

分担研究課題
次世代のマススクリーニングの在り方に関する研究

研究分担者 松原洋一（国立成育医療研究センター 研究所長）

研究要旨

疾病の発症予防にとって極めて有用な新生児マススクリーニング（NBS）は、適切な対象疾患を拡大することによって、更なる小児の健康増進と医療費削減に寄与することが期待される。本分担研究では、遺伝子解析を中心とした新しい技術の導入によるNBS対象疾患の拡大の可能性について検討をおこなった。具体的には、すでに欧米各国で遺伝子解析に基づくNBSが実施されている原発性免疫不全症を中心に検討した。次に、新たなNBS対象疾患の候補選定に必要な疾患頻度推定を目的として、東北メディカルメガバンクの大規模ゲノムコホートデータを用いた保因者頻度および疾患頻度の推定を試みた。また、次世代遺伝子解析装置を用いたNBSへの可能性についても考察を加えた。

研究協力者

呉 繁夫（東北大学大学院医学系研究科・教授）
小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科・教授）
斎藤加代子（東京女子医科大学
附属遺伝子医療センター 教授）
今井耕輔（東京医科歯科大学・准教授）
小野寺雅史（国立成育医療研究センター・部長）

A．研究目的

時代とともに開発される新しい技術を取り入れ、小児の障害予防の対象疾患を拡大していくことは、NBS に課せられた重要な使命の一つである。1960 年代に枯草菌を用いたフェニルケトン尿症のスクリーニングから始まった NBS は、その後甲状腺機能低下症、メープルシロップ尿症、ガラクトース血症などにも応用されるようになった。1990 年代に導入されたタンデムマススペクトロメトリーは、各種のアミノ酸とアシルカルニチンを網羅的に分析することにより、スクリーニング対象疾患の数を一気に拡大することになった。このことによって、多くの脂肪酸代謝異常症や有機酸代謝異常症の発症を未然に防止することができるようになり、NBS の社会貢献度・重要性は一

層高まったといえる。

最近、米国をはじめとする諸外国では、技術革新が著しい遺伝子解析法を用いて原発性免疫不全症の NBS が実施されるようになった。原発性免疫不全症は放置されると致死的な疾患であり、約 5 万人に一人の頻度と考えられている。早期の造血幹細胞移植、遺伝子治療によって救命するとともに予後を大きく改善できることが知られている。用いられている遺伝子解析法は TREC (T-cell receptor excision circle)を検出するもので、T細胞受容体再構成の副産物として生じる環状の DNA で、細胞増殖の際に複製されないため胸腺からの成熟 T細胞産生量を推測するためのマーカーとなっている。発見された患者には、早期治療が実施され大きな成果が挙げられている。わが国ではまだ実施されていない。



本分担研究では、近年技術革新が著しい遺伝子解析を中心とした新しい技術の導入による NBS 対象疾患の拡大の可能性、とくに重症複合型免疫不全症を含む原発性免疫不全症について、検討をおこなった。また、新たな NBS 対象疾患の候補選定に必要な疾患頻度推定を目的として、東北メディカルメガバンクの大規模ゲノムコホートデータを用いた保因者頻度および疾患頻度の推定を試みた。さらに、次世代遺伝子解析装置を用いた NBS への可能性についても考察を加えた。

B. 研究方法

1. 新しい NBS 対象疾患としての原発性免疫不全症に関する検討

原発性免疫不全症の遺伝子解析を用いて施設内の新生児を対象に検査を提供している 3 医療施設（国立成育医療研究センター、名古屋大学、東京医科歯科大学）における実施状況を調査した。

また、最近画期的な治療法が開発され、簡便な遺伝子解析によって同定ができる脊髄性筋萎縮症についてその現況を調査した。

2. 大規模ゲノムコホートデータを用いた遺伝性疾患頻度の推定

東北メディカルメガバンクの 2049 人の全ゲノムシーケンスデータを用いて、フェニルケトン尿症およびカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ欠損症（CPT2 欠損症）の疾患頻度の推定が可能かどうかを検証した。

遺伝子変異の効果予測ソフトとしては PolyPhen2、SIFT、Mutation Taster などに加え、最近発表された、CADD（Combined Annotation Dependent Depletion）ソフトウェアを用い、種々のパラメーターで予測し、変異リストを出力した。また疾患変異データベースとして Human Gene Mutation Database も参照した。

3. 次世代遺伝子解析装置による NBS の検討

国内外の新しいマススクリーニング法や網羅的遺伝子解析法に関する情報、また検討すべき新

しい対象疾患についての情報を、文献、関連研究者および関連学会を通じて収集し、分析を行った。（倫理面への配慮）

本分担研究自体は、実際に患者情報を扱ったり、新たな遺伝子解析を実施しないため、特段の倫理面への配慮は不要と考えられた。

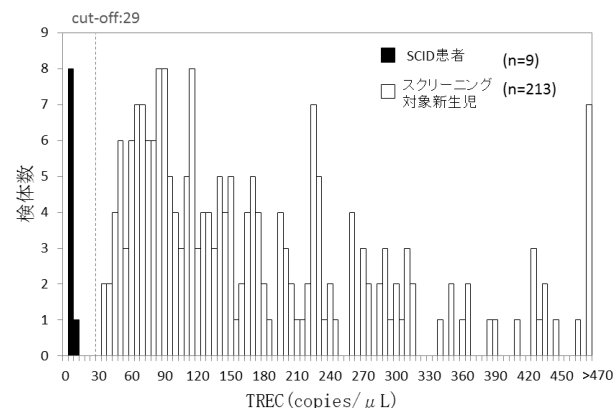
C. 研究結果

1. 遺伝子解析を用いた原発性免疫不全症の NBS 国立成育医療研究センターでの検討

センター内で出産した 331 名の新生児に対して説明を行い、303 検体に対して TREC 測定を行った。結果、2 検体の陽性があり、実際、1 名は false positive であった（約 0.3%）。一方、陽性であった 1 検体は実際にリンパ球の減少を反映していた。確かに、この新生児は一過性のリンパ球減少症ではあったが、新生児期にウイルス感染症の罹患率が高いことを考えると、これら TREC 値が低い新生児を早期に観察することは新生児期の重篤な感染症予防に繋がる可能性が考えられる。

名古屋大学での検討

新生児乾燥濾紙血の TREC 中央値は 139（32～473）copies/ μ L で、全例で海外において用いられるカットオフ値 29 copies/ μ L 以上であった。保存 DNA 検体を用いた検討では SCID 患者の TREC の中央値（範囲）は 4（3～8）copies/ μ L であった。



実際に日齢 4～7 の新生児 213 名を対象として TREC 法によるスクリーニングを実施したところ陽性例は認められなかった。陽性対照検体はすべ

て同定することができた

東京医科歯科大学での検討

2016年5月から12月にかけて東京医科歯科大学で出生した213名の新生児を対象に、TREC法及びKREC法を用いてスクリーニングを実施した。

原発性免疫不全症(PID)の早期発見にご協力ください

原発性免疫不全症(PID)は生まれつき感染病に弱い病態です(1万人~5万人に1人)。BCGやロタワクチンなどの病原体ワクチンで感染しやすくなり、感染は速く広がる可能性があります。そのため、生後早期に診断し、感染症の予防や治療を行うことが重要です。当院では、全国の大学と共同でその早期診断法を確立しましたが、まだ日本人での正常値がわかりません。そこで、

あなたのお子様が生まれて、約5日後に行われる、新生児マススクリーニング検査の際に、0.1ml~3.0ml(2~3滴)程度の血液をいただけませんか。

※新生児マススクリーニング検査は、生後5日以内に新生児科に行われる検査で、先天性免疫不全症などの重篤な早期発見に用いられています。

●ご協力いただける方は、医師による詳しい説明がございます。

説明書をお願いしたい、説明書が足りない場合は同封書に御署名をお願いします。

●説明書に記入するかどうかは任意です。説明書に記入しない場合でもあなた(ご本人)のお子様に不利な結果は発生しません。

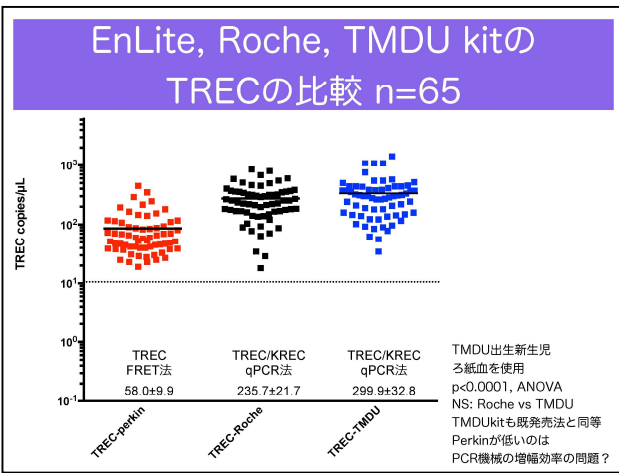
●個人情報の保護には十分配慮しております。

●本研究(研究機関名：原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究)は、本学倫理委員会(倫理番号：1404)の承認を受けております。

●詳細情報は、下記にお問い合わせください。

東京医科歯科大学小児科
連絡先：〒113-8531 東京都文京区湯島1-5-45
電話：03-3826-3034 FAX: 03-3826-3035
お問い合わせ先(研究機関)：研究機関

その結果、両手法で得られる結果は出生体重、出生週数に影響を受けないことが判明した。また、市販のキット(EnLite, Roche)と自家製キット(TMDU)のいずれにおいても適切な結果が得られることを確認した。



脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) に関する調査

脊髄性筋萎縮症は、予後不良の下位運動ニューロン病である。近年、その病態分子機構の解明に基づく画期的な治療薬が開発された。治療開始にはあたっては可能な限りの早期介入が必須であり、NBSの可能性が示唆される。国際共同治験ではSMA治療薬の劇的な効果が確認されており、また新生児早期からの治療が予後に大きく影響を

与えることが示唆された。SMAの遺伝子診断にはすでに簡易迅速検査法が開発されており、将来的にはNBS対象疾患の候補と考えられた。

2. 大規模ゲノムコホートデータを用いた遺伝性疾患頻度の推定

まず、1,070人の全ゲノム配列を対象としてフェニルケトン尿症の責任遺伝子であるPAHについて解析したところ、推定疾患頻度は約4万5千人に1人であった。これまで、わが国のNBSにおけるフェニルケトン尿症の頻度は5万3千人に1人と報告されている。

次に、東北メディカルメガバンクの2049人の全ゲノムシーケンズデータを用いCPT2欠損症の疾患頻度の推定が可能かどうかを検証した。検討集団では、CPT2遺伝子において34個のエクソン内SNPが検出された。このうちHuman Gene Mutation Databaseに記載されている変異のみを対象として計算するとわが国の疾患頻度は47万人に1人となった。一方、島根大学小児科の患者変異リストに基づいて計算すると、疾患頻度は4.1万人に1名となった。

CPT2欠損症の疾患頻度推定

- 1) 変異リスト全て~保因者68名
 $(68/2049)^2 \times 1/4 = 1/3,600$
- 2) HMDB~保因者5+1名(342名に1人)
 $(1/342)^2 \times 1/4 = 1/468,000$
- 3) 島根リスト~保因者19+1名(102人に1人)
 $(1/102)^2 \times 1/4 = 1/41,000$

3. 次世代遺伝子解析装置によるNBSについて

次世代シーケンサーは、個々人のゲノムを網羅的にシーケンスするもので、原理的にはほぼあらゆる遺伝性疾患の検出が可能である。技術的には、ゲノム全体をシーケンスするwhole genome sequencing (WGS)、タンパク翻訳領域をコードするエクソン部分のみについてシーケ

ンスする whole exome sequencing (WES)、標的とする一群の疾患群の遺伝子部分のみをシーケンシングする targeted re-sequencing の 3 種類に分類することができる。いずれも数多くの遺伝性疾患を網羅的に一斉にスクリーニングすることが可能である。

諸外国における現状

WGS あるいは WES を用いた新生児集団の遺伝子解析については、すでに研究的な検討が始められている。米国 NIH では、2013 年より Genomic Sequencing and Newborn Screening Disorders program のもとに、4 つの研究医療機関に 5 年で 2500 万ドルの研究費を交付し、倫理面を含めた検討が開始されている。

網羅的遺伝子解析の課題

・費用

現在のところ、1 検体あたり十～数十万円のコストを要する。数多くの疾患を一斉に解析することが可能なため、1 疾患当たりの費用は数百円程度に抑えることができるが、総額としては現行のマススクリーニング事業をはるかに超える金額となり、現行制度にそのまま組み込むことは難しい。現時点ではこれが最大の課題である。今後、遺伝子解析コストのさらなる大幅な低下によって、現行の手法との逆転が起こる可能性も考えられる。

・技術的課題

研究機器として開発されてきたことから、マススクリーニングのプラットフォームには対応していない。しかしながら、各ステップの自動化、機械化が進んできており、マススクリーニングに適したシステムを組むことは十分可能と考えられる。

遺伝子解析というこれまでのスクリーニング法と全く異なる技術の導入は、担当者の教育・研修を含めた新たな課題に対処する必要がある。

・感度、特異度

現段階の技術では、遺伝子解析によってすべての患者を同定することはできない。また、病的変異のデータベースが未整備なため、遺伝子配列変

化があっても、しばしばその判定をすることが困難である (VUS:variant of unknown significance)。これらの制約を理解したうえでスクリーニングを行う必要がある。

・対象疾患の選定

病因遺伝子が明らかにされている疾患すべてを対象とすることが可能であるが、NBS としてふさわしいかどうかを慎重に評価する必要がある。各疾患の専門家を交えた慎重な議論が必要である。

・偶発的所見

網羅的解析によって、本来目的としない疾患までも検出することの是非が議論されている。このことについては、米国の臨床遺伝専門医学会である American College of Medical Genetics による提言 (ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing, *Genetics in Medicine*, 2013) をもとにしばしば議論がなされている。慎重な検討が必要と考えられる。

D. 考察

1. 遺伝子解析を用いた原発性免疫不全症の NBS

TREC 検査は、遺伝子の塩基配列の変化を検出するものではなく、免疫関連細胞が作られる過程で生じる「特定の遺伝子産物の定量」である。スクリーニングに当たっては、定量とカットオフ値の設定が最も重要な要素であり、代謝産物やホルモンを測定する現行の NBS と親和性が高い。

TREC を用いたマススクリーニングは米国において実用化されており、すでにその有用性が示されている。2013 年 7 月までに、全米で 303 万人の新生児がスクリーニングを受け、52 例の SCID 症例が診断された。SCID の頻度は 58000 出生当たり 1 人 (95% 信頼区間, 1/46000 ~ 1/80000) であった。厚生労働省人口動態統計の日本の年間出生数は 100 万人 (平成 26 年) であるため、米国における SCID 患者の発生頻度を考慮すれば、日本においても年間 17.2 人の SCID 患者が診断されると推定される。わが国の 3 施設 (国立成育医療

研究センター、名古屋大学、東京医科歯科大学)の独立した研究協力者らの研究によって、TREC測定が適切な精度で実施可能であり、日本人においても患者群と健常群を明確に判別できることが実証された。測定に要する費用は1件当たり2,600~6,000円と試算された。今後、愛知県において大規模なパイロットスタディが開始される予定となっている。欧米各国ではすでにスクリーニング開始されて救命される新生児が増加していることに鑑み、わが国でも早急に実施に向けた検討を始めるべきではないかと思われる。わが国における費用対効果の算定も必須である。

脊髄性筋萎縮症については、新たなNBS対象疾患として将来的には有力な候補であると考えられた。今後、治療薬市販後の調査や費用対効果などの検討が望まれる。

2. 大規模ゲノムコホートデータを用いた遺伝性疾患頻度の推定

健常人ゲノムコホートデータを用いた保因者頻度、患者頻度の推定が可能であることが示された。今後、最適なゲノム参照パネルのサイズの検討とともに、さらに多くの変異解析と発現解析が重要と考えられる。

3. 次世代遺伝子解析装置によるNBSについて

遺伝子解析法を用いたNBS法としては、1st tierとしての遺伝子診断と、確定診断のための2nd tierとしての遺伝子診断が考えられる。

1st tier 遺伝子診断は、現時点ではコストなどの点でNBSに対応できる段階にはないと思われる。しかしながら今後の急速な技術革新により、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析に収束していく可能性が否定できない。その際、対象疾患の選定、手法、精度、費用、検出感度/陽性率、倫理的諸問題、遺伝カウンセリングなどが今後の検討課題である。

2nd tierとしての遺伝子診断は、すでに一部でキャピラリーシーケンサーによる遺伝子毎の解析が実施されているが、今後は次世代シークエ

ンサーによる疾患パネルの一斉解析に移行していくと考えられる。こちらでは、手法、精度、費用、検出感度/陽性率について検討することが必要と考えられる。

E. 結論

原発性免疫不全症のNBSに関して、国内で一定規模のパイロット研究を実施すべき時期に来ているものと考えられる。また、わが国における費用対効果の検討をおこなうべきである。

健常人ゲノムコホートデータは、保因者頻度、患者頻度の推定に有用であることが示された。

次世代シーケンサーのNBSへの導入は現時点では時期尚早と考えられるが、将来的には対象疾患を飛躍的に拡大させていくことが予測される。

F. 健康危険情報

特になし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y. TBX1 mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. PLoS One. 9(3):e91598, 2014.
- 2) Dragneva S, Szyszka-Niagolov M, Ivanova A, Mateva L, Izumi R, Aoki Y, Matsubara Y. Seven Novel Mutations in Bulgarian Patients with Acute Hepatic Porphyrias (AHP). JIMD Rep. 16:57-64, 2014
- 3) Inoue SI, Moriya M, Watanabe Y,

- Miyagawa-Tomita S, Niihori T, Oba D, Ono M, Kure S, Ogura T, Matsubara Y, Aoki Y. New BRAF knockin mice provide a pathogenetic mechanism of developmental defects and a therapeutic approach in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Hum Mol Genet.* 23(24):6553-66, 2014
- 4) Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Sasahara Y, Rikiishi T, Nishiyama A, Nishiyama S, Endo K, Kato M, Warita H, Konno H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y, Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: A report of two siblings. *Neuromuscul Disord.* 24(12):1068-72, 2014
 - 5) Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nagasaki K, Horikawa R, Nagai T, Tsuchiya T, Suzuki E, Miyado M, Hata K, Nakabayashi K, Hayashi K, Matsubara Y, Baba T, Morohashi K, Igarashi A, Ogata T, Takada S, Fukami M. Testicular dysgenesis/regression without campomelic dysplasia in patients carrying missense mutations and upstream deletion of SOX9. *Mol Genet Genomic Med.* 3(6):550-7, 2015
 - 6) Fujiwara I, Murakami Y, Niihori T, Kannno J, Hakoda A, Sakamoto O, Okamoto N, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Kinoshita K, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y. Mutations in PIGL in a patient with Mabry syndrome. *Am J Med Genet A* 167A(4):777-85, 2015
 - 7) Moriya M, Inoue SI, Miyagawa-Tomita S, Nakashima Y, Oba D, Niihori T, Hashi M, Ohnishi H, Kure S, Matsubara Y, Aoki Y. Adult mice expressing a Braf Q241R mutation on an ICR/CD-1 background exhibit a cardio-facio-cutaneous syndrome phenotype. *Hum Mol Genet.* 24(25):7349-60, 2015
 - 8) Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kaneko T, Hashii Y, Irie M, Sato A, Saito-Nanjo Y, Funayama R, Nagashima T, Inoue S, Nakayama K, Ozono K, Kure S, Matsubara Y, Imaizumi M, Aoki Y. Mutations in MECOM, encoding oncoprotein EVI1, cause radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 97(6):848-54, 2015
 - 9) Komatsuzaki S, Ogawa E, Shimozawa N, Sakamoto O, Haginoya K, Uematsu M, Hasegawa Y, Matsubara Y, Ohura T. First Japanese case of Zellweger syndrome with a mutation in PEX14. *Pediatr Int.* 57(6):1189-92, 2015
 - 10) Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Suzumura H, Nakahara A, Nakano Y, Hokosaki T, Ohmori A, Sawada H, Migita O, Mima A, Lapunzina P, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Ogata T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Inoue S, Matsubara Y, Kure S, Aoki Y. Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with RIT1 mutations. *Hum Genet.* 135(2):209-22, 2016
 - 11) Nishi E, Mizuno S, Nanjo Y, Niihori T, Fukushima Y, Matsubara Y, Aoki Y, Kosho T. A novel heterozygous MAP2K1 mutation in a patient with Noonan syndrome with multiple lentigines. *Am J Med Genet A.* 167A(2):407-11, 2015
 - 12) Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Targeted next-generation sequencing effectively analyzed the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 60(5):1297-307,

- 2015
- 13) Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod.* 30(3):499-506, 2015
- 14) Suzuki E, Izumi Y, Chiba Y, Horikawa R, Matsubara Y, Tanaka M, Ogata T, Fukami M, Naiki Y. Loss-of-function SOX10 mutation in a patient with Kallmann syndrome, hearing loss, and iris hypopigmentation. *Horm Res Paediatr* 84:212-216, 2015
- 15) Nakano E, Geisz A, Masamune A, Niihori T, Hamada S, Kume K, Kakuta Y, Aoki Y, Matsubara Y, Ebert K, Ludwig M, Braun M, Groneberg DA, Shimosegawa T, Sahin-Tóth M, Witt H. Variants in pancreatic carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 309(8):G688-94, 2015
- 16) Aoki Y, Niihori T, Inoue SI, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. *J Hum Genet.* 61(1):33-9, 2016.
- 17) Shima H, Tanaka T, Kamimaki T, Dateki S, Muroya K, Horikawa R, Kanno J, Adachi M, Naiki Y, Tanaka H, Mabe H, Yagasaki H, Kure S, Matsubara Y, Tajima T, Kashimada K, Ishii T, Asakura Y, Fujiwara I, Soneda S, Nagasaki K, Hamajima T, Kanzaki S, Jinno T, Ogata T, Fukami M; Japanese SHOX study group. Systematic molecular analyses of SHOX in Japanese patients with idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Hum Genet.* 61(7):585-91, 2016
- 18) Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saitsu H, Doi K, Shimizu M, Nakabayashi K, Aoki Y, Tsurusaki Y, Morishita S, Kawaguchi T, Migita O, Nakayama K, Nakashima M, Mitsui J, Narahara M, Hayashi K, Funayama R, Yamaguchi D, Ishiura H, Ko WY, Hata K, Nagashima T, Yamada R, Matsubara Y, Umezawa A, Tsuji S, Matsumoto N, Matsuda F. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet.* 61(6):547-53, 2016
- 19) Miyake H, Yamada S, Fujii Y, Sawai H, Arimori N, Yamanouchi Y, Ozasa Y, Kanai M, Sago H, Sekizawa A, Takada F, Masuzaki H, Matsubara Y, Hirahara F, Kugu K. Nationwide survey for current clinical status of amniocentesis and maternal serum marker test in Japan. *J Hum Genet.* 2016 Jun 30. doi: 10.1038/jhg.2016.67. [Epub ahead of print]
- 20)
2. 学会発表
- 1) 松原洋一：希少遺伝性疾患研究の最前線」第22回日本家族性腫瘍学会学術集会。松山市，2016年6月
- 2) 松原洋一：小児科医が知っておきたい希少疾患の基礎知識と最近の話題」第8回日本小児科学会 長野地方会。長野県上田市，2016年6月
- 3) 松原洋一：Rare Disease Research in Japan」第61回日本新生児成育医学会・学術集会。東京都，2016年11
- 4) 松原洋一：新生児におけるゲノム医療 Genomic medicine for newborns」第61回日本新生児成育医学会・学術集会。大阪府，2016年12月