

令和元年6月14日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08980

研究課題名(和文)メンデル遺伝病の補完遺伝子検査システムの構築と遺伝医療における社会実装

研究課題名(英文)Construction of complementary genetic testing system for Mendelian genetic disease and social implementation in genetic medicine

研究代表者

新井田 要(NIIDA, Yo)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：40293344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本邦ではメンデル遺伝性疾患の遺伝子検査は、検査の原価と保険診療報酬との乖離のため検査会社が供給できず、未だに普及していない。また、従来の翻訳領域配列を決定する方法のみでは検出できない遺伝子変異が存在する。本研究では新たにMugCap (Multiple gene competitive amplification)法とLong-PCR based NGS (Next generation sequencing)法を開発し、補完的に組み合わせることでより網羅的な遺伝子検査システムを構築した。開発した方法は検査原価を低く抑えることが可能であり、本検査システムは実臨床で患者に安価に提供されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たな遺伝子検査法を開発し、これをアルゴリズムに従って組み合わせることで網羅的かつ補完的な遺伝子検査システムを構築することが出来た。これにより従来は検出不能であった低頻度モザイク変異や、深部イントロン変異によるスプライシング異常、大欠失のbreak pointの同定などが容易となり、遺伝子検査の精度は飛躍的に向上した。本検査システムは金沢医科大学病院ゲノム医療センターで診断目的の遺伝子検査として導入されており、安価に患者に提供されている。多くの遺伝性疾患を持つ患者および家族の遺伝子診断、遺伝カウンセリングに有用であることは勿論、指定難病や小児慢性特定疾患の申請の際にも役立っている。

研究成果の概要(英文)：In Japan, genetic testing for Mendelian inherited diseases has not been widely used because clinical testing companies can not supply the tests due to the discrepancy of the cost for testing and the insurance fee. In addition, there are several gene mutations that can not be detected only by conventional methods, determining the sequences of whole coding regions and exon-intron boundaries. In this study, we developed MugCap (Multiple gene competitive amplification) and Long-PCR based NGS (Next generation sequencing) and combined them complementarily to construct a more comprehensive gene testing system. This system can detect low frequency mosaic mutation and splicing mutation due to deep intronic substitution. Also, these developed methods can keep the low cost of examination, and whole examination system is provided at low cost to patients who visit our hospital.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：遺伝子検査学 臨床遺伝学 遺伝子診断 遺伝子変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

約 7000 種類あるとされるメンデル遺伝病(単一遺伝子病)のうち、既に半数を超える疾患において原因遺伝子が同定されており、遺伝子検査は患者の正確な診断と治療、遺伝カウンセリングのために、かつてないほど重要となってきた。多くの疾患の診療ガイドラインや指定難病、小児慢性特定疾患の診断基準に遺伝子検査が盛り込まれているが、国内では臨床目的の遺伝子検査を供給できていない実態がある。欧米では 3000 疾患以上の遺伝子検査が臨床検査として提供されているのに対し、本邦で保険収載された遺伝学的検査は 36 項目に過ぎない(その後 2018 年の診療報酬改定で 75 項目に拡大)。この差は技術水準の差ではなく、医療保険制度の違いによるところが大きい。遺伝子検査は実費で 10~20 万円/検体と高価であるが、欧米では中産階級以上にとっては各自が加入している民間の医療保険でカバーされるため、患者負担は 1~2 万円程度で済んでいる。一方日本では、皆保険制度による遺伝子検査の診療点数が 3800 点と規定されており(2018 年の診療報酬改定で、容易なもの 3,880 点、複雑なもの 5,000 点、極めて複雑なもの 8,000 点の 3 段階となる)、採算が取れないために検査会社が受注しているのは 36 項目中 7 項目にすぎない(2019 年 6 月時点で 75 項目中 20 項目)。このような社会情勢の中、国内で遺伝子検査を普及させるためには検査にかかるコストを大幅に引き下げ、かつ簡便で高感度な変異スクリーニング法の開発が必要であった。研究代表者は酵素ミスマッチ切断法の応用である CHIPS (CEL nuclease mediated heteroduplex incision with polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining)法を開発し、所属する金沢医科大学病院集学的医療部遺伝子医療センター(現ゲノム医療センター)での診療に用いている。200 項目以上の遺伝子検査を、保険収載された遺伝子検査の患者負担分と同額の自由診療で提供しており、年間 100 件を超える検査実績を持つ。しかしながら、この経験を通じ、従来の遺伝子検査法、すなわち翻訳領域およびエクソン・イントロン境界の DNA 塩基配列決定では不十分であることが判明した。疾患責任変異には、染色体レベルや遺伝子配列内部の大欠失/重複変異、調節領域やイントロン内部の変異による mRNA 発現量の低下やスプライシング異常による変異、さらには体細胞モザイク変異による発症例があり、従来の方法では平均 70%程度の検査陽性率しか得られない。そこで以前 CHIPS 法を開発した時と同様に、安価で効率の良い補完的な遺伝子検査システムを構築し、これを実際の診療に導入する必要性が生まれた。

### 2. 研究の目的

(1) 従来の遺伝子検査法では同定が困難であった、コピー数変異(大欠失/重複変異)、発現変異(mRNA 発現量の低下やスプライシング異常)、モザイク変異を一定のフローチャートに従い、安価かつ効率的に検出するシステムを構築する。一次検査の結果に応じて、必要となる補完的検査を追加することで診断率の向上を図る。

(2) 構築したシステムを病院の遺伝子診療部で実臨床に応用し社会実装化を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究は当初以下の原理と計画に基づき実施された。任意のゲノム領域のコピー数を測定するための MugCap (Multiple gene competitive amplification)法と、体細胞モザイク変異を検出するための COLD-CHIPS (Co-amplification at lower denaturation temperature PCR with CHIPS)法を新たに開発する。変異スクリーニングはまず CHIPS 法で行う。CHIPS 法で変異が同定されなかった場合、翻訳領域に多型を認めた場合は、この多型部位を RT-PCR で増幅し両アレルの発現量を比較する(EAT, Expressing Allele Test)。片アレルのみが強く発現しているなら、他方のアレルに発現低下変異が存在する。多くの遺伝子は末梢リンパ球で mRNA 発現を持っているため RT-PCR は有用な解析ツールとなる。翻訳領域に多型を認めなかった場合は MugCap 法で遺伝子コピー数を測定する。大欠失/重複があれば検出される。MugCap 法で全て 2 コピーであれば、MugCap 法のプローブ領域をプライマーとした Long-PCR (Anchored Long-PCR)を行う。プライマー部は 2 コピーである事が分かっているので、Long-PCR の増幅範囲に欠失/重複があれば検出される。また、deep intronic 変異によるスプライシング異常は、複数の RT-PCR プライマーセットで全翻訳領域をタイリングすれば(Tiling RT-PCR)検出可能である。全ての検査で陰性の場合、翻訳領域正常の mRNA が両アレル性に発現していることとなり、家族例の 2 世代目以降の患者であれば解析対象遺伝子が疾患の原因であることは否定的となる。一方孤発例では体細胞モザイク変異による発症の可能性が残され、これは COLD-CHIPS により検出を行う。

(2) 遺伝子のコピー数検定には MLPA(multiplex ligation-dependent probe amplification)法が主に使用されているが、この方法はプローブの作成が困難で自由度が低く、試薬が割高である事から、予想された程には普及していない。MugCap 法はこれを補うもので、その原理は単純である。PCR プライマーと同様、ターゲット特異的な 20mer のプローブ配列を DNA の同一鎖上に設

計する。各プローブには共通の 20mer の PCR プライマー配列が連結されている。この 40mer のオリゴヌクレオチドの合成は通常のプライマー合成と同様に安価に外注できる。プローブを DNA の目的領域にハイブリダイゼーションさせ、プローブ間を Taq DNA polymerase で合成し、Taq ligase で接続する。酵素は同時に加え 60、15 分の反応で完了する。共通 PCR プライマーで増幅すると、ターゲット間で競合 PCR となり、コピー数を反映して増幅される。

(3) COLD-CHIPS は COLD-PCR (Co-amplification at lower denaturation temperature PCR) を用いて変異 DNA と野生型 DNA のヘテロデュプレックスを濃縮した後に CHIPS 法で検出する方法である。これにより低頻度の体細胞モザイク変異の検出が可能となる。COLD-PCR の原理は左に示す通りで、ヘテロデュプレックスの方がホモデュプレックスに比較してより低い温度で熱変性され、選択的に増幅されることを利用している。原理は単純であるが、多様な変異に対し汎用性を持つて使用できるように至適化する必要がある。

#### 4. 研究成果

(1) MugCap 法：プローブ間を通常の Taq polymerase で伸長すると、5' to 3' exonuclease 活性のために 3' 側プローブが分解されることが判明。またアガロースゲル電気泳動によるバンド強度測定には定量性に問題がある

事が判明した。このため 5' to 3' exonuclease 活性を持たない Klen Taq polymerase へ変更し、蛍光キャピラリーシーケンサーによるフラグメント解析を導入した。この改良によりコピー数決定が容易に行えることが示された。図 1 は結節性硬化症患者サンプル TS53, TS72 で各々 TSC1 遺伝子 TSC2 遺伝子のプローブ領域の欠失が定量的に示されている。また、この技術は、Long-PCR 法と組み合わせる事で、ミトコンドリア三頭酵素欠損症の責任遺伝子 HADHA の未知の大欠失変異の break point を決定することが可能であった (5. 雑誌論文)。MugCap 法によるスクリーニングで欠失が存在

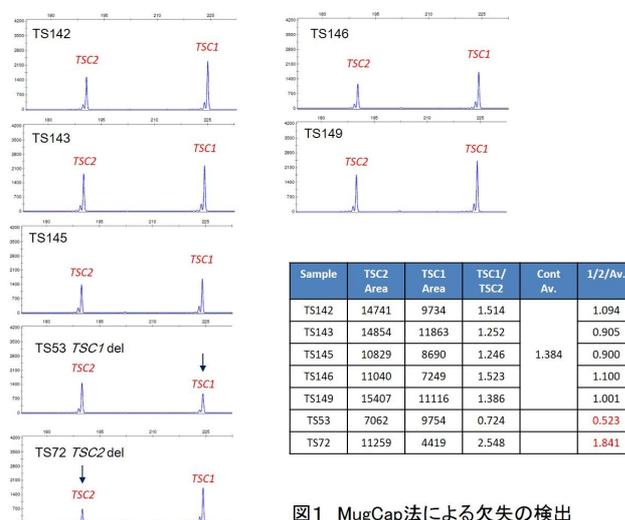


図1 MugCap法による欠失の検出

すると目されるゲノム領域周辺を、2 コピー領域と 1 コピー領域 (欠失領域) に仕分け、欠失を跨ぐ最近傍の 2 コピー領域に Long-PCR Primer を設定することで、break point を含む PCR 増幅産物を得ることが出来た (MugCap walking 法)。この産物を、ダイレクトシーケンシングすることで、break point の DNA 配列を決定し、Alu-Alu recombination による欠失であることを、クローニングすることなく突き止めた。これは Anchored Long-PCR 法の応用例の一つとして注目に値する成果である。

(2) COLD-CHIPS 法とモザイク変異検出：COLD-PCR 法の至適化を行い、いくつかの遺伝子変異で変異アレルの濃縮、モザイク変異の検出は可能であったが変異のパターンや周辺 DNA 配列により結果は大きくばらついた。これは変異を含む DNA 配列に依存して、変異アレルを分離するための至適な変性/アニーリング温度が異なる事に起因すると考えられた。従って、本法においては各変異に対する個別の至適化が必須となり、単一プロトコルによる低頻度モザイク検出は困難であると結論された。解決のための代案として次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的解析法を考案した。NGS を用いた遺伝子診断は、一般には高価となるが Long PCR base とし、イルミナ社の Nextera を用いてライブラリー作成を行う事で、低価格化が可能である。15~20Kb の Amplicon で解析遺伝子領域をタイリングすることで塩基置換のみならず、大欠失等の構造変異も同時検出可能である。また Amplicon に多型が存在しない場合には、さらに大きなレベルの欠失が存在する事が予想され、これを昨年度までに開発した MugCap 法にて確認できることを示した。さらに、多くの遺伝子で末梢白血球由来 RNA で全長 mRNA の RT-PCR が可能であり、これも同様に NGS の系でライブラリーを作成する事ができる。Index を変えることで複数検体に関して、特定遺伝子のイントロンを含めた全 DNA 配列と全 mRNA を一度に解析する事ができ、その成果として、TSC1 の深部イントロン変異によるスプライス異常の家族例を報告した (5. 雑誌論文)。また、NGS の特性を生かし depth を増やすことで癌の生検材料において SMAD4 遺伝子の 1% のモザイク変異 NM\_005359.5(SMAD4):c.389C>T p. (Pro130Leu) を検出し得た (図 2)。この例では、検体を duplicate し、NGS で検出された、共通の低頻度アレルコールを抽出している。この変異

隣臓癌 胸膜播種 Duplicate samples  
 L 患者リンパ球  
 P 患者胸水 腫瘍細胞含有率2%

NM\_005359.5(SMAD4):c.389C>T p.Pro130Leu

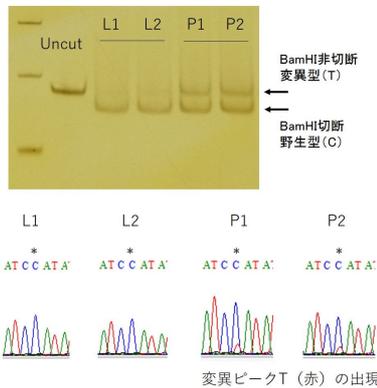
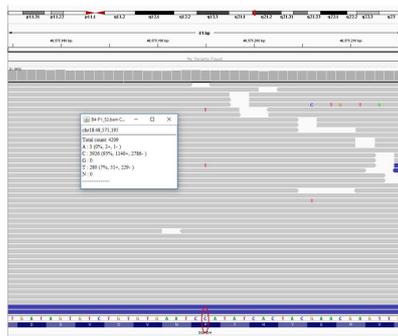


図2 低頻度モザイク変異の検出

が実在するかを確認するため、野生型アレルが制限酵素 BamHI で切断され、変異型アレルが切断されないことを利用して Nested PCR を行い変異アレルを濃縮したところ、サンガー法で変異アレルピーク(T)の出現が確認された。このように Long PCR base の NGS 解析は、特定遺伝子の遺伝子診断において網羅的な解析を安価に提供できることが証明

され、本研究課題の目的は達成された。

(3) 遺伝子検査システム概要:本研究により達成されたメンデル遺伝病の遺伝子検査システムは以下の通りとなる(図3)。

まず CHIPS 法により変異スクリーニングを行う。変異が同定できなかった場合は、RT-PCR によりスプライシング変異及び発現変異を確認する。また大欠失が想定される場合は MugCap 法で確認。欠失範囲の確定は広域には DNA マイクロアレイを使用、局所的には MugCap walking 法で break point を定める。それでも変異が同定できない場合は Long PCR 法により遺伝子ゲノム領域をカバーすると同時に、全長 cDNA を合成し、これを NGS 解析する。PCR 産物を deep

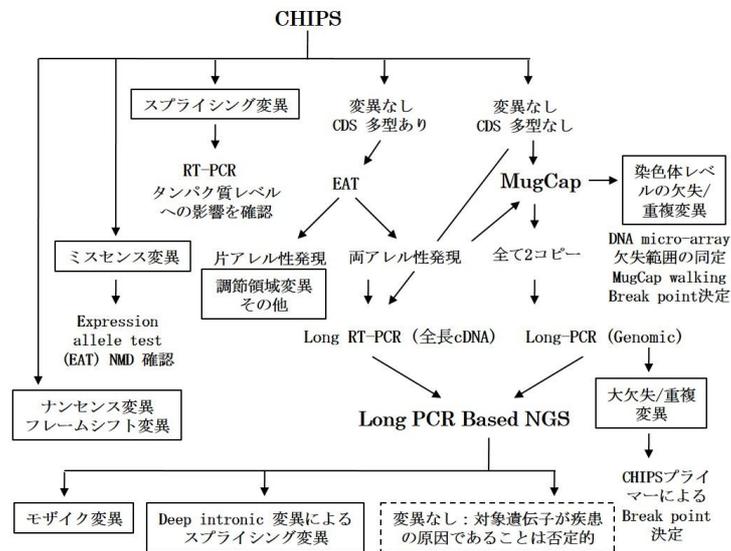


図3 網羅・補完的遺伝子検査システム

sequence することでモザイク変異の同定が可能である。また DNA データと cDNA データを突き合わせることで、深部イントロン変異によるスプライシング異常の解釈が可能となる。本システムは金沢医科大学病院ゲノム医療センターで、臨床診断目的での運用が開始されている。これにより、従来検出できなかった様々なタイプの疾患責任遺伝子変異の同定が可能となっている。なお本研究の成果は論文発表や学会発表により広く内外に周知された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Shoji T, Konno S, Niida Y, Ogi T, Suzuki M, Shimizu K, Hida Y, Kaga K, Seyama K, Naka T, Matsuno Y, Nishimura M. Familial multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia with a novel splicing mutation in TSC1: Three cases in one family. PLoS One. 2019 Feb 22;14(2):e0212370. DOI: 10.1371/journal.pone.0212370. 査読あり

Sako S, Niida Y, Shima KR, Takeshita Y, Ishii KA, Takamura T. A novel PHEX mutation associated with vitamin D-resistant rickets. Hum Genome Var. 2019 Feb 14;6:9. DOI: 10.1038/s41439-019-0040-3. 査読あり

Yasui Y, Sato H, Niida Y, Kohno M. Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 associated with novel compound heterozygous mutations in IGHMBP2: Differential diagnosis in a case with congenital diaphragm eventration. Congenit Anom (Kyoto). 2019 Jan;59(1):22-23. DOI: 10.1111/cga.12280. 査読あり

Yokoi A, Niida Y, Kuroda M, Imi-Hashida Y, Toma T, Yachie A. B-cell-specific

accumulation of inclusion bodies loaded with HLA class II molecules in patients with mucopolysaccharidosis II (I-cell disease). *Pediatr Res.* 2018 Nov 21. DOI:10.1038/s41390-018-0234-2. 査読あり

Kondo T, Niida Y, Mizuguchi M, Nagasaki Y, Ueno Y, Nishimura A. Autopsy case of right ventricular rhabdomyoma in tuberous sclerosis complex. *Leg Med (Tokyo)*. 2019 Feb;36:37-40. DOI: 10.1016/j.legalmed.2018.10.001. 査読あり

Niida Y, Ozaki M, Shimizu M, Ueno K, Tanaka T. Classification of Uniparental Isodisomy Patterns That Cause Autosomal Recessive Disorders: Proposed Mechanisms of Different Proportions and Parental Origin in Each Pattern. *Cytogenet Genome Res.* 2018;154(3):137-146. DOI: 10.1159/000488572. 査読あり

Niida Y, Inoue M, Ozaki M, Takase E. Human Malformation Syndromes of Defective GLI: Opposite Phenotypes of 2q14.2 (GLI2) and 7p14.2 (GLI3) Microdeletions and a GLI/R Balance Model. *Cytogenet Genome Res.* 2017;153(2):56-65. DOI:10.1159/000485227. 査読あり

Ishikawa H, Niwa A, Asahi M, Matsuura K, Masuzugawa S, Niida Y, Maeda M, Kondo M, Tomimoto H. Diffusion tensor imaging and magnetic resonance spectroscopy in a patient with adult onset tuberous sclerosis complex. *J Clin Neurosci.* 2018 Feb;48:108-110. DOI: 10.1016/j.jocn.2017. 査読あり

Bo R, Yamada K, Kobayashi H, Jamiyan P, Hasegawa Y, Taketani T, Fukuda S, Hata I, Niida Y, Shigematsu Y, Iijima K, Yamaguchi S. Clinical and molecular investigation of 14 Japanese patients with complete TFP deficiency: a comparison with Caucasian cases. *J Hum Genet.* 2017 Sep;62(9):809-814. DOI:10.1038/jhg.2017.52. 査読あり

Niida Y, Mitani Y, Kuroda M, Yokoi A, Nakagawa H, Kato A. A Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson variant of Ohdo syndrome with a KAT6B 10-base pair palindromic duplication: A recurrent mutation causing a severe phenotype mixed with genitopatellar syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2017 May;57(3):86-88. DOI: 10.1111/cga.12196. 査読あり

Yasui Y, Kohno M, Nishida S, Shironomae T, Satomi M, Kuwahara T, Takahashi S, Niida Y. Cartilage-hair hypoplasia associated with isolated hypoganglionosis: A case report. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2017 Jan;57(1):32-34. DOI: 10.1111/cga.12175. 査読あり

Niida Y, Sato H, Ozaki M, Itoh M, Ikeno K, Takase E. Angelman Syndrome Caused by Chromosomal Rearrangements: A Case Report of 46,XX,+der(13)t(13;15)(q14.1;q12)mat,-15 with an Atypical Phenotype and Review of the Literature. *Cytogenet Genome Res.* 2016;149(4):247-257. Epub 2016 Oct 22. DOI: 10.1159/000450847. 査読あり

Itoh M, Kittaka Y, Niida Y, Saikawa Y. A novel frameshift mutation in the TRPS1 gene caused Tricho-rhino-phalangeal syndrome type I and III in a Japanese family. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2016 Jul;25(3):115-8. DOI: 10.1297/cpe.25.115. 査読あり

Niida Y, Yokoi A, Kuroda M, Mitani Y, Nakagawa H, Ozaki M. A girl with infantile neuronal ceroid lipofuscinosis caused by novel PPT1 mutation and paternal uniparental isodisomy of chromosome 1. *Brain Dev.* 2016 Aug;38(7):674-7. DOI: 10.1016/j.braindev.2016.01.004. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

新井田 要、結節性硬化症の遺伝子診断の問題点と意義、第 60 回日本小児神経学会学術集会、2018

Niida Y, Mutational Analysis of *TSC1* and *TSC2* in Japanese Patients with Tuberous Sclerosis Complex, International TSC Research Conference (ITSCRC), 2018

新井田 要、常染色体劣性遺伝性疾患発症の原因となる片親性イソダイソミーの分類、第 59 回日本小児神経学会学術集会、2017

Niida Y, Mutational Analysis of *TSC1* and *TSC2* in Japanese Patients with Tuberous Sclerosis Complex, The 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (AOCN), 2017

新井田 要、日本人結節性硬化症患者の *TSC* 遺伝子解析、第 58 回日本小児神経学会学術集会、2016

〔図書〕(計 1 件)

新井田 要、医歯薬出版株式会社、CHIPS 法による遺伝子変異スクリーニング 週刊医学の

〔その他〕

ホームページ等

<http://mri-genome-medicine.kanazawa-med.labos.ac/one/>

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~hospital/section/others/post-11.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。