

ゲノム診断体制の整備

要 匡	国立成育医療研究センターゲノム医療研究部 部長
義岡 孝子	国立成育医療研究センター病院病理診断部 統括部長
藤野 明浩	慶應義塾大学医学部 教授
永田 公二	九州大学病院 講師
川久保 尚徳	九州大学大学院医学研究院 助教
下島 直樹	国立成育医療研究センター 診療部長
曹 英樹	川崎医科大学医学部 教授

【研究要旨】

希少難治性消化器疾患において、遺伝的要因を明らかにすることは、確定診断や個別医療の実現、分子病態解明にも重要である。本研究においては、国内の希少難治性消化器疾患患者に対するゲノム診断体制を構築することを第一の目的とする。具体的には、まず、各施設から臨床情報、検体の収集を行う体制を整え、次に、網羅的ゲノムシーケンス、データ解析、解釈、結果還元までの一連の体制を構築する。

令和5年度は、ゲノム解析体制の全体概要を作成し、課題の抽出を行うと同時に、実際の症例でのゲノム解析～結果提供を実践した。並びに、技術開発では、腸管神経節細胞僅少症を対象として、腸管組織の凍結切片よりLaser microdissection (LMD)を用いた筋間神経叢の切り出し条件（薄切条件、固定法、染色条件、LMD設定条件等）の検討を行った。

結果、技術開発においては、次世代シーケンス解析に十分な筋間神経叢の切り出し条件が設定され、患者検体での解析を開始した。実際の症例解析では、診断基準を満たさず診断が確定していない巨大膀胱、嘔吐を呈する患児のゲノム解析により、巨大膀胱短小結腸腸蠕動低下症候群（指定難病100）の確定診断に至り、また、バリエーション情報から適切な治療対応へとつながり、ゲノム解析の有用性が示された。

希少難治性消化器疾患のより良い医療の提供へ向け、引き続きゲノム解析の体制構築・整備、技術開発、症例解析実践を進めることが重要であると考えられた。

A. 研究目的

本研究では、1) 国内の希少難治性消化器疾患患者に対するゲノム診断体制を構築すること、2) 体制構築により、ガイドライン作成、新規治療開発に資するため、確定診断、層別化に重要なデータの算出、提供を行うこと、並びに、3) 実際に解析を実践し、患者還元を行う

ことを目的とする。1)～3)は、同時に進めつつ最終的な体制の構築を目指す。

希少難治性疾患の遺伝的要因を明らかにすることは、確定診断や個別医療の実現、分子病態解明に重要である。これは、原因不明、あるいは診断困難な希少難治性消化器疾患においても同様である。希少難治性消化器疾患患者で診断

が確定せず、治療方針等の決定に難渋する場合などに対して、当該疾患の遺伝的解析をスムーズに行える国内体制を構築することで、診断精度を向上させ、より良い医療、治療へ繋げることを目指す。加えて、患者の症状等の情報、ゲノム解析データを集積することで、疾患の層別化等に有用な結果の提供を行い、ガイドライン作成や原因遺伝子バリエーション等に基づく新規治療（治療法、治療薬）の開発に資するデータの算出・提供が可能となることも目指す。

具体的な体制構築については、まず、各施設から臨床情報、検体の収集の体制を整え、また、網羅的ゲノムシーケンス、データ解析、解釈、結果還元までの一連の体制を整備する。同時に、解析技術の開発、データ解釈のためのエキスパートパネル（必要に応じて病理診断とも連携）の整備も検討する。実際の症例について解析を実践し、結果の患者還元を行いつつ、課題の抽出、改良を行い、構築を進めていく。

本研究における目的・背景（現在までの準備状況）・全体計画については、別表にまとめた通りである（ゲノム解析グループ 目的・背景・計画）。本ゲノム診断体制については、関連学会などを通じて紹介、リクルート等の周知も行うこととする。

B. 研究方法

令和5年度は、以下を行った。

1. 体制構築

ゲノム解析（診断）体制の構築に向け、まず概要の設計を行うと共に、それぞれの課程について課題となる点の洗い出しを行った。これらについては、全国の難病のゲノム解析体制を参考にしつつ、必要項目を抽出し、希少難治性消化器疾患患者での解析において解決すべき点を挙げ、その具体的解決法を列挙することとした。

本体制整備には期間を要すると思われるが、すでに患者は生じており、また、診療を受けているので、並行して、必要に応じてゲノム解析を実践し、得られた結果について還元することとした（研究方法2）。

2. 解析実践

実際に解析を必要とする患者に対し、医療施設（担当医）より連絡・相談を受け、臨床情報の授受と共に、研究参加の同意取得後、検体受取、DNA抽出、ゲノム・データ解析を行った。ゲノム解析は、短鎖型次世代シーケンサを使用し、全エクソーム解析または全ゲノム解析を行

うこととした。次世代データ解析は、内製のパイプラインおよびin houseデータを活用してアノテーションに基づくバリエーションの絞り込み、キュレーション等を行い、患者症状の原因と思われる病的バリエーションの探索・抽出を行った。最終的な結果について、医療施設（担当医を通じた患者家族）への報告（還元）を行った。

3. 解析技術開発

今年度は、腸管神経節細胞僅少症を対象として、コントロール腸管組織の凍結切片よりLaser microdissection(LMD)を用いた筋間神経叢の切り出し条件（薄切条件、固定法、染色条件、LMD設定条件等）の検討、切り出し組織からの核酸抽出、を行い、次世代ゲノム解析のための品質確認等を行った。



Laser microdissection機器

C. 研究結果

1. 体制構築

国内の希少難治性消化器疾患患者に対するゲノム診断体制に向けた全体像を作成した（図：ゲノム解析体制の構築）。ゲノム解析相談窓口は、成育医療研究センターとし、疾患グループより横断的に相談、検体を受けることを想定した。これらの各パート（①臨床情報等の授受および検体送付、②ゲノム解析（実施、分担）、③解析法、④結果の提供）について検討した結果、現時点において解決すべき以下の課題が存在すると考えられ、情報提供の方法設定、提供用紙設定など解決に向けた対策を予定した。

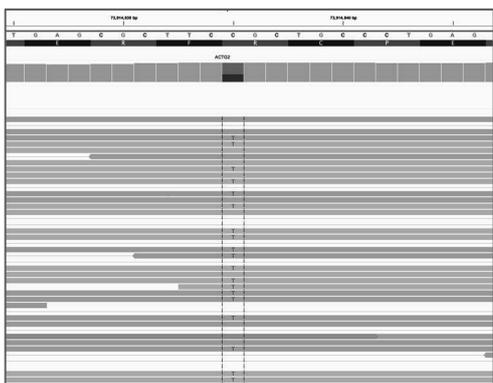
- ① 情報提供の方法（流れ）、情報提供用紙の整備、検体輸送法の整備
- ② 解析分担（グループ内）の整理
- ③ 解析検体（種類）の整理、解析手法の整理・選択、解析スタイルの想定
- ④ 報告方法、報告書の様式の策定・決定

うち、③については、患者状況に対応可能な迅速解析、網羅的解析の2つを想定し、検討することも必要と考えられ、検討を開始した。また、本解析グループは、各疾患グループからの

横断的に相談、検体を受けるが、対象疾患が課題となるため、検討、設定を開始した。

2. 解析実践

患児のゲノム解析、結果還元に至った相談事例として、生後16日の巨大膀胱、嘔吐を呈した男児を提示する。本児は胎児期に既に膀胱腫大を指摘されており、腹部X-rayにて小腸拡張を認めた。疾患の確定に至らず、同意取得後、短鎖型次世代シーケンサによる全ゲノム解析を施行、迅速解析により5日後に患児の病因と思われる*ACTG2*遺伝子の病的バリエントを特定した。本病的バリエント特定により、指定難病（100）である巨大膀胱短小結腸腸蠕動低下症候群（MMIHS type5）の診断が確定した。また、バリエントのタイプにより予後不良であることが判明し、家族への説明とともに理解を得、急変等に適切に対応（治療）でき、通院によるフォローアップへと繋がった。



患児に認められた*ACTG2*遺伝子病的バリエント（ヘテロ接合）

3. 解析技術開発

腸管神経節細胞僅少症の病変部分である筋間神経叢について、コントロール腸管組織の切片よりLMDを用いて壁内神経叢を正確に切り取り収集する手法を確立した。切り出した組織より核酸抽出を行い、変異解析が可能な品質のgenomic DNAが得られた。腸管神経節細胞僅少症検体（1検体）からのgenomic DNA抽出も行き、解析を開始した。

D. 考察

体制構築については、現在までのゲノム解析の経験に基づき全体の概要を作成したが、各パートの課題が抽出されたので、これら課題を順次解決していく必要があると考えられた。解決には、各様式等の設定に加え、安定した体制の整備に向け、手順書（SOP）等の作成も必要であると考えられた。また、これら課題は、現

時点で想定されるものであり、作業実施とともに新たな課題も見出されると思われるので、実際の症例等の解析を実施しつつ、解決を図ることが重要と考えられた。対象疾患については、希少難治性消化器疾患の中で、専門医が集積している疾患グループがカバーする指定難病（99慢性特発性偽性腸閉塞症、100巨大膀胱短小結腸腸管蠕動不全症、101腸管神経節細胞僅少症、291ヒルシュスプルング病、290非特異性多発性小腸潰瘍症、292総排泄腔外反症、295総排泄腔遺残、295乳幼児巨大血管腫）を対象とするのが良いと考えられた。特に、99慢性特発性偽性腸閉塞症、100巨大膀胱短小結腸腸管蠕動不全症、101腸管神経節細胞僅少症のいわゆるヒルシュスプルング病類縁疾患は、診断、原因解明、治療法探索において重要であり、まず、これらヒルシュスプルング病類縁疾患とヒルシュスプルング病（指定難病291）を中心としたゲノム解析の体制を構築することが効率的で適切と考えられた。

具体的な構築においては、まず患者情報等の連絡システム、臨床情報連絡交換、検体輸送のラインの確立、臨床情報または患者状況に応じてゲノム解析法の選択、データ解析パイプラインへの流し込みといった流れが想定され、症例解析で実践した。

今回の実際の症例解析では、ゲノム解析の迅速な結果提供が確定診断とその後の適切な治療対応にもつながったと思われた。技術的なことに関し、今回の症例の解析実践において、データ解析パイプラインは、内製の次世代データ解析共通パイプラインを使用した。本研究では、まず、ヒルシュスプルング病および類縁疾患を中心に据える予定であるので、それらの効果的な解析のため、疾患の原因遺伝子および症状・所見に関連する遺伝子に特化したパイプラインの改変修正・構築が、今後有用になると考えられた。

解析技術開発に関しては、LMD機器を用いた筋間神経叢切り出しによる核酸抽出は、コントロール腸管組織から解析に必要なgenomic DNAが抽出精製で疾患検体からも抽出、解析を開始できた。本手法により、標的部位での変異解析が可能と考えられた。

E. 結論

体制構築については、まず課題の抽出が行われ、それらにつき解決していくことで次の段階へと進むと思われ、今後も実際にゲノム解析を実践しつつ課題抽出と解決を図ることが重要と考えられた。

実際の症例（巨大膀胱、短小結腸を呈する患児）のゲノム解析では、臨床所見のみではMMIHSの診断基準を満たしていなかったものの、解析結果により原因遺伝子病的バリエントが明らかとなり、確定診断、疾患に対応した適切な診療・治療へとつながった。1症例であるが、ゲノム解析が有用であることが示され、今後も引き続き解析を実践しつつ体制を整備・構築していくことが重要と考えられた。

腸管神経節細胞僅少症の標的組織（筋間神経叢内細胞）を対象とした解析に関して、LMD機器を用いた筋間神経叢切り出しが有効と確認できた。今後、本手法を用いて病変領域のDNA変異解析・epigenetic解析、RNA発現解析を進める予定である。

本横断的ゲノム診断グループは、今年度より開始されたが、構築へのステップは計画通り進んでおり、また、当初より検体解析の実践もスムーズに行え、結果も得られた。次年度も引き続き体制構築計画のステップを踏むとともに、患者検体について、相談に応じて解析を実践、結果の還元を行いつつ、また、解析技術の開発も行うことで、目標とする体制構築を効率よく進めることができると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iida T, Igarashi A, Fukunaga K, Aoki T, Hidai T, Yanagi K, Yamamori M, Satou K, Go H, Kosho T, Maki R, Suzuki T, Nitta Y, Sugie A, Asaoka Y, Furutani-Seiki M, Kimura T, Matsubara Y, Kaname T. Functional analysis of RRAS2 pathogenic variants with a Noonan-like phenotype. (2024). *Front Genet*, in press
- 2) Shimabukuro W, Chinen Y, Imanaga N, Yanagi K, Kaname T, Nakanish K. Renal coloboma syndrome/dominant optic atrophy with severe retinal atrophy and de novo digenic mutations in PAX2 and OPA1. (2024). *Pediatr Nephrol*, in press
- 3) Ikeda K, Tamagake A, Kubota T, Izumi R, Yamaguchi T, Yanagi K, Misu T, Aoki Y, Kaname T, Aoki T. An adult case of Poretti-Boltshauser syndrome diagnosed by medical checkup. (2024). *Cerebellum*, in press
- 4) Nakamura W, Hirata M, Oda S, Chiba K, Okada A, Mateos RN, Sugawa M, Iida N, Ushiyama M, Tanabe N, Sakamoto H, Sekine S, Hirasawa A, Kawai Y, Tokunaga K; NCBN Controls WGS Consortium (Kaname T); Tsujimoto S-I, Shiba N, Ito S, Yoshida T, Shiraishi Y. Assessing the efficacy of target adaptive sampling long-read sequencing through hereditary cancer patient genomes. (2024). *npj Genom Med*, 9:11. doi: 10.1038/s41525-024-00394-z.
- 5) Nishi E, Yanagi K, Kaname T, Okamoto N. Clinical details of individuals with Rauch-Steindl syndrome due to NSD2 truncating variants. (2024). *Mol Genet Genomic Med*, in press.
- 6) STAT6 Gain-of-Function International Consortium (Sharma M, Suratannon N, Leung D, Baris S, Takeuchi I, Samra S, Yanagi K, Duque JSR, Benamar M, Del Bel KL, Momenilandi M, Béziat V, Casanova J-L, van Hagen PM, Arai K, Nomura I, Kaname T, Chatchatee P, Morita H, Chatila TA, Lau YL, Turvey SE). Human germline gain-of-function in STAT6: from severe allergic diseases to lymphoma and beyond. (2024). *Trends Immunol*, in press
- 7) Handa H, Sugiyama A, Kaname T, Shigemoto Y, Sato N, Hirano S, Nakagawa Y, Uzawa A, Aotsuka A, Kuwabara S. Frontal deficits and atrophy in a patient with neuroserpinosis with single-case voxel-based morphometry. (2023). *BMC Neurology*, in press.
- 8) Tokunaga S, Shimomura H, Taniguchi N, Yanagi K, Kaname T, Okamoto N, Takeshima Y. A novel DLG4 variant causes DLG4-related synaptopathy with intellectual regression. (2023). *Hum Genome Var*, in press
- 9) Hijikata A, Suyama M, Kikugawa S, Matoba R, Naruto T, Enomoto Y, Kurosawa K, Harada N, Yanagi K, Kaname T, Miyako K, Takazawa M, Sasai H, Hosokawa J, Itoga S, Yamaguchi T, Kosho T, Matsubara K, Kuroki Y, Fukami M, Adachi K, Nanba E, Tsuchida N, Uchiyama Y, Matsumoto N, Nishimura K, Ohara O. Exome-wide benchmark of difficult-to-sequence regions using short read next-generation DNA sequencing. (2023). *Nucleic Acids Res*, doi: 10.1093/nar/gkad1140. in press
- 10) Kawai Y, Watanabe Y, Omae Y, Miyahara R, Khor S-S, Noiri E, Kitajima K, Shimanuki H, Gatanaga H, Hata K, Hattori K, Iida A, Ishibashi-Ueda H, Kaname T, Kanto T, Matsumura R, Miyo K, Noguchi M, Ozaki K, Sugiyama M, Takahashi A, Tokuda H, Tomita T, Umezawa A, Watanabe H, Yoshida S, Goto Y-i, Maruoka Y, Matsubara Y, Niida S, Mizokami M,

- Tokunaga K. Exploring the genetic diversity of the Japanese Population: Insights from a Large-Scale Whole Genome Sequencing Analysis. (2023). *PLOS Genet*, in press
- 11) Aoki E, Manabe N, Ohno S, Aoki T, Furukawa J-I, Togayachi A, Aoki-Kinoshita K, Inokuchi J-I, Kurosawa K, Kaname T, Yamaguchi Y, Nishihara S. Predicting the pathogenicity of missense variants based on protein instability to support diagnosis of patients with novel variants of ARSL. (2023). *Mol Genet Metab Rep*, 2023. doi: 10.1016/j.ymgmr.2023.101016. in press
 - 12) Shimoda F, Naito T, Kakuta Y, Kawai Y, Tokunaga K; NCBN Controls WGS Consortium (Kaname T); Shimoyama Y, Moroi R, Shiga H, Nagasaki M, Kinouchi Y, Masamune A. HLA-DQA1*05 and upstream variants of PPARGC1B are associated with infliximab persistence in Japanese Crohn's disease patients. (2023). *Pharmacogenomics J*, doi: 10.1038/s41397-023-00312-z. in press.
 - 13) Kouno H, Kunishima S, Takebe J, Uchiyama T, Kaname T, Ishiguro A. Measurement of immature platelet fraction is useful in the differential diagnosis of MYH9 disorders. (2023). *Int J Lab Hematol*, 45(5):700-706. doi: 10.1111/ijlh.14123.
 - 14) Imanishi R, Nakau K, Shimada S, Oka H, Takeguchi R, Tanaka R, Sugiyama T, Nii M, Okamoto T, Nagaya K, Makita Y, Yanagi K, Kaname T, Takahashi S. A novel HECW2 variant in an infant with congenital long QT syndrome. (2023). *Hum Genome Var*, in press.
 - 15) Kawano S, Araki K, Bai J, Furukawa I, Tateishi K, Yoshinobu K, Usuki S, Nimmo R, Kaname T, Yoshihara M, Takahashi S, Sashida G, Araki M. A gain-of-function mutation in micro-RNA-142 is sufficient to cause the development of T-cell leukemia in mice. (2023). *Cancer Sci*, 114(7):2821-2834 doi: 10.1111/cas.15794.
 - 16) Haga S, Takeguchi R, Tanaka R, Satake A, Makita Y, Yanagi K, Kaname T, Takahashi S. Clinical characteristics of muscle cramps in hereditary angiopathy with nephropathy, aneurysms, and muscle cramps syndrome associated with a novel COL4A1 pathogenic variant: A family case study. (2023). *Brain Dev*, 45(7):390-394. doi: 10.1016/j.braindev.2023.02.008.
 - 17) Tanabe Y, Nomura N, Minami M, Takaya J, Okamoto N, Yanagi K, Kaname T, Fujii Y, Kaneko K. HIST1H1E syndrome with deficiency in multiple pituitary hormones. (2023). *Clin Pediatr Endocrinol*, 32(3):195-198. doi: 10.1297/cpe.2023-0002. in press.
 - 18) Yanagi K, Coker J, Miyana K, Aso S, Kobayashi N, Satou K, Richman A, Indupuru S, Matsubara Y, Kaname T. Biallelic CC2D2A variants, SNV and LINE-1 insertion simultaneously identified in siblings using long-read whole-genome sequencing and haplotype phasing. (2023). *J Hum Genet*, 68(6):431-435. doi: 10.1038/s10038-023-01130-8.
 - 19) Okano S, Makita Y, Miyamoto A, Taketazu G, Kimura K, Fukuda I, Tanaka H, Yanagi K, Kaname T. GRIA3 p.Met661Thr variant in a female with developmental epileptic encephalopathy. (2023). *Hum Genome Var*, 10(1):4. doi: 10.1038/s41439-023-00232-1.
 - 20) Takeuchi I*, Yanagi K*, Takada S, Uchiyama T, Igarashi A, Motomura K, Hayashi Y, Nagano N, Matsuoka R, Sugiyama H, Yoshioka T, Saito H, Kawai T, Miyaji Y, Inuzuka Y, Matsubara Y, Ohya Y, Shimizu T, Matsumoto K, Arai K†, Nomura I†, Kaname T†, Morita H†. STAT6 gain-of-function variant exacerbates multiple allergic symptoms. (2023). *J Allergy Clin Immunol*, †co-corresponding doi:10.1016/j.jaci.2022.12.802.
 - 21) Wada MK, Fukuhara Y, Hayakawa I, Kaname T, Ishiguro A. KARS-related diseases with macrothrombocytes and pulmonary arterial hypertension. (2023). *Pediatr Int*, 65(1):e15428. doi: 10.1111/ped.15428.
 - 22) Yamano S, Iguchi A, Ishikawa K, Sakamoto A, Uchiyama T, Yanagi K, Kaname T, Kunishima S, Ishiguro A. Splenectomy as an effective treatment for macrothrombocytopenia in Takenouchi-Kosaki syndrome. (2023). *Int J Hematol*, 117(4):622-625. doi: 10.1007/s12185-022-03491-w.
 - 23) Tamai M, Fujisawa S, Nguyen TTT, Komatsu C, Kagami K, Kamimoto K, Omachi K, Kasai S, Harama D, Watanabe A, Akahane K, Goi K, Naka K, Kaname T, Teshima T, Inukai T. Creation of Philadelphia chromosome by CRISPR/Cas9-mediated double cleavages on BCR and ABL1 genes as a model for initial event in leukemogenesis. (2023). *Cancer Gene Ther*, 30(1):38-50. doi:10.1038/s41417-022-00522-w.

- 24) 要 匡、柳久美子：【遺伝を考える】
Genome Data Viewer. 日本医師会雑誌、
152:S13-S14, 2023.
- 25) 要 匡：【遺伝を考える】 遺伝学的診断
個別診療分野における遺伝学的診断の進歩
未診断疾患イニシアチブ. 日本医師会雑誌、
152: S128-S131 2023.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし