

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関連分野）  
総合研究報告書

先天性疾患における非同義置換のメダカモデルを用いた解析

研究分担者 氏名 谷口善仁 所属機関 慶應義塾大学 職名 講師

研究要旨

次世代シーケンサーによるゲノム解析により、多数の非同義置換が発見された。これらが先天奇形に与える影響を調べるには、発見された非同義置換の数を考えると、解析を効率的に進めるためのモデルが必要である。メダカは、遺伝子改変可能で体外発生するため、非同義置換の意義を検証するのに有用な脊椎動物モデルである。本研究では、ターゲット遺伝子のアンプリコンリシーケンスと全ゲノムシーケンスにより、ヒト疾患解明の理解に資する有用なメダカモデルを作ることを目的とする。

A. 研究目的

メダカは小型で胚発生時は透明であるので、臓器の観察が容易である。メダカは、遺伝子改変可能で体外発生するため、非同義置換の意義を検証するのに有用な脊椎動物モデルである。本研究では、ターゲット遺伝子のアンプリコンリシーケンスと全ゲノムシーケンスを行い、ヒト疾患解明の理解に資する有用なメダカモデルを作ることを目的とした。

B. 研究方法

1) アンプリコンリシーケンス

TILLIG変異メダカライブラリーは、ミュータジェネシスにより変異導入した5,760個体のメダカからゲノムDNAと凍結精子をセットにして保存したバイオリソースである (Taniguchi, et al. *Genome Biol.*, 2006)。これらはライブラリー全体で見ると、60塩基に一つの割合で点変異を持っている。いくつかの先天奇形を引き起こす疾患遺伝子をPCR増幅し、それらの配列を解析することにより、疾患関連変異を持つメダカの作製を試みた。

2) 全ゲノムシーケンス

p53遺伝子欠損メダカは谷口らにより作製された (Taniguchi, et al. *Genome Biol.*, 2006)。戻し交配を行っていない個体、すなわち、ミュータジェネシスを行ったG0世代の次の世代であるF1世代のゲノムは、凍結して-20°Cに保存されている。これを解凍し、次世代シーケンサー-GAIIX (イルミナ社) で全ゲノムを解析した。

C. 研究結果

1) アンプリコンリシーケンス

BRAF、CHD7 (CHARGE 症候群)、CREBBP (Rubinstein-Taybi 症候群)、NF1 (神経線維腫症)、NSD1 (Sotos 症候群)、TGFBR (Loeys-Dietz 症候群)、p63 (EEC 症候群)、MC4R (メラノコルチン受容体、肥満)、DRD2 (ドパミン受容体、ジストニア)、BRAF (Noonan 症候群、メラノーマ)、KRAS (Noonan 症候群)、SMAD4 (遺伝性出血性末梢血管拡張症) を標的としてアンプリコンリシーケンスを試みた。

メダカを始め魚類では進化の過程における全ゲノム重複の過程により、いくつかの遺伝子にはパラログが存在するが、CREBBP 遺伝子は二種類存在した。また、TGFBR は1と2の2種類存在する。

これらの遺伝子において非同義置換が多く見られる「ホットスポット」にアンプリコンを設定し、Phusion ポリメラーゼにより変異メダカゲノムライブラリーを増幅した。アンプリコン長は、1,064 から 2,951 塩基対であり、合計 24.5Mb になった。TruSeq DNA Sample Prep Kits (イルミナ社) によるアダプターライゲーションや、Nextera (イルミナ社) によるトランスポゾンタギングを行った。

また、BRAF、KRAS、SMAD4 の3遺伝子については、LightScanner (アイダホテクノロジー社) を用いてHRM (温度融解曲線) による変異解析を行った。

前者は、多数のアンプリコンをタグ付けすることにより次世代シーケンサーのプラットフォームに載せ、点変異解析を試みるものであったが、5,670 検体へのタグ付けを含むライブラリー作

製が思うように進まなかった。後者の HRM による変異解析では、ヒトで報告されているものと完全に同じではないものの、ホットスポット内に数多くの非同義置換を同定することができた。

## 2) 全ゲノムシーケンス

p53 遺伝子はゲノム維持に関わる重要ながん抑制遺伝子であり、これを欠損したメダカでは自然発がんにより、生後 1 年以内に個体は死亡する。作製時の F2 世代の個体は、腎臓や網膜、肝臓、リンパ系など、諸臓器に腫瘍が発生することが明らかとなった (Taniguchi, et al. *Genome Biol.*, 2006)。しかし、p53 欠損個体を野生型個体に戻し交配し、ゲノム上にランダムに導入された p53 遺伝子以外の点変異を正常型アレルに置換していくと、10 回野生型に戻し交配した F10 世代ではそれらの腫瘍形成が見られなくなった。戻し交配後の p53 欠損個体は外表から明らかな腫瘍は観察されないものの、野生型に比べて明らかに短命であったので、連続病理組織切片を作製して体内の様子を観察した。その結果、主として腹腔内に浸潤性の腫瘍を認めた。

メダカの組織抗原に交差する抗体がないために原発組織を特定するに至らなかった。戻し交配により明らかに腫瘍発生スペクトラムに変化が生じたので、その遺伝的背景を調べるために、F2 世代のゲノムを次世代シーケンサー GAIIX (イルミナ社) で全ゲノムシーケンスを行った。

TILLIG 変異メダカライブラリーに登録されているメダカは、一個体あたり 2,000 から 3,000 個の点変異が導入されていると考えられる。次世代シーケンスにより十分な厚みを持ったデータが得られたので、それを参照ゲノムに貼り付けた。現在、非同義置換を起こしたがん関連遺伝子を中心に、戻し交配前後の表現型の違いの原因となる点変異を絞り込んでいる。

## D. 考察

TILLING 変異メダカライブラリーは、5,760 個体よりなり、点変異の密度は全体で 60 塩基対の一つである。それらのほとんどがイントロンでの変異か、同義置換であり、TILLING 法により特定の遺伝子に変異を持つ個体を同定することは非常に効率が悪く難しいと考えられた。今後は、また手法が完全に確立されていないが、CRISPR/cas9 などのエンドヌクレアーゼによるゲノム切断後に起こる homology-mediated repair を利用した変異導入等の手法により、標的遺伝子の変異導入が可能になるものと思われる。

標的遺伝子への人工的な変異導入を試みる一方、全ゲノムを次世代シーケンサーにより配列を決定し、すべての点変異をカタログ化するというアプローチも必要である。p53 変異メダカには、腫瘍の発生スペクトラムを変化させる副次的な変異があることが知られており、今後、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析は主流になっていくと考えられる。

## E. 結論

TILLING 変異メダカライブラリーから、HRM 法によって疾患関連遺伝子変異を持つ個体の同定を試み、BRAF 遺伝子などの疾患関連領域に複数の非同義置換変異体を同定した。また、タグで標識した上で次世代シーケンサーを活用するアンプリコンシーケンスは、ライブラリーのサイズから技術的な困難があったが、全ゲノムシーケンスによる点変異の探索の有用性が示された。今後は、標的遺伝子を効率よく破壊できる CRISPR/cas9 による変異体作製系と組み合わせ、ヒトで同定された疾患関連非同義置換変異のメダカを用いた *in vivo* での解析が促進されていくものと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 Deficiency Induces a Decrease in Cathepsin D Activity, Fingerprint-like Inclusion Body Formation, and Selective Degeneration of Dopaminergic Neurons. *FEBS Lett.* 587:1316-1325, 2013.

Matsui H, Gavinio R, Asano T, Uemura N, Ito H, Taniguchi Y, Kobayashi Y, Maki T, Shen J, Takeda S, Uemura K, Yamakado H, Takahashi R. PINK1 and Parkin complementarily protect dopaminergic neurons in vertebrates. *Hum Mol Genet.* 22:2423-2434, 2013.

Ishikawa T, Okada T, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kamei Y, Shigenobu S, Tanaka M, Saito TL, Yoshimura J, Morishita S, Toyoda A, Sakaki Y, Taniguchi Y, Takeda S, Mori K. ATF6 $\alpha$ / $\beta$ -mediated Adjustment of ER Chaperone Levels Is Essential for Development of the Notochord in Medaka Fish. *Mol Biol Cell.* 24:1387-1395, 2013.

Morita A, Nakahira K, Hasegawa T, Uchida K, Taniguchi Y, Takeda S, Toyoda A, Sakaki Y, Shimada A, Takeda H, Yanagihara I. Establishment

and characterization of Roberts syndrome and SC phocomelia model medaka (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ.* 54:588-604, 2012.

Isoe Y, Okuyama T, Taniguchi Y, Kubo T, Takeuchi H. p53 Mutation suppresses adult neurogenesis in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Biochem Biophys Res Commun.* 423:627-631, 2012.

Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, Picard JY, Toyoda A, Taniguchi Y, di Clemente N, Tanaka M. Hyperproliferation of mitotically active germ cells due to defective anti-Müllerian hormone signaling mediates sex reversal in medaka. *Development.* 139:2283-2287, 2012.

Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, Toyoda A, Taniguchi Y, Tanaka M. Analysis of medaka *sox9* orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance. *PLoS One.* 7:e29982, 2012.

Ishikawa T, Taniguchi Y, Okada T, Takeda S, Mori K. Vertebrate unfolded protein response: mammalian signaling pathways are conserved in Medaka fish. *Cell Struct Funct.* 36:247-259, 2011.

## 2. 学会発表

谷口善仁 (シンポジウム) 「医学・環境分野への遺伝子改変メダカの応用」日本動物学会第84回大会、2013年9月28日、岡山

Taniguchi Y, Yoshioka N. (ポスター) Genetic disease model by TILLING medaka. CSH-Asia Conference - Fishing for Answers: Zebrafish Models of Human Development & Disease、蘇州、2012年5月

## G. 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

〔Ⅲ〕

資料

英国 NHS・UKGTN における検査適応基準

【疾患名】ベックウィズウィードマン症候群 (BWS 130650)

【遺伝子名】H19, imprinted maternally expressed transcript-*H19*(103280)  
 insulin-like-growth factor 2(somatomedin A) -*IGF2*(147470)  
 cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57,Kip2) -*CDKN1C*(600856)  
 cyclin kinase overlapping transcript 1 -*KCNQ1OT1*(604115)

【患者名】	【患者生年月日】
【患者コード】	【NHS 番号】
【申請医氏名】	
【職名】	
【検査施設 ID】	

【申請医資格】以下のいずれかを満たすものでなければならない。	
	下記にチェックを記載
臨床遺伝専門医	
小児科専門医	
胎児診療専門医・産科専門医	

【遺伝子解析するにあたり最低限満たさなければならない診断基準】	
診断基準項目	チェック記入欄
<b>1. BWS 診断基準</b>	
<b>大基準 2項目以上</b>	
出生前からの過成長	
耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩	
巨舌	
腹壁欠損	
片側肥大	
胎児性腫瘍	
腎尿路奇形	
<b>小基準 1項目以上</b>	
羊水過多	
新生児期低血糖	
顔面の火焰状母斑	
心奇形	
特異顔貌	
または、胎児期臍帯ヘルニアの有無	

対象が診断基準を満たさなかった場合もしくは申請医の資格が上記3つに当てはまらない場合にも検査が実行されるべきと感じる場合には、検査の実行について検査実施施設に問い合わせしてください。

## NHS Gene Dossier における遺伝学的検査評価のための申請書

### 検査－疾患－対象者

<p>疾患－疾患名と概要 (もしリストに加えない別名があれば提供してください) (A)－検査の基準</p>	<p>・ Beckwith Wiedemann Syndrome (BWS) ・ 胎児期に診断された臍帯ヘルニア ベックウィズ・ヴィーデマン症候群は、胎児期の過成長・腹壁欠損・巨舌を特徴としている。他の特徴としては、耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩、腹腔内臓器腫大、片側肥大、新生児期低血糖、腎臓の異常、胎児性腫瘍（とくにウィルムス腫瘍）が含まれる。</p>
<p>疾患の OMIM 番号</p>	<p>・ BWS- OMIM 130650</p>
<p>遺伝子－遺伝子名と概要 (もしリストに加えない別名があれば提供してください)</p>	<p><i>H19</i> (ASM1) <i>IGF2</i> (somatamedin A) <i>CDKN1C</i> (p57; KIP2) <i>LIT1</i> (KCNQ10T1)</p>
<p>遺伝子の OMIM 番号</p>	<p><i>H19</i> - 103280 <i>IGF2</i> - 147470 <i>CDKN1C</i> - 600856 <i>LIT1</i> - 604115</p>
<p>変異スペクトル (どの検査を行うか)</p>	<p>・ <i>LIT1</i> 遺伝子の脱メチル化 (<i>LIT1</i> 遺伝子内の KvDMR1) ・ <i>H19</i> 遺伝子の高メチル化 ・ 父親由来 11p15 領域の重複 ・ 11p15 領域の父由来片親性ダイソミー ・ 母由来の <i>H19</i> 遺伝子 DMR 領域の微小欠失 ・ 母由来 KvDMR1 の微小欠失</p>
<p>技術的な方法</p>	<p>1. メチル化特異的多重ライゲーション依存的プローブ増幅 (MS-MLPA 法) 2. MS-MLPA 法によって同定された陽性例において、片親性ダイソミーと確定するための 11p15 マイクロサテライト分析 3. MS-MLPA 法の裏付けとして、高解像度のメチル化特異的融解分析</p>
<p>妥当性検証のプロセス 注：自施設において、どのようにこの検査の妥当性を検証したか説明してください</p>	<p>ブラインド化 (盲検化) した 51 サンプル (24 人の健常者と 27 人の罹患者) を 1 つの「テストセット」として、この分析方法 (アッセイ) の妥当性を検証した。全てのサンプルは正確に同定された (Scott et al 2008, 添付資料参照)。 解析は、健常コントロールが合計 200 人含まれるまで行い、いまだ偽陽性となる結果は認めなかった。この妥当性検証はサットン・がん研究所の Rahman 教授のラボにおいて実行された。</p>

	<p>単一実験において、MS-MLPA 法は、過成長や成長の遅れがある場合に認識される 11p15 領域のエピジェネティックな変化やコピー数異常を全て検出するのに有効であると、この解析は示していた。その領域における現存のメチル化アッセイとは違って、このアッセイは単離されたメチル化欠失から遺伝性のコピー数異常を区別する。加えて、MS-MLPA 法をファーストラインのアッセイとして使用することは、マイクロサテライト分析の必要性を少数の UPD 例に限定する。</p> <p>したがって、現存する診断的検査のアプローチ方法を比較すると、このアプローチ方法 (MS-MLPA 法) は検出できる 11p15 異常の範囲を広げ、この領域の解析の複雑さとコストを軽減する。</p>
<p>この検査をすでに提供していますか？もし提供しているならば、いくつ報告書を作成しましたか？すでに報告した陽性例・陰性例の数を教えてください。</p>	<p>いいえ</p>
<p>このサービスをどのくらいの間提供していますか？</p>	<p>まだ適用していない</p>
<p>この疾患に特化した臨床的／研究的な専門知識がありますか？</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/>はい / <input type="checkbox"/>いいえ 詳細を提供してください。 Rahman 教授に臨床的および研究的専門知識の両方があり、聖ジョージの名誉顧問でもある。がん研究所付近にある彼の研究グループ (子どもの過成長研究, the Childhood Overgrowth (COG) study) は 11p15 領域の MS-MPLA 法を最適化した。</p>
<p>今回のものと関連している他の遺伝子や疾患について検査していますか？詳細を教えてください。</p>	<p>南ウェールズのテムズ川地域の分子遺伝学的診断のラボが現在ソトス症候群や他の過成長症例の <i>NSD1</i> 遺伝子検査を提供している。加えて、COG 研究グループは新規の過成長遺伝子と表現型との関連を同定しようと試みている。ヒトの過成長に有意に関与する新規遺伝子の検査も将来的に聖ジョージのラボにおいて提供されるだろうと予想される。</p>
<p>自施設の活動 あなたのラボでは年間何件くらいの検査を提供しますか (提供するつもりですか)。</p>	<p>約 100 件</p>

<p>経験も基づいて、何件くらいの検査が全国で必要とされますか？ どの情報に基づいているかも明記してください。</p>	<p>約 200 件。異なる技術により、これらの健康状態に対して提供される検査実施件数に、この情報は基づいている。</p>
---	---

## 疫学

<p>【UK での有病率】</p>	<p>BWS : 13,700 に 1 人 (Thorburn et al 1970) 11p15 異常 80%に認められる (Elliott et al 1994) 臍ヘルニア : 10000 人に対して 2.5 人 (Calzolari et al 1995), 11p15 異常は 10-20% (Heider et al 2004, Fratelli et al 2007) その他の表現型 : 11p15 異常例では BWS の臨床症状を一部認めるが診断基準を満たさない例もある。これらの表現型の頻度は明らかではないが、5,000-20,000 人に 1 人程度と考えられている。</p>
<p>【遺伝子変異の頻度】 保因者やアレル頻度</p>	<p>一般人口を母集団としたデータはないが疾患に基づいた研究のデータによると、11p15 異常は 10,000-20,000 人に 1 人の頻度と考えられる。</p>
<p>【浸透率】</p>	<p>ここ 10-15 年間に 11q15 異常と過成長の関係を調べた結果は 100%の浸透率であった。</p>
<p>【標的集団】 規定された臨床的・家族歴を満たすものを標的集団とする</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. BWS の診断基準を満たすもの <ul style="list-style-type: none"> <li>2 項目以上の大項目かつ、1 項目以上の小項目を満たす <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 大項目 : 胎児期の過成長、耳介線状溝・耳輪後縁の小窩、腹壁欠損、片側肥大、胎児性腫瘍、腎尿路奇形</li> <li>◆ 小項目 : 羊水過多、新生児期低血糖、顔面の火焰状母斑、心奇形、特異顔貌</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>2. 11p15 異常があり、臨床的には疑われるが BWS の診断基準を満たさない場合</li> <li>3. 胎児期に臍帯ヘルニアが診断された場合</li> </ol>
<p>【標的集団における有病率】</p>	<p>一般の有病率の欄を参照。</p>

それぞれ何のデータに基づいているかの確認が必要。



使用計画書（回答には付録 A を使用して下さい。）

該当項目にチェックをしてください	はい	いいえ
診断	✓	
治療		✓
予後&マネージメント	✓	
発症前検査	✓	
リスクアセスメント	✓	

## 検査の特性

<p><b>分析的感度および特異度 (Analytical sensitivity and specificity)</b></p> <p>特定の検査を適応するためのデータがない場合、もしくは、まだ検査が確立されていない場合、使用される方法や技術の分析的感度・特異度のデータは自施設ラボのデータに基づくべきである。</p>	<p>上記に記載された妥当性のデータ (妥当性を検証したデータ) によると、MS-MLPA 法は分析的感度・特異度がほぼ 100%と示されている。</p>
<p><b>対象者における臨床的感度・特異度</b></p> <p>臨床的感度 (Clinical sensitivity) は、病気であるとわかっている時に、陽性の検査結果が出る確率のことである。臨床的特異度 (Clinical specificity) は、病気でないわかっている時に、陰性の検査結果が出る確率である。このケースの分母は、感度においては病気である人の数、特異度においては病気でない人の数である。</p> <p>陽性的中率および浸透率は概念上どの単一アレルでも同様である。つまり、陽性の検査結果により与えられる疾患の発症の確率は陽性的中率および浸透率と一致している。しかし、疾患責任遺伝子が1つ以上の遺伝子の場合、より複雑になる(遺伝子座異質性：染色体の異なる遺伝子座における遺伝子変異が同一の表現型を示す場合)。また、1つの遺伝子でも複数のアレルをもつ場合 (アレル異質性)、全てのアレルを検査しない限り、同様の分析が複数のアレル上の遺伝子に適応されるかもしれない。これらのケースでは、臨床的感度および陰性的中率に含意がある。</p> <p>例えば、2つの異なる遺伝子によって引き起こされると考えられる病気 (例：APKD) は、たとえ浸透率が100%であっても、臨床的感度および陰性的中率 (加えて臨床的妥当性) はどちらも減少する。臨床的感度は、その最大値が特定の遺伝子によって病気が</p>	<p><b>臨床的感度 (Clinical sensitivity)</b></p> <p><b>BWS</b></p> <p>この検査は、<i>CDNK1C</i> 遺伝子以外の変異 (~5%) を除く、BWS で認められる 11p15 上のすべての異常を検出することができる。したがって、臨床的感度は、変異に関わらず全ての BWS で 75%と推定されており、(検査で認識される) 欠失をもつケースでは 95%と推定される。</p> <p><b>臍帯ヘルニア</b></p> <p>11p15 異常、原発性の <i>ICD2</i> 遺伝子のインプリンティング異常および <i>CDKN1C</i> の変異は出生前に臍帯ヘルニアと診断された 10~20%で同定される。この検査では <i>ICD2</i> 遺伝子のメチル化異常は全て検出できるが <i>CDKN1C</i> 変異は検出できない。したがって、感度は胎児期の臍帯ヘルニアでは 10~15%と推定される。</p> <p><b>NB.</b> <i>CDKN1C</i> 遺伝子のシーケンス解析は現在開発中で、このサービスは後日提供される予定である。</p> <p><b>臨床的特異度</b></p> <p>上記に記載された妥当性のデータ (妥当性を検証したデータ) によると、この検査の特異度はほぼ 100%と示されている。</p>

引き起こされる割合を超えないと考えられ（臨床的感度は特定の単一遺伝子によって引き起こされる疾患においてもっとも信頼できる）。また、陰性的中率においても、遺伝子 A の陰性の結果は、遺伝子 B がその病気を引き起こすかもしれないため、患者が表現型（臨床症状）を呈さないことを保証するわけではない。複数のアレルを持つ遺伝子の解析においても、全てのアレルを検査しない限り、同様の分析が複数のアレル上の遺伝子に適応されるかもしれない。

## 臨床的妥当性

(対象集団での陽性的中率と陰性的中率)

遺伝学的検査における臨床的妥当性は、その検査がどの程度、表現型、臨床的疾患、体質の有無（易罹患性）を測定できるかである。これは陽性的中率(疾患であった場合に陽性に出る確率)と陰性的中率(疾患でなかった場合に陰性に出る確率)で示される。

この場合、母集団は各々のテストの陽性人口と陰性人口になり、疾患の罹患者と非罹患者ではない。

臨床的妥当性は感度・特異度と対象集団での有病率で推定される。陽性的中率と陰性的中率は検査集団の有病率に依存する。

陽性的中率および浸透率は概念上どの単一アレルでも同様である。つまり、陽性の検査結果により与えられる疾患の発症の確率は陽性的中率および浸透率と一致している。陽性的中率と浸透率は概念的にどの単一アレルでも同様である。つまり、陽性であった場合に疾患である確率は同等である。しかし、疾患責任遺伝子が1つ以上の遺伝子の場合、より複雑になる(遺伝子座異質性：染色体の異なる遺伝子座における遺伝子変異が同一の表現型を示す場合)。また、1つの遺伝子でも複数のアレルをもつ場合(アレル異質性)、全てのアレルを検査しない限り、同様の分析が複数のアレル上の遺伝子に適応されるかもしれない。これらのケースでは、臨床的感度および陰性的中率に含意がある。例えば、2つの異なる遺伝子によって引き起こされると考えられる病気(例：APKD)は、たとえ浸透率が100%であっても、臨床的感度および陰性的中率(加えて臨床的妥当性)はどちらも減少する。臨床的感度は、その最大値が特定の遺伝子によって病気が引き起こされる割合を超えないと

## 陽性的中率／浸透率

公表されたデータでは、検査で検出できる11p15異常は十分に浸透率があると考えられ、陽性的中率はほぼ100%である。

## 陰性的中率

出生後のMLPA法を用いた11p15分析では、陰性的中率は95%程度である。残り約5%のBWSのケースで認める*CDKN1C*遺伝子の変異は検出できないことによる。出生前に臍帯ヘルニアと診断されたケースではより高い割合で*CDKN1C*遺伝子変異が同定され、MPLA法を用いた11p15分析ではわずかに低い陰性的中率となる。しかし、出生前に臍帯ヘルニアと診断されたケースで*CDKN1C*遺伝子が認められる割合を示した確立したデータは今のところ入手できない。

11p15分析は、診断を除外するというよりは、原則的に確定診断に用いられ、再発率の情報提供することを目的とし、ウィルムス腫瘍のリスクを推定するのに用いられる(臨床的有用性のセクションも参照)。陰性のテスト結果の場合、患者/家族は正常の11p15をもつが表現型を呈する個人向けの経験的リスクによってカウンセリングされる。

遺伝性の11p15異常がある稀な家族においては、発症前診断をアットリスクの個人に対して行うことができる。

(例：*H19*遺伝子の微小欠失)

この場合、陰性的中率は非常に高い(ほぼ100%)。

考えられ（臨床的感度は特定の単一遺伝子によって引き起こされる疾患においてもっとも信頼できる）。また、陰性的中率においても、遺伝子 A の陰性の結果は、遺伝子 B がその病気を引き起こすかもしれないため、患者が表現型（臨床症状）を呈さないことを保証するわけではない。

複数のアレルを持つ遺伝子の解析においても、全てのアレルを検査しない限り、同様の分析が複数のアレル上の遺伝子に適応されるかもしれない。

<p>対象集団での臨床的有用性 (注釈 A 参照)</p> <p>検査を受けた患者の臨床的治療経過は詳細にすべて記載するように。</p> <p>検査のために医療専門家が参照できるように詳細も含んでいることが必要である。</p> <p>(B) 検査基準</p> <p>検査がどのように患者のマネージメントや臨床経過に影響を与えるか？</p> <p>この検査によって、この疾患の集団において代替となるような管理や検査の必要性を除外できるか？ (不必要な検査を除外できるか)</p> <p>代替となるような診断や分子学的診断ではなく予測する方法があるか？</p> <p>もしあるならば(もしくは生化学的検査があるならば)、分子学的検査の利点を記述せよ。</p>	<p><u>検査の基準</u></p> <p>1. BWS の診断基準を満たす人 (大基準 2 つ以上 および 小基準 1 つ以上) 大基準：胎児期の過成長、耳垂の線状溝、巨舌、腹直筋離開、片側肥大／非対称な成長、胎児性腫瘍もしくは腎臓の異常 小基準：羊水過多、新生児期の低血糖、顔面の火焰状母斑、心奇形もしくは特異顔貌)</p> <p>2. 胎児期に臍帯ヘルニアと診断された人</p> <p><u>精査を行う臨床医</u> 臨床遺伝専門医 (コンサルト もしくは スペシャリストの登録) 小児科医によるコンサルト 胎児診療医もしくは産科医によるコンサルト</p> <p><u>アウトカム</u></p> <p>1. 11p15 異常の同定</p> <p>a. BWS の診断の出生前もしくは出生後の分子学的確定 臍帯ヘルニアの精査に伴う出生前の BWS の診断は両親を安心させ、適切なスクリーニングの導入を可能にしうる。BWS の診断は、児が生まれた後も、BWS の合併症 (例：新生児期の低血糖およびスクリーニング)、もし該当する場合には、ウィルムス腫瘍に対する適切なスクリーニングの導入を可能にしうる。</p> <p>b. MS-MLPA 法 MS-MLPA 法は、非遺伝性の 11p15 異常から遺伝性の変化を区別し、再発率や児のリスクを正確に推定することを可能にする。</p> <p>c. 11p15 異常の正確な分類は、アットリスクの患者にウィルムス腫瘍をターゲットにしたサーベランスを可能にする。ある 11p15 異常 (UPD, 11p15 重複もしくは <i>H19</i> 遺伝子の高メチル化) はウィルムス腫瘍のリスク増加に関連しているが、一方で、<i>KvDMR1</i> 遺伝子の脱メチル化には関連しない。<i>KvDMR1</i> 遺伝子の脱メチル化の児 (50% の BWS のケース) はウィルムス腫瘍のスクリーニングを必要としない。これらの子どもにおいて不必要なスクリーニングを避けることは、NHS の大きな</p>
---	---

<p>この検査に特異的な倫理的、法的、社会的問題はないか？</p>	<p>財政負担や両親の不安を減らす。</p> <p>2. 異常が何も認められない場合</p> <p>a. 陰性の 11p15 検査結果に続いて、両親/家族は、正常な 11p15 で表現型のあるグループの経験的リスクによるカウンセリングをさる。</p> <p>b. 家族内に遺伝性の 11p15 異常がある場合、アットリスクの血縁者における陰性の検査結果は、安心をもたらし、患者への適切なカウンセリングおよび不必要なサーベイランスを避けることを可能にする。</p> <p>この検査に特異的な倫理的、法的もしくは社会的な問題はない。</p>
-----------------------------------	--

次のページの精査手順と検査基準のフォームを記入して下さい。

## 精査手順のテンプレート

注：このページをテンプレートとして使用してください。必要に応じてテキストボックスを拡大してください。

### 対象集団

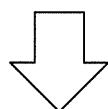
#### 1. BWS の診断基準を満たす人

(大基準 2 つ以上 および 小基準 1 つ以上)

大基準：胎児期の過成長、耳垂の線状溝、巨舌、腹直筋離開、片側肥大／非対称な成長、胎児性腫瘍もしくは腎臓の異常

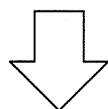
小基準：羊水過多、新生児期の低血糖、顔面火焰状母斑、心奇形もしくは特異顔貌)

#### 2. 胎児期に臍帯ヘルニアと診断された人



どの専門家もしくは臨床医から検体を受け取るか。

1. 臨床遺伝専門医（コンサルト もしくは スペシャリストの登録）
2. 小児科医によるコンサルト
3. 胎児診療医もしくは産科医によるコンサルト

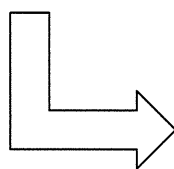


どのように精査医が妥当性をアセスメントしたか詳細を提供してください。

検査の基準は UKGTN のウェブサイト公表されている。

1 年後に、このサービスは精査医に監査される。

精査されるケースの種類を分析し、必要に応じて基準を改正することができる。



年間何件の検査を提供しますか？

100 件



英国 NHS・UKGTN における検査適応基準

【疾患名】 歌舞伎症候群 1; KABUKI (147920)

【遺伝子名】 myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2, MLL2 (602113)

【患者名】	【患者生年月日】
【患者コード】	【NHS 番号】
【申請医氏名】	
【職名】	
【検査施設 ID】	

【申請医資格】 以下のいずれかを満たすものでなければならない。	
	下記にチェックを記載
臨床遺伝専門医	

【遺伝子解析するにあたり最低限満たさなければならない診断基準】	
診断基準項目	チェック記入欄
歌舞伎症候群を示唆するような特徴的な顔貌： ● 下眼瞼外側の外反を伴う切れ長の眼瞼裂 ● 広く弧を描く外側が薄い眉 ● 鼻尖を押し下げる短い鼻柱 ● 大きく突出した耳、又はカップ状の耳	
かつ、発達障害	
または、新生児期のみ：歌舞伎症候群を示唆するような先天奇形の合併	

対象が臨床の診断基準を満たさなかった場合や申請医の資格を満たさなかった場合において、検査が必要と考えられる場合は検査施設まで問い合わせをお願いします。

## NHS Gene Dossier における遺伝学的検査評価のための申請書

### 検査－疾患－対象者

疾患－疾患名	歌舞伎症候群
疾患の OMIM 番号	147920
疾患－他の疾患名 (もしリストに加えた い別名があれば提供し てください)	歌舞伎メイキャップ症候群 (KABUKI MAKE-UP SYNDROME; KMS) ニイカワークロキ症候群
疾患－疾患の特徴を簡 潔に説明して下さい	歌舞伎症候群は、特異顔貌、低身長、様々な他の先天的奇形 (例: 口蓋裂および先天性心疾患) および医学的合併症 (例: 新生児期の低血糖、免疫不全および甲状腺機能不全症) を伴った発達遅滞/学習障害が特徴的である。
疾患－遺伝形式	常染色体優性遺伝 (通常、新規突然変異 de novo)
遺伝子－遺伝子名	<i>MLL2</i>
遺伝子の OMIM 番号	602113
遺伝子－他の遺伝子名 (もしリストに加えた い別名があれば提供し てください)	<i>ALR; MLL4; AAD10; KMT2B; KMT2D; TNRC21; CAGL114</i>
遺伝子－概要 (アンプリ コンの数も含む)	<i>MLL2</i> 遺伝子は 54 エクソンからなり、78 のアンプリコンで解析される。
変異スペクトル (頻度の 高い変異の詳細も含む)	点変異および挿入および微細欠失 頻度の高い変異 (common mutations) は同定されていない。 今のところ、複数エクソンの欠失や重複がこの遺伝子の変異スペクトラムに有意に関連しているかどうかは知られていない。
技術的な方法	<i>MLL2</i> 遺伝子のシーケンス解析 (順逆の両方向) この解析は、全エクソンおよびエクソン-イントロンの境界領域を含む。
妥当性検証のプロセス 注: 自施設において、ど のようにこの検査の妥 当性を検証したか説明 してください	シーケンスプライマーは全 78 個のアンプリコンに対し設計され、最適化された。歌舞伎症候群疑いの 60 人と正常コントロールが 1 つのパネルとしてシーケンス解析によりスクリーニングされた。このパネルの 60 人中 35 人 (58%) に変異が同定された。この方法により、 <i>MLL2</i> 遺伝子の頻度の高い多型も同定することを可能である。 また、本検査実施施設は UK NEQAS および EMQN

	<p>の全ての妥当性ある EQA 枠組みに参加している：  2007 –EQA でシーケンシングされた 3 検体全てを正しく判定した。  2006 –EQA でシーケンシングされた 3 検体全てを正しく判定した。  2005 –EQA でシーケンシングされた 3 検体全てを正しく判定した。  2004 –EQA でシーケンシングされた 4 検体全てを正しく判定した。</p>
<p>この検査をすでに提供していますか？もし提供しているならば、いくつか報告書を作成しましたか？すでに報告した陽性例・陰性例の数を教えてください。</p>	<p>妥当性検証中から、2010 年に研究ベースで提供している。  報告書作成数： 50  陽性報告書数： 35  陰性報告書数： 15</p>
<p>このサービスをどのくらいの間提供していますか？</p>	<p>6 か月</p>
<p>この疾患に特化した地域に医師／研究者はいますか。</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/>はい / <input type="checkbox"/>いいえ 詳細を提供してください。  Richard Scott 医師：ニューイングランド テムズ川地域遺伝サービスの臨床遺伝学部長</p>
<p>今回のものと関連している他の遺伝子や疾患について検査していますか？詳細を教えてください。</p>	<p>いいえ</p>
<p><b>現在の活動</b>  もし可能であれば—自施設では、現在、年間何件の検査を提供していますか。</p>	<p>発端者症例：40 件  血縁者の変異が同定されている家系員：50 件</p>
<p><b>Gene Dossier に登録された場合の受け入れ可能件数</b>  Gene Dossier に登録され、NHS 基金に推奨された場合に年間何件の検査を提供できますか。</p>	<p>発端者症例：50 件  血縁者の変異が同定されている家系員：100 件</p>

<p>経験も基づいて、何件くらいの検査が全国で必要とされますか？ どの情報に基づいているかも明記してください。</p>	<p>発端者症例：年間で 50 症例。推定有病率 32,000 人に 1 人に基づく (Niikawa et al Am J Med Genet 1988;31:565-89)。 血縁者の変異が同定されている家系員：年間 40～50 件。 60～75%の変異検出率 (Ng et al. Nat Genet 2010;42:790-, Paulussen et al Hum Mutat Epub 2010) および両親の検体が得られない可能性 (～20%) で推定。通常、変異が <i>de novo</i> であることを確定するために両親の検査をしている。症例が蓄積されると、明らかな病的変異の際、両親の検査は不要になるであろう。</p>
<p>国での活動 (イングランド、スコットランド、ウェールズ &amp; 北アイルランド) もし自施設が国全体のニーズ全ては満たすことができないならば、どのように国の要求にあうか情報を提供して下さい。</p>	<p>本検査実施施設は国のサービスを提供できる。 また、マサチューセッツ検査施設が UKGTN にこのサービスを提供予定であり、合わせて、我々の検査施設は予想されている発端者 50 症例を超え、国の要求を満たす。</p>