

分担研究課題

マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究

研究分担者 山口清次（島根大学医学部 特任教授）

遺伝子診断パネル運用システム

研究協力者 深尾敏幸（岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 教授）

研究要旨

2014年から全国でタンデムマス(TMS)による新生児マススクリーニング(NBS)が開始され、対象疾患は6疾患から少なくとも19疾患に増加した。先天代謝異常症は遺伝子変異により酵素の残存活性に変化をきたすので、遺伝子変異を同定した上でフォローアップを行うことは本人の臨床的重症度を推測する上でも有用である。本研究事業と協力し、我々は日本医療研究開発機構(AMED)の難治性疾患実用化研究事業として、二次対象疾患を含めた遺伝子診断パネルを用いて疾患の遺伝子解析を行い、研究班で運用する仕組みを構築した。遺伝子型を評価したうえでの臨床経過、治療反応性、予後をフォローすることでデータの蓄積を進め、遺伝子変異によって同一疾患であってもその診療ガイドラインを個別化できる可能性もある。

その他の研究協力者

笹井英雄（岐阜大学医学部附属病院新生児集中治療部 医員）

大塚博樹（岐阜大学医学部附属病院小児科 医員）

A．研究目的

2014年から全国でTMSによるNBSが開始され、対象疾患は6疾患から少なくとも19疾患に増加した。遺伝性疾患においては、genotype-phenotype correlationがみられる疾患が多い。先天代謝異常症においては遺伝子変異により酵素の残存活性に変化をきたすので、遺伝子型を評価することは臨床像、治療反応性、予後を考える上で重要である。しかし、これまで一部の疾患を除けば、遺伝子変異を検討した上での調査研究は行われていない。

NBSの1次対象疾患となった疾患については遺伝学的検査およびそれに対する遺伝カウンセリング料が保険算定されているが、保険点数が低いためにこれで請け負ってくれる検査会社がなく、

実際問題として遺伝子変異同定をこの保険診療として行うことが難しい。一部の疾患については、個々の専門家が、自分の研究室で時間をみつけてPCR、シーケンスをサービスで行っているのが現状であった。

NBSという公的なスクリーニング対象疾患に対して、遺伝子解析による確定診断が公的に提供されていないことは、変異の差による臨床像の差、治療反応性の差、予後の差などを評価できず、マススクリーニングのコホート・コンサルテーション体制に関する研究において障害となると考えられる。

近年、次世代シーケンサー(NGS)にかかるコストは年々減少しており、場合によっては従来の古典的なキャピラリーシーケンスとほぼ変わらない程度まで安価になりつつある。そこで、かずさDNA研究所と協力してNGSを用いた遺伝子パネルによる診断システムを構築し運用を開始した。

B．研究方法

AMED の班研究として、二次対象疾患も含めた遺伝子パネルを用いて疾患の遺伝子解析を行い、下記のフロー（図1）に示すように研究班で運用する仕組みを構築した。先天代謝異常学会の患者

レジストリシステムである JaSMIn への登録も促していくことで、今後の患者情報のフォローも視野に入れたシステムである。

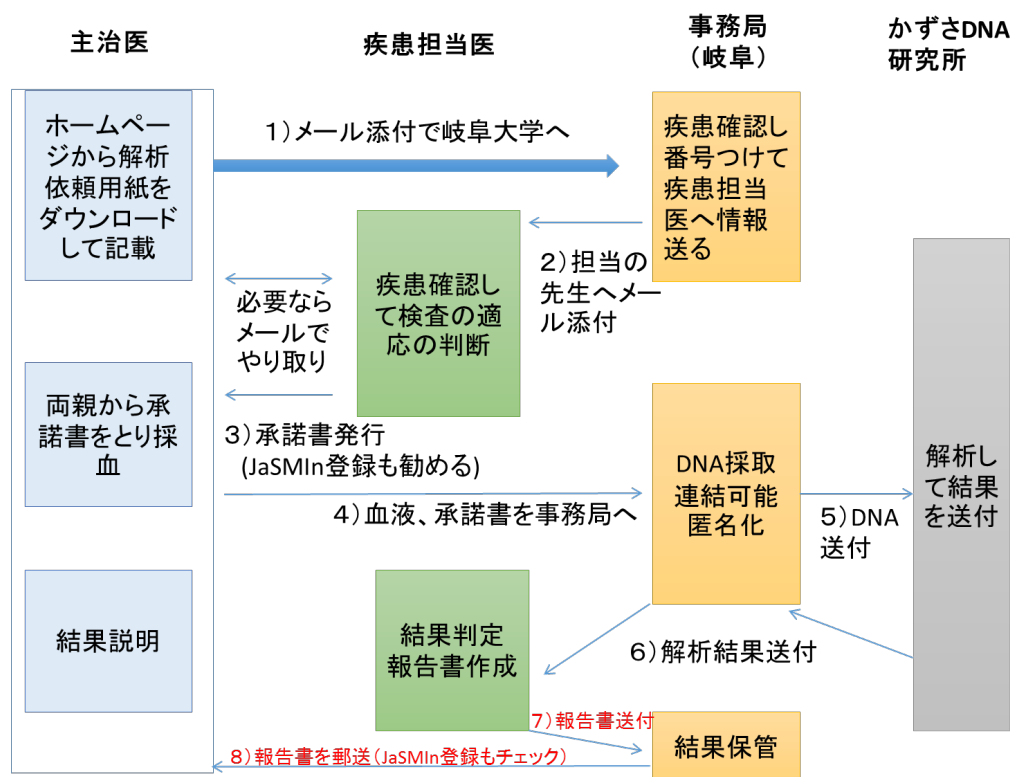


図1. 遺伝子診断パネルの解析フロー

2015年5月から(<http://www.jsiem.com/>)で受付を開始し、疾患群ごとに適切な疾患担当医へ割り振ることで、主治医への専門的なアドバイスも可能となっている。疾患担当医を以下に示す。

藤田保健衛生大学医学部小児科 中島葉子、伊藤哲哉
ガラクトース血症

大阪市立大学大学院医学系研究科発達小児医学 濱崎考史
フェニルケトン尿症、関連疾患

熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野 松本志郎、中村公俊
メーブルシロップ尿症、アルギニノコハク酸尿症
シトルリン血症1型、OTC欠損症、CPS欠損症、NAGS欠損症

東北大学大学院医学系研究科発生発達医学講座小児病態学分野 坂本修
国立成育医療研究センター研究所マススクリーニング研究室 但馬剛
東京慈恵会医科大学小児科学 小林正久
メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、イソ吉草酸血症
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症、ホモシスチン尿症
CPT1欠損症、CPT2欠損症、CACT欠損症、シトリン欠損症

島根大学医学部小児科 小林弘典、長谷川有紀
岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 笹井英雄、深尾敏幸
HMG-CoAリアーゼ欠損症、β-ケトチオラーゼ欠損症、OCTN2欠損症
メチルクロトニルグリシン尿症、グルタル酸尿症I型、グルタル酸尿症II型
三頭酵素欠損症、VLCAD欠損症、MCAD欠損症

当初、ライブラリ調整コストが比較的安価であるマルチプレックスPCR法にて計60遺伝子を含む遺伝子パネルで運用を開始した。その後、システムが安定して軌道に乗ったため、2016年7月からはシーケンス効率がより優れているCapture probe法へ検査方法を移行した。同時に、NBS対象疾患の鑑別としてあがることの多いケトン体・脂肪酸代謝異常症や糖原病の遺伝子もまとめて

検査が可能となる計168遺伝子を含む遺伝子パネルへ拡張した。具体的な遺伝子名を図2に示す。

60遺伝子 ～2016年7月

- ABCD4, ACADM, ACADVL, ACAT1, ASL, ASS1, AUH, BCKDHA, BCKDHB, BTM, CBS, CPS1, CPT1A, CPT2, DBT, DLD, ETFB, ETLF, ETLFDH, GALE, GALK1, GALT, GCDH, GCH1, HADHA, HADHB, HCFC1, HLCS, HMGCL, HSD17B10, IVD, LMBRD1, MAT1A, MCCC1, MCCC2, MMAA, MMAB, MMACHC, MMADHC, MTHFR, MTR, MTRR, MUT, NAGS, OTC, PAH, PCBD1, PCCA, PCCB, PTS, QDPR, SLC22A5, SLC25A13, SLC25A20, SLC52A1, SLC52A2, SLC52A3, SLC5A6, SPR, TAZ

168遺伝子 2016年7月～ Capture probe法へ移行 (ケトン体・脂肪酸代謝異常症パネル、糖原病パネルと合体)

- ABCD4 ACAA2 ACAD10 ACAD11 ACAD8 ACAD9 ACADL ACADM ACADS ACADSB ACADVL ACAT1 ACAT2 ACSF3 ACSM1 ACS2 ADPGK AGL ALDH6A1 ALDOA ALDOB ASL ASS1 AUH BCKDHA BCKDHB BDH1 BSG BTM CBS CPS1 CPT1A CPT1B CPT1C CPT2 CRAT CROT DBT DECR1 DLD ECHS1 EC1 ENO3 EPM2A ETFB ETLF ETLFDH FBP1 G6PC GAA GALE GALK1 GALT GAPDH GBE1 GCDH GCH1 GCK GK2 GPD1 GPD2 GSK3B GYG1 GYS1 GYS2 HADH HADHA HADHB HCFC1 HIBADH HIBCH HK1 HLCS HMGCL HMGCS2 HSD17B10 IVD LDHA LDHB LMBRD1 LPIN1 MAT1A MCCC1 MCCC2 MMAA MMAB MMACHC MMADHC MTAP MTHFR MTR MTRR MUT NAGS NHLRC1 OTC OXCT1 PAH PCBD1 PCCA PCCB PCK1 PCK2 PFKL PFKM PFKP PGAM2 PGK1 PGM1 PHKA1 PHKA2 PHKB PHKG1 PHKG2 PKLR PKM PLCH2 PPP1R3B PPP1R3C PRKAG2 PRKAG3 PRKCA PTS PYGB PYGL PYGM QDPR RBCK1 SLC16A1 SLC16A10 SLC16A11 SLC16A12 SLC16A13 SLC16A14 SLC16A3 SLC16A4 SLC16A5 SLC16A6 SLC16A7 SLC16A8 SLC16A9 SLC17A3 SLC22A5 SLC22A5 SLC25A13 SLC25A20 SLC2A1 SLC2A10 SLC2A11 SLC2A12 SLC2A13 SLC2A14 SLC2A2 SLC2A3 SLC2A4 SLC2A5 SLC2A6 SLC2A7 SLC2A8 SLC2A9 SLC37A4 SLC52A1 SLC52A2 SLC52A3 SLC5A12 SLC5A6 SLC5A8 SPR TAZ

図2. 遺伝子診断パネルによる解析対象遺伝子

C. 研究結果

2015年度は62症例を解析した。JaSMINへの登録は約半数程度の結果であった。

2015年度(2015/5/1-2016/3/31)

62症例

(2014/1/1以降に出生の児)

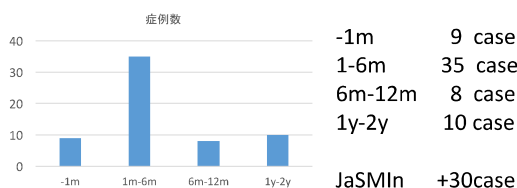


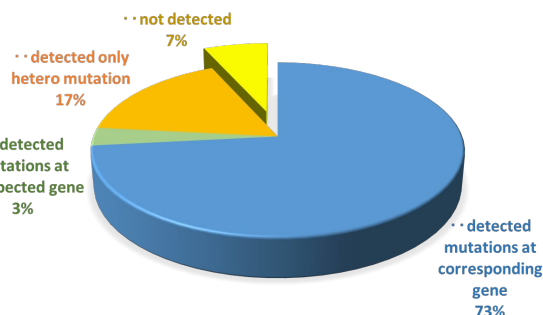
図3. 2015年度 解析対象 症例数

疾患の内訳は次の表1に示す通りである。

表1. 2015年度 解析対象 疾患内訳

臨床暫定診断	症例数
プロピオン酸血症	13
メチルマロン酸血症	10
全身性カルニチン欠乏症	7
メチルクロトニルグリシン尿症	6
VLCAD欠損症	5
高フェニルアラニン血症	3
MCAD欠損症	3
シトルリン血症I型	3
OTC欠損症	2
シトルリン欠損症	2
グルタル酸血症I型	2
CPS-I欠損症/NAGS欠損症	1
アルギニノコハク酸尿症	1
ガラクトース血症	1
軽症型マルチプルカルボキシルセ欠損症/経度ピオチン欠乏	1
三頭酵素欠損症	1
メープルシロップ尿症	1
計	62

対象症例のうち、図4に示すように多くの症例で責任遺伝子に変異を同定できた。



- 56/60=93.3%

図4. 2015年度 解析結果 変異同定率

2016年度は新規症例に加えて過去の典型例の解析も行っており、解析症例数は順調に増加している(12月22日時点で102症例。経過中であるが、JaSMIN登録はおよそ半数程度となっている)。

2016年度 (2016/4/1-2016/12/22)

102症例

(2014/1/1以前に出生の児も含む)

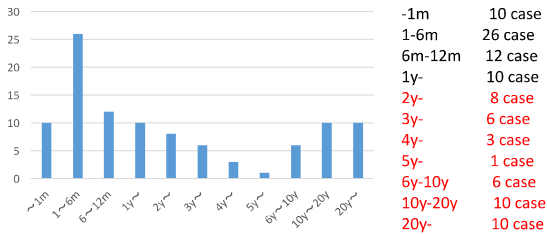


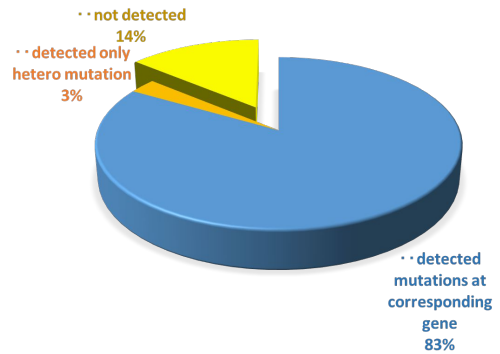
図 5. 2016 年度 解析対象 症例数

同様に疾患の内訳を次の表 2 に示す。

表 2. 2016 年度 解析対象 疾患内訳

臨床暫定診断	依頼症例総数 (~2016.12.22)
プロピオン酸血症	17
高フェニルアラニン血症	12
メープルシロップ尿症	10
VLCAD欠損症	9
ガラクトース血症	9
メチルマロン酸血症	7
メチルクロトニルグリシン尿症	6
MCAD欠損症	5
CPT2欠損症	4
シトルリン血症1型	4
グルタル酸血症1型	4
全身性カルニチン欠乏症	3
CPS1欠損症	3
マルチプルカルボキシラーゼ欠損症	2
ホモシスチン尿症	2
一過性高メチオニン血症の疑い	2
OTC欠損症	1
アルギニノコハク酸尿症	1
CPT1欠損症	1
計	102

まだ解析中の症例を多く含み、結果は中途であるが、対象症例のうち、図 6 に示すように多くの症例で責任遺伝子に変異を同定できている。



• 30/36=83.3%

図 6. 2016 年度 解析結果 変異同定率

この遺伝子診断パネル運用システムでは、遺伝子型 - 表現型の相関 (genotype-phenotype correlation) のデータを蓄積していくことが重要な目的であるが、その 1 例を表 3 に示す。

表 3. genotype-phenotype correlation の例

No.	Age (at the consulting)	Clinical Tentative Diagnosis	Identified Gene	Allele	Allele
55	5m	PA	(Under examination)		
48	2m	PA	n.d.	n.d.	n.d.
49	1m	PA	PCCA	G497R	n.d.
14	1m	PA	PCCB	T428I	Y435C
16	2m	PA	PCCB	Y435C	Y435C
20	1m	PA	PCCB	Y435C	Y435C
21	1m	PA	PCCB	Y435C	Y435C
38	2m	PA	PCCB	C365Y	Y435C
39	1m	PA	PCCB	Y435C	Y435C
47	1m	PA	PCCB	T428I	Y435C
50	1m	PA	PCCB	Y435C	Y435C
56	8m	PA	PCCB	Y435C	R499*
61	5m	PA	PCCB	T428I	Y435C
2	1y3m	MMA	MUT	IVS2+5G>A	c.1864_1865insA
7	day25	MMA	MUT	R369H	L494*
9	1m	MMA	MUT	R369H	G648D
22	1m	MMA	MUT	IVS2+5G>A	R727*
26	day17	MMA	MUT	IVS2+5G>A	R727*
28	day29	MMA	MUT	E117*	R581*
34	2m	MMA	MUT	G426R	R581*
37	1y0m	MMA	MUT	c.1180_1181insGTCA	n.d.
44	1y0m	MMA	MUT	N120K	R581*
46	1y0m	MMA	MUT	Q35*	IVS2+5 G>A

プロピオン酸血症 (PA) であると NBS から診断された症例の多くで PCCB 遺伝子に Y435C 変異をホモで持つ症例が同定できた。そして、これらの症例は少なくとも現時点では一度もアシドーシス発作を起こしておらず、Y435C は残存活性を持った軽症変異であることが推測される。

D. 考察

疾患ごとに、genotype-phenotype correlation のデータを多く蓄積していくことで、遺伝子型から臨床経過、治療反応性、予後との関連性が明らかとなり、その診療ガイドラインを個別化できる

可能性がある。

現在、NBS 対象疾患のうち、1 次対象疾患については 3880 点の保険点数がついており、この遺伝子診断パネルのシステムを恒常的に成り立たせるには保険医療制度の中で遺伝子検査を行っていくことが必要になってくる。DNA 解析を行うか、さ DNA 研究所が、本年度に衛生研究所の資格を取得したため、今後は保険請求の仕組みを含む形でのシステム運用も検討している。

E . 結論

遺伝子診断パネルの運用を開始し、NBS 対象疾患の genotype-phenotype correlation のデータ蓄積・解析を開始した。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Akagawa S, Fukao T, Akagawa Y, Sasai H, Kohdera U, Kino M, Shigematsu Y, Aoyama Y, Kaneko K. Japanese Male Siblings with 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency (HSD10 Disease) Without Neurological Regression. *JIMD Rep.* Jun 16, 2016

2) Erdol S, Ture M, Yakut T, Saglam H, Sasai H, Elsayed A, Otsuka H, Fukao T. A Turkish Patient With Succinyl-CoA:3-Oxoacid CoA Transferase Deficiency Mimicking Diabetic Ketoacidosis. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening.* Vol.4 Jun 3, 2016 DOI: 10.1177/2326409816651281

3) Otsuka H, Sasai H, Aoyama Y, Elsayed A, Vassiliki K, Martin L, Oliver JS, Fukao T. Exon 10 skipping caused by a novel mutation (c.949G>A) located in an exonic splice enhancer site in *ACAT1* gene. *Mol Med Reports.* 2016 in press

4) Abdelkreem E, Otsuka H, Sasai H, Aoyama Y,

Hori T, Mohamed A, Shaimaa M, Fukao T. Beta-Ketothiolase Deficiency: Resolving Challenges in Diagnosis. *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening .* Vol 4, 2016 DOI: 10.1177/2326409816636644

5) 笹井英雄、深尾敏幸

MTHFD1 欠損症 pp.276-282

別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ(36) 免疫症候群(第 2 版) 日本臨牀社, 2016

2 . 学会発表

1) Sasai H, Otsuka H, Fujiki R, Ohara O, Nakajima Y, Ito T, Kobayashi M, Tajima G, Sakamoto O, Matsumoto S, Nakamura K, Hamazaki T, Kobayashi H, Hasegawa Y, Fukao T: Japan-wide gene panel study for target metabolic diseases in newborn mass screening using tandem mass spectrometry. Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism, 6-9 September, Rome, 2016

2) 笹井英雄、藤木亮次、小原収、中島葉子、伊藤哲哉、小林正久、但馬剛、坂本修、松本志郎、中村公俊、濱崎考史、小林弘典、長谷川有紀、深尾敏幸: 本邦における新生児マススクリーニング対象先天代謝異常症の遺伝子パネル解析. 第 58 回 日本先天代謝異常学会総会 10 月 27-29 日 東京、2016

H . 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