

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た検体及び市販の 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 Leukodystrophy	<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決める体制を構築し、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