

研究から臨床検査への移行が難しい疾患領域の遺伝学的検査の実態を調査する研究

研究分担者 原田直樹
京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

研究要旨

国策ゲノム医療の実装を目的として、医療法と臨床検査技師法に関する法律が改正され、2018年12月から施行された。新規制では検体検査分類が一部変更され、遺伝子関連検査と染色体検査において新たな検査室の管理と精度確保の基準が設定されている。ゲノム医療の対象のひとつに難病・希少疾患が設定されているが、診断を目的とした遺伝学的検査では、専門医の関わりのもと、長らく診療と研究が区別されずに実施されてきた経緯がある。本研究班の関連学会や難治性疾患等政策研究に向けた啓蒙活動により、新規制に適合する検査体制への移行が徐々に進められているものの、一部の疾患においては研究機関における解析で診断検査が継続されている現状がある。このような事例における課題を明らかにする目的で、Beckwith-Wiedemann 症候群と Silver-Russell 症候群の診断を研究として実施している研究室の調査研究を行った。

難病を含む遺伝性疾患のうち、単一遺伝子疾患の多くが DNA シークエンスで疾患原因バリエーションを特定することで診断が可能である。しかしながら、エピゲノム変異を含む多様な発症機構をもつような疾患においては、複雑な解析を階層的に実施することで疾患原因バリエーションが特定され、技術的にも経済的にも臨床検査への移行が困難である。難病等の医療策として、DNA sequencing を集約して合理的に実医療に実装することと同時に、特殊検査を集約して実施する機関の設置が必要であり早期に実現されるべきである。

A. 研究目的

希少遺伝性疾患が多数含まれる難病等を対象とした遺伝学的検査では、項目毎の検体数が少なく、開発経費の回収が見込めないために体外診断薬や医療機器の開発を行う事業者が存在しない。また、現状の個別遺伝学的検査の保険点数が現実的な検査稼働コストに見合わず、事業性が見込めないために、LDT（検査室自家開発検査）を開発して参入する登録衛生検査所等の事業者は大変少なく、国内の遺伝学的検査実施機関は極僅かしか存在しない状況である。そこで、多数の難病等の疾患責任遺伝子を標的化したパネルシーケンシングを LDT として実用化すること、およびその開発段階で実施すべき妥当性確認項目と運用段階で行うべき内部精度管理策を含めた品質管理項目をガイダンス案として昨年度に提案した。一方で DNA シークエンス法のみで疾患原因を特定できない疾患が存在しており、これらの一部で診断検査が研究機関の解析に依存している状況がある。その代表的な例として、Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）（小児慢性特定疾病）と Silver-Russell 症候群（SRS）の診断を研究として実施している佐賀大学医学部分子生命学講座分子遺伝学・エピジェネティクス分野の副島英伸教授に協力を依頼し、分子遺伝学的解析の内容詳細を調査し、係る課題の明確化を試みた。

B. 研究方法

佐賀大学の副島研究室を訪問しての現地調査、文書による情報照会、および副島教授と複数回のオンライン面談を行い、以下の項目について情報を収集し、さらに課題解決に向けた方向性についてディスカッションを行った。

- 1) 検体の受け入れ実績
- 2) 検体受け入れ手順
- 3) 検査工程
- 4) 精度管理策
- 5) 労務と担当者
- 6) 解析コストと実費徴収策
- 7) 報告書作成方法
- 8) 現状と将来の課題

（倫理面への配慮）

特記事項無し

C. 研究結果

- 1) 検体の受け入れ実績

BWS については 2000 年より臨床検体の受け入れを開始し、現時点で年間 20 症例（家系）程度を、これまでに約 300 症例（家系）の解析を実施済み。SRS については、分子遺伝学的発症機序が BWS の逆の機構であることが明らかになった後、2010 年より検体の受け入れを開始しており、現在は年間 1 例程度、これまでに 15 症例（家系）の解析を実施済みとのことであった。これまでの解析で、BWS の分子遺伝学診断の確定率（即ち、疾患原因となる変異の同定率）は 73%、SRS は 43% である。

同定した異常の種類（エピゲノム異常、片親性ダイソミー、塩基置換、コピー数バリエーション、染色体異常等）とその割合は GeneReviews（BWS: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1394/>; SRS: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1324/>）等、既報との差異はないとのことであった。即ち、BWSの発症原因バリエーションは高頻度なものから順に、ICR2 (KvDMR1) の loss of methylation (LOM)、11p15 の部分父性片親性ダイソミー (pat UPD)、ICR1 (H19-DMR) の gain of methylation (GOM)、*CDKN1* の病的バリエーション、11p15 の父性染色体重複、ゲノムワイド pat UPD であり、メチル化異常や pat UPD においては、体細胞モザイク率を考慮した解析が必須となるとのことであった。

SRS については、ICR1 (H19-DMR) の LOM、7 番染色体の母性片親性ダイソミー (mat UPD)、11 番染色体のモザイク mat UPD、その他に *CDKN1* や *IGF2* の遺伝子欠失等である。

2) 検体受け入れ手順

検体提出元は全件医療機関であり、患者の担当医がインターネットで BWS, SRS の遺伝学的検査の受け入れ先を検索するなかでマッチングができている状況であった。検体提出要領、臨床症状確認票、研究参画への患者と家族の同意書、検査実費の徴収方法について説明資料一式を送付し、事前の日程調整がなされた後、宅配便を利用して検体の受け渡しが行われている。

3) 検査工程 別図に記載

4) 精度管理策

全検体の全工程について、独立した解析を2回実施していた。エピゲノム解析 (bisulfite pyrosequencing) では、既知の高メチル化試料の希釈系列 (0, 25, 75, 100%) を内部コントロールとして同時測定し、検量線を作成して対応していた。

5) 労務と担当者

ウェット解析は時間雇用の技術員1名が専任で担当し、週18時間の労務で対応していた。個別解析の結果は教員1名が確認し、追加解析の要否を判断する仕組みとなっていた。

6) 解析コストと実費徴収策

解析に係る費用を実費で徴収しており (1 家系、原則トリオ解析で 50,000 円)、研究費または寄付として大学事務で受け付ける仕組みが構築されていた。66%が佐賀大学への寄付として、患者家族が支払いを行っているとのことである。なお、5 万円という金額は患者家族会と相談し、家族で自己負担が可能な金額を探る中で設定されたものである。スクリーニング検査 (別図参照) で疾患バリエーションが同定できた場合の解析コストは、ルーチン解析

(トリオ STR 解析と ICR1, ICR2 のエピゲノム解析) の部分の試薬・消耗品コストのみで、BWS が 56 千円、SRS が 45 千円、追加解析に進んだ場合には、1 件数万円単位で研究費の持ち出しとなり、解析を担当する技術員の雇用経費や解析機器の費用 (減価償却費等) も徴収額には含まれていないとのことであった。

7) 報告書作成方法

必要な全ての解析が終了した後副島教授が結果を確認し、報告書を作成していた。報告書にはすべての解析結果が記載されており、陽性の場合、遺伝型-表現型相関の分析を踏まえて疾患原因タイプが特定され、明確に記載されていた。陰性であった場合には、既知の異常は認めないと記載されていた。なお、改正医療法の施行に伴い、報告書には次の一文が付記されていた。「これは研究の結果であり、診療の用に供する検査ではありません。このため、必ずしも診断のための質の担保がなされているものではありません」。

8) 現状と将来の課題

BWS は小児慢性特定疾病に指定されており、医療費助成を申請する際の医療意見書には、遺伝学的検査結果の記載欄が存在し (染色体検査・FISH・マイクロアレイ染色体検査・遺伝子検査 (*CDKN1C* 遺伝子異常) インプリンティング異常、その他)、現実に遺伝学的検査の結果が診断の根拠になっている状況である。

BWS と SRS の疾患関係性については分子遺伝学的発症機序のうち、主要な疾患病理が表裏の関係になっており、同様のフローで解析を進めるのが合理的でもある。両疾患の多様な原因を追求するためには、DNA 多型、bisulfite sequencing、DNA sequencing、MLPA 等、異なる技術を織り交ぜ、階層的に解析を実施する必要がある、技術的且つコスト的に臨床検査化が容易ではないことが推測される。また、BWS、SRS ともに異常をもつ細胞の体細胞モザイクによって発症するものが多く、モザイク率が低い患者の解析がポイントで、経験に基づき結果を見立てるスキルが解析者には求められる。この点も臨床検査への移行が難しい原因になると思われる。

副島教授が在任中は前期の診断検査を研究として実施していく考えであるものの、追加解析や技術支援員の人件費等に回して手当している研究費がなくなれば、患者家族が支払う寄付金や研究費の価格を上げざるを得ず、厳しい状況となることが予測される。また、研究室を主催する立場としては、BWS、SRS の解析を担当する技術支援員が経年的に雇用できないことも問題と指摘されていた (3 年雇用ルールに依る)。また、地域的に技術員の候補者が少ないことから、その確保も課題である。さらに、この種の検査は研究者の成果にならない可能性が高いため、教員に過度に解析の担当を

させることができない。これらを鑑みると、ご自身の研究室がこの種の検査を長期に請け負うことは難しくなると推測されていた。

D. 考察

BWS, SRS は遺伝性疾患の診断、診療方法、遺伝カウンセリングに関する情報等が記載された国際標準データベースである GeneReviews に記載されており、分子遺伝学的発症機序、臨床診断、確定診断方法、診療指針が確立された疾患である。両方も超希少疾患ではあるものの、特に BWS については出生数が非常に少ないわけではなく (BWS 1:14,000 出生; SRS 1:30,000-100,000 出生)、遺伝学的検査として医療機関において臨床検査化が望まれる疾患のひとつとなっている。

海外においては、MS-MLPA 法が BWS と SRS の第 1 選択診断検査法として頻用されはじめている状況がある。これは市販される MRC-Holland 社製 SALSA ME030-C3 BWS/SRS キットとキャピラリーシークエンサーを使用したフラグメント解析によるものであり、複数種類の疾患原因バリエーションを比較的簡便な手法で検出することが理論的に可能で、スクリーニング検査としての有効性が期待される。この MS-MLPA 検査の有用性についての副島教授の見解は、当該キットを使用した解析で、既知低メチル化検体の検出感度が低いことを確認しており、当該法で陰性であっても、BWS、SRS 罹患を否定することができず、第 1 検査として採用するのは難しいとのことであった。この見解を踏まえたうえで、研究による複雑な解析で陽性結果が得られた後、その確認検査を MS-MLPA 法にて医療機関で実施することで臨床検査としての運用が期待できるものと考え、主要な臨床検査センター 2 社に受託の可否を照会してみた。しかしながら、2 社ともに受託数僅少のため受け入れ不能との正式回答であった。以上より、国内では一次検査、そして研究としての解析後の確認 (臨床) 検査の受け入れ先も存在しない状況である。

近年 BWS の臨床診断と分子遺伝学的診断、スクリーニングと診療のための国際指針 (Brioude et al., Nat Rev Endocrin 2018) が公表されている (古典的臨床所見を呈しながら分子遺伝学的検査が陰性、および BWS 関連表現型を呈し分子遺伝学的検査が陽性のものを、Beckwith-Wiedemann spectrum, BWS_p として取り扱い)。これを参考に臨床所見をスコア化し、一定基準以上のものを臨床診断することとし、分子遺伝学的検査 (研究) の結果は参考とすることで小児慢性特定疾病の医療意見書の様式を改訂し、運用することは検討できるかもしれない。しかしながら、その場合であっても、臨床診断が難しい例に対しては、分子遺伝学的検査が必要となる訳であり、該当する患者への対応が難しいことには変わりはない。

近年、遺伝学的検査の保険収載が拡大傾向にあり、本年春には指定難病 52 疾患の検査が保険適応となった。難病法の下、難病医療の充実を目的として、指定難病の診断検査の保険診療化が順次適う状況である。一方で、児童福祉法の下、多数の疾患が小児慢性特定疾病に指定されるものの、その診断を目的とした検査については、保険適応とはならない状況が継続している。改正医療法の施行により、研究による診断から診療の用に供する (臨床) 検査化が進められている中で、どうしても移行が困難であり、医療費助成の根拠となる診断検査を研究に依存している代表的な例として、小児慢性特定疾病である BWS の状況を報告した。

BWS が難病の指定を受けないことについては、国内で成人の患者についての報告やデータが存在せず、現実的に慢性的に医療を受けている大人の患者が少ないことが推測され、小児慢性特定疾病の認定を受けながらも難病指定とならないものと思われる。SRS については SGA 低身長として新生児期から捕捉され、そのまま保険診療として成長ホルモン治療の適応になっていることが推測される。遺伝学的検査を実施せずとも、医療支援が進められる状況があるのかもしれない。

E. 結論

BWS は小児慢性特定疾病に指定され、遺伝学的検査の結果が医療費助成の根拠となるものの、その多様な発症機序により、DNA 解析とエピゲノム解析を複数組み合わせた研究としての特殊な検査で診断がなされている。SRS も含め、本来は臨床検査によって診断がなされ、医療が提供されるべきであるが、検査を担う医療機関が存在せず、現状では解決に向けた方策はない。特定の研究機関が、自ら獲得した競争的資金で検査を担う体制を長期に維持することは難しく、インプリンティング疾患等に対する特殊な臨床診断検査を請け負う国立センター的な検査拠点の整備が必要である。

<謝辞>

本調査研究を実施するにあたって、佐賀大学の副島英伸教授と研究室員の皆様には長期に渡り多大なご協力をいただきましたことを感謝申し上げます。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

原田直樹, 小原 収, 要 匡, 堤 正好, 足立香織, 難波栄二: 次世代シークエンサーを使用する遺伝学的検査の品質課題への対応策. 第 44 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会. 2020.7.3-12. Web 開催

原田直樹, 小原 収, 要 匡, 堤 正好, 足立香織,

難波栄二：自家開発の NGS パネル遺伝学的検査の品質要件. 第 27 回日本遺伝子診療学会大会. 2020.9.10-19. Web 開催

Harada N, Ohara O, Kaname T, Tsutsumi M, Adachi K, Nanba E : A Practical Guidance for the Development and Operation of Laboratory Developed NGS-based Gene Panel Genetic Testing. 日本人類遺伝学会第 65 回大会 2020.11.18-12.2. Web 開催

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

別図. BWS と SRS の研究としての診断検査の流れ

I. BWS 解析フロー

ルーチン解析

下記①と②は同時に実施し、陰性出会った場合に *CDKN1C* の変異解析を実施

- ① 11p15 BWS 責任領域 トリオ STR 解析 (4 塩基重複マーカー, 3 座)
父性 UPD と父性染色体重複のスクリーニング
- ② ICR2 (*KvDMR1*) と ICR1 (*H19-DMR*) 領域の bisulfite pyrosequencing
ICR2 の LOM と ICR1 の GOM のスクリーニング
- ③ *CDKN1C* の sanger sequencing

追加解析

(1) ②の解析の結果、*H19-DMR* が GOM であった時は以下を実施

- a) MLPA 法によるコピー数解析
父性 UPD と父性染色体重複の鑑別
- b) 上記で 2 コピーを確認した場合には *H19-DMR* の変異解析
母由来の可能性、次子の再発リスクを考慮し、点変異と indel の有無を確認する
(トリオで 6kb の領域全長をサンガーシークエンスし、親由来も確定)

(2) ①の解析で父性 UPD を疑う場合には以下を実施

- a) ゲノムワイド父性 UPD の合併の有無を確認するために、11 番 (3 座)、14 番、15 番、16 番 (各 2 座) の STR 解析 (全て 4 塩基重複マーカー)
- b) モザイク率 20-50%の時 (*H19-DMR* のメチル化が 60-75%、または *Kv-DMR1* のメチル化が 25-40%と同義) には、MLPA 法によるコピー数解析
父性染色体重複の鑑別

(3) ① ② ③のすべてで陰性であったときは、6 番、7 番、14 番の UPD である可能性を考慮して以下の解析を実施

- a) 6 番、7 番 (各 4 座)、14 番 (2 座) のトリオ STR 解析 (全て 4 塩基重複マーカー)
- b) 6 番 (*ZAC*)、7 番 (*GRB10*, *PEG10*, *PEG1 MEST*)、14 番 (*MEG3*) の DMR の bisulfite pyro-sequencing

II. SRS 解析フロー

ルーチン解析

下記①と②は同時に実施

- ① 11p15 BWS-CR (3 座) と 7 番染色体 DMRs (6 座) のトリオ STR 解析 (全て 4 塩基重複マーカー)
母性 UPD と母性染色体重複のスクリーニング
- ② 11 p 15 の ICR2 (KvDMR1) と ICR1 (H19-DMR) 領域、および 7 番の DMRs (*GRB10*, *PEG10*, *PEG1* *MEST*) の bisulfite pyrosequencing
11p15 ICR1 (H19-DMR) LOM, 母性 UPD7 のスクリーニング

追加解析

- ① ② で陰性であったときは以下の解析を実施
 - a) *CDKN1C* 変異解析
 - b) *IGF2* 変異解析
 - c) 14 番 (2 loci)、16 番、20 番 (各 4 座) のトリオ STR 解析 (全て 4 塩基重複マーカー)
類縁症状がみられる upd(14)pat, upd(16)mat, upd(20)mat との鑑別
 - d) 14 番 (*MEG3*) DMR の bisulfite pyro-sequencing