

## 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<sup>1)</sup>  
研究協力者 山田 奈美恵<sup>2)</sup>

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もない、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・遺伝子のミニマムリスト (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が、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、患者説明を定期的に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 が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ろ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。ナトリウムチャネル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

モリスク分類、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、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 *FBN1* 遺伝子の変異が主因であるが、TGF- $\beta$  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 *FBN1* 遺伝子変異によるものを Marfan 症候群、TGF- $\beta$  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、*FBN1* 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 *FBN1* 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に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.