

難病領域の遺伝学的検査の実態を調査する研究

研究分担者 小原 収
かずさDNA研究所・ゲノム事業推進部・副所長 兼 部長

研究要旨

かずさDNA研究所は、これまでの10年以上に亘る複数の難病研究班との共同臨床研究において遺伝子解析を担当してきた。その対象症候群のいくつかの遺伝学的検査が保険収載されたことを契機に、衛生検査所登録を取得し、希少難病に特化して遺伝学的検査を社会に提供する活動を2017年から続けてきた。今年度は、希少難病に関係する学会、難病研究班との連携の上に、大幅に拡大された保険収載検査を安定的に提供する体制を実運用した。更に、国際的に進められているデータ標準化の流れに沿って、次世代シーケンシングによる遺伝学的検査の精度管理の技術的課題を解決し、新しい遺伝子解析の分析的妥当性の指標となるべきスコアを創出した。最後に、遺伝学的検査の臨床的妥当性と有用性を高めるために、具体的な疾患に対する難病班と連携し、継続的に遺伝学的検査による診断基準をアップデートしていく枠組みを構築した。

A. 研究目的

DNA構造解析の技術開発と大量シーケンシングの経験を基礎として、これまで臨床研究として厚生労働省難治性疾患克服研究事業下の難病研究班等が実施される遺伝子解析を10年以上に亘り実施してきた。近年、そうした臨床研究で進めてきた遺伝学的検査の多くが保険収載されたことを受けて、今後は臨床研究としてではなく、診療の用に供される情報として遺伝学的検査の結果を報告できるように、平成29年に衛生検査所登録を行った。更に平成30年の医療法改正の施行をうけ、これまで基準の明確な規定がなかった次世代DNAシーケンシング(NGS)による検査の精度管理をどうしていくかが大きな問題として浮上してきた。こうした問題に技術的に対応するため、これまでのDNAシーケンシング技術開発や大量シーケンシングプロジェクトでの経験を踏まえて、我が国の希少難病の遺伝学的検査の現状を調査しながら、より多くの希少難病の遺伝学的検査をより高精度に提供していく体制のモデルを提案する。

B. 研究方法

(ア) 希少難病の遺伝学的検査体制の実稼働における課題の抽出

令和1年に準備した新たに保険収載された検査の検体受け入れを開始し、それらの検査が円滑に実施されるために必要な課題を抽出し、その解決策を探る。

(イ) NGS遺伝学的検査の精度管理の技術的な検討と情報科学的な難読領域の全ゲノム領域からの抽出

国際的なデータシェアリングの流れから、NGSデータの精度管理方法が提唱されていることを受け、その方法を実際に利用した精度管理方法について検討する。更に、公的に利用できるヒト遺伝子のNGSデータから、それぞれの遺伝子のNGSによる分析的妥当性を評価するための指標を創出する。

(ウ) 希少難病の専門医の難病研究班と連携し、遺伝子学的検査の全体としての有用性を向上させるために、診断基準における遺伝学的検査の記述内容を合同で精査する。

(倫理面への配慮)

本研究では、検査体制構築と遺伝子検査精度管理についてのみを検討するため、個人情報等の倫理的に配慮を必要とする研究は実施しない。

C. 研究結果

(ア) 令和2年度に新しく保険適用になった検査の中で、NGSで解析可能な検査60種類を新しく追加して登録衛生検査所で実施する体制を構築した。これまでの保険収載検査と合わせて、合計100種類の疾患の検査提供が実現できた。また、この際に、検査対象疾患を研究対象とする学会・難病研究班との連携関係を本研究班の仲介を得ながら構築し、必要に応じて検査依頼をした主治医がその疾患の専門医に相談できる体制も構築した。これらの新規検査については、検査依頼元の病院との契約を進め、現在までのところ順調に検査提供が進捗している。検査依頼数も、検査所設立時の想定であった5000件の目標に近づくことができた。

(イ) これまで、サンガー法などでの少数の遺伝子の検査においては、検査系の精度管理は既存の臨床検体を用いて実施されることが主流であった (Analyte-specific testing)。しかし、NGS 解析を用いた系の精度確認には、方法論に依拠した形で精度管理することが適切であると考えられている (J Mol Diagn. 2014 May;16(3):283-7.)。更に、全長配列解析を終えたヒトゲノム標準 DNA を用いて、バリエントコールのベンチマークを行う方法も報告されている (Nat Biotechnol. 2019 May;37(5):555-560.)。ので、外部から入手可能な国際標準物質として広く利用されている DNA を用いての NGS バリエントコールの精度管理が可能となった。バリエントコールに供するための NGS リードデータについてはシーケンサー毎にリードの品質評価スコアが算出されているので、このバリエントコールの部分の精度管理が実現できれば、NGS を用いた 1 塩基置換と短い挿入欠失変異の検出については、全行程を評価することが可能となった。こうした精度管理の技術的な方法を考える間に、現在汎用されている短鎖リード型 NGS シーケンサーでヒトゲノムを解析したデータが数万件公的データベースに登録されていることに着目し、ゲノムワイドに NGS でのそれぞれの塩基の解析精度の指標を機械学習を使って算出した。現在、その指標を共同研究者に評価依頼しており、それが済み次第、論文として報告する予定である。この指標の実利用に向けて、精度管理に用いている標準ヒトゲノムリファレンス DNA を用いた Exome 解析を実施し、得られた自家データと開発した NGS 精度管理指標との整合性を確認した。

(ウ) 平成30年度末に、The European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) と国際自己炎症性疾患会議のサテライトミーティングで議論された NGS での自己炎症性疾患の遺伝学的検査のベストプラクティスガイドラインを報告した (論文発表 No.8)。しかし、その会議に同席していた我が国の自己炎症性疾患の研究班の研究者らから、日本人の遺伝的な特徴を踏まえたガイドラインの作成が必要であるとの提案があり、厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患政策研究事業) 「自己炎症性疾患とその類縁疾患の全国診療体制整備、移行医療体制の構築、診療ガイドライン確立に関する研究」班と連携して、アップデートされた遺伝子解析による診断基準作成作業を行った。今年度は、まず NLRP3 遺伝子と MEFV 遺伝子などを取り上げ、この遺伝子解析の臨床的妥当性、有用性、分析的妥当性について、当研究班の分担研究者の原田直樹氏が報告されているスキームに沿って検討を進め、解析対象となる病的バリエントリストなどを作成した。

D. 考察

(ア) 指定難病の確定診断のための遺伝学的検査の需要は想像以上に大きく、本研究班の仲介によって、遺伝学的検査から診断に至るプロセスを支援する難病研究班などとの連携関係が構築できたことは大変に重要であった。また、NGS による研究が活発化した結果、希少難病の原因となる新規遺伝子、新規病的バリエントが次々と明らかにされており、指定難病の遺伝学的検査による確定診断のために必要な遺伝子情報のアップデートが必要とされるケースが多く見られている点は問題であった、

(イ) 標準物質として広く国際的に利用されているゲノム DNA を用いることで、NGS によってリード取得するステップからバリエント検出するステップまでを定量的に精度検証することが可能となった点は大きな進歩であった。また、それぞれの塩基位置が短鎖リード型の NGS で難読かどうかの定量的な指標と組合わせて評価することで、遺伝学的検査の分析的妥当性の評価の効率化が実現されることが期待される。

(ウ) 臨床専門医であっても、これまでの遺伝学的検査が研究の延長線上で行われてしまっていたために、検査としての検査の位置づけについての理解が必ずしも十分でない場合があり、遺伝学的検査を用いた診断基準の策定に当たっては、検査側の視点を取り入れた検討が重要であると考えられた。

E. 結論

(ア) 新たに保険収載された遺伝学的検査も含めて、検査を安定的に提供していくための体制が構築でき、順調に進捗することができた。

(イ) 国際的に使われているヒトゲノム標準 DNA とベストプラクティスガイドラインとして公開されているプログラムを使うことで、検査対象のヒトゲノム領域の解析精度を定量的に評価可能となった。また、ヒトゲノムのどの領域が現在汎用されている短鎖リード型 NGS での難読領域になるかを示す定量的な指標を機械学習を用いて創出した。

(ウ) 「自己炎症性疾患とその類縁疾患の全国診療体制整備、移行医療体制の構築、診療ガイドライン確立に関する研究」班と連携して、アップデートした遺伝学的検査による診断基準のための情報整備を実現した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shinar Y, Ceccherini I, Rowczenio D, Aksentijevich I, Arostegui J, Ben-Chétrit E, Boursier G, Gattorno M, Hayrapetyan H, Ida H, Kanazawa N, Lachmann HJ, Mensa-Vilaro A, Nishikomori R, Oberkanins C, Obici L, Ohara O, Ozen S, Sarkisian T, Sheils K, Wolstenholme N, Zonneveld-Huijssoon E, van Gijn ME, Touitou I. ISSAID/EMQN Best Practice Guidelines for

the Genetic Diagnosis of Monogenic Autoinflammatory Diseases in the Next-Generation Sequencing Era. Clin Chem. 2020 Apr 1;66(4):525-536. doi: 10.1093/clinchem/hvaa024.

2. 小原 収、【遺伝情報と遺伝カウンセリング】遺伝学的検査の保険制度下での実施にかかわる取り組み. 小児内科 52(8) 1128-1130 2020年
3. 小原 収、【ビッグデータ時代のゲノム医学】ゲノム医学の進歩 ゲノム医学におけるオミックス解析. 生体の科学 71(2) 114-118 2020年

2. 学会発表

1. 小原 収、希少難病の遺伝学的検査の提供体制：研究と検査の間で、第62回日本小児神経学会学術集会、東京、国内 招待講演
2. 小原 収、保険収載された希少難病の遺伝子検査の現状、第27回日本遺伝子診療学会、オンライン、招待講演
3. 小原 収、先端ゲノミクス計測の臨床検査への応用可能性と課題、第32回日本臨床検査医学会関東信越支部総会 特別講演1、千葉、招待講演
4. 小原収、堤正好、希少難病のクリニカルシーケンシングによる遺伝学的検査の現状と課題、第40回医療情報学連合大会、オンライン、招待講演
5. 小原 収、短鎖リード型NGSデータを補完するための臨床オミックス解析の遺伝学的検査への応用、第43回日本小児遺伝学会 オンデマンド企業セミナー、オンライン、国内 招待講演
6. 小原 収、希少難病の遺伝学的検査の現状と課題、日本遺伝子診療学会 遺伝子診断・検査技術推進フォーラム 公開シンポジウム2020、オンライン、招待講演
7. 小原 収、小児科診療における遺伝子診断の実際、第34回近畿小児科学会 教育講演、オンライン、招待講演
8. 小原 収、難病の遺伝学的検査実績とNGS検査の精度管理について、難波班シンポジウム：難病医療における遺伝学的検査の現状と課題、オンライン、招待講演
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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