

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に関する研究と 神経疾患における二足および四足歩行の定量的解析

研究分担者 辻 省次 東京大学医学部附属病院神経内科教授

研究要旨

神経変性疾患の遺伝子診断目的に、当院でエク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、エク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、エク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。

ロコモーションの評価を行う際、歩行障害が重度となった患者では、そもそも二足歩行が困難となり、二足歩行の分析に用いる時間因子・空間因子による評価が出来ない。そこで我々は、ヒトの二足歩行が四つ這いから発達することに着目し、成人患者においても、四つ這いをロコモーションの評価に用いることとした。本研究では、まずは四足歩行の計測システムを開発した。重度の患者でもロコモーションの評価が行えるようになることが期待される。

A. 研究目的

神経変性疾患には、遺伝性疾患が占める割合が多く、また、同じような表現型においても遺伝的異質性が高い場合が少なくない。このような背景のもと、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析を診療現場で活用するクリニカルシーケンシングの普及が期待されている。本研究では、クリニカルシーケンシングを神経変性疾患に適用し、その有効性と課題について検討した。

パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患では運動障害により歩行障害を来す。二足歩行の評価として、歩幅・複歩幅・歩隔などの空間因子や、歩行周期・立脚相・遊脚相などの時間因子による定量的評価が行われている。しかし歩行障害が重度となった患者では、そもそも二足歩行自体が困難となり、上記因子による評価が出来ない。

そこで我々は、ヒトの二足歩行が四つ這いから発達することに着目し、成人患者においても、重度の患者でも行えうる四つ這いを評価することにした。本研究では、まずは四足歩行の計測システムを開発した。

B. 研究方法

神経変性疾患の遺伝子診断目的に、当院でエク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)エク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。

エク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

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。

ハードウエアは, 歩行路 Walkway MW-1000(アニマ社, 東京)を特別に 4 倍に拡張した。幅 1200mm・奥行き 4800mm の計測領域を持ち, 総計 57,600 個のひずみゲージが 10mm 間隔で埋め込まれ, 接地を検出することができる。サンプリング周波数は 100Hz である。

ソフトウェアは, ハードウエアで計測した接地から, 空間因子と時間因子を抽出するオリジナルのプログラムを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は, ヘルシンキ宣言および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針, 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 の採取ならびに歩行解析にあたっては, 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, 個人情報の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, エク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。

四つ違いを定量的に評価するのに, 空間的關係については, 4 肢のうち, ある肢に着目し, この肢が次に接地するまでの距離を計測することにより, 二足歩行のストライド長に相当する数値を表現した。また, この接地点を原点とする座標系を作り, 他 3 肢の接地点をこの座標系で表現した。時間的關係については, ある肢が次に接地するまでの時間を計測することにより, 二足歩行の歩行周期に相当する数値を表現した。また, この肢の接地時刻を基準として, 他 3 肢の接地時刻を計測し, 接地のタイミングのずれを表現した。4 肢の立脚時間を各々で計測した。空間因子と時間因子を合わせて 15 の数値で四つ違いを定量化することに成功した。

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。エク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、エク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。

四足歩行は、二足歩行より支持点が多く安定しているため、重度の患者でも評価可能である。さらに、二足歩行と四足歩行には共通の神経機構があると言われており、二足歩行できる症例でも四足歩行と併せて包括的に評価することで、病態理解が深まると考える。今後症例での計測を重ねていく。

E. 結論

神経疾患を対象にしたエクソーム解析で、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、エク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。

四つ這いを定量化するシステムを構築した。症例研究を重ね、病態理解に役立てていく。

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

1. Yozu A, Hamada M, Sasaki T, Tokushige S, Tsuji S, Haga N. Development of a novel system to quantify the spatial-temporal parameters for crutch-assisted quadrupedal gait. *Advanced Robotics*. 31: p80-87; 2017
2. Ikeda T, Nakahara A, Nagano R, Utoyama M, Obara M, Moritake H, Uechi T, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Doi K, Kenmochi N, Morishita S, Nishino I, Tsuji S, Nunoi H. TBCD may be a causal gene in progressive neurodegenerative encephalopathy with atypical infantile spinal muscular atrophy. *J Hum Genet*. 2016 Dec 8. doi: 10.1038/jhg.2016.149.

3. Williams KL, Topp S, Yang S, Smith B, Fifita JA, Warraich ST, Zhang KY, Farrarwell N, Vance C, Hu X, Chesi A, Leblond CS, Lee A, Rayner SL, Sundaramoorthy V, Dobson-Stone C, Molloy MP, van Blitterswijk M, Dickson DW, Petersen RC, Graff-Radford NR, Boeve BF, Murray ME, Pottier C, Don E, Winnick C, McCann EP, Hogan A, Daoud H, Levert A, Dion PA, Mitsui J, Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Kost J, Gellera C, Gkazi AS, Miller J, Stockton J, Brooks WS, Boundy K, Polak M, Muñoz-Blanco JL, Esteban-Pérez J, Rábano A, Hardiman O, Morrison KE, Ticozzi N, Silani V, de Bellerocche J, Glass JD, Kwok JB, Guillemin GJ, Chung RS, Tsuji S, Brown RH Jr, García-Redondo A, Rademakers R, Landers JE, Gitler AD, Rouleau GA, Cole NJ, Yerbury JJ, Atkin JD, Shaw CE, Nicholson GA, Blair IP. C9orf72 mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Nat Commun*. 2016 Apr 15;7:11253.
 4. Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saito 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*. 2016 Jun;61(6):547-53.
 5. Ishiura H, Tsuji S. Epidemiology and molecular mechanism of frontotemporal lobar degeneration/amyotrophic lateral sclerosis with repeat expansion mutation in C9orf72. *J Neurogenet*. 2015;29(2-3):85-94.
 6. Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Atsuta N, Sobue G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, Hozumi I. Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology*. 2014 Feb 25;82(8):705-12.
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