

「兵庫県立こども病院における小児希少難病の迅速診断システムの開発」

兵庫県立こども病院 森貞直哉

1. 研究の背景と目的

「希少難病」は、患者数が少なく治療が難しい疾患の総称である。各疾患の罹患者は少数であるが、希少難病全体で見るとわが国総人口の1%以上が罹患していると考えられており、正確な診断と医療提供体制の構築が求められている。希少難病の多くは遺伝子の異常に起因して小児期に発症することが多く、そのため兵庫県においては小児医療の拠点である兵庫県立こども病院（以下当院）を受診する機会が多い。

近年、希少難病の分子機序の解明が進み、次世代シーケンサー（next generation sequencing、以下NGS）をはじめとする網羅的な遺伝子解析によって診断が可能となる希少難病が増えている。その中には特異的な治療法が既に存在するもの、あるいは今後治療法の開発が期待できるものがあり、迅速な診断と医療介入が不可欠である。当院では2016年から臨床遺伝科を開設し、神戸大学や慶應義塾大学と共同でさまざまな希少難病の遺伝学的診断を行なっている。実際に当院でGLUT1欠損症やHartnup病などの患者をNGSによって診断し、それぞれ特異的治療を開始して症状を改善させることができた。このようにゲノムデータを実臨床で迅速に活用することで、希少難病患者の予後の改善に大きく貢献することが期待できる。

本研究は未診断希少難病患者の遺伝学的診断を迅速に進め、さらに当院各科の連携により適切な治療を早期に開始し、小児医療現場における希少難病ゲノム医療のモデルとなることを目的とした。

2. 研究方法・研究内容

当院を受診し、診断が未確定でかつ遺伝子・染色体の異常が原因と考えられた例を対象とした。研究的遺伝子解析は神戸大学で施行した。臨床診断が可能であった場合は遺伝子特異的直接シーケンスもしくはMLPA法を施行した。臨床診断が困難であった場合にはNGSもしくはアレイCGHを用いた。NGSは主な既知の希少難病を網羅した遺伝子解析パネルを使用した（I社TruSight One, 4813種）。バリエーションの評価は各種データベース（Human Genome Mutation Database、ClinVarなどの疾患データベース、genomADやjMorpなどの健常者データベース）、in silico解析（wANNOVAR, SIFT, PolyPhen2など）を用いた。最終診断はゲノムデータと当院各専門診療科の臨床診断をあわせ、総合的に評価した。

本研究においては遺伝子解析前後に遺伝カウンセリングを施行した。遺伝カウンセリングは当院の臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラー[®]が担当した。検査後遺伝カウンセリングにより同意が得られたものは両親の解析も施行した。本研究での遺伝子解析は当院および神戸大学で倫理審査委員会の承認を受けて行った。

3. 研究成果

1) 本研究へのエントリー数

2020年4月から2021年3月までに当院臨床遺伝科を受診した患者のうち、70家系が本研究に参加した。

2) 遺伝子解析結果 (別表)

26家系で遺伝学的に診断できた(37.1%)。このうち7例は臨床診断から直接シーケンスを施行し診断した。いずれも遺伝学的検査の保険適用はない疾患であった。うち2例はRett症候群の女兒であった。1例はミトコンドリア異常によるmitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS)で、診断確定により特異的治療が開始された。また母親からの遺伝である可能性が高く、母自身も罹患者であると考えられたため、母の体調管理についても説明した。

19例は網羅的解析手法(アレイCGHもしくはNGS)で診断した。いずれも臨床診断が困難であった。アレイCGHで診断したのは5例で、いずれも知的障害を伴っていた。1例は3歳の男児で*MECP2*重複症候群と診断した。本疾患は母親が保因者である可能性が高く、次子再発の可能性について遺伝カウンセリングを実施した。また染色体4q25欠失を認めた知的障害がある男児は、当院眼科で虹彩異常と診断されており、眼の異常は本欠失によるAxenfeld-Rieger症候群と考えられた。さらに本例は欠失範囲に不整脈の原因遺伝子*ANK2*を含んでいたため、当院循環器内科と連携してfollowを開始した。

NGSでの診断は14例であった。1例は呼吸障害を伴う0歳女児で、原因不明であったためNGSを施行した。その結果*FBNI*異常を認めて新生児Marfan症候群と診断し、早期に循環器内科でのfollowにつなげられた。4歳の軽度知的障害と大頭のある女児は、NGSにより*PTEEN*異常によるCowden症候群と診断した。Cowden症候群は悪性腫瘍を高率に併発する疾患であり、今後当院での腫瘍スクリーニングを行う予定である。17歳男児は網膜色素変性症があり、その他に多指の手術歴と軽度の知的障害を認めたため当院紹介となった。NGSでの解析により*BBS10*異常によるBardet-Biedl症候群(BBS)と診断された。BBSは高率に腎機能障害を認めるため本例も検索したところ、血清クレアチニンの上昇を認め腎臓内科に紹介した。本例はまた神戸市立神戸アイセンター病院とも連携し、同センターで眼の治療を受けている。15歳の女児は生後から原因不明の脳障害と診断され、妹も同じ疾患であったがご両親には脳障害はなかった。NGSを施行したところ姉妹に*COL4A1*の異常を認め、脳小血管病と診断した。本疾患は小血管の基底膜が障害される常染色体優性遺伝疾患であり、脳のほか腎臓や目に異常が見られることがある。ご両親のどちらかが同じ病気を持っていると考えて検索したところ、父親に同じ遺伝子の異常を認めた。精査したところ父親は眼の病気があり、本症によるものと考えられた。幸い脳血管には異常がなく、今後定期的に脳ドックを受けることをお勧めした。

結果返却は25症例ですでに終了した(残り1例は2021年4月に予定)。同意取得から結果返却までの期間はおおよそ2か月(59.88日±35.1)であり、迅速な診断と結果返却が行えたと考えた。

3) 研究から得た考察

今回の研究では、小児医療現場でのゲノムデータの活用による希少難病の早期診断法の開発と有用性について検討した。一般に希少難病を診断することは難しいが、その理由として医療者が経験しにくい疾患が多いことが挙げられる。希少難病では各種の臨床

検査や画像検査でも特徴的なマーカーが存在することが少ないため、ゲノムデータの利用は希少難病を診断するために非常に重要な手法であると考えられる。

今回の研究では、同意取得からおおよそ2ヵ月で診断結果を患者家族に報告することができた。一般に、臨床診断が可能な疾患の場合は1-2ヵ月で遺伝子解析結果が返却されるが、未診断疾患の場合は数ヶ月から数年かかることもある。今回は研究代表者が医療現場で直接患者を診察し、さらに神戸大学で得られたゲノムデータを直接解読することで、未診断疾患も含めて迅速に診断することができた。診断を正しく行なうことで、患者自身、さらに両親の健康管理にも役立てることができた。これはゲノムデータが小児のみならず成人の健康管理にも有用であることを示している。

臨床現場でのゲノムデータの活用に関してはいくつかの課題がある。ひとつは費用である。現在さまざまな遺伝性疾患の遺伝子解析が保険診療として認められるようになりつつあるが、NGSのような網羅的解析についてはまだ保険診療として認められておらず、今回のように研究として行なわれている。今回はNGSパネルを用いたが、全エクソン・全ゲノム解析でも現在1人につき数万円程度で施行できるようになっており、さまざまな臨床検査をくり返すより迅速で安価であると考えられることから、今後実臨床での網羅的解析の導入が期待される。

ゲノムデータを正しく解読することも重要な課題である。膨大なゲノムデータを読み解くには遺伝に関する知識やさまざまなデータベースの活用が必要である。さらにその情報を臨床につなぐためには正しい臨床診断が重要である。当院は小児医療の専門家が集結した医療機関であり、全診療科と連携することで正しい診断、治療方針の策定が可能となると考えた。また、ゲノム情報を正しく臨床で利用するためには遺伝カウンセリングも重要である。遺伝カウンセリングは遺伝性疾患をもつ患者やその家族と医療者とのコミュニケーション技法の1つで、遺伝に関するあらゆる相談を行なう場である。希少難病の場合、特異的治療法がなく診断だけで終わってしまうことも少なくなかったが、当院では認定遺伝カウンセラーを配置して遺伝カウンセリングを受けやすい体制を整備し、適切な遺伝診療を行なうようにしている。

4. 生活や産業への貢献及び波及効果

ゲノムデータの臨床活用は病気をもつ患者とその家族に多大な利益をもたらす。長年「この子の病気の原因は何だろう」と考えていた患者家族にとって、確実な診断を行うことは、診療方針、患者の同胞や患者自身の子への遺伝を考慮するうえで重要であり、今後もゲノム医療が推進されるであろう。ゲノムデータを臨床に活用するためには医療機関での基盤整備が重要である。

臨床と研究の連携も重要である。今回は神戸大学小児科の研究リソースを活用し、迅速に解析を行なうことができた。ゲノム情報の利用については、臨床現場では迅速に診断することが求められ、研究では新規遺伝子の発見や治療法の開発が期待される。当院は神戸大学小児科や慶應義塾大学、理研BDRなどとの共同研究を行なっており、引き続き希少難病の診断、治療について貢献して参りたい。

本研究を通じて2例の希少難病症例を論文として報告した。

本研究により発表した論文

1. Shishido A, Morisada N, Tominaga K, Uemura H, Haruna A, Hanafusa H, Nozu K, Iijima K. A Japanese boy with *NAI10*-related syndrome and hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Genome Var.* 2020 Aug 17;7:23.
2. Morisada N, Ishida Y, Tokumoto S, Maruyama A, Iijima K. Severe neurodevelopmental disorder caused by an *MEF2C* nonsense mutation nonsense mutation. *Pediatrics International* (2021年2月8日受理)

表：本研究期間に施行し診断した症例

年齢	性別	疾患名	原因遺伝子	解析方法	同意から報告まで (日)
8	F	Type2 collagenopathy	<i>COL2A1</i>	DS	63
3	F	口顔指症候群1型	<i>OFD1</i>	DS	42
5	M	Lesch-Nyhan 症候群	<i>HPRT1</i>	DS	30
7	F	前頭骨端異形成	<i>MAP3K7</i>	DS	175
2	F	Rett 症候群	<i>MECP2</i>	DS	28
5	F	Rett 症候群	<i>MECP2</i>	DS	31
9	M	MELAS	mitochondria	DS	98
3	M	MECP2 重複症候群	<i>MECP2</i>	aCGH	20
3	M	4q 微細欠失 Axenfeld-Rieger 症候群	4q25del	aCGH	31
4	M	6q 微細欠失	6q21q22del	aCGH	71
2	M	15q11.2 欠失	15q11.2	aCGH	63
0	F	19q 微細欠失	19qdel	aCGH	-
12	F	Noonan 症候群/もやもや病	<i>RAF1/RNF213</i>	NGS	77
0	F	Marfan 症候群	<i>FBN1</i>	NGS	38
0	F	てんかん性脳症	<i>SCN2A</i>	NGS	47
0	M	Young-Simpson 症候群	<i>KAT6B</i>	NGS	15
4	M	Dent 病	<i>CLCN5</i>	NGS	110
4	M	Dent 病	<i>CLCN5</i>	NGS	56
1	M	非特異的知的障害	<i>HNRNPU</i>	NGS	85
4	F	Cowden 症候群	<i>PTEN</i>	NGS	63
17	M	Bardet-Biedl 症候群	<i>BBS10</i>	NGS	91
15	F	脳小血管病	<i>COL4A1</i>	NGS	27
2	F	てんかん性脳症	<i>CHD2</i>	NGS	35
16	M	滑脳症	<i>TUBA1A</i>	NGS	35
6	F	KBG 症候群	<i>ANKRD11</i>	NGS	83
3	M	KIF1A 異常	<i>KIF1A</i>	NGS	83

DS：直接シーケンス、aCGH：アレイ CGH、NGS：次世代シーケンサー