

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

遺伝学的検査の実施拠点のあり方に関する研究

分担研究者 梅澤明弘 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所・副所長

研究要旨：

遺伝学的解析手法の発展により、多くの疾患で原因遺伝子が同定されている一方で、小児先天性疾患や異常妊娠は、稀少性に加えて従来の遺伝学的手法では同定が困難である。今後、次世代シーケンサーやマイクロアレイ技術を利用した小児科・産科疾患の原因遺伝子同定への応用例は少なく、ゲノム・エピゲノム解析体制の整備が喫緊の課題である。精度の高い解析体制の均てん化には、これらの遺伝学的検査の集約化と体系的な運用規約の作成が必要であると考えられる。

A. 研究目的

遺伝学的解析手法の発展により、多くの疾患で原因遺伝子が同定されている一方で、小児先天性疾患や異常妊娠は、稀少性に加えて従来の遺伝学的手法では同定が困難な微細なゲノム変異やエピゲノム変異、あるいは細菌叢の異常を有すると考えられており、次世代シーケンサーやマイクロアレイ技術による網羅的配列解析が必須かつ極めて有効と期待される。実際に、すでに様々な疾患で、これらの配列解析技術を利用し、多くの画期的研究成果が上げられている。しかし、小児科・産科疾患の原因遺伝子同定への応用例は少なく、ゲノム・エピゲノム解析体制の整備が喫緊の課題である。

小児科・産科領域でこのような解析が進みにくい主因の一つとして、希少疾患が多いことや、厳密なコントロール群の準備が難しいことが挙げられる。本研究では、これまでの国内の難治性疾患克服研究事業研究班との連携による新規・未知病因遺伝子探索研究で培われた難病研究拠点としての機能を基に、遺伝子検査支援体制の運用・検証を考察した。

B. 研究方法

申請者らはすでに、難治性疾患克服研究事業研究班を中心に、様々な小児科・産科疾患の遺

伝子解析ネットワーク体制を構築している。現在もこれらの連携を利用し、精度の高い臨床情報を伴った症例の収集と解析を進めているその実際の運用から明らかになった問題点や望まれる改善点を考察した。

【解析手法】

全エクソン解析による *de novo* 変異同定

約 60 Mb の全エクソン配列を網羅したオリゴキャプチャーで、ゲノム DNA からエクソン領域を選択的に捕捉回収し、次世代シーケンサー（HiSeq）で網羅的に解読する（冗長度 100-200 X）。情報解析は、BWA による Mapping、dbSNP との異同比較、変異の及ぼすアミノ酸置換程度の評価、KEGG パスウェイなどの一連のアノテーションパイプラインにより行う。また、シーケンサーメーカー仕様の各種ソフト

（Mapping, CNV, Inversion, SNPs, Large Indel, Small Indel 等）も活用する。さらに、タンパク質機能への影響予測（SHFT, PolyPhen2）や、これまでの研究成果で得られた独自の日本人集団の多型データベース（Human Variation Genome Browser）迅速な責任遺伝子候補の同定とその生物学的機能注釈を行う。なお、454 等を用いた変異の validation を

行う。

ターゲットリシーケンスによる既知・未知変異同定

すでに疾患責任領域が同定・推定されている疾患では、責任領域の任意配列を網羅したオリゴプローブを設計し、疾患責任領域を選択的に回収し、次世代シーケンサーで網羅的に配列解析する。

網羅的一塩基多型解析

マイクロアレイ技術を用い、全ゲノム関連解析、未知微細欠失同定を含む染色体構造解析を行った。

既知疾患関連多型の大量並列解析

マイクロアレイ技術およびマスアレイ技術を用い、既知の遺伝子多型を多数検体で効率的に解析した。

【解析体制】

解析チームに博士研究員一名、技術補助員一名を配置し、次世代シーケンサーを中心とした大規模高速配列解析を、年間合計約 500 例を目標に行った。全エクソン配列解析では、解析症例とマッチングさせた対照群の配列情報も併せて取得し、変異アレルの出現頻度、アミノ酸置換を伴う *de novo* 変異についてフィルタリングを行い、疾患原因候補を絞り込むまでを行った。

データベース構築は、特に、疾患とゲノム変異との相関性の観点に注意し、OMIM や種々の疾患データベースへのリンクを念頭に入れてデザインを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来のゲノム解析・遺伝子解析研究であるためヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針をはじめとする関連法令と指針を遵守して計画され、本センターおよび連携研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得て行っている。すべての検体は、書面で患者本人もしくは代諾者からインフォームドコンセントを得た後に採取され、採取時に各医療機関で匿名化が実施された。網羅的遺伝子解析については、説明書・同意書を用いて同意を取得した。次世代配列解析を行うに当たっては、網羅的配列解析に対する包括的同意を得る

必要があるが、加えて本研究の検体提供者は、ほとんどが未成年者であり、代諾により同意を得るという特異性を伴う。この点に関しては、特段の配慮と検討を行い、決して拙速な結論に至らぬよう、十分な社会的合意のもとに研究を進めていく必要がある。成育バイオバンクではすでに、これらの倫理的問題を考慮した未成年者検体の取り扱いを進めており、これらの作業と協調し、適正かつ厳格な倫理面の運用の枠組みを作成した。また国立成育医療研究センターでは、定期的（年2回以上）に生命倫理に関する講演を開催し、申請者のみならず関与する医師・研究者の受講を最大限促した。

C. 研究結果

本事業に参加している分担研究者から提供された検体合計 1,450 症例の解析を行った。そのうち特に臨床診断を目的としたのは約 500 症例で、そのうち 100 例程度（25%程度）が確定診断に至った。

D. 考察

本研究では、これまでのゲノム解析拠点としての実績に基づき、難治性疾患克服研究事業で選定されている様々な研究班と連携して疾患を収集解析し、原因不明とされてきた難治性疾患、稀少疾患の関連遺伝子変異および関連遺伝子多型の効率的な同定を目指した。また前述のように、請け負った解析のおよそ三分の一は、分子遺伝学的確定診断を目的とした、ある程度候補病因遺伝子や分子遺伝学的病態が知られている症例であった。

本研究では、先進的解析技術の提供と研究の推進と併せ、遺伝子検査的な側面を持つ解析支援も行った。次世代シーケンサー等を用いた網羅的包括的な遺伝子解析にあたっては、倫理的問題への対応の十分な検討が必要である。特に小児疾患においては代諾による解析が避けられず、社会的合意を踏まえた慎重な運用が望まれる。その結果、遺伝子解析対背運用には多くのコストがかかるため、集約化と共に公正公平な運用基準を定める必要がある。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝学的検査の均てん化には、解析を集約して技術面での安定性や効率化を図ることが有効である。また、特に成育疾患の解析では代諾等の特殊な状況が存在し、倫理面に十分な注意を払った解析が必要である。「予期せぬ結果」を含むこれらの対応にはコストがかかり、網羅的な遺伝子解析を広く提供するにはある程度拠点化して対応することが有効であると予想される。一方で、これらの解析支援を集約化・拠点化しつつ広く還元するには、公正公平な運用基準の作成も重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, Umezawa A, Okamura K, and Hata K
Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women.:
Journal of Human Genetics in press (2014)

2. 学会発表

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

全エクソーム解析により解決できた原因不明の周産期異常家系

分田研究者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科・遺伝学・教授

原因不明の3回の胎児異常と4回の稽留流産を経験した1家系の原因解明にむけて母・健常児・異常胎児の3例のDNAを用いて全エクソーム解析を行い、IFT122 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を同定した。1例の稽留流産絨毛からDNAを採取し、同変異の有無を確認したところ同じく複合ヘテロ接合性変異を同定した。以上から本家系で認められた頻回の周産期異常の原因が *IFT122* の変異によると考えられた。

1. 研究目的

原因不明の周産期異常が繰り返す家系に、産科医が遭遇することは稀ではない。本研究は、3回の胎児異常（胎児水腫で13週で中期中絶1例、13週で子宮内胎児死亡1例、骨系統疾患で21週で中期中絶）、及び6-8週で4回繰り返した稽留流産を経験した一家系の原因を全エクソーム解析で明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

1. 検体収集

母、健常児、中絶胎児のそれぞれより血液を採取ゲノムDNAを抽出した。

2. 次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析

それぞれから3μgのゲノムDNAを用いて Sureselect V4 でエクソン領域を抽出後、HiSeq 2000 を用いてペアエンドシーケンスを行い、Novoalign>GATK>Annovar による変異候補絞り込みを行った。同胞発症が多発していることを考慮し常染色体劣性遺伝形式を特に重視して variant 探索を行った。

3. 稽留流産物の検討

変異を発見した場合、稽留流産絨毛（パラフィン固定）からもDNAを抽出して変異の有無を確認する。

3. 研究結果

3例の全エクソーム解析から1125バリエントを抽出、症例のみに認められる劣性変異に着目すると、*IFT122* の複合ヘテロ接合性変異

c. 622delG (p. Glu208Serfs*51) /

c. 1636G>A (Gly546Arg) を認めた。

c. 622delG (p. Glu208Serfs*51) は母親由来であった。

c. 1636G>A (Gly546Arg) は未解析の父由来と考えられた。

4回目の稽留流産絨毛からDNAを抽出後

PCR-cloning シーケンスを行い同2個の変異が認められることを確認した。

4. 考察

IFT122 は Sensenbrenner 症候群の責任遺伝子で骨系統疾患を呈していた中絶胎児の表現型と矛盾なかった。よって妊娠中期に胎児死亡や胎児異常で中絶した胎児の遺伝的原因は *IFT122* の複合ヘテロ接合性変異が原因であると判断した。4回の稽留流産のうち少なくとも1回の流産物に同複合ヘテロ接合性変異を認めたため、同変異が稽留流産の原因である可能性がある。

5. 結論

原因不明の多発する周産期異常家系の原因解明に全エクソーム解析が有用であった。

6. 研究発表

1. 論文発表

Tsurusaki Y, Yonezawa R, Furuya M, Nishimura G, Pooh RK, Nakashima M, Saitu H, Miyake N, Saito S, and Matsumoto N. Whole exome sequencing revealed causative biallelic IFT122 mutations in a family with CED1 and recurrent pregnancy loss. Clin Genet (in press)

2. 学会発表等

平成 24 年度東京医科歯科大学大学院特別講義・松本直通「神経発達異常のエクソーム解析」平成 25 年 1 月 15 日・東京医科歯科大学・東京

市民・研究者シンポジウム 第 3 回「難病研究と創薬」松本直通「希少疾患ゲノム研究の現状と将来」平成 25 年 1 月 27 日千里ライフサイエンスセンター・豊中

NSFC-JST Workshop on Genomics for Clinical Studies. Naomichi Matsumoto, “Mendelian Exome”, Le Meridien She Shan Shanghai, Shenshan, Shanghai, China, Feb 4, 2013

大分大学医学系研究科・特別講義・松本直通「ヒト遺伝性疾患の最前線」平成 25 年 2 月 18 日・大分大学医学部・大分

福島県立医大・平成 24 年度次世代医学セミナー・シンポジウム「ダイナミックなゲノム-遺伝子解析の最前線-」松本直通・招聘講演「ヒト疾患エクソーム」平成 25 年 2 月 28 日福島県立医大・福島

第 4 回福岡胎児医療フォーラム・松本直通 (特別講演)「ゲノム解析の技術革新と医学」平成 25 年 3 月 1 日・天神ビル・福岡

第 4 回 Pediatric Blood Master Conference・松本直通 (特別講演)「次世代シーケンサーを用いた遺伝性疾患解析」平成 25 年 3 月 5 日・名古屋大学医学部付属病院・名古屋

臨床研究情報センター研修会・松本直通「遺伝性難病のゲノム解析：現状と展望」平成 25 年 4 月 10 日@臨床研究情報センター・神戸

九州大学産科婦人科学講演・松本直通「変革期を迎えた疾患ゲノム解析」平成 25 年 5 月 15 日@九州大学医学部臨床研究棟・福岡

The 10th International Workshop on Advanced Genomics. Naomichi Matsumoto “Mendelian Exome Analysis” @ National Center of Sciences, Tokyo, May 21, 2013

European Conference of Human Genetic 2013. N. Matsumoto, T. Nishimura, K. Muramatsu, H. Kodera, S. Kumada, K. Sugai, E. Kasai-Yoshida, N. Sawaura, H. Nishida, A. Hoshino, F. Ryujin, S. Yoshioka, H. Arakawa, M. Kato, N. Mizushima, H. Saitu. De novo mutations in the autophagy gene encoding WDR45 (WIPI4) cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood June 9, 2013 @Palais des Congrès, Paris, France

順天堂大学医学部セミナー・松本直通「変革期を迎えた疾患ゲノム解析」平成 25 年 6 月 26 日@順天堂大学医学部・東京

第 17 回小児分子内分泌研究会特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いてわかってきたこと」平成 25 年 7 月 7 日札幌北広島クラッセホテル

次世代解析装置を用いた難病の原因究明、治療法開発研究プロジェクトの成果発表会・松本直通「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」平成 25 年 7 月 13 日都市センターホテル・東京

第 20 回日本遺伝子診療学会大会・シンポジウム 1・松本直通「疾患ゲノム解析における次世代シーケンサーの有用性」平成 25 年 7 月 19 日アクトシティー浜松コンgresセンター・浜松

CiRA genomics epigenomics and bioinformatics seminar series VIII. 松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析」平成 25 年 8 月 23 日@CiRA 京都大学

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業「次世代遺伝子解析装置を用いた難病研究」平成 25 年度第 1 回ワークショップ 松本直通「コントロールデータベースに関する話題」平成 25 年 8 月 24 日@京都大学（芝蘭会館）

神奈川県立循環器呼吸器病センター職員研修会 松本直通「新たな時代を迎えた遺伝性疾患解析」平成 25 年 8 月 19 日@神奈川県立循環器呼吸器病センター・横浜

現場の会第三回研究会基調講演・松本直通「NGS がもたらしたヒト疾患ゲノム解析のパラダイムシフト」平成 25 年 9 月 4 日神戸国際会議場@神戸

第 23 回遺伝医学セミナー講義・松本直通「遺伝性疾患の責任遺伝子単離法」平成 25 年 9 月 7 日三井ガーデンホテル千葉@千葉市

第 22 回発達腎研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析:現状と限界」平成 25 年 9 月 13 日高槻市生涯学習センター@高槻市

第 18 回山形小児神経研究会・特別講演・松本直通「次世代シーケンス解析で分かってきたこと」平成 25 年 9 月 27 日パレスグランデール@山形市

第 58 回日本人類遺伝学会大会・シンポジスト・松本直通「ヒト疾患エクソーム解析の現状と課題」平成 25 年 11 月 23 日@江陽グランドホテル仙台
希少疾患・難病の全エクソーム解析 -現状と課題-
松本直通「希少疾患・難病の全エクソーム解析-現状と課題-」平成 25 年 12 月 3 日日経バイオテック「希少疾患・難病の治療薬開発におけるゲノム活用」@秋葉原コンベンションホール

東京大学大学院人類遺伝学特論 II・Naomichi Matsumoto「Rare Variants in Human Diseases」平成 25 年 12 月 4 日@東京大学

7.知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
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

小児病院におけるマイクロアレイ染色体検査実施状況

研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科 岡本伸彦

研究要旨

小児科領域では原因不明の知的障害や自閉症、多発先天異常において、染色体検査が実施される。従来のG分染法では異常の検出率は3%程度である。マイクロアレイ染色体検査はG分染法で同定困難な微細な染色体の欠失や重複（CNV）を件出可能である。15～20%の検出率といわれている。最近大阪府立母子保健総合医療センター受診症例で実施したマイクロアレイ染色体検査の実施状況をまとめた。最近100例で31例の異常が同定された。適切な症例の選択により、従来言われているよりも高率の異常CNVの同定が可能であった。実施にあたっては慎重な臨床的評価と遺伝カウンセリング実施体制が重要と考えられた。

A. 研究目的

臨床的に確定診断が困難な小児の知的障害、自閉症や先天異常などにおいては、マイクロアレイ染色体検査が推奨されている。従来のG分染法では異常の検出率は3%程度である。マイクロアレイ染色体検査はG分染法で同定困難な微細な染色体の欠失や重複（CNVs: copy number variations）を件出可能である。15～20%の検出率といわれている。わが国でもマイクロアレイ染色体検査の普及が望まれる。しかし、保険収載がないために、高額検査（10-15万円）である。あるいは研究所レベルの解析となっている。CNVs領域の解析結果の解釈については、臨床遺伝学に精通した専門家の関与が必要である。実施にあたっては遺伝カウンセリングが必須である。大阪府立母子保健総合医療センターでは関西地域の小児医療の中核的医療機関であり、多くの先天異常症例が集積する。他の医療

機関で診断がつかなかった症例が多数紹介される。

大阪府立母子保健総合医療センターでのマイクロアレイ染色体検査の実施状況をまとめた。

B. 研究方法

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科で最近マイクロアレイ染色体検査を実施した知的障害と先天異常を合併する100例について結果をまとめた。

症例は全例、G分染法で異常がない症例か、異常核型があってもそれだけで病状を説明できない症例である。事前に詳細な臨床的評価を行い、単一遺伝子病や環境要因による疾患を極力排除し、マイクロアレイ染色体検査で異常が検出されそうな症例を選択している。

マイクロアレイ染色体検査は、東京医科歯科大学分子細胞遺伝学教室（林深先生、稲澤譲治先生）、東京女子医科大学統合医科学研究所（山本俊至先生）、（株）三菱化学メディエンスで

行った。マイクロアレイで異常が見つからなかった症例の一部について、単一遺伝子疾患の解析を大阪府立母子保健総合医療センター内で実施した。あるいは次世代シーケンサー解析を横浜市立大学遺伝学教室（松本直通先生）に依頼した。

（倫理面への配慮）マイクロアレイ染色体検査および遺伝子解析にあたり、保護者の代諾により書面で同意を得た。実施前後に認定遺伝カウンセラーによるカウンセリングを実施した。

C. 研究結果

最近100例では31例（31%）で病的なコピー数変化を同定した。この検出率は過去のマイクロアレイでの異常検出率（15–20%）よりも多かった。異常例では両親の検査を行ってde novoの確認を行うように努めているが、一部の例は今後確認予定である。しかし、欠失範囲の大きなや過去のデータベースとの比較から、これら31例は全例有意な変化と考えている。

事前に既知の症候群は十分鑑別を行っているが、Williams症候群、Smith-Magenis症候群が各1例診断された。この2例は事前にG分染法は行っていたが、FISHは行っておらず、マイクロアレイ染色体後に診断にいたった。症状的にはやや非典型例であった。

SNPアレイ実施例ではLOH領域がひろく、特定の劣性遺伝病がホモ接合になっていることが判明した例があった。

解析結果から、特定の原因遺伝子が同定され、病態の解明に有用なデータが得られた例が存在した。均衡型転座と思われたが、転座領域に微細欠失を認める例が複数あった。一方、均衡型転座であるが、転座に関与する染色体に欠失が

なく、別の領域に欠失を認める例があった。このような所見はマイクロアレイ染色体検査を行わなければ同定困難と考えられた。

D. 考察

マイクロアレイ染色体検査は従来の方法で同定されない染色体異常の検出に非常に有力な検査である。後出の関連論文にあるように、マイクロアレイ染色体検査を用いた研究論文も多数発表している。

マイクロアレイ染色体検査実施にあたっては事前の臨床的な評価が重要である。ダウン症候群や22q11.2欠失症候群のような従来の染色体検査で診断できる疾患、単一遺伝子病を事前に極力排除した。そこではDysmorphology的考察が重要であった。詳細な評価を行えば、30%の症例で有意なCNVを検出することができる可能性がある。

実施にあたっては事前に遺伝カウンセリングを行った。これは主治医とともに非医師の認定遺伝カウンセラーも担当した。結果の解釈に際しても、遺伝カウンセラーが医師の診断後のカウンセリングを行った。遺伝カウンセラーはマイクロアレイ染色体や次世代シーケンサーに関する知識も要求される。マイクロアレイ染色体検査の普及にあたっては、こうした専門職種の養成も重要課題である。

複数のCNVsが出現する例も少なくなかった。両親の検査を行い、比較する必要があった。マイクロアレイ染色体検査実施にあたっては、両親の検査が必要になる可能性について、事前に説明が必要である。

今回の解析で異常を認めなかった症例の一部について、次世代シーケンサー解析を行った結

果、現時点において2症例でSWI/SNF系の遺伝子変異とてんかん関連遺伝子変異を同定した。さらに解析を継続予定である。次世代シーケンサー解析にあたっては、事前のマイクロアレイ解析で病的CNVsを把握しておくことは重要と考えられる。

マイクロアレイ染色体検査の実施にあたっては結果の専門的解釈を行い、遺伝カウンセリングを行う体制が必須と考えられた。一般の医療機関で行う場合も、適宜コンサルトできる体制が必要であろう。

E. 結論

マイクロアレイ染色体は非常に有用性の高い検査であり、さらなる普及が望まれる。しかし、実施にあたっては臨床遺伝学的な詳細な検討が必要である。遺伝カウンセリング体制の充実が必要と考えられた。

F. 研究発表

Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, Yamamoto T. 109 kb deletion of chromosome 4p16.3 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;161:1465-9.

Ohba C, Okamoto N, Murakami Y, Suzuki Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Kinoshita T, Matsumoto N, Saitsu H. PIGN mutations cause congenital anomalies, developmental delay, hypotonia, epilepsy, and progressive cerebellar atrophy. *Neurogenetics*. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]

Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Mizuno S, Matsumoto N, Makita Y, Fukuda M, Isidor B, Perrier J, Aggarwal S, Dalal A, Al-Kindy A, Liebelt J, Mowat D, Nakashima M, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Coffin-Siris syndrome is a SWI/SNF complex disorder. *Clin Genet*. 2013 Jul 1. doi: 10.1111/cge.12225. [Epub ahead of print]

Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N. Neuroradiologic Features in X-linked α -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013;34:2034-8.

Miyake N, Mizuno S, Okamoto N, Ohashi H, Shiina M, Ogata K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Saitsu H, Niikawa N, Matsumoto N. KDM6A Point Mutations Cause Kabuki Syndrome. *Hum Mutat*. 2013;34:108-10

Kosho 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*. 2013;161:1221-37.

Hitomi Yatsuki, Ken Higashimoto, Kosuke Jozaki, Kayoko Koide, Junichiro Okada, Yoriko Watanabe, Nobuhiko Okamoto, Yoshinobu Tsuno, Yoko Yoshida, Kazutoshi Ueda, Kenji Shimizu, Hirofumi Ohashi, Tsunehiro Mukai, Hidenobu Soejima Novel mutations of CDKN1C in Japanese patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Genes and Genetics*

Miyatake S, Murakami A, Okamoto N, Sakamoto M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. A de novo deletion at 16q24.3 involving ANKRD11 in a Japanese patient with KBG syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:1073-7.

Shimada S, Okamoto N, Hirasawa K, Yoshii K, Tani Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Clinical manifestations of Xq28 functional disomy involving MECP2 in one female and two male patients. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:1779-85.

Shimada S, Okamoto N, Nomura S, Fukui M, Shimakawa S, Sangu N, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. Microdeletions of 5.5 Mb (4q13.2-q13.3) and 4.1 Mb (7p15.3-p21.1) associated with a saethre-chotzen-like phenotype, severe intellectual disability, and autism. *Am J Med Genet A*. 2013;161:2078-83.

Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. MECP2 duplication

syndrome in both genders. *Brain Dev.* 2013;35:411-9.

Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. *J Hum Genet.* 2013;58:391-4.

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.* 2013;93:173-80.

Yokoo N, Marumo C, Nishida Y, Iio J, Maeda S, Nonaka M, Maihara T, Chujoh S, Katayama T, Sakazaki H, Matsumoto N, Okamoto N. A case of Toriello-Carey syndrome with severe congenital tracheal stenosis. *Am J Med Genet A.* 2013;161:2291-3.

Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi JI, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria and midbrain tectal hyperplasia. *Neuropathology.* 2013;33:553-60.

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.* 2013;161:2234-43.

Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. De Novo Mutations in SLC35A2 Encoding a UDP-Galactose Transporter Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Hum Mutat.* 2013 ;34:1708-14.

Koshimizu E, Miyatake S, Okamoto N, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Performance Comparison of Bench-Top Next Generation Sequencers Using Microdroplet PCR-Based Enrichment for Targeted Sequencing in Patients with Autism Spectrum Disorder. *PLoS One.* 2013;8:e74167.

Nakajima J, Okamoto N, Shiraishi J, Nishimura G, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Kawashima H, Matsumoto N, Miyake N. Novel FIG4 mutations in Yunis-Varon syndrome. *J Hum Genet.* 2013 ;58:822-4.

Ichikawa K, Kadoya M, Wada Y, Okamoto N. Congenital disorder of glycosylation type Ic: report of a Japanese case. *Brain Dev.* 2013;35:586-9.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
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 山内泰子 川崎医療福祉大学 准教授

研究要旨：次世代シーケンサーを用いる遺伝学的検査における倫理的課題に関する指針（incidental findings：IFや結果の開示）に関して検討した。ACMGレポート（2013年3月）の方針を基準に、遺伝カウンセリングの立場から遺伝学的検査実施前に被験者に伝えるべきことなど倫理的問題点を検討した。

遺伝情報を適切に医療の場で生かす遺伝医療では、被検者の理解が遺伝情報を扱う上で不可欠である。さらに、本人ばかりでなく、影響が及ぶ現在および将来の家族にも遺伝カウンセリングが必要になる可能性がある。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いる遺伝学検査の実施に伴い生じる、本来の目的とする遺伝子以外のincidental findingsがに関する倫理的問題点について検討する。

B. 研究方法

ACMG Recommendations for Reporting Of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing, Genet Med. 2013 July; 15(7): 565-574を参考に、次世代シーケンサーを用いる遺伝学的検査に関し、遺伝カウンセリングの観点から倫理的問題点を抽出・検討した。

C. 研究結果および考察

次世代シーケンサーを用いる遺伝学検査は疾患を限定して、被検者に偶発的な所見を結果として伝えるべきであろうか。塩基配列の意味づけがなければその価値はない。医療とはいえ、被検者が希望していないことまで調べるべきだろうか。特に、疾患との関連が明らかになっていない変異型の解釈を含めた被験者へ対応は、遺伝医療に生かせたいえるか。遺伝医療は被検者の自律的意思決定に基づくべきではないだろうか。研究と臨床では目的が異なるが、検査目的と限界、予想される結果と医療適応を被検者が理解・承諾していることが検査実施に必須である。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いる遺伝学的検査によるには被検者の理解不可欠で、必要に応じた遺伝カウンセリングが必要。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - ・遺伝子検査ビジネスに法規制は必要か：認定遺伝カウンセラーの立場から、山内泰子、第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、於川崎市、2013. 6. 20-23
 - ・出生後のダウン症候群の診断告知の時に医療者が親へ伝える情報、峠和美、山内泰子、大西敬子、升野光雄、黒木良和、第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、於川崎市、2013. 6. 20-23
 - ・遺伝カウンセリングの現状と未来：あらためて遺伝カウンセリングとは、山内泰子、日本人類遺伝学会第 58 回大会、於仙台市、2013. 11. 21-2

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
分担研究報告書

次世代シーケンサーを用いた遺伝学的検査の倫理的課題の研究

分担研究者 武藤香織 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析は、疾患の診断・治療法の選択等にとって必要不可欠な手続きとなりつつあり、今後ますます増加することが予想されている。

しかしながら、クリニカルシーケンシングの時代が到来することによる倫理的な課題の洗い出しは十分ではない。そこで、本研究では、偶発的所見への対応、データ公開に関する対応、インフォームド・コンセントへの対応に関する倫理的な課題の論点を整理した。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析は、疾患の診断・治療法の選択等にとって必要不可欠な手続きとなりつつあり、今後ますます増加することが予想されている。

しかしながら、クリニカルシーケンシングの時代が到来することによる倫理的な課題の洗い出しは十分ではなく、患者が当初受診した病院から解析拠点に至るまで、どのような準備をすべきか、検討されていない。

そこで、本研究では、クリニカルシーケンシング時代を目前に控えた現在、倫理的な課題として解決すべき論点を整理することを目的とする。

B. 研究方法

網羅的な文献調査および過去に実施した一般意識調査のデータセットを用いた分析。

（倫理面への配慮）

人を対象とした介入研究ではないため、該当しない。

C. 研究結果

（1）偶発的所見をめぐる論点整理

ここでは、クリニカルシーケンシングを、患者の診断・治療に資する情報を得ることを目的とした解析として定義し、研究目的のシーケンスを除外して検討する。解析結果は、「本来の知見」(pertinent findings) と、意図していない「偶発的所見」(incidental findings) に大別される (Knoppers & Dam 2001)。クリニカルシーケンシングの場合、「本来の知見」は、もともと得ることを目的としていた結果であり、何らかの対処が可能なものとして解析されていることが前提となる。したがって、患者に対しては、診療上の意思決定につながるように説明されるべきであり、専門医と協議されるべき内容として扱うことを原則とすべきである。専門医は、ただ単に変異箇所を伝達するだけでなく、現時点で共有されている科学的な解釈、取りうる選択肢についての説明を伴うべきである。また、遺伝性の変異と関連する所見であった場合や、

患者自身が遺伝的な不安を抱いた場合には、速やかに遺伝カウンセリングを提供すべきである。

他方、「偶発的所見」とは、一般的に「最初に行われた研究や処置の目的とは別に得られる結果」である。2013年7月に米国臨床遺伝・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全エクソンシーケンス解析において、被験者にその結果を開示すべき24疾患、56遺伝子を公表している（Green RC et al, AJMG 15: 565-574, 2013）。このワーキンググループでリストアップしたのは、遺伝性乳がん卵巣癌症候群（HBOC）などの家族性腫瘍（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。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ため、被検者への十分な情報提供と意思疎通を行うことが必要だと結論づけている。

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。

日本では、これまでのところ、クリニカルシーケンシングに伴う「偶発的所見」について、学術界からの声明は出されていない。なお、研究を遂行するうえで発見される「偶発的所見」については、「ヒトゲノム・遺伝子

解析研究に関する倫理指針」（以下、三省指針）では、平成23年度の改正時において、新たに「偶発的所見の開示に関する方針に関する細則」を設け、「研究責任者は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の過程において当初は想定していなかった提供者及び血縁者の生命に重大な影響を与える偶発的所見（incidental findings）が発見された場合における遺伝情報の開示に関する方針についても検討を行い、提供者又は代諾者等からインフォームド・コンセントを受ける際には、その方針を説明し、理解を得るように努めることとする」と定めたところである。

この細則を参考にして、クリニカルシーケンシング導入の現場でも、事前の方針決定をすべきであると考えられるが、いくつか留意すべき点があると考えられる。クリニカルシーケンシングを伴う現場は、本来、患者の診断・治療を行う場であり、「偶発的所見」への対応は副次的にならざるを得ない。対応方針を検討するにあたっては、診療の進め方との関連を十分考慮し、本来の診療を妨げないこと、現場を混乱させないような対応が求められる。

（2）データ公開に関する論点整理

近年、ヒトゲノム解析研究においては、解析されたデータを公的データベースで公開ないし制限つき公開することが強く求められており、日本でも科学技術振興機構（JST）がナショナル・バイオサイエンス・データベース・センター（NBDC）等を通じてデータの利活用を促進している。

クリニカルシーケンシングで得られたデータは、解析実施時点では診断・治療の目的のために行われているが、他方、現在のヒトゲノム解析研究の現状を考慮すると、研究的価値のある情報でもある。

その点では、インフォームド・コンセント取得時に、データ公開の可能性がある旨を説明し、同意を得ておくべきである。

なお、公開にあたっての選択肢をオープンとするか、制限アクセスとするかについては、個人識別可能性やセキュリティの観点から様々な議論がある。データベース側の審査委員会でも議論されるところではあるが、解析した者の意向は尊重されるため、データ公開の手続き時点で十分考慮する必要がある。

特に、稀少疾患の場合には、個人識別性が高まることから、公開方針について、患者自身の意向についても再度確認できることが望ましい。

(3) インフォームド・コンセントに関する留意事項

インフォームド・コンセントに関しては、通常の遺伝学的検査で説明すべき内容に加えて、以下のような項目に関する説明を追記することになると考えられる。想定される項目を例示する。

- ① クリニカルシーケンシングの目的
- ② 実際の作業内容について、通常の遺伝学的検査と同様の説明部分に加え、クリニカルシーケンシング特有の作業についても、できるだけ具体的な説明
- ③ がんの場合、がん細胞と正常細胞の両方でおこなわれること及びその内容の違い
- ④ 得られたデータは、その後も診療や研究に幅広く利活用されること
- ⑤ 院内でのデータ保管方法、セキュリティ、アクセスできる人員の制限状況
- ⑥ 得られたデータは、さらなる研究の進展のため、公開される可能性があること、データを管理するデータベースとはどのようなものか。データベース寄託後の患者の権利

(同意撤回の可否) など。

- ⑦ 偶発的所見については、本人の希望がない場合の通知はおこなわないこと
- ⑧ 偶発的所見については、通知する価値があるかどうかを、誰がどのように判断・情報を共有し、誰から連絡がくる可能性があるのか。また、一定の年月を経過してから、突然、連絡がやってくる可能性があること。通知されることの利益と不利益。
- ⑨ [予め同意を得ておく場合のみ該当] 意思変更の申し出方法
- ⑩ 費用負担
- ⑪ 不安が生じた場合の相談先
- ⑫ その他

D. 考察

クリニカルシーケンシングに関する倫理的な課題をいくつか整理したが、日本では安心して診療・研究に利用するための基盤となる法整備が遅れており、重過失や悪用に関する法的な手当はなされていない。個人情報保護法では、個人遺伝情報の取り扱いを断念しており、同法の対応は診療や研究で取り扱う遺伝情報の対応としては不十分である。

我々が実施した一般意識調査(2014, n=7,540)では、個人遺伝資源の無断採取(72.1%)、個人遺伝情報の無断利用(70.8%)、個人遺伝情報の第三者への無断提供や転売(68.2%)に関する法規制を求める声が高く、これらは個人遺伝情報に基づく雇用・就労での処遇決定(66.6%)、保険加入上の差別(59.7%)最も高かった。今後は個人遺伝情報の利活用と保護に関する法整備が急がれる。

E. 結論

クリニカルシーケンシングに関する倫理的

な課題について、偶発的所見への対応、データの長期利用、インフォームド・コンセントにおける留意点に絞って論点を整理した。しかし、日本では個人遺伝情報を安心して診療・研究に利用するための基盤となる法整備が遅れているため、今後議論が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

荒内貴子, 井上悠輔, 磯部太一, 武藤香織.
ゲノム解析技術の進展と課題：巨大化する医学・生命科学分野の技術. 社会技術研究論文集、Vol. 11, in press.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

IV 研究成果の一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

辻 省次

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S, Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S, Sasaki M, Hirose S.	Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients.	<i>PLOS One</i>	8	e56120	2013
Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J, Morishita S, Goto J, Tsuji S.	Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1.	<i>J. Neurol. Sci.</i>	331	158-60	2013
Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horichi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee V M-Y, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Ozelius L, Foroud T, and Tsuji S.	Mutations of COQ2 in familial and sporadic multiple system atrophy.	<i>New Engl. J. Med.</i>	369	233-44	2013

Landouré G, Toro C, Z hu P-P, Johnson JO, Br icceno KV, Rinaldi C, Meilleur KG, Sangaré M, Diallo O, Pierson T M, Ishiura H, Tsuji S, Hein N, Fink JK, Stoll M, Nicholson G, Gon zalez M, Züchner S, D ürr A, Stevanin G, Bie secker LG, Accardi J, Landis D, Gahl WA, T raynor BJ, Blackstone C, Fischbeck KH, Burn ett BG.	Hereditary spastic paraplegia typ e 43 (SPG43) is caused by mutation in C19ORF12.	<i>Human Mu tation</i>	34	1357-60	2013
Isojima T, Doi K, Mits ui J, Oda Y, Tokuhira E, Yasoda A, Yorifuji T, Horikawa R, Yoshi mura J, Ishiura H, Mor ishita S, Tsuji S, and Kitanaka S.	A recurrent de novo FAM111A mutation causes Kenny–Caffey syndrome type 2.	<i>J Bone Mi neral Res</i>			in press
Sasaki M, Ishii A, Sai to Y, Morisada N, Iiji ma K, Takada S, Araki A, Tanabe Y, Arai H, Yamashita S, Ohashi T, Oda Y, Ichiseki H, Hirabayashi S, Yasuhara A, Kawawaki H, Kimura S, Shimono M, Narumiya M, Suzuki M, Yoshida T, Oyazato Y, Tsuneishi S, Ozasa S, Yokochi K, Dejima S, Akiyama T, Kishi N, Kira R, Ikeda T, Oguni H, Zhang B, Tsuji S and Hirose S.	Genotype–Phenotype Correlations in Alternating Hemiplegia of Childhood.	<i>Neurology</i>			in press

Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa N, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G, JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown, Jr.RH, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J and Tsuji S.	ERBB4 Mutations that Disrupt the Neuregulin-ErbB4 Pathway Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 19.	<i>Am J Hum Genet</i>	93	900-5	2013
Doi K, et al.	Rapid detection of expanded short tandem repeats in personal genomics using hybrid sequencing.	<i>Bioinformatics</i>			in press
Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Astuta N, Sobue G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, and Hozumi I.	Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan.	<i>Neurol</i>			in press
Ishiura H, Takahashi Y, Hayashi T, Saito K, Furuya H, Watanabe M, Murata M, Suzuki M, Sugiura A, Sawai S, Shibuya K, Ueda N, Ichikawa Y, Kanazawa I, Goto J, Tsuji S.	Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses.	<i>J. Hum. Genet.</i>			in press