

次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析の診療への応用

田中 真生¹⁾
石浦 浩之¹⁾
三井 純¹⁾
森下 真一²⁾
辻 省次¹⁾

- 1) 東京大学医学部附属病院神経内科
- 2) 東京大学大学院新領域創成科学研究科

研究要旨

神経変性疾患の遺伝子診断目的に、当院でエキソーム解析を施行した 717 症例のデータに基づき、病原性を有する可能性の高い変異の絞り込み手法の検討および変異の同定、エキソーム解析データに基づくコピー数変異の検出、VUS (Variant of unknown significance) 検出数、の 3 項目について検討を行った。結果、病原性を有する可能性のある変異が 209 例 (29.1%) において検出され、その有用性が示された。また、エキソーム解析データに基づいたコピー数変異の検出では、さらに 10 例 (1.4%) において病原性変異が検出された。また、1 例あたり平均 62 個の VUS が検出された。今後、臨床応用を考えるにあたっては、病原性変異の絞り込み方法の確立、エキソーム解析では検出が困難な変異への対応、VUS の解釈、品質管理など、様々な項目に関して検討が必要である。また、大規模な日本人健常者のゲノム多様性のデータベース、病原性変異のデータベースの作成が必須であると考えられる。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析、特にエキソーム解析は、神経変性疾患の診断確定のためのツールとして期待されており、一定の成果を挙げつつあるが、今後臨床応用していく上でどのような課題があるかを考え、その対応方法について検討する。

B. 研究方法

神経変性疾患の遺伝子診断目的に、当院でエキソーム解析を施行した 717 症例 (痙性対麻痺 264 例、脊髄小脳変性症 156 例、筋萎縮性側索硬化症 58 例、パーキンソン病 37 例、筋疾患 36 例、シャルコー・マリー・トゥース病 32 例、白質脳症 27

例、その他 107 例) のデータを元にして、(1) 病原性を有する可能性の高い変異の絞り込み手法の検討および病原性変異の同定、(2) エキソーム解析データに基づくコピー数変異の検出、(3) VUS (Variant of unknown significance) の検出数、の 3 項目について検討を行った。

エキソームデータ解析は、(1) 各塩基配列データのヒトゲノムリファレンス (hg19) 上への貼り付け (Borrows Wheeler Aligner)、(2) 遺伝子変異の検出 (Samtools)、(3) 遺伝子産物機能に影響を与えないと想定される変異の除去 (当施設作成のプログラム)、(4) 各変異について当施設内コントロールの頻度情報および公開データベースの情報を付加 (当施設作成のプログラム)。ま

た、公開データベースについては、コントロール集団の変異頻度データとして、ExAC (The Exome Aggregation Consortium), Exome Variant Server (NHLBI Exome Sequencing Project), HGVD (Human Genetic Variant Database), 疾患関連の変異データベースとして HGMD (Human Gene Mutation Database), 遺伝性疾患に関する情報データベースとして OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) を使用した。

上記解析により得られた遺伝子変異リストの中から、病原性を有する可能性の高い変異の絞り込みについては、以下のようにして当施設作成のプログラムを用いて行った。(1) エラーの可能性の高い変異の除去(クオリティ 30 未満), (2) 健常者頻度の高い変異の除去(公開データベースおよび当科コントロールデータでアリル頻度 1%以上を除去), (3) 神経疾患の原因遺伝子の変異かつ、疾患の遺伝形式と遺伝型が一致している変異に絞り込み(OMIM の情報を利用), (4) ヘテロ接合性変異の場合、健常者アリル頻度 0.1%以上を除去。同プログラムにより絞り込まれた個々の変異について目視で確認を行い、(1) 変異が既報告もしくは機能喪失変異(LOF: loss-of-function mutation)かどうか、(2) 臨床診断名と OMIM 登録診断名が一致するかどうかを元にして、病原性変異として可能性のある変異かどうかを最終的に判定した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、研究倫理審査委員会の承認のもとに実施した。DNA の採取にあたっては、書面を用いてインフォームド・コンセントを取得した。また、個人情報取り扱いについて十分に配慮し、研究を行った。

C. 研究結果

遺伝子産物機能に影響を与えないと想定される変異(同義置換変異, イントロン領域の変異)

を除くと、エキソーム解析によって 1 例あたり平均 11100 個の変異が検出された。さらに、公開データベースおよび当科健常者解析データから得られた健常者における頻度情報、OMIM データベースから得られた神経疾患関連遺伝子のリストおよび遺伝形式情報を用いて、自作のプログラムを用いて変異の絞り込みを行ったところ、1 例あたり平均 6.2 個の変異が検出された。

これらの変異について、(1) 変異が既報告のある変異もしくは機能喪失変異かどうか、(2) 臨床診断名と OMIM に登録されている疾患名が一致するかどうか、の 2 項目に基づき、病原性変異の可能性があるかどうかについて判定を行い、最終的に病原性を有する可能性のある変異を 209 例(29.1%)において同定した。

また、既報のプログラムである Conifer を用いてコピー数変異の検出を行い、新たに 10 例(1.4%)において病原性を有する可能性の高い変異を検出した。

さらに、健常者において検出されず、疾患との関連の報告もこれまでに無い変異を VUS(variant of unknown significance) と定義し、検索を行ったところ、1 例あたり平均 62 個の VUS が検出された。

D. 考察

今回の解析で、717 例中 209 例において病原性を有する可能性のある変異が検出され、神経疾患の遺伝子診断において有用であることが示された。なお、209 例のうち 24 例では、病原性を有する可能性のある変異を複数個有していた。このような症例において、一方の変異のみが病原性を有していると判断して良いのか、両方の変異が共同して疾患発症に関わっていると考えたほうが良いかは、判断が難しいと考えられる。複数の遺伝子異常の関与による疾患発症についての知識は現時点では少なく、今後の情報の蓄積を待つ必要がある。

また、今回 1 例あたり 1 万個を超える多数の変

異の中から目的の変異を抽出するにあたり、可能性のある少数の変異に絞り込む作業を、自作のプログラムを用いて行った。エキソーム解析が行われるようになって以降、現在も新規病因遺伝子が次々と同定されており、過去に解析された症例についても、アップデートされた情報を用いた定期的な再解析・検討が必要であることを考えると、手作業での変異確認では限界があり、プログラムを用いた変異検出の自動化が必要と考えられる。

Conifer を用いたコピー数変異についての解析では、10 例において変異を検出した。コピー数変異を含め、エキソーム解析では検出が困難な変異は少なくなく、診断感度を高めるためには、他のゲノム解析技術も併用すべき場合があると考えられる。

また、今回の解析において、1 例あたり平均 62 個という多くの VUS が検出された。診断病名に一致する既知の遺伝子変異が見つからない場合、これらの VUS の中から病原性変異の可能性のある変異を探索することになるが、臨床診断名が正確でない場合にその病名をキーとして変異の検索を行うと、実際には関係のない遺伝子を病原性変異と判定する可能性がある。従って、病原性変異の絞り込みにはなるべく正確な臨床診断名が必要である。また、正確な臨床診断名に基づく場合であっても、VUS を病原性変異と判断する場合には、将来的な情報の蓄積（健常者で検出されることがわかった、別の VUS が病原性を有していることが判明した、など）によって評価が変わる可能性があることについて、十分に考慮に入れる必要がある。さらに、このように多数検出される VUS について解釈を行うためには、大規模な日本人健常者のゲノム多様性のデータベース、病原性変異のデータベースの作成も必須であると考えられる。

また、今後臨床応用していくにあたっては、検査の品質管理について、必要な要件を満たし、品質保証をすることが不可欠であり、検体の管理、実験操作の標準化、データ処理の標準化など、検討すべき課題が残されている。

E. 結論

神経疾患を対象にしたエキソーム解析で、約 30% の症例について病原性を有する可能性のある変異を同定でき、その有用性が示された。今後臨床応用を考えるにあたっては、病原性変異の絞り込み方法の確立、エキソーム解析では原理的に検出が困難な変異への対応、VUS の解釈、品質管理など、様々な項目に関して検討が必要であり、また、大規模な日本人健常者のゲノム多様性のデータベース、病原性変異のデータベースの作成が必須であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

H. 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