

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
国際医療福祉大学ゲノム医学研究所

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。診断確を目的として、全エクソンシーケンス解析の実施についての課題について、検討を行った。

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。

網羅的ゲノムシーケンス解析の精度管理について、内部精度管理、外部精度管理を実施した。さらに、診断確を目的として、全エクソンシーケンス解析の実施についての課題について、検

討を行った。

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 Bottle Project 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。

診断確定を目的として、全エクソンシーケンス解析の実施における課題について、あわせて検討を行った。

ALS の病因遺伝子は多数同定されていることから、全エクソンシーケンス解析を用いて家族性 ALS、孤発性 ALS について、網羅的な変異の解析を行った。さらに、孤発性 ALS について、*ATXN2* の ALS リスクアレルの関連についての検討を行った。

(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 に対応する変異を含めて、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。

神経変性疾患を含む単一遺伝子疾患の診断確定を目的としたクリニカルシーケンスを開始した。認定遺伝カウンセラーによる遺伝カウンセリングの提供体制を整備した。病原性の解釈については、基本的に ACMG のガイドラインに従い行ったが、データベースに登録のない新規の変異については、解釈が VUS (variants of uncertain significance)にとどまる場合が多かった。二次的所見については、ACMG が推奨している 78 遺伝子について、pathogenic variants が検出された場合に、希望があれば、臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラーから十分な説明、情報提供を行った。

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、exome 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。ALS については、全エクソンシーケンス解析の結果から、家族性 ALS 症例の 56 例 (64.4%)、孤発性 ALS 症例の 78 例 (20.7%) に ALS 病因遺伝子の稀な変異 (病原性変異を含む)を見出した。稀な変異が 2 個以上重複し

て検出された症例は、家族性 ALS の 7 例、孤発性 ALS の 6 例で認め、複数の稀な変異が病態に参与している可能性を見出した。日本人の SALS における ATXN2 の intermediate-length repeat の関連解析を実施し、日本人の SALS 群と健常者群の間で ATXN2 の ALS risk alleles のキャリアー頻度に有意な関連を認めず、集団における large normal alleles の分布の違いが今回の結果の背景にある可能性を示した。

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、*GBA1* 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。

Variants の解釈におけるデータベースに登録のない新規の変異については、常染色体顕性遺伝性疾患の場合、解釈が VUS (variants of uncertain significance)にとどまる場合が多く、機能解析研究の充実が求められる。

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、診断確定を目的とした全エクソンシーケンス解析の体制を構築した。

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