

[ここに入力]

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が変化するコピー数変化 (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、シーケンス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うる疾患もあり、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、健常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、症例的に 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

Narumi 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

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, Saito 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

Tanaka 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

Nishi 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

Shimizu 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

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 - 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 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

Nishi 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

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 - 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 - . 第 20 回日本遺伝子診療学会大会, 2013 年 7 月, 浜松

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

Nishi 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

Narumi 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

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