

遺伝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：

「成育医療における次世代シーケンサーを用いた遺伝学的検査のミッション」的な事を書く。

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った特異性を伴う。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連する医師・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、ある程度候補病変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