

別紙 3

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
神経変性疾患領域の基盤的調査研究 分担研究報告書
神経変性疾患の網羅的ゲノムシーケンス解析に関する研究

研究分担者： 辻 省次
国際医療福祉大学医学部

研究要旨

アカデミアの研究室で、網羅的ゲノムシーケンス解析の結果を診療に提供するために、衛生検査所の登録を実現し、次世代シーケンサーを用いたゲノムシーケンス解析、インフォマティクスパイプラインの全体を内製のシステムとして整備を行い、ゲノム解析の内部精度管理システム、外部精度管理システムを整備した。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析手法を、神経変性疾患の診断に応用する。網羅的ゲノム解析を、神経変性疾患の診断に用いるにあたり、次の点を検討課題として設定した。1. 神経変性疾患は、多様な症候を呈しうる疾患であり、診断確定のためには、多数の疾患を鑑別する必要がある。2. アカデミアの研究室では、検査結果を診療に提供する場合に、改正医療法への対応が求められている。3. 精度管理については、内部精度管理、外部精度管理を実施する必要がある。4. 保険収載されている疾患は限られており、保険非収載の疾患への対応が求められる。互いに重複する診療の立場からは、症候に基づき、多数の疾患を鑑別する必要がある。

網羅的ゲノム解析として、筋萎縮性側索硬化症（ALS）を含む、神経変性疾患全体に対して、国内の医療機関からの遺伝子診断の依頼に対して迅速な遺伝子診断を実施する体制を確立する。

網羅的ゲノムシーケンス解析の精度管理につて、内部精度管理、外部精度管理を実施した。

B. 研究方法

神経変性疾患の遺伝子診断体制を整備し、国内の医療機関から依頼を受けて、遺伝子解析を迅速に実施する体制を整えた。神経変性疾患においては、疾患ごとに解析すべき遺伝子が多数に上る場合があり、エクソーム解析による網羅的な解析や、フラグメント解析などの結果を迅速に提供するシステムを構築した。

アカデミアの研究室において、診断確定を目的とした網羅的ゲノム解析を実施するために、衛生検査所の登録をした上で、網羅的ゲノム解析を進めた。網羅的ゲノム解析手法として、NovaSeq6000 を用いた全エクソンシーケンス解析を導入した。インフォマティクスパイプラインとしては、BWA, GATK, VEP を用いたパイプラインを内製で整備した。参照ゲノム配列は hg38, 参照データベースとしては、dbSNP, gnomAD, ToMMo (jMorp), CLinVar, HGMD

を用いた。精度管理については Genome in a BottleProject で用いているゲノム DNA を用いた解析を行った。外部精度管理については、CAP survey を受検した。

(倫理面への配慮)

所属機関の倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

アカデミアの研究室において、診断確定を目的とした網羅的ゲノム解析を実施するために、衛生検査所の登録を進めた。網羅的ゲノム解析手法として、NovaSeq6000 を用いた全エクソンシーケンス解析を導入した。インフォマティクスパイプラインとしては、BWA, GATK, VEP を用いたパイプラインを内製で整備した。参照ゲノム配列は hg38, 参照データベースとしては、dbSNP, gnomAD, ToMMo (jMorp), ClinVar, HGMD を用いた。

網羅的ゲノム解析の精度管理については、Genome in a Bottle Project で採用している、ヒトゲノム DNA を用いて内部精度管理を行った。全エクソンシーケンス解析の場合、平均カバレッジとして、110 程度、カバレッジ 10 未満の領域は 0.2%であった。診断確定のために必要となる、標的遺伝子のリストに基づき、variants の抽出を実施し、想定される遺伝形式、有病率などを参考に、候補 variants を抽出し、ACMG のガイドラインに従って annotation を行うパイプラインを整備した。

外部精度管理については、CAP survey を受検した。CAP survey では、ゲノム DNA が送られてきて、全ゲノムシーケンス解析を実施した。検体の中に、Gaucher 病の保因者 (p.L483P) が含まれていたが、GRCh38/hg38 の参照配列において、GBA の pseudogene である、GBAPI の参照配列に、p.L483P に他王

する変異を含めて、3つの rare allele が登録されていて、これらの rare allele が GBA の配列に一致することから、p.L483P を含む read が、GBAPI に mapping されてしまうことを見いだした。GCRh38/hg38 の参照配列に問題点があることを見いだしたが、外部精度管理は、順調に実施することができた。

D. 考察

衛生検査所の登録を取得し、解析結果を診療に提供するシステムを整備した。機器の保守管理などを含め、衛生検査所を維持するための費用負担はかなり大きく、アカデミアの研究室でこれを維持するには、財政面、人員面のサポートが必須であり、持続性のある検査体制の維持が検討課題となる。精度管理については、網羅的ゲノム解析の内部精度管理体制を確立した。外部精度管理については、CAP survey を受検することにより、実施することが出来、精度管理についての体制を整備することができた。

外部精度管理の過程で、GRCh38/hg38 の参照配列において、GBAPI の参照配列の中に rare allele が登録されていることを見だし、Gaucher 病の診断において、頻度の高い病原性変異である p.L483P を見逃す可能性があり、留意すべき現象であった。

E. 結論

アカデミアにおいて、網羅的ゲノムシーケンス解析を、診療に提供することを実現するために、内部精度管理、外部精度管理のシステムを整備した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

2. 学会発表

辻 省次, 田中 真生, 野本 順子, 佐藤 奈穂子, 西垣 昌和. 単一遺伝子疾患のゲノム解析研究のミッションと改正医療法下の遺伝学的検査. 第29回日本遺伝子診療学会大会. 2022年7月15-16日. 金沢市

田中 真生, 野本 順子, 佐藤 奈穂子, 辻 省次. 次世代シーケンサーを用いたクリニカルシーケンスの実施にあたって必要となるプログラム群およびパイプラインに関する検討. 日本人類遺伝学会第67回大会. 2022年12月14-17日. 横浜市

佐藤 奈穂子, 田中 真生, 野本 順子, 西垣 昌和, 辻 省次. 次世代シーケンサーを用いたクリニカルシーケンスの診療体制の構築. 日本人類遺伝学会第67回大会. 2022年12月14-17日. 横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし