

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等を通じて把握した。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。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。

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

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等を通じて把握した。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

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。

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。

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。

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。

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。

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 Loeys-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