

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08884

研究課題名(和文) 死後遺伝子検査の実践と課題の抽出

研究課題名(英文) Issues in practice of the postmortem genetic testing

研究代表者

大澤 資樹 (OSAWA, Motoki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90213686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：原因が特定できない乳幼児の突然死に対して、死後にゲノム解析から死因となった疾患を推定する死後遺伝子検査が普及し始めている。不整脈疾患や脂質代謝異常疾患が主な対象であり、今回の研究では法医解剖となった19例に実施し、2例に重大な心臓疾患を来しうる変異を検出できた。一方で、ゲノム解析なので、診断に加えて、残された家族への配慮が必要である。死後遺伝子検査を実施する中で、臨床医と遺伝カウンセラーにグリーフケアを含めて遺伝相談に当たってもらうことができた。病院内の異なる専門家が集まり役割分担をする中で、予期せず子供を失った家族に対応する体制の原型作りができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The postmortem genetic testing to unexpected sudden deaths in infant is becoming popular to deduce the cause of death, in which inheritable disorders such as arrhythmia and impaired fatty acid metabolism are subjects of investigation. In this study, we detected two critical nucleotide substitutions for fatal disorders among 19 examined cases. In addition to diagnosis, care for family members should be necessary in the genome analysis. In the present examined cases, genetic counseling including grief care was performed to parents in cooperation with genetic counselors and clinical doctors. We think a new system to take care of family members has been developed by the multidisciplinary approach including various stuffs in hospital.

研究分野：法医学

キーワード：乳幼児突然死症候群 次世代シーケンサー QT延長症 プルガダ症候群 遺伝カウンセリング

1. 研究開始当初の背景

チャイルド・デス・レビュー (child death review, CDR) とは、乳幼児を中心とした小児の突然死や事故死を様々な角度から検討し、再発予防を提言する体制のことであり、欧米を中心に制度化され広く展開している。異状死体の剖検を行う法医学領域では、当初健康状態が良好で予期しない内因性急死を多く扱う。剖検を行っても、死因が不明な場合には、乳幼児突然死症候群 (sudden infant death syndrome, SIDS) と診断する場合もある。しかし、原因不明の突然死でも、臨床遺伝学研究から減数分裂時の変異 (de novo 突然変異) が原因となる QT 延長症などの常染色体優性遺伝の疾患が含まれていることが明らかにされている。このような剖検例に対して診断目的でゲノム解析を進めてゆく手法を、死後遺伝子検査 (postmortem genetic testing) ないし molecular autopsy と呼んでいる。網羅的なゲノム解析が必要となるが、廉価で実施が可能となるにつれて、今後の普及が予想される。それに備えて、確実な診断体制と家族への配慮が求められるので、問題点や課題を見つけ出す必要性がある。

2. 研究の目的

死後遺伝子検査では、遺伝性疾患が対象となるので、家族にも異常となる変異が共有されている可能性があることが、CT 画像といった剖検時検査と異なる特殊な状況となる。豪州・NZ では、臨床系学会が法医学とコロナーに向けて "Post-mortem in sudden unexpected death in the young: Guidelines on autopsy practice" (2008) と題した死後遺伝子検査に関するガイドラインを作成し公表している。内容は、対象疾患の説明、遺伝性疾患の特殊性、剖検や検体採取上の注意点、遺族への対応などを含んでいる。しかし、遺伝カウンセラーを認定している日本人類遺伝学会は、法医学を対象外としており、対応を受けられるのか不明である。今回の研究では、検査を実施する中で法医学ができることは限られるので、遺族への環境調査、倫理面での配慮等の課題を抽出し、小児科医・遺伝学者・遺伝カウンセラーらとの共同作業を実践し、死後遺伝子診断を実行性のあるものに確立してゆくことを目的としている。また、対象の大半は1歳未満の乳幼児であり、残された家族への悲嘆 (グリーフ) ケアの側面も含めて、どのような対応が可能なのか検討を加えてみた。

3. 研究の方法

剖検にて死因不明とせざるをえなかった乳幼児突然死例に対して、網羅的ゲノム解析を行った。まず抽出した DNA について、Ion AmpliSeq Inherited Disease Panel (Life Technologies) を用いてライブラリーを作成した。これを Ion PGM 次世代シーケンサーにアプライし、DNA 配列を得た。さらに、循環

器系疾患に関連する 52 遺伝子について Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 を用いて、ミスセンス変異をコールした。タンパク分子機能への影響を予測する解析ソフトを複数用いて、これらを definitive class と possible class に分け、文献での報告も参考にして、発症につながる可能性のある変異を確認していった。

死亡時の状況も併せて考えた時に、発症につながったと可能性が高いと思われる変異があった場合に、付属病院の遺伝診療部と協議し、遺族にどう伝え、カウンセリングを行うことが可能か討議を進めた。これらの実践的試みの中で、死後遺伝子検査のガイドライン作成やカウンセリングシステムの開拓を進め、将来実施が期待される CDR に向けて実践的な試行を進めていった。なお、本研究は、東海大学医学部医の倫理委員会の承認を得て実施されている。

4. 研究成果

研究期間内に、法医学解剖となった予期されない乳幼児の突然死 19 例に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子検査を実施した。対象は0ヶ月児から1歳7ヶ月児で、親の書面による代諾の上、解析を進めた。Ion PGM 次世代シーケンサーでは、各事例における coverage はおおむね 20 万 ~ 340 万リード、52 遺伝子での変異検出数は 50 ~ 155、ミスセンス変異の数は 14 ~ 23 であった。これらのうち、definitive class と判断したものを表 1 に挙げる。

表 1 検出された主な変異

遺伝子	変異	ミスセンス
MYLK	G>T, hetero	Asp914Glu
	A>G, hetero	Leu861Pro
	G>A, hetero	Arg845Cys
AKAP9	insAAC, hetero	Leu1336insThr
KCNH2	delG, homo	Frameshift
MYH7	G>A, hetero	Thr441Met
HCN4	G>A, hetero	Pro1056Ser
KCNE1	T>C, homo	Ser38Gly
KCNQ1	insC, hetero	P631fs/19

これらの中で、2 例は先天性循環器系疾患の発症による突然死が強く疑われた。1 例は KCNQ1 遺伝子の変異で、過去に QT 延長症の 2 例で報告がある変異で、循環器科へのコンサルトの結果でも、小児発症型 QT 延長症と診断するのが適当との意見だった。もう 1 例は、心筋症を発症する可能性のある変異を MYH7 遺伝子に見出すことができた。さらに、この事例では親とのやり取り中で、次の妊娠に対して不安を訴えたために、付属病院遺伝診療部の遺伝カウンセラーに対応を依頼した。臨床心理士が遺族の対応に当たる実践ができ、

両親は納得した様子であった。この事例をきっかけに突然死を経験した親に対して、グリーフケアを含めて対応できるように遺伝診療科を含めた体制ができた。また、専用のパンフレット作成までできた。

この経験から、想定される死後遺伝子検査に関する対応体制としては、突然死の解剖を担当する法医学を端緒とし、まず残された家族を中心に置くことが大切である。そして、病態をよく知り治療法を知る臨床医と、グリーフを含めた遺伝相談に当たるカウンセラーを巻き込んだ多方面からのアプローチを展開する必要がある。その大まかなイメージを図1にまとめてみた。

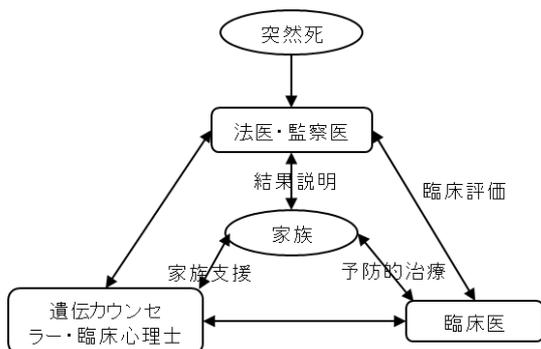


図1 乳幼児突然死のあった家族に対する多方面からのアプローチの模式図

2016年3月には第22回日本SIDS乳幼児突然死予防学会学術集会を横浜で主催し、CDRに関するシンポジウムを開催し、我々の死後遺伝子診断における取り組みについて発表した。CDRでは、虐待や託児中の急変など社会的に問題となる事例が対象となりやすいが、予期しない突然死全般に対応することに理解を得られた。会議では活発な議論がなされ、特に米国での実施体制における法的整備が非常に参考になった。わが国においても制度として導入してゆく必要があり、その一翼を担ってゆきたいと改めて考えている。

この多方面からのアプローチは、死後遺伝子検査以外の事例でも有効であった。3ヶ月児の突然死例において、死亡の2日前に受けたワクチン接種（肺炎球菌、ヒブ）と死亡との因果関係が問題となった。小児科医と連絡と取りあい意見書をまとめ、救済制度に認定を受けることができた。やはり、多方面からの専門家が力を合わせて、乳幼児の急死における死因の解析、事後対応や予防措置まで検討してゆくことの重要性が確認できた。今後は、実施数を増やし、可能な限りマニュアル化を進めて、家族への包括的な対応ができる体制作りができるようにしてゆかなければならない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12件)

落合恵理子, 松島裕, 垣本由布, 大澤資樹. 次世代シーケンサーを用いた死後遺伝学的検査: 突然死例に対する循環器系疾患関連遺伝子解析. DNA 多型、査読無 25(1):164-166, 2017.

Tamura T, Osawa M, Kakimoto Y, Ochiai E, Suzuki T, Nakamura T. Combined effects of multiple linked loci on pairwise sibling tests. Int J Legal Med 査読有 131(1):95-102, 2017. (doi: 10.1007/s00414-016-1491-4).

尾中啓枝, 引間涼子, 澤口範真, 黒木明信, 大澤資樹: 東海大学医学部付属病院における法医学教室と遺伝子診療科の連携 グリーフケアについて. 日本SIDS乳幼児突然死予防学会雑誌、査読有 16(1), 20-27, 2016.

近藤朱音, 長谷川巖, 大貫優子, 高橋千果, 尾中啓枝, 森屋宏美, 溝口満子, 大澤資樹, 前田和寿, 和泉俊一郎. 法医学部門と遺伝診療部門にて診療連携した2症例. 日本染色体遺伝子検査学会雑誌. 査読有 34(1):48-55, 2016.

Kakimoto Y, Seto Y, Ochiai E, Satoh F, Osawa M. Cytokine Elevation in Sudden Death With Respiratory Syncytial Virus: A Case Report of 2 Children. Pediatrics 査読有 138(6):e20161293, 2016.

Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Hayashi H, Ochiai E, Osawa M. MicroRNA deep sequencing reveals chamber-specific miR-208 family expression patterns in the human heart. Int J Cardiol 査読有 211:43-8, 2016. (doi: 10.1016/j.ijcard.2016.02.145.)

大澤資樹, 中留真人, 落合恵理子, 宮下京子, 垣本由布, 佐藤文子: 疾病診断目的の死後遺伝学的検査における倫理面の一考察. DNA 多型、査読無 23(1):191-194, 2015.

Osawa M, Inaoka Y, Nakatome M, Miyashita K, Ochiai E, Kakimoto Y, Satoh F, Matoba R. Association analysis of CYP2A6 polymorphism to sudden and unexpected death of infants. Integr Mol Med 査読有 2(2):142-144, 2015. (doi: 10.15761/IMM.1000129)

Satoh F, Seto Y, Tsuboi A, Osawa M. Regressive changes of the myocardial sleeves in elderly victims of sudden bathtub death. Forensic Medicine and Anatomy Research 査読有 3:57-65, 2015, (<http://dx.doi.org/10.4236/fmar.2015.32011>)

Tamura T, Osawa M, Ochiai E, Suzuki T, Nakamura T. Evaluation of advanced multiplex short tandem repeat systems in pairwise kinship analysis. Leg Med 査読有 17(5):320-325, 2015. (doi:

10.1016/j.legalmed.2015.03.005)
Kakimoto Y, Kamiguchi H, Ochiai E, Satoh F, Osawa M. MicroRNA Stability in Postmortem FFPE Tissues: Quantitative Analysis Using Autoptic Samples from Acute Myocardial Infarction Patients. PLoS One 査読有 10(6):e0129338, 2015. (doi: 10.1371/journal.pone.0129338)
Inaoka Y, Osawa M, Mukasa N, Miyashita K, Satoh F, Kakimoto Y. Allelic imbalance of mRNA associated with 2-HS glycoprotein (fetuin-A) polymorphism. Dis Markers 査読有 Article ID 865053, 2015. (<http://dx.doi.org/10.1155/2015/865053>)

〔学会発表〕(計 11 件)

大澤資樹, 垣本由布, 垣内康宏, 坪井秋男, 佐藤文子 剖検からみた予防接種後の乳幼児突然死例. 第 24 回 日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会, 2018 年 2 月, 京都.

Ochiai E, Kakimoto Y, Seto Y, Tsuboi A, Matsushima Y, Osawa M: Postmortem genetic testing using the next generation sequencing system: Evaluation of cardiovascular disease analysis panel. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2017 年 9 月, Düsseldorf, Germany.

大澤資樹 法医解剖データからの乳幼児突然死症候群 (SIDS) 診断のための問診・チェックリスト記入. 第 23 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会, 2017 年 3 月, 津.

落合恵理子, 松島裕, 垣本由布, 大澤資樹. 次世代シーケンサーを用いた死後遺伝学的検査: 突然死例に対する循環器系疾患関連遺伝子解析. 日本 DNA 多型学会第 25 回学術集会. 2016 年 11 月, 千葉.

Osawa M, Ochiai E, Kakimoto Y, Satoh F. Allelic imbalance of mRNA transcription in 2-HS glycoprotein (fetuin-A) gene. 13th International Congress of Human Genetics (ICHG). 2016 年 10 月, Kyoto.
落合恵理子, 松島裕, 垣本由布, 大澤資樹. 乳幼児突然死例に対する死後遺伝学的検査. 第 23 回日本遺伝子診療学会大会. 2016 年 7 月, 東京.

落合恵理子, 宮下京子, 松島裕, 垣本由布, 佐藤文子, 大澤資樹. 乳幼児突然死例に対する次世代シーケンサーを用いた死後遺伝学的検査. 第 22 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会. 2016 年 3 月, 横浜.

垣本由布, 瀬戸良久, 松島裕, 佐藤文子, 大澤資樹. RS ウイルス感染により突然死した幼児症例とその法医学的診断法. 第 22 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会学術集会. 2016 年 3 月, 横浜.

落合恵理子, 宮下京子, 水口 清, 垣本由布, 佐藤文子, 大澤資樹. 次世代シーケンサーを用いた Y 染色体ハプログループ解析. 日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会, 2015 年 11 月, 岡山.

Osawa M, Miyashita K, Ochiai E, Tamura T, Kakimoto Y, Satoh F. NGS Application To Forensic Kinship Analysis. 5th Annual Next Generation Sequencing Asia Congress. 2015 年 10 月, Singapore.

大澤資樹, 内因性急死に対する遺伝学的病態解析 (特別講演) 第 99 次日本法医学会学術全国集会, 2015 年 6 月, 高知.

〔図書〕(計 2 件)

大澤資樹: 「遺伝子検査技術-遺伝子分析化学認定士テキスト-」(改訂第 2 版、2016 年 1 月) 克誠堂出版、一般社団法人日本遺伝子分析科学同学院編(分担) 第 3 章 遺伝子関連検査結果の評価 F. 個人識別, pp. 274-279, (ISBN 978-4-7719-5070-2)

大澤資樹: ゲノム解析による個人識別法のあらたな展開(解説). 医学のあゆみ「ゲノム医療時代の遺伝子関連検査の現状と展望」261(3):265-267, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://forensic.med.u-tokai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 資樹 (OSAWA, Motoki)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 90213686

(2) 研究協力者

垣本 由布 (KAKIMOTO, Yu)
東海大学・医学部・講師

落合 恵理子 (OCHIAI, Eriko)
東海大学・医学部・特任助教