だけを検査する(ターゲットリシーケンスをおこなう)場合には変異検出感度・特異度やコスト以外に新たな問題が生じる可能性は低い、全エクソーム解析をおこなった場合にはこれまでに経験しなかった問題が発生することが予想される。そのひとつが incidental findings (secondary findings)である。

全エクソーム解析における incidental findings は diagnostic results 以外に判明した、将来のリスクを示唆する variant を指す。incidental findings を説明する際には CT 検査など画像検査にしばしば例えられる(腎臓の画像検査をおこなったところ副腎に腫瘍が見つかった、など)が、決定的に違う点がある。画像検査で判明する incidental findings は「疾患そのもの」であるのに対し、全エクソーム解析における incidental findings は「疾患のリスク」とどまる、という点である。解釈、患者説明の局面でこの違いを十分に考慮する必要がある。「あくまでリスクにすぎない」という捉え方に加え、遺伝学的検査結果の特殊性(不変性、予見性、共有性、危害性)にも注意を払う必要がある。ここでは、議論をわかりやすいものにするために incidental findings の範囲を既報変異だけに限定する。

ACMG は clinical sequence に関する policy statement を 2012 年に発出し、その中で incidental findings に関して検査前に患者と議論し同意を得るべきである、検査すべきである、検査結果を告知すべきであると述べている[3]。どのような遺伝子が検査され告知の対象になるのか、たとえば、未だ研究段階であり意義づけがはっきりしていない variant は対象にしない、など「検査前に」決め同意を得るべき、としている。さらに ACMG Working Group は、germline の全エクソーム・全ゲノム解析検査を診療でおこなった場合に、最低限でもどの遺伝子において変異を同定し告知すべきかそのミニマムリスト (ACMG56) を発表した[1]。これは年次改訂の予定ということである

が、がん関連以外では、Ehlers-Danlos 症候群 vascular type、Marfan 症候群・Loeys-Dietz 症候群・家族性胸部大動脈瘤解離症候群、肥大型心筋症、カテコラミン誘発多形性心室頻拍、不整脈原性右室心筋症、QT 延長症候群、家族性高コレステロール血症の遺伝子群において変異を同定し、年齢を問わず、告知すべきとしている。予め incidental finding 同定のための範囲を決めてしまいその範囲に関する完全な告知を望まない患者はシーケンス検査そのものを受けべきでないとするこのミニマムリストに対しては、自己決定権 autonomy を否定するものだとする強い反論も見られ[4]、どのような年次改訂がおこなわれるかが注目されている。

D. 考察

ACMG56(2013)が適正か否かはさらに議論が必要であるが、全エクソーム解析検査をおこなった後の incidental findings の扱いに関して予め決めておくことは重要と考える。incidental findings を解釈し告知すべきターゲット領域一覧を検査前に決めておく(本邦の各専門領域の学会がワーキンググループを作りターゲット領域一覧の妥当性を検証する必要がある)のが理想的であるが、それが整備されるまでは incidental findings が偶然得られる可能性があることを事前説明したうえで遺伝学的検査の同意を取得することが必要である。ターゲット領域一覧があるにせよ、偶然見つかったときに個別対応するにせよ、一般の医師が一連のハンドリングをおこなうのは現実的に困難である。incidental findings が得られた時の紹介ルールを検査前に決めておくことが重要であろう。医師は「incidental findings が見つかりましたが、確定および今後のコンサルテーション方針に関しては～を受診してください」と患者に説明する、各専門領域ごとに拠点医療機関を設置する、あるいは、各専門領域の学会に臨床遺伝専門医からなるワーキンググループを作りそこで判断する、など対策を講じる必要がある。

ゲノム研究は日進月歩であり、1-3年後には incidental findings 解釈の根拠になるデータが替わることが予想されるので、アップデート解釈を定期的におこない、患者説明を定期的やり直すべきである。variant のカテゴリーをアップデートし、各カテゴリーに関して患者にリスクベネフィットをわかりやすく提供し、患者自身が範囲を選び、結果が「アップデート解釈」「アップデート対応策」とともに返される

のが理想である。また、従来型シーケンスの時代は当該疾患と遺伝子の関係だけを知っていれば事足りたが、次世代シーケンサー時代にはこのような incidental findings の意味も理解しなくてはならない。従来型の遺伝学的検査に比べて理解が難しいので国民に対する遺伝教育と医療者に対するさらなる遺伝医療教育が必要とされる。

ACMG56 で incidental findings を解釈し告知すべきとされている肥大型心筋症、拡張型心筋症、不整脈原性右室心筋症、QT 延長症候群、Brugada 症候群、Marfan 症候群、Loeys-Dietz 症候群の遺伝子診療の現況を疾患別に概観し、実現可能性、可能にするための方策を考察する。

肥大型心筋症 (Hypertrophic Cardiomyopathy; HCM)

循環器領域の単一遺伝子疾患(常染色体優性遺伝疾患)として最多である。軽度の左室肥大をきたすが無症状で診断には至らないという症例も多い。心不全、心房細動の合併、塞栓症・脳卒中以外に突然死発症には特に注意を払う必要がある。HCM は若年者突然死の主因である。心筋細胞内にある筋原線維サルコメアを構成するタンパクの遺伝子変異が現在までに 1000 種類以上報告されている。肥大型心筋症患者の 60%程度に原因変異が同定されている。

diagnostic result として既報変異が同定された場合にも下記のような留意点がある [5]。

- 1) 診断確定の「補助」診断として有用である、遺伝学的検査による変異同定は診断に必須ではない、ただし、原因変異と確定すれば血縁者の遺伝子スクリーニングにも有用である。
- 2) 浸透率が低いので既報変異がみつかったも必ず発症するとは言い切れない。
- 3) private variant が多いので既報変異以外であってもその家系においてのみ原因変異としてはたらく variant である可能性を否定できない。
- 4) 「既報変異」データベース自体の信憑性も再精査する必要がある。大規模シーケンス解析が可能になった昨今、健常者であってもサルコメア遺伝子に rare variant を持っていることがわかってきた。3600 名のコホートで、8 サルコメアタンパク遺伝子を調べたところ [6]、402 名 (全体の 11.2%) がアミノ酸置換をきたす rare variant を有しており、そのうち pathogenic と判定されるのは 22 名 (全体の 0.6%) であった。このように rare variant は健常者にも相当数見られることから、HCM 患者で見つかったサルコメア遺伝子の rare variant

をそのまま「既報変異」として変異データベースにリストアップしてはいけないことがわかる。本来は家系内での co-segregation (発症者はすべて変異陽性者)を確認して初めて原因変異と断定できる。変異データベースにリストアップする際に、どの程度 HCM との因果関係が証明された variant か注釈をつける必要があると考える。したがって、遺伝学的検査時も「既報変異」が見つかったからといって、それが HCM の原因であると即断してはいけない。どの程度検証された後に報告された変異なのかを個別に吟味する必要がある。さらに、家系内の co-segregation を確認し原因変異を確かなものにするようつとめる。

5) 「この遺伝子変異がある」とこのような病態になる」、という対応関係がはっきりしない、遺伝子解析結果を ICD 植込みによる一次予防有効例選別に使用できれば理想的であるが、実現していない。

incidental findings として HCM 既報変異が検出された場合、その症例は genotype (+) phenotype (-) ということになる。genotype (+) phenotype (-) 例の予後、治療反応性は未解明なので、年一回の心エコーフォローアップを勧め、早期発見につとめるのが現実的である。

拡張型心筋症 (Dilated Cardiomyopathy; DCM)

DCM 患者の約 30%に原因変異が同定されているにとどまる。各家系で個別的に発生しその家系で受け継がれている private variant がほとんどで、原因遺伝子は約 40 遺伝子と多岐に渡る。一般に浸透率は低く、variant 陽性でも若年期には発症しないことも多い。小家系から候補遺伝子アプローチにより同定されたものが多く、それらの中で co-segregation が十分確認されていない variant は、厳密には「原因変異」というよりも pathogenic variant にとどまる。遺伝学的検査時に既報変異リストを参照する際にはこの点に大いに注意する必要がある。タイチンを例に挙げる。タイチンはサルコメアの Z 帯から M 帯までをつなぐ巨大弾性タンパク (35991 アミノ酸) であり、タイチン遺伝子 (TTN) の変異は DCM をきたすことが知られる。短いタイチンタンパクの生成を惹起する TTN 遺伝子の truncating variant が家族性 DCM の 25%、孤発性 DCM の 18%にみられることが報告された [7]。そもそも truncating variant はタンパク機能に影響を及ぼすので原因変異と考えられてもよさそうであるが、浸透率は低く、

co-segregation を示せないものもある[8]。健常者の 3%にみられること[7]も明らかになり、たとえ *TTN* の truncating variant が見つかったとしても原因変異と即断はできないようである。このように、原因変異かどうかあいまいな variant もあるので、遺伝学的検査時も「既報変異」が見つかったからといって、それが DCM の原因であると即断してはいけない。どの程度検証された後に報告された変異なのかを個別に吟味する必要がある。さらに、家系内の co-segregation を確認し原因変異を確かなものにするようつとめる。原因変異と確定すれば血縁者の遺伝子スクリーニングにも有用である。

incidental findings として *MYH7*, *TNNT2*, *TPM1*, *ACTC1*, *LMNA* に DCM 既報変異が検出された場合、その症例は genotype(+)phenotype(-) ということになる。genotype(+)phenotype(-) 例の予後、治療反応性は未解明なので、年一回の心エコーフォローアップを勧め、早期発見につとめるのが現実的である。

不整脈原性右室心筋症 (Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy; ARVC)

心筋の脱落、脂肪変性、線維化をきたす心筋症であり、若年者突然死の原因として注意すべき疾患である。30%-50%の症例に、細胞間接着に関与するデスモソーム構成タンパクの遺伝子変化が検出される。プラコフィリン-2 遺伝子 (*PKP2*) の variant が最も多く(検出されるデスモソーム構成タンパク遺伝子異常の 70%以上)見られるが、2 つ以上の variant がみられる (*PKP2* の別の variant、あるいは他のデスモソーム構成タンパク遺伝子の variant を伴う)ものが多く、単独の *PKP2* variant で原因になっていると断定できるものは少ない[9]。そもそも健常者の 16%にデスモソーム構成タンパク遺伝子異常(ほとんどがミスセンス)が検出されることから [10]、「原因変異」と解釈する際にはかなりの注意が必要である。diagnostic results としても incidental findings としても遺伝学的検査の有用性は現時点では疑問である。

QT 延長症候群 (Long QT syndrome)

家族性 QT 延長症候群とは、心電図上の QT 部分(心筋の再分極過程)の延長を呈し、心室性(多形性)頻拍発作(torsade de pointes)による失神発作や突然死を高率にきたす疾患である(Schwartz 診断基準 1993)。頻度は 5000 人に 1 人。乳幼児突然死症候群(SIDS)と診断

されているケースの約 10%は本症候群とされる。

QT 延長症候群患者の約 70%で原因変異が判明している。LQT1、LQT2、LQT3 をあわせると原因変異が判明しているケースの 90%を上回る(LQT1>LQT2>LQT3)。心臓突然死は LQT1 1%、LQT2 7%、LQT3 14%である。浸透率は LQT1<LQT2<LQT3 であるが、全体では約 60%である。逆に言うと約 40%では QTc は正常範囲ということになる。これらいわゆる無症候性キャリアーに対して QT 延長をきたしやすい薬剤(キニジン、プロカインアミド、ジソピラミド、三環系抗うつ薬、テルフェナジン、エリスロマイシンなど)を投与する際には慎重でなくてはならない。LQT1 は運動など交感神経活性化状態で発作が起こりやすく [11]、それに対して LQT3 は安静時に発作が起こりやすい。LQT1 では β 遮断薬が有効という事実と符合する [12]。一般に QTc が長いものは高リスクであるが、遺伝子型との組み合わせで判断すべきである。LQT1、LQT2 では QTc が短いものについては低リスクであるが、LQT3 では QTc と無関係にリスクは高い [13]。本症候群の遺伝子検査および遺伝カウンセリングは既に保険収載されている。遺伝子変異データベースがかなり整備されているので、既報変異が検出されればそれによるリスク分類、治療選択がある程度可能である。さらに、家系内の co-segregation を確認し原因変異を確かなものにするようつとめる。原因変異と確定すれば血縁者の遺伝子スクリーニングにも有用である。

incidental findings として *KCNQ1* (LQT1)、*KCNH2* (LQT2)、*SCN5A* (LQT3)に QT 延長症候群既報変異が検出された場合、その症例は無症候性キャリアーということになるので、心電図フォローアップをおこない、QT 延長をきたしやすい薬剤を避けるなどの指導もおこなう。

Brugada 症候群

Brugada 症候群では体表面心電図上、V1~V3 誘導で特異な ST 上昇(coved型、saddleback型)を呈し、心室細動により突然死をきたす。40 歳前後の男性に多い。ナトリウムチャンネル α サブユニットをコードする *SCN5A* 遺伝子の変異が原因である。ただし *SCN5A* 遺伝子に変異が見つかるケースは全体の数%~15%であり、他にも多くの原因遺伝子が報告されているがそれらの頻度はきわめて低い。既報変異が検出される確率は低い上に、検出されたとしてもリスク分類、治療選択には貢献しない。原因変異と確定すれば血縁者の遺伝子スクリーニ

ングに有用である。

incidental findings として *SCN5A* に Brugada 症候群既報変異が検出された場合、その症例は無症候性キャリアーということになるので、定期的な心電図フォローアップを勧めるのが現実的である。

Marfan 症候群・Loeys-Dietz 症候群

Marfan 症候群は、高身長、漏斗胸、くも指趾、水晶体亜脱臼、脊柱変形、硬膜拡張、気胸、萎縮皮膚線条、僧帽弁逸脱症、大動脈瘤、大動脈基部（弁輪）拡張症などをきたす常染色体優性遺伝疾患であるが、約 25% は孤発性である。3,000~5,000 人に 1 人の頻度。大動脈解離など心血管系異常は本症候群患者の生命予後を著しく左右する（本症候群死因の 95%）。きめ細かいスクリーニングと早めの大動脈手術、β 遮断薬や ARB による血圧降下が必要である。本症候群の原因は、microfibril の主要構成成分である fibrillin-1 の異常であり、fibrillin-1 をコードする *FBNI* 遺伝子の変異が主因であるが、*TGF-β* 受容体をコードする *TGFBR1*、*TGFBR2* 遺伝子の変異も報告されている。改訂 Ghent 基準[14]では大動脈拡大、水晶体亜脱臼、遺伝性が重視されている。Loeys-Dietz 症候群では頭蓋骨早期癒合症、眼間開離、口蓋垂裂、口蓋裂、内反足、くも指趾、硬膜拡張、動脈管開存症、上行大動脈拡張、大動脈蛇行などをみる。大動脈解離を起こしやすい。*TGFBR1*、*TGFBR2*、*SMAD3*、*TGFBR2* 遺伝子の変異による。最近では *FBNI* 遺伝子変異によるものを Marfan 症候群、*TGF-β* シグナル系の遺伝子変異によるものを Loeys-Dietz 症候群と捉える傾向にある。既報変異が検出されれば診断に有用である。家族歴がない Marfan 症候群の場合、*FBNI* 変異陽性は診断基準の一要件である[14]。さらに、家系内の co-segregation を確認し原因変異を確かなものにするようつとめる。原因変異と確定すれば血縁者の遺伝子スクリーニングにも有用である。

incidental findings として *FBNI* などに Marfan 症候群既報変異が検出された場合はどうであろうか。無症候性キャリアーの予後・治療反応性などに関するデータは少ないが、定期的なフォローアップを勧めるのが現実的である。

このように、肥大型心筋症、QT 延長症候群、Marfan 症候群、一部の拡張型心筋症に関しては遺伝子解析研究が比較的進んでおり基礎となる変異データが蓄積されているのである程

度の対応は可能と考える。しかしながら、それ以外の疾患に関しては現時点の既報変異だけを調べ incidental findings の有無を判断することが診療に貢献できるか否かは疑問であり、むしろ「変異陰性」という誤った解釈が依頼医・患者をミスリードすることを危惧する。遺伝子解析研究をさらに進め既報変異データベースを充実させることが先決である[15]。

incidental findings は「フェノタイプ陰性の時点で見つかるリスク」という観点から、究極の予防医療を可能にする各個人固有のデータと考えられる。incidental findings を診療に活かすためには、遺伝子解析研究推進による変異データの整備および予後・最適治療との対応関係確立、結果解釈の確実性向上、告知を受ける受けない権利の明確化、持続可能性のある判定範囲の設定と受益者による選択、カウンセリングや告知後のコンサルテーション整備、責任の所在と費用負担の明確化、膨大なデータを患者に説明する方法の確立、説明される側の遺伝知識向上など課題がきわめて多い。

E. 結論

incidental findings が診療に与える影響、それらを解決するための方策を考察することにより、次世代シーケンサー遺伝学的検査を循環器領域の診療に実装する前には克服すべき課題が山積していることが確認された。遺伝子解析研究推進による変異データ確立は大前提である。さらに、結果解釈の確実性向上、告知をめぐる倫理的問題、告知後のコンサルテーション整備、説明される側への遺伝教育などに関しても方策を早急に議論すべきと考える。

G. 研究発表

Morita H: Human genomics in cardiovascular medicine-implications and perspectives- *Circ J* 2013; 77(4): 876-885.

森田啓行、山田奈美恵、小室一成：肥大型心筋症の遺伝子診断：推進に向けての方策。 *日内学誌* 2013; 102(5): 1233-1242.

Morita H, Komuro I: A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine* 2013; 369(22): 2161-2162.

Morita H: Genetic variants and dilated cardiomyopathy - To be or not to be causative: Is that the question? - *Circ J* 2013; 77(12): 2879-2880.

森田啓行: 遺伝子から心筋症をみる。 *日内会誌* 2014; 103(2): 285-292.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

参考文献

1. Green RC, et al: ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med* 2013; 15(7): 565-574.
2. 森田啓行、山田奈美恵、小室一成: 肥大型心筋症の遺伝子診断: 推進に向けての方策. *日内学誌* 2013; 102(5): 1233-1242.
3. ACMG Board of Directors: Points to consider in the clinical application of genomic sequencing. *Genet Med* 2012; 14(8): 759-761.
4. Wolf SM, et al: Point-counterpoint. Patient autonomy and incidental findings in clinical genomics. *Science* 2013; 340(6136): 1049-1050.
5. Morita H: Human genomics in cardiovascular medicine—implications and perspectives—*Circ J* 2013; 77(4): 876-885.
6. Bick AG, et al: Burden of rare sarcomere gene variants in the Framingham and Jackson Heart Study cohorts. *Am J Hum Genet* 2012; 91(3): 513-519.
7. Herman DS, et al: Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2012; 366(7): 619-628.
8. Norton N, et al: Exome sequencing and genome-wide linkage analysis in 17 families illustrate the complex contribution of TTN truncating variants to dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2013; 6(2): 144-153.
9. Xu T, et al: Compound and digenic heterozygosity contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(6): 587-597.
10. Kapplinger JD, et al: Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(23): 2317-2327.
11. Schwartz PJ, et al: Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001; 103(1): 89-95.
12. Priori SG, et al: Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *JAMA* 2004; 292(11): 1341-1344.
13. Priori SG, et al: Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(19): 1866-1874.
14. Loeys BL, et al: The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* 2010; 47(7): 476-485.
15. 森田啓行: 遺伝子から心筋症をみる. *日内会誌* 2014; 103(2): 285-292.

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

海外の状況・動向に関する研究

研究分担者 小崎 健次郎 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授

研究要旨

次世代シーケンサーの臨床応用は、わが国では欧米にて比して進展している現況である、そこで、海外の状況・動向について調査を行い、わが国における今後のあり方を考える上で参考とした。これまでの厚生労働省の研究班活動を通じて、英国UKGTNのMark Kroese博士、フランスOrphanetのAyme博士と定期的な情報交換を行っている。欧州の状況については、両博士から原資料やウェブサイトを通じて把握した。米国状況については、米国の臨床遺伝専門医の団体であるAmerican College of Medical Geneticsの内部資料等から情報を得た。英国においては近年の次世代シーケンサー技術の発達を受けて、臨床応用が積極的に推進されている。特に、臨床応用が進んでいるのは、数個から数十個の遺伝子を纏めて分析するパネル検査である。パネル検査と並行して、発達遅滞のある小児の遺伝子診断を中心に、患者本人・父・母の三つ組みでの全エクソーム解析（すべての遺伝子の翻訳領域の検査）が英国の公的医療制度（NHS）の枠組みを介して実施されている。ヨーロッパにおける診断用遺伝子診断のデータ情報センターであるEuroGenetestの情報によればEuropean Commission（EC）内の25の検査室が、776の次世代シーケンサーを用いたパネル検査を臨床検査として実施されている。デスクトップ型シーケンサーのMiSeq（MiSEQ DX）はヨーロッパにおけるCEマーク（検査機器の質保証）と米国におけるFDAの承認を受けている。米国のハーバード大学とMITが共同で運営しているBroad Instituteはマサチューセッツ州にて臨床検査所としての登録を終え、CLIAによる認証も受けている。ペーラー医科大学では既に臨床検査としてWhole exomeの検査を開始して個人加入の医療保険からの支払いも行われている。米国では疾患の原因である遺伝子変異の国家レベルでの集積が推進され、Clinvarデータベースとして集積されている。検査技術の高度化に伴い、多数の遺伝子の解析が可能となると、一回の検査で多数の病的意義が不明な遺伝子多型ないし変異が同定されるようになる。これらの結果を判定するためには、遺伝子型と表現型の関連に関するデータベースの作成が必須である。

研究協力者

鳥居千春 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター

A.研究目的

欧米を中心に次世代シーケンサーを用いて、遺伝子診断を効果的に実施する体制が整備されつつある。本研究班の目的は、わが国における体制整備のあり方を考えることにあるが、次世代シーケンサーの臨床応用は、わが国では欧米にて比して進展している現況である、そこで、海外の状況・動向について調査を行い、わが国における今後のあり方を考える上で参考とした。

B.研究方法

これまでの厚生労働省の研究班活動を通じて、英国UKGTNのMark Kroese博士、フランスOrphanetのAyme博士と定期的な情報交換を行っている。欧州の状況については、両博士から原資料やウェブサイトを通じて把握した。米国状況については、研究分担者が所属する

American College of Medical Geneticsの内部資料等から情報を得た。

（倫理面への配慮）

施設の倫理委員会の承認を受け、ゲノム指針に従い研究を遂行した。

C.研究結果

英国における次世代シーケンサーの臨床応用の現況

英国の公的医療制度であるNHSの下に遺伝子診断の臨床応用が進められている。これらの遺伝子群の検査を担当する施設として、30の診断センターが存在する。2011年の報告では、英国においてNHSの制度下に行われている検査の件数は人口10万人あたり140件（700人に1

名)であると報告されている。ゲノムデータの臨床応用については、英国首相が将来的に経済的な観点からも国益になる事業として勧奨している。予算措置を行っており、来る5年間のうちに10万人の全ゲノムの配列を決定する計画が立案されている。

これまでは、歴史的な経緯から遺伝子毎に遺伝子検査が開発され、579疾患、726遺伝子がNHSが実施する検査の対象となっている。このうち、313遺伝子・255疾患について遺伝子診断の適応や検査実施時の注意点に関する情報が文書化され、公開されている。毎年、適応が認められている疾患が、40疾患から50疾患ずつ増加している。

近年の次世代シーケンサー技術の発達を受けて、臨床応用が積極的に推進されている。

特に、臨床応用が進んでいるのは、数個から数十個の遺伝子を纏めて分析するパネル検査である。具体例としては、先天性ミオパチー、滑脳症、全ミトコンドリアシーケンスなどがパネル検査として利用され始めている。パネル検査と並行して、発達遅滞のある小児の遺伝子診断を中心に、患者本人・父・母の三つ組みでの全エクソーム解析(すべての遺伝子の翻訳領域の検査)がNHSの枠組みを介して実施されている。この臨床応用を目指したエクソーム解析プロジェクトから明らかになったことは、下記の5点とされる。

- ① 個人のゲノムには単体では解釈困難な遺伝子変異/多型が多数存在し、その病的意義の判断には両親の検体が極めて重要である。
- ② 標的を決めた遺伝子解析の臨床的有用性は高い。エクソーム解析は網羅性が魅力であるが、コストの面ではパネル検査の方が安価となる。また、疾患原因と直接に関係の無い遺伝子変異(偶発的所見)の問題に関わる可能性が少ない。
- ③ 遺伝子型と表現型の関連に関するデータベースの作成は必須である。上述のごとく単体では解釈が困難なことが少なくないが日本人の遺伝子型と表現型の関連に関するデータベースが充実するにつれて、確定診断可能な事例が増加すると期待される。
- ④ 表現型と家族歴に関する情報は、分析結果の解釈のために必須である。
- ⑤ 最新の情報を参照して、アノテーションを繰り返して行う事が重要である。現状では、遺伝子診断を行う場合、診断時に最新のデータベース等を参照して最終報告とすることが多い。今日、多型・変異に関するデータ量は急速に拡大しつつあり、複数回にわたりアノテーションを繰り返す必要があると思われる。

ヨーロッパにおける次世代シーケンサーの臨床応用の現況

ヨーロッパにおける診断用遺伝子診断のデータ情報センターであるEuroGenetestの情報によれば2013年の10月の時点で、European Commission(EC)内の25の検査室が、776の次世代シーケンサーを用いたパネル検査を臨床検査として実施しており、このパネルでカバーされる遺伝子の総数は2236、疾患の総数は1114種である。

(<http://www.eurogentest.org/index.php?id=668>)

デスクトップ型シーケンサーのMiSeq(MiSEQ DX)はヨーロッパにおけるCEマーク(検査機器の質保証)と米国におけるFDAの承認を受けている。

米国における次世代シーケンサーの臨床応用の現況

米国のハーバード大学とMITが共同で運営している世界を代表する次世代シーケンサーのBroad Instituteはマサチューセッツ州にて臨床検査所としての登録を終え、CLIAによる認証も受けている。ベラー医科大学では既に臨床検査としてWhole exomeの検査を開始しており、15週間で結果を返すとしており、個人加入の医療保険からの支払いも行われている。

ベラー医科大学が属する米国ヒューストンエリアでは、多型データの共有が行われており、基盤になるソフトウェアとしてはvariant toolsが用いられている。これまで世界各地で下記のような種々の多型や変異に関するデータベースが編纂されているが、歴史的な経緯から少しずつフォーマットが異なっており、統一的な利用が妨げられてきた。variant toolsはこれらのリソースを統一的に使用することを目的に設計され、しかも代表的なコンピューターのオペレーティングシステム間でのデータベースファイルの相互利用が保証された、画期的なデータベースである。

Exome Variant Server (EVS):

dbNSFP: non-synonymous variants of CCDS genes.

dbSNP: NCBI's variant database.

1000 Genomes: 1000 Genomes variants deposited in dbSNP

1000 Genomes (provided through the European Bioinformatics Institute):

COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In

Cancer) Project
gwasCatalog:
keggPathway:
CancerGeneCensus:

米国では疾患の原因である遺伝子変異の国家レベルでの集積が推進され、Clinvar データベースとして集積されている。Clinvar における、病的意義の分類は下記の通りである。

Pathogenic, Likely pathogenic, Uncertain significance, Likely benign, Benign, association, drug response, confers sensitivity, protective, risk factor

である。Clinvar はウェブブラウザから検索可能であるが、一本のテキストファイル（正確には vcf ファイル）としてダウンロード可能となっている。

D. 考察

次世代シーケンサーの遺伝子変異解析の用途のためには、品質がある程度、安定していると考えられている。たとえばイルミナ社のデスクトップシーケンサーMiSeqDX は欧州および米国の両方で、臨床検査機器としての承認を受けるに至っている。

ソフトウェアの使用方法についても米国で、BWA/GATK を基本としたソフトウェアパイプラインを使用している検査室が CLIA の認証を受けるに至っている。

全遺伝子ではない多数の遺伝子を同時に解析する「パネル」が英国を含む欧州で盛んに使用されている。一方で、全遺伝子の解析を診療に用いようとする試みも英国、米国で行われている。また、遺伝子あたりの解析単価の低下に伴い、既知のヒト疾患遺伝子をすべて網羅するパネル等の市販も開始されている。これらのパネルは、いわば all-in-one の製品であり国際的な標準化や検査の質の保証につながるものと期待される。

検査技術の高度化に伴い、多数の遺伝子の解析が可能となると、一回の検査で多数の病的意義が不明な遺伝子多型ないし変異が同定されるようになる。これらの結果を判定するためには、遺伝子型と表現型の関連に関するデータベースの作成が必須である。日本人の遺伝子型と表現型の関連に関するデータベースが充実するにつれて、確定診断可能な事例が増加すると期待される。全国的にこのようなデータを集積し、共有するための枠組みの整備が急がれる。上述した、オープンソースソフトウェア variant tools はデータベースの実体を、単一のファイルとして配布かのうであり、全国におけるデータ共有

の手段としては優れていると考えられる。

E. 結論

全遺伝子ではない多数の遺伝子を同時に解析する「パネル」が英国を含む欧州で盛んに使用されている。一方で、全遺伝子の解析を診療に用いようとする試みも英国・米国で行われている。検査技術の高度化に伴い、多数の遺伝子の解析が可能となると、一回の検査で多数の病的意義が不明な遺伝子多型ないし変異が同定されるようになる。これらの結果を判定するためには、遺伝子型と表現型の関連に関するデータベースの作成が必須である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takenouchi T, Nishina S, Kosaki R, Torii C, Furukawa R, Takahashi T, Kosaki K. Concurrent deletion of BMP4 and OTX2 genes, two master genes in ophthalmogenesis. *Eur J Med Genet.* 2013 ;56(1):50-53.
2. Hirasawa A, Masuda K, Akahane T, Tsuruta T, Banno K, Makita K, Susumu N, Jinno H, Kitagawa Y, Sugano K, Kosaki K, Aoki D. Experience of Risk-reducing Salpingo-oophorectomy for a BRCA1 Mutation Carrier and Establishment of a System Performing a Preventive Surgery for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome in Japan: Our Challenges for the Future. *Jpn J Clin Oncol.* 2013;43(5):515-519.
3. Yamazaki F, Osumi T, Kosaki K, Mikami S, Hirato J, Shimada H. Large Congenital Melanocytic Nevi With Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor. *Pediatr Blood Cancer.* 2013.;60(7):1240-1241
4. Ueda K, Awazu M, Konishi Y, Takenouchi T, Shimozato S, Kosaki K, Takahashi T. Persistent hypertension despite successful dilation of a stenotic renal artery in a boy with neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet A.* 2013 ;161(5):1154-1157.
5. Komoike Y, Matsuoka M, Kosaki K. Potential Teratogenicity of Methimazole: Exposure of zebrafish embryos to Methimazole causes similar developmental Anomalies to Human Methimazole Embryopathy. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2013.;98(3):222-229.
6. Takenouchi T, Kosaki R, Torii C, Kosaki K. Daytime somnolence in an adult with Smith-Magenis syndrome American

- Journal of Medical Genetics .
2013;161(7):1803-1805.
7. Takenouchi T, Saito H, Maruoka R, Oishi N, Torii C, Maeda J, Takahashi T, Kosaki K. Severe obstructive sleep apnea in Loey's-Dietz syndrome successfully treated using continuous positive airway pressure. *Am J Med Genet A*. 2013 ;161(7):1733-1736.
 8. Hirasawa A, Zama T, Akahane T, Nomura H, Kataoka F, Saito K, Okubo K, Tominaga E, Makita K, Susumu N, Kosaki K, Tanigawara Y, Aoki D. Polymorphisms in the UGT1A1 gene predict adverse effects of irinotecan in the treatment of gynecologic cancer in Japanese patients. *J Hum Genet*. 2013;58(12):794-798.
 9. Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Severe congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: Mutation in the penultimate exon of FBN1 causing a recognizable phenotype. *Am J Med Genet A*. 2013;161(12):3057-3062.
 10. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. (in press)
 11. Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H, Kosaki K. Multiple café au lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. *Am J Med Genet A*. 2014 ;164(2):392-396.
 12. Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: a cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8(1):172.
 13. Hirasawa A, Masuda K, Akahane T, Ueki A, Yokota M, Tsuruta T, Nomura H, Kataoka F, Tominaga E, Banno K, Makita K, Susumu N, Sugano K, Kosaki K, Kameyama K, Aoki D. Family History and BRCA1/BRCA2 Status Among Japanese Ovarian Cancer Patients and Occult Cancer in a BRCA1 Mutant Case. *Jpn J Clin Oncol*. 2014 ;44(1):49-56
 14. Kubo A, Shiohama A, Sasaki T, Nakabayashi K, Kawasaki H, Atsugi T, Sato S, Shimizu A, Mikami S, Tanizaki H, Uchiyama M, Maeda T, Ito T, Sakabe J, Heike T, Okuyama T, Kosaki R, Kosaki K, Kudoh J, Hata K, Umezawa A, Tokura Y, Ishiko A, Niizeki H, Kabashima K, Mitsunashi Y, Amagai M. Mutations in SERPINB7, Encoding a Member of the Serine Protease Inhibitor Superfamily, Cause Nagashima-type Palmoplantar Keratosis. *Am J Hum Genet*. 2013 ;93(5):945-956.
 15. Takagi M, Ishii T, Torii C, Kosaki K, Hasegawa T. A novel mutation in SOX3 polyalanine tract: a case of kabuki syndrome with combined pituitary hormone deficiency harboring double mutations in MLL2 and SOX3. *Pituitary*. 2013(in press)
 16. Takenouchi T, Hashida N, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. 1p34.3 deletion involving GRIK3: Further clinical implication of GRIK family glutamate receptors in the pathogenesis of developmental delay. *Am J Med Genet A*. 2014 ;164(2):456-60

2.学会発表

1. 小崎健次郎。臨床応用を念頭においた最新のゲノム解析：全ゲノムからエクソーム、ターゲットシーケンスまで 日本人類遺伝学会第58回大会 2013年11月、仙台

G.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あり方に関する研究
分担研究報告書

神経疾患における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 青木 正志
東北大学大学院医学系研究科 神経内科 教授

研究要旨

遺伝性神経・筋疾患の、特に症例数の少ない希少疾患の遺伝学的検査提供体制の必要性・重要性及び附帯する課題について検討した。主に成人期に発症する遺伝性筋疾患の中には、種々の筋変性疾患、代謝性疾患、ミトコンドリア関連疾患などが含まれるが、筋疾患関連遺伝子は、複数の巨大遺伝子を含め少なくとも40以上存在するため、変異の有無を網羅的に解析することは従来困難であった。このような問題に対して、次世代シーケンサーを利用し、既知の筋疾患関連遺伝子を網羅的に解析することで診断率の向上を得ることが可能である。Dysferlinopathyが疑われるものの診断が未確定の症例で20例においてターゲットリシーケンス解析を行った。従来の解析方法で検出できていなかったDYSF遺伝子の変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる他の筋関連遺伝子での変異が検出された。今後、サンガー法に相当する結果を得るためにサンプル当たりどの程度のデータを得る必要があるかについては検討が必要である。

研究協力者

井泉瑠美子

（東北大学神経内科、遺伝病学分野）

青木洋子（東北大学遺伝病学分野）

松原洋一（国立成育医療研究センター研究所）

A. 研究目的

神経内科領域においては、遺伝性疾患の診療を行う機会は比較的多く、対象とする疾患の種類も多い。遺伝性疾患の診断において常に病因となっている突然変異を同定すること（遺伝子診断）が必須というわけではないが、遺伝子診断により確定診断のつくことは、診療の根本をなすもので、その臨床的有用性は基本的に疑問の余地はない。

主に成人期に発症する遺伝性筋疾患の中には、種々の筋変性疾患、代謝性疾患、ミトコンドリア関連疾患、一部の炎症性疾患が含ま

れるが、筋疾患関連遺伝子は、複数の巨大遺

伝子を含め少なくとも40以上存在するため、変異の有無を網羅的に解析することは従来困難であった。このような問題に対して、次世代シーケンサーは網羅的な遺伝子配列決定を可能とすることから、既知の筋疾患関連遺伝子を網羅的に解析することで診断率の向上を得ることが第一の目的である。また、既知の筋疾患関連遺伝子に変異を認めない場合や、非典型的で原因不明の遺伝性筋疾患に対し、全エクソン解析（エクソーム解析）を行うことで新たな疾患原因遺伝子を特定することが第二の目的である。遺伝性筋疾患の多くは、原因不明で有効な治療法がないため新たな遺伝子変異を明らかにすることは病態解明につながり、将来的な治療法開発への端緒ともなりうる。

B. 研究方法

1. 既知の筋疾患関連遺伝子の解析

次世代シーケンサーを用いてターゲットリシーケンス解析を行う。解析対象としては、既知の筋疾患関連遺伝子である以下の42遺伝子の検索を行う。新規遺伝子の報告があった場合には随時追加を行う。

2. エクソーム解析

既知の筋疾患関連遺伝子に変異を認めない場合に行う。罹患者についてエクソンキャプチャー法を用いて抽出した全エクソン領域を、次世代シーケンサーにて配列解析する。家系内の非罹患者を解析する場合、罹患者と比較することで疾患に関連した変異のみを抽出する。必要に応じて以下のアレイ CGH や連鎖解析を行い、照合することで候補遺伝子を絞り込む。次世代シーケンサーは HiSeq 2000 (Illumina)を用いて 101 塩基のペアエンド解析を行った。得られたデータは、BWA でマッピングを行い、GATK v1.5 で変異の一塩基置換や欠失挿入の抽出を行った。変異のアノテーションには、ANNOVAR を使用した。

(倫理面への配慮)

患者からの臨床情報の取得および DNA の採取に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、最初に東北大学医学部のヒトゲノム委員会および倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得ている。

C. 研究結果

当科では、1995年より臨床的にDysferlinopathy（三好型遠位型筋ジストロフィーもしくは肢帯型筋ジストロフィー2B型）の疑われる患者に対する *DYSF* 遺伝子の変異スクリーニングをSSCP法により行ってきたが(Takahashi T, et al. 2003, 2013)、発端者169例の約40%で診断が未確定である。これらの症例を対象に、ターゲットリシーケンス解析による既知の筋疾患関連遺伝子の解析を行った。

現在までに、20例のターゲットリシーケンス解析を行った。12サンプル毎のターゲットリシーケンス解析を行った結果、解析対象とした全標的領域の約90%以上が、目標としている最低Depth 30以上でカバーされた。SSCP法で片アレルにのみ *DYSF* の病的変異を検出していた9例中、6例に病因となりうるホモ接合もしくは複合ヘテロ接合の *DYSF* 遺伝子変異を検出した。全く *DYSF* に変異を検出していなかった11例では、*DYSF* には病的変異を認めなかったものの、3例でその他の筋疾患遺伝子に原因の可能性のある変異を検出した。

D. 考察

既に解析した症例で、従来の解析方法で検出できていなかった *DYSF* 遺伝子の変異の検出や、遠位型ミオパチーと類似の臨床・病理像をとる他の筋関連遺伝子での変異が検出されてきている。今後、サンガー法に相当する結果を得るためにサンプル当たりどの程度のデータを得る必要があるかについては検討が必要である。また、変異の病的意義を考える上では、解析症例の蓄積やデータベース化も重要である。

E. 結論

Dysferlinopathyの疑われる患者に対する *DYSF* 遺伝子の変異スクリーニングは、国内外から依頼が継続されており、これらの症例に対し、今回有用性を確認したターゲットリシーケンス解析による既知の筋疾患関連遺伝子の解析を今後継続することは、筋疾患の診断率向上に寄与する。

さらに神経疾患の遺伝子診断をどのような実施体制で行うか、その費用負担をどうするのか、検査体制の質の評価・遺伝子検査結果の解釈をどのように担保するかなどの課題を検討して行く必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.* 2013; 58(5):259-66

Takahashi T, Aoki M, et al., Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013; 84: 433-40

2. 学会発表

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: A mutation in A-band titin is associated with hereditary myopathy with early respiratory failure in a Japanese family. the 63rd Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Boston, MA, Oct 24, 2013

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

次世代シーケンサー時代に予想される神経変性疾患遺伝子解析

研究分担者 小野寺理 新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析

研究要旨

次世代シーケンサーの時代に入り、神経変性疾患の遺伝子診断は大きく変わる可能性がある。しかし、医療の目的が患者の利益にあることから考えると、その導入が無意味な混乱を招かないように最大限の注意をもって進める必要がある。特に成人の神経変性疾患で一見、家族例がないように見える致死性疾患、認知症に対して、本検査が導入された場合、その混乱が危惧される。それを回避するためには、孤発性疾患に対する検査指針の設定、症状毎の検査遺伝子パネルの設定、全国規模のデータベースの設置の3点について、解決すべきである。そして何よりも診断できる疾患は、企業が可能なコスト設定での保険収載を強く期待する。加えて、当該疾患を診療する医師は、当然のこととして、遺伝性疾患に対する十分な知識を持つことのように、学会の専門医認定時に留意し、遺伝性疾患医療の逆差別を防ぐ手立てが強く望まれる。

A. 研究目的

次世代シーケンサーの時代に入り、神経変性疾患では遺伝子レベルで理解される事例が増えることが推定される。しかし、腫瘍性疾患において、遺伝子解析が治療方法の選択に大きく寄与しているのに比して、神経変性疾患では、その結果が治療方法の選択に繋がる例は少ない。また遺伝性疾患を疑っていなかった家系症例に対し、あらたな問題を提示する事に繋がる可能性がある。本研究では、この問題について考察する。

B, C. 研究結果および考察

医療における最大の目的は治療である。しかし、神経変性疾患の場合、それが必ずしも成功していない。現在の治療方法は症状に対する介入療法であり、原因に対する治療方法は選択さ

れていない。この点が、近年の分子標的療法による腫瘍性疾患との相異である。本来は、神経変性疾患でも分子病態に沿った治療方法が提案されるべきである。本症での遺伝子診断の持つ混乱の大きな理由は、この治療方法が提案できないという点に由来する。

それではどのような混乱が想定されるのだろうか。まず、遺伝性疾患を考慮していなかった症例に対して、遺伝性疾患であることが提示される可能性がある。これらの検査は患者の同意の下に遂行されるが、かなりの理解力を持った方でも、現在の遺伝性疾患の変異の持つ意義を正確に把握できるとは言い難い。つまり検査前に、その検査が陽性であった場合のもたらす種々の影響について、必ずしも正確に理解できていない可能性がある。問題となるのは成人で家族歴が明らかでない孤発性の症例で、子孫が

いる場合の遺伝子診断の是非である。小児とは明らかに異なる問題がここには内在する。高齢者の場合、両親での検索、家系内検索は不可能であることが多く、孤発性症例に対して、見出された変異の病的意義につき正確に提示することは困難である。さらに、その事実は、子孫に対し、同様の疾患に罹患するかもしれないという漠然とした不安感を植え付けることになる。特に認知症や、致死的な疾患の場合、その持つ意味は大きい。

また認知症の場合、誰から同意を取得し、誰にその事実を伝えるのかという問題がある。本来遺伝子診断はパーソナルな物であり、あくまでも本人の意志の元に本人に伝えるべき物である。しかし、認知症の場合、発端者はその持つ意味を理解できないと考えられる。一方、子孫は at risk にあたるため、このような対象としては相応しくない。配偶者は、その関係を清算する権利を有している個人であり、この極めてパーソナルな事象を伝えることに適しているかどうか状況により判断する必要がある。若年であれば離婚する可能性を内在するし、高齢であれば、ただでさえ配偶者の疾病に苦しんでいるところに新たな悩みをもたらすことになる。明らかに家族歴がある物であれば、そのことに対する準備もできている可能性があるが、孤発性の物に対して、介入方法が大きく異ならないのであれば、現時点で余計な混乱を招くだけではないかと考える。この面からは、医療としては、次世代シーケンサーによる診断は、対象とする疾患、家系の条件を設定すべきであると考えられる。現時点では、子孫がある場合の孤発症例の次世代シーケンサーによる遺伝子診断は行うべきではないように思う。

次に、得られた結果の意義の解釈であるが、今後は、判断に迷う変異が集積することが予想される。国費でこのような研究が行われる以上、その結果について、第三者機関の要望に添った

形での結果の開示、データベース化を進め、症例の集積の上に、その意義につき判定できる土壌を作っていくべきであると考えられる。得られた結果を無駄にしない取り組みが何よりも大切である。研究者コミュニティへの信頼が失われつつある現在において、その扱いは厳に律すべきであり、解析とは関係のない機関がデータを収集していくべきであろう。このような国家規模の疾患ゲノムセンターをデータ解析部門のみでも作っていくことが望ましい。これは大学レベルで行う物ではなく、基本的には国管轄の研究組織で恒久的な予算措置により行われるべきである。このようなデータベースなしでは、次世代シーケンサーの多くの結果は不要な混乱をもたらす。

最後に本検査を保険収載に載せるスキームは重要ではあるが、まだまだ解決すべき医学的問題が多い。それよりも、確実に現在の医療知識で診断が可能な疾患についての保険収載を確実に進めることが重要である。その方法として、コスト面から次世代シーケンサーを用いる時代になるかもしれない。その場合は、便宜的に、医療として検査する遺伝子と、検査はするが伝えない遺伝子に明確に分けた上で、進める方向性が望まれる。

E. 結論

次世代シーケンサーによる遺伝子診断には、孤発性疾患に対する検査指針の設定、症状毎の検査遺伝子パネルの設定、全国規模のデータベースの設置の3点について、解決すべきである。そして何よりも診断できる疾患は、企業が可能なコスト設定での保険収載を強く期待する。加えて、当該疾患を診療する医師は、当然のこととして、遺伝性疾患に対する十分な知識を持つことように、学会の専門医認定時に留意し、遺伝性疾患医療の逆差別を防ぐ手立てが強く望まれる。

以下は昨年の報告書に記載した物であるが、これらの進歩が垣間見えない、もはや論議ではなく行動の時代と考える。

1. 神経疾患は遺伝性難治性希少疾患が多い、しかし、遺伝子検査の多くは保険収載されておらず、それ故に、その診断体制が極めて貧弱である。本邦なりの診断体制の構築が望まれる

2. 神経分野における遺伝性難治性希少疾患は、臨床症状が極めて酷似し、かつ特定の生化学異常をもたない。そのため、その確定診断は遺伝子検査に委ねられる。

3. 患者サイドから見れば、遺伝情報の提供を求めれば与えられるシステムの構築が要望される。

4. 基本理念は診断可能な疾患は、保険診療内で診断可能とする道筋をつけ、それに十分な報酬体系を構築する。

(ア) 民間検査会社が検査を行っているにも拘わらず、その保険収載がなされていない疾患群に関して保険収載すること、

(イ) 民間検査会社が検査を行っていない疾患群に体して、その診断体制を担保する。

5. 下記の事項について、全ての医師が十分に認識するような教育体制が必要

(ア) 優性遺伝性疾患の検査は十分に理解した上で、検査の可否を決定することが必要である。

(イ) 発端者に認知症がある場合の検査の同意の取得について論議する必要がある。

(ウ) 伴性劣性遺伝性に関しては、発端者の娘に体して、その児への影響を示唆する。

(エ) 出生前診断の可否について明確な共通のガイドラインが必要。

6. インターネットや電話を用いた受カウ

ンセリングを認めるべきである。

G. 研究発表

なし

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

日本人の遺伝子変異データベースの構築

研究分担者 松田 文彦 京都大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

ヒト疾患の解析に全ゲノムシーケンスが利用可能となったことで、稀少難治性疾患の原因遺伝子変異の情報が加速度的に蓄積されると考えられるが、効率的な研究の実施、医科学的価値の高い成果の創出、患者の適切な診断治療においては、疾患原因遺伝子情報を共有するシステムの構築が不可欠である。本課題では、稀少難治性疾患研究拠点が連携し、日本人遺伝子リファレンス情報（3,248人の健常者のSNP頻度情報、1,208検体のエクソーム解析情報）、稀少難治性疾患の遺伝子変異情報をデータベースに集約し公開した。本データベースが難病研究の中核として機能することは疑いなく、疾患遺伝子情報を手がかりとして当該疾患領域の医療・研究が加速され、難病研究領域の全体的なレベルアップに繋がるとともに、稀少難治性疾患の遺伝子診断における標準化が進むなど、臨床に直結する基盤情報が提供される。

A. 研究目的

難病の研究や診断治療において、全ゲノムシーケンスを利用した原因遺伝子の探索は極めて強力なアプローチである。平成23年度より「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業」が開始されたことで、従来とは比較にならない量の原因遺伝子変異の情報が加速度的に蓄積されると考えられる。そういった情報を公開・共有することは、重複を回避した効率的な研究の実施と、さらなる医学的価値の高い成果の創出に不可欠であり、患者の適切な診断治療にも欠かせない。しかし、疾患遺伝子解析研究で収集した臨床情報や解析された遺伝子情報を全国で統一的に管理・運用するナショナルデータベースは、これまでに構築されていない。そこで、稀少難治性疾患研究拠点間の連携で、難病の発症や予後等に関連する遺伝子変異情報を集約したデータベースを構築し、蓄積した情報を広く公開することで、科学的価値の高い成果を創造し、精度の高い診断、迅速な治療方針の決定による質の高い「個の医療」の実現に資することを目標とする。

B. 研究方法

拠点と一般研究班の緊密な連携のもと、厚労省「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）」の各研究班に集積された難病患者の検体の遺伝子解析情報を対象に、遺伝子リファレンスライブラリーの構築を実施する。

（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学倫理委員会の承認を得て実施する。エクソーム解析や全ゲノムシーケンスなど網羅性の高いデータを扱うことから、データの公開・共有にあたっては、インフォームドコンセントで同意が得られているもののみとし、それに応じて公開レベルを設けるなど、十分に配慮する。共同研究機関においては、各機関の倫理委員会で承認を得たプロトコールに基づいた解析情報のみを利用し、データベースへは、匿名化された情報のみを受領する。

C. 研究結果

データベース構築

データベース設計に先立ち、各班から疾患基礎情報項目一覧の提供を受け、構築に必要なデータ構造を考案した。また、変異

情報の授受に必要なデータフォーマットの定義、及び、それに則した遺伝子データベースの設計と構築を実施した。データ閲覧用インターフェイスの開発と全データエントリー登録を完了した 2013 年 11 月 12 日に、遺伝子リファレンスライブラリーデータベース (Human Genetic Variation Database: HGVD) を公開し、情報の配信を開始した。

(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/index.html>)

データエントリー

日本人集団のゲノム変異情報の集約を実施した。具体的には、SNP アレイを用いたゲノムスキニング法により得られた約 3,248 人の健常者の一塩基多型頻度情報の標準化を行い、データベースに蓄積した。次世代シーケンサーによる日本人ゲノム変異情報については、研究分担者から提供されたデータも含め、計 1,208 検体のエクソームシーケンス情報より多種多様なゲノム変異情報を抽出し、それらの頻度情報を集約してデータベースへ蓄積した。

京都大学でエクソーム解析を実施した DNA 検体 300 例については、ゲノムスキニング法による一塩基多型解析、及び、発現解析アレイによる末梢血 RNA からの遺伝子発現解析も実施した。これらの情報をもとに、遺伝子多型と発現量との関連解析 (eQTL 解析) を実施し、結果をデータベースに登録した。エクソーム解析で見出された新規のゲノム変異の機能的役割を解釈する上で有用な情報となることが期待される。

ゲノム解析によって同定された難病の原因となる日本人特異的な遺伝子変異の情報提供を受けてデータベースに蓄積し、12 疾患、215 変異の登録を完了した。また、変異データ登録システムを設計・構築・公開し、様々な研究施設からのデータ受け入れ態勢を整えた。本年度中にさらに 35 遺伝子、600 変異のデータが登録される予定である。

情報の発信

データベースの公開に先立ち、本事業のウェブページを立ち上げ、プロジェクトの概要・目的・研究計画、及び、各研究班の研究内容に関する情報を発信した (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/>

ntractableDiseases)。データベース公開時には、記者会見をおこない、情報の周知に努めた。また、研究代表者、研究分担者および一般研究班の連携協力者の参加による研究成果進捗報告を兼ねた一般公開ワークショップを開催し、研究内容・意義についての幅広い普及を行った。

・「次世代遺伝子解析装置を用いた難病研究」平成 24 年度第 1 回ワークショップ

2012 年 9 月 6 日、京都大学芝蘭会館稲盛ホール

平成 24 年度第 2 回ワークショップ

2013 年 3 月 23 日、東京国際フォーラム

平成 25 年度第 1 回ワークショップ

2013 年 8 月 24 日、京都大学芝蘭会館稲盛ホール

D. 考察

本研究事業が提供する日本人固有のゲノム変異情報は、希少難治性疾患の研究に携わる研究者のみならず、多くのヒト疾患研究者にとって極めて価値の高いものである。日本人の遺伝子変異情報、および、多種の希少難治性疾患の関連遺伝子変異を集積した本データベースが難病研究の中核として機能することは疑いなく、疾患遺伝子情報を手がかりとして当該疾患領域の医療・研究が加速され難病研究領域の全体的なレベルアップに繋がるとともに、希少難治性疾患の患者の遺伝子診断における標準化が進むなど、臨床に直結する基盤情報が提供される。本データベースを研究者が利活用することによって、日本人での遺伝病の原因遺伝子の発見や、見出された変異が疾患発症に関わる可能性の評価・解釈、種々の病気になるやすい遺伝的体質の解明が大きく進展するものと期待される。

E. 結論

運営委員会で策定された事業計画と制度設計に沿って計画通りに事業を推進し、2013 年 11 月 12 日に遺伝子リファレンスライブラリーデータベースを公開した。本データベースの利活用により、疾患の原因変異究明のプロセスが飛躍的に向上することが期待できる。将来に向けて、本事業で得られた成果やバイオリソースなどを、研究者コミュニティが広く活用できるような仕組みを今後さらに発展させることが重要である。今後は、日本人ゲノム変異データベースの検体数を増やすとともに、難病の

遺伝子変異のデータベース登録を難病研究班にうながし、新たなデータの蓄積、機能の向上、維持管理などを継続的におこない、より充実したデータベースとすることが重要である。本事業によっておこなわれた大規模研究成果のデータベース化と公開により、難病研究、ゲノム医学研究が今後大きく発展する礎になれば幸いである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

【論文発表】

1. Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., Graham, R. R., Manoharan, A., Ortmann, W., Bhangale, T., Denny, J. C., Carroll, R. J., Eyler, A. E., Greenberg, J. D., Kremer, J. M., Pappas, D. A., Jiang, L., Yin, J., Ye, L., Su, D. F., Yang, J., Xie, G., Keystone, E., Westra, H. J., Esko, T., Metspalu, A., Zhou, X., Gupta, N., Mirel, D., Stahl, E. A., Diogo, D., Cui, J., Liao, K., Guo, M. H., Myouzen, K., Kawaguchi, T., Coenen, M. J. H., van Riel, P. L. C. M., van de Laar, M. A. F. J., Guchelaar, H. J., Huizinga, T. W. J., Dieude, P., Mariette, X., Bridges Jr, S. L., Zhernakova, A., Toes, R. E. M., Tak, P. P., Miceli-Richard, C., Bang, S. Y., Lee, H. S., Martin, J., Gonzalez-Gay, M. A., Rodriguez-Rodriguez, L., Rantapaa-Dahlqvist, S., Arlestig, L., Choi, H. K., Kamatani, Y., Galan, P., Lathrop, M., the RACI consortium, the GARNET consortium, Eyre, S., Bowes, J., Barton, A., de Vries, N., Moreland, L. W., Criswell, L. A., Karlson, E. W., Taniguchi, A., Yamada, R., Kubo, M., Liu, J. S., Bae, S. C., Worthington, J., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Raychaudhuri, S., Stranger, B. E., De Jager, P. L., Franke, L., Visscher, P. M., Brown, M. A., Yamanaka, H., Mimori, T., Takahashi, A., Xu, H., Behrens, T. W., Siminovitch, K. A., Momohara, S., Matsuda, F., Yamamoto, K. and Plenge, R. M. (2014) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506**, 376-381.
2. Tanaka, K., Terao, C., Ohmura, K., Takahashi, M., Nakashima, R., Imura, Y., Yoshifuji, H., Yukawa, N., Usui, T., Fujii, T., Mimori, T. and Matsuda, F. (2014) Significant association between *CYP3A5* polymorphism and blood concentration of tacrolimus in patients with connective tissue diseases. *J. Hum. Genet.* **59**, 107-109.
3. Yamakawa, N., Fujimoto, M., Kawabata, D., Terao, C., Nishikori, M., Nakashima, R., Imura, Y., Yukawa, N., Yoshifuji, H., Ohmura, K., Fujii, T., Kitano, T., Kondo, T., Yurugi, K., Miura, Y., Maekawa, T., Saji, S., Takaori-Kondo, A., Matsuda, F., Haga, H. and Mimori, T. (2014) A clinical, pathological and genetic characterization of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders. *J. Rheumatol.* **41**, 293-299.
4. Terao, C., Bayoumi, N., McKenzie, C. A., Zelenika, D., Muro, S., Mishima, M.; The Nagahama Cohort Research Group, Connell, J. M., Vickers, M. A., Lathrop, G. M., Farrall, M., Matsuda, F. and Keavney, B. D. (2013) Quantitative variation in plasma angiotensin-I converting enzyme activity shows allelic heterogeneity in the ABO blood group locus. *Ann. Hum. Genet.* **77**, 465-471.
5. Terao, C., Yoshifuji, H., Ohmura, K., Murakami, K., Kawabata, D., Yurugi, K., Tazaki, J., Kinoshita, H., Kimura, A., Akizuki, M., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Miura, Y., Maekawa, T., Saji, H., Mimori, T. and Matsuda, F. (2013) Association of Takayasu arteritis with HLA-B*67:01 and two amino acids in HLA-B protein. *Rheumatol. (Oxford)*. **52**, 1769-1774.
6. Terao, C., Yoshifuji, H., Kimura, A., Matsumura, T., Ohmura, K., Takahashi, M., Shimizu, M., Kawaguchi, T., Chen, Z., Naruse, T. K., Sato-Otsubo, A., Ebana, Y., Maejima, Y., Kinoshita, H., Murakami, K., Kawabata, D., Wada, Y., Narita, I., Tazaki, J., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Yurugi, K., Miura, Y., Maekawa, T., Ogawa, S., Komuro, K.,

Nagai, R., Yamada, R., Tabara, Y., Isobe, M., Mimori, T. and Matsuda, F. (2013) Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 289-297.

7. Plenge, R. M., Greenberg, J. D., Mangravite, L. M., Derry, J. M., Stahl, E. A., Coenen, M. J., Barton, A., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Mariette, X., Moreland, L. W., Bridges, S. L. Jr, de Vries, N. Huizinga, T. W. Guchelaar, H. J., International Rheumatoid Arthritis Consortium (INTERACT), Friend, S. H. and Stolovitzky, G. (2013) Crowdsourcing genetic prediction of clinical utility in the Rheumatoid Arthritis Responder Challenge. *Nat. Genet.* **45**, 468-469.

【学会発表】

なし

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