



第9回 感覚器シンポジウム

東京医療センター・感覚器センター設立10周年記念

《市民公開講座》

日時 ● 平成26年3月14日(金) 12:55~18:00
 会場 ● 東京医療センター 外来棟3階 大会議室
 主催 ● 東京医療センター臨床研究(感覚器)センター NISO

〈主題〉視覚障害および聴覚障害における原因遺伝子の新たな解明と新治療への急展開

基調講演 遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性 — 横浜市立大学医学研究科遺伝学教授 / 松本直通

講演 1. ゲノム解析事業の過去・現在・未来 — タカラバイオ(株)、バイオ研究所 所長 / 北川正成

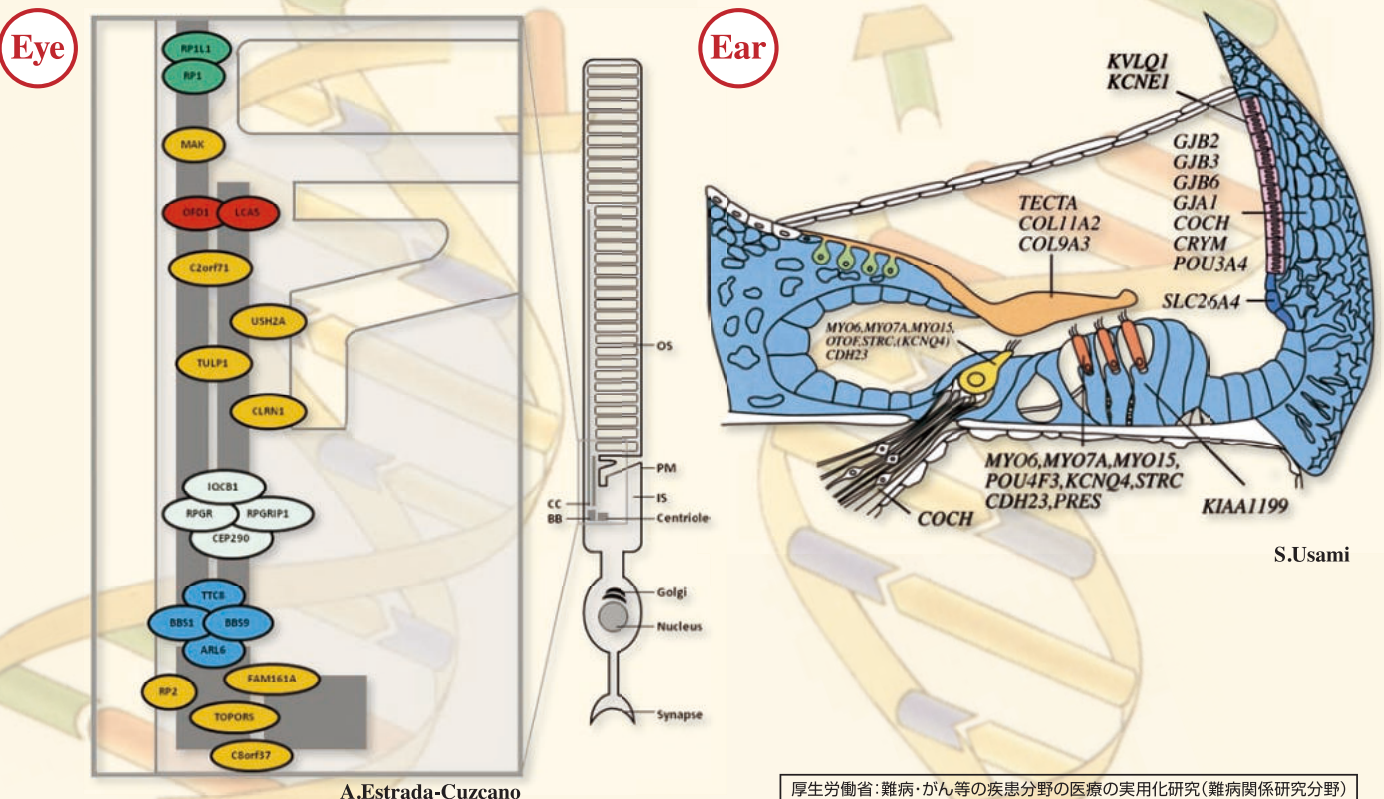
2. 臨床現場における遺伝子検査と遺伝カウンセリングの課題

— 胎児クリニック東京 医療情報・遺伝カウンセリング室長 / 田村智英子

3. 聴覚障害における原因遺伝子の新たな解明 — 感覚器センター聴覚障害研究室長 / 松永達雄

4. 視覚障害における原因遺伝子の新たな解明 — 感覚器センター分子細胞生物学研究部長 / 岩田 岳

総合討論 座長: 岩田 岳、松永達雄



A.Estrada-Cuzcano

S.Usami

厚生労働省: 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究(難病関係研究分野)

視覚障害および聴覚障害における原因遺伝子の 新たな解明と新治療への急展開

基調講演

- ①松本 直通／横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学教授
「遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性」…………… 2

講演

- ②北川 正成／タカラバイオ株式会社、バイオ研究所長
「ゲノム解析事業の過去・現在・未来」…………… 19

- ③田村 智英子／胎児クリニック東京 医療情報・遺伝カウンセリング室長
「臨床現場における遺伝子検査と遺伝カウンセリングの課題」…………… 29

- ④松永 達雄／感覚器センター 聴覚障害研究室長
「聴覚障害における原因遺伝子の新たな解明」…………… 36

- ⑤岩田 岳／感覚器センター 分子細胞生物学研究部長
「視覚障害における原因遺伝子の新たな解明」…………… 45

- 総合討論 …………… 64

- あとがき ……………臨床研究（感覚器）センター 名誉臨床研究センター長 加我 君孝 … 72

① 遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性

横浜市立大学大学院医学研究科 遺伝学教授

松本 直通

今日は、われわれが、この4、5年、かなりアグレッシブにやっている、エクソームという解析法の現状等についてお話しします。整理のために、少しキーワードを挙げました。ここは厚労省関係の病院だと思いますが、希少疾患は5万人未満です。厚労省が定義する難病は、希少で、原因不明、治療法未確立、長期にわたる生活の支障がある患者の状態を言います。

ゲノムは、細胞の中の遺伝情報の総体で、大きさは30億塩基対あります。2003年までの約13年間を通して、30億ドルをかけてヒトゲノムプロジェクトが行われ、ヒトゲノムも、テキストになるような参照シーケンスが決められました。

それ以降、アメリカで「千ドルゲノムプロジェクト」が立ち上がり、今年が設定目標の達成におけるターゲットイヤーです。それは、ヒト1名分の全ゲノムを千ドル（10万円）で解析することです。今年が、まさにザ・イヤーです。30億ドルが一気に千ドルになるという、滝の上と下ぐらいの大きな落差が起こります。われわれはその現状を目の当たりにして、これからはこれを使って医療が大きく変わることは間違いないことを予感しています。

ご存じの方もいるかもしれませんが、次世代シーケンサーは「ネクストジェネレーション」と言いますが、現行のものです。既に、お金を出せば誰でも手に入るものです。標準のハイスペック型の一番大型のものは、イルミナ社の600ギガで、ヒトのゲノムが大体200回ぐらい読める出力があります。ただ、問題点は、このハイスペック型は、1回回すのに、10日で数百万円のお金がかかることです。

これは、通常の研究に係るコスト域としては現実的に厳しいため、パーソナルタイプと称して、出力をがくんと落としたものを各社が出し

ています。これで、1回、大体10万円から20万円ぐらいで、出力は20分の1とか30分の1のシーケンサーを販売しています。これで、研究の裾野がだいぶ広がりました。さらに、最近、この中間型みたいなものがぼつぼつ登場しています。パーソナルタイプより少し高額で、かなりの出力を持ったものが出てきています。

今まで述べたものは、主にPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）をかませたシーケンサーですが、一方で、PCRをかけないで、そのまま何もせず、ゲノムそのものを素で読んでいこうというシーケンサーも登場しています。いろいろありますが、出ては消えたものもありますし、現行のパックバイオ（PacBio）とか、これから出てくるもの、期待されているものもあります。今のところ出ているものに関しては、精度が少し低くて、例えば10%以上のエラーが入るようなシーケンサーだと、ある意味、ヒトゲノム解析で上手に使っていくのは少し難しい状態です。どちらにしても、ゲノム解析の世界は次世代シーケンサーの登場で完全に変わったと言えます。

以降、ネクスト・ジェネレーション・シーケンサーをNGSと言いますが、NGSの登場の前と後で、研究スタイルや、どういう疾患を対象にしたらいいのかという考え方が大きく変わったと思います。まさに、パラダイムシフトが起こったと思います。

NGS登場の前は、いわゆる病態を考えて、機能がわかるものは、何かの機能異常から遺伝子に遡る考え方でしたが、もし機能がわからない、例えば、指が1本多いとか口蓋裂とかに関しては、別に血液の性状を調べても何も異常は出てきません。そういうものに関して、何らかの遺伝子に至るポジションの情報を提供するような家系であるとか、染色体異常などのまれな付加

条件の付いた特殊なケースを集めて、その特殊例に対してゲノム手法をもって遺伝子に迫るやり方が主流でした。ですから、本当の意味でコアな専門家しか付加価値のある症例にアプローチできず、普通では遺伝子が採れない世界でした。

ところが、NGS以降、NGSの高出力が有する網羅的解析が可能になり、全部の遺伝子を見ればいいという乱暴な話が通用するようになりました。ですから、この網羅性のあるデータを解析することで、何とか病と名前の付いた孤発例をいくつか集めてきて、とにかくそれをNGSにかけて、個々の症例が呈する異常遺伝子の中で共通するものを探していけば責任遺伝子が見つかるということが、一つのストラテジーになってしまったと考えます。

ですから、研究の間口という意味での対象疾患が、まさに、極めてレアな特殊ケースから、何とか病を持った個々の患者に移ってしまった、時に遭遇する症例へと移ってしまったという大きな変化が起こったと思います。ですから、NGSを用いれば、誰でも遺伝子が採れる時代になったということを意味します。

これは、割と有名な図です。横軸がバリエーションと言って、スニップ (SNP)、GATCの塩基の変化の頻度と考えてください。右にいくほど一般人に見られる普通の変化となり、左ほど非常にまれな変化です。縦軸を、その遺伝子変化があることで非常に病気になりにくいものから(浸透率が低い)(下)、一つ持っているとも病気になるような高い効果を持つ浸透率の高いもの(上)とすると、病気の成り立ちを考えるうえで、非常にシンプルな図ができました。

この非常にまれな遺伝子の変化で、非常に強い遺伝子効果を表すメンデル遺伝病、すなわち、ある遺伝子異常で病気になると決定されるものが左上に位置します。一方で、コモンディゼイズ(ありふれた病気)は、一般人が比較的持っているようなバリエーションで、持っているともその効果が少しだけあり、一般的なありふれた病気になるリスクが少し上昇し、その数がたくさんあるとさらにリスクが上昇するというものがあります。ここが、「ミレニアムプロジェクト」と言って、小渕内閣の頃の2000年以降、盛んに研究が進んで、どちらかというとも非常に理解が進んだ部分になります。

一方で、病気の成り立ちの部分の全体像はまだ全くわからない状況にあり、今、NGSが、この部分を大きく埋めてくれることを期待されて、世界中で、圧倒的なお金と労力をかけてダイナミックに研究が進んでいます。

今日話をする「エクソーム」という言葉ですが、何でエクソームかということ簡単に言うと、遺伝子のエクソンイントロンのエクソンを集めた領域を解析する研究ということになります。

どういう領域かということ、まず、遺伝子の領域であること、そして、ヒトゲノムの、基本的にたんぱく質の翻訳領域だと考えてください。すると、最大に見積もっても、ゲノムの約2%です。そして、これはよく知られた事実ですが、既知メンデル遺伝病の85%は、たんぱく質翻訳領域の異常で起こります。逆に言うと、この領域を集中的に解析すれば、病気の原因はかなり見出だせるということを意味しています。

全ゲノムをシーケンスすると数百万のバリエーションが出てきますが、この領域だけに限って言うと、数万ぐらいに絞って解析していけばいいので、まず、解析における敷居が随分下がります。あと、何といてもシーケンス量が少なく済むので、全ゲノムシーケンスの4、5分の1ぐらいの値段でできることが大きいです。

エクソン領域をどうやって集めるかを述べます。ゲノムは、連続性のある一つのひもみたいなものですが、まず、その部分をばらばらにして、少し修飾しますが、それはのちのプロセスのための修飾です。これに、目的の領域のところを持ったプローブを作って、そこに磁気ビーズを配置します。これでDNAにハイブリダゼーションして磁気ビーズで集めてくると、欲しいところのDNAがいつも簡単に手に入ります。

これは全部キットで売っていて、1検体当たり数万円とか十数万円するようなキットです。こちら(右)はちょっと原理が違いますが、基本、このようなことを使ってエクソン領域を集めてきます。

どうやって病気の原因にたどり着くかという簡単な図です。これは、他の人が書いた総説から拝借しています。ホール・エクソームシーケンス(WES)と書いていますが、一例のエクソン領域を解析すると、エクソン領域に大体2万から5万ぐらいのバリエーションが出てきます。これが、

エクソン領域とスプライスサイトに厳しく限定して見ると、この10分の1ぐらいに減ります。

そして、それがたんぱく質配列の異常に至るものになると、さらにその10分の1から20分の1ぐらいになって、結局、1サンプル当たり、この数百個の中で原因遺伝子変異を一つに限定していく作業をしていけばいいという流れです。このようなデータが複数例分あることで共通項を探せるという仕組みです。

2014年2月時点のデータなので、今調べると何十個か増えている可能性があります。ヒト疾患の数は7,718個あります。これは、基本的に遺伝性の疾患がマジョリティーだと思いますが、このうち、遺伝子が既にわかって、採られたものが53%の4,134個になっていました。逆に言うと、遺伝子がわかっていないものが46%ぐらい残っているということとなります。また病気の原因がわかるということで、さらに細分化が進み、病気の数自体もどんどん増えています。一方で、たんぱく質をコードする遺伝子の総数は2万2千個ですから、「1対1」関係ではありませんが、ある遺伝子は機能を持っていないかもしれないことを考えると、遺伝子数と疾患数の間が結構近付いている気がします。

われわれは、2009年からエクソーム解析、いわゆるネクスト・ジェネレーション・シーケンスをやっていますが、今年度中に4千サンプルぐらいのエクソーム解析が終了する予定です。

ネクスト・ジェネレーション・シーケンシングを使って単離したという意味での遺伝子の数が随分増えました。2011年に二つの病気の遺伝子を決めました。2004年には四つ、2013年には八つぐらいの遺伝子が採れました。年々スピードが増しています。昔は、われわれのところのような小さいラボで、2、3年に1回ぐらい遺伝子が採れたら、お祝いをしたぐらいの画期的な事象でしたが、今は、遺伝子が採れることはそれほど珍しいことではない時代になったと思います。半分、寂しいところがありますが、今はそういう状況です。

例を少し述べます。2012年に発表したのが、コフィン・サイリス (Coffin-Siris) 症候群です。一見レアで、ほとんど遭遇することのないような病気と考えられていましたが、今はそれなりに世界中から報告がなされるようになりました。

コフィン先生とサイリス先生が1970年に見つけた病気で、特異顔貌、疎な頭髪、知的障害と、第五指の爪の低形成が特徴です。いわゆる奇形症候群と位置づけられます。多くは孤発例で、遺伝形式等もあまりはっきりしませんでした。

私が、2003年に横浜市大に赴任したときに、どういう疾患研究をやるかと考えて、いろいろな先生に相談したところ、種々の臓器にわたって多発奇形を伴うものは、何らかのゲノムの異常が存在し、それが原因となって多臓器異常を来すのではないかというアドバイスを受け研究をスタートしました。しかし当時は、なかなか集まりませんでした。

いろいろな先生にお願いして、何とか10例ぐらいの症例を集めることができましたが、マイクロアレーをかけると、基本的に非典型例にのみ小さな欠失があつて、実は、そこに原因遺伝子が含まれていましたが、この欠失の中に、少なくとも100個ぐらいの遺伝子がありました。

しかも、このケースは非典型例で、欠失があつても、ほかの患者すべてに通用するような遺伝子が入っているとはなかなか思いづらくて、この時点では止まっていた。ちょうどこのころNGSが登場し、未解明の遺伝性疾患にぜひ用いて解析をしたいと、僕が寝言のように言っていたら、横浜市大でNGSを買おうという機運が出てきて、2009年に買ってもらいました。

そこで止まっていた典型例5例の解析を再開、エクソームシーケンスをやりました。次世代シーケンサーは今も非常に高価な試薬代がかかりますが、この当時も非常に高価で、1サンプル当たり50万円ぐらい解析にかかっていたと思います。5サンプルをやるのに多分250万円ぐらいかかったと思いますが、そういう時代からやってきました。今は、1例10万円ぐらいに値段が下がっています。

例えば、1サンプル当たり、シーケンサーの1レーンを使ってやっていたのですが、それでやると、5回以上シーケンスするところが、遺伝子領域の大体90%前後になります。そこから非同義置換とかスプライトサイトの異常とか、欠失とかに相当するものを抽出して、数百までバリエーションを絞ります。

そして、われわれのところにあるインハウスのデータベースにかけて、正常コントロールの

中にしっかりと認められるものは病気に関係ないだろうということで、そういうものを全部除くと、最終的には100個か、せいぜい250個ぐらいのバリエーションに限定され、その中に真の遺伝子の異常が入っているに違いないと考えられるリストが出来ます。

さらに、3家系では両親を含めてトリオで解析しました。これは患者が孤発例なので、両親はバリエーションを持たず、患者にだけバリエーションのある、いわゆるデノボ (de novo) の変異に着目して絞っていく形になりますが、この場合遺伝子異常候補は数個しか残りません。スライドに示すように、それぞれの症例で最終遺伝子候補リストが、3個、6個、3個と105個と129個まで絞られ、この中から共通項を探すのは、比較的簡単です。

今回の解析で、二つの遺伝子異常の候補が出てきました。一例からは採れませんでした。その採れない理由は、十数塩基の欠失があって、次世代シーケンサーの100塩基ぐらいの短いリードではうまく同定されませんでした。

いずれにしても、いとも簡単に5例の解析から二つの遺伝子の候補が採れました。それは *SMARCB1* と *SMARCA4* という遺伝子でしたが、通常遺伝子異常の候補を見つけると、集積した患者群で一気にスクリーニングをやります。その手法にならって、何とかこの時点で集めることができた患者22例を、全部解析してみました。

すると *SMARCB1* には4例に異常があって、赤色がデノボ変異ですが、二つのデノボ変異と、これは親を解析できませんでしたが、同じ場所にリカレントミューテーションが独立した2例も見つかりました。

それから *SMARCA4* は、6例の患者に異常がありました。これは全部ミスセンス変異でかつデノボ変異です。 *SMARCB1* と *SMARCA4*、名前は違うけど少し似ています。何の遺伝子かという、SWI/SNF 複合体というもののサブユニットをそれぞれコードしています。SWI/SNF 複合体というのは少なくとも十数個のサブユニットを持つ巨大なコンプレックスです。

これを見たときに、二つの遺伝子のファンクショナルサブユニットが一つの機能的な複合体を作っているなら、それぞれのサブユニットを全部シーケンスしていったら、ぼろぼろと遺伝

子異常が採れていくのではないかと考えました。こういうとき遺伝学的なアプローチをすると、大体予想と異なりはズレることが多いのですが、このときだけは違いました。

SMARCE1 という別のサブユニットにデノボの変異が1例ありました。そして、*ARID1A* と *ARID1B* の変異が、それぞれ3例と5例に見つかり、見つかったなかでデノボ変異がぼこぼこありました。この緑色は親の解析が得られなかったという意味で、デノボの確認ができなかった検体となります。

また、*ARID1A* と *ARID1B* で見つかった変異はすべてトランケーションタイプで、ストップコドンとかフレームシフトとかのタイプばかりです。さらにもう一つ、一番最初に、2007年までに終了していたマイクロアレーのデータを見直したときに、一例が有する微細欠失の中に *ARID1B* が含まれていました。これも変異の一つと位置づけられます。

結果として、見出した遺伝学的結果はこんなことがあるのだというびっくりするような結果でした。SWI/SNF 複合体の中の五つのサブユニット遺伝子の変異で、コフィン・サイリス症候群の22例中19例、86%に説明がつくという、遺伝学的にはすさまじいデータとなりました。

このSWI/SNF 複合体の立体構造はこのようになり、模式図で描くとクワガタ虫の頭みたいな形をしています。これがヌクレオソームに張り付いてヌクレオソームのいろんな機能的な変更を行います。この変更を介して、下流や関連の遺伝子の転写調節を行っているため、SWI/SNF 複合体が異常を起こすことで下流の遺伝子にかなりいろいろな影響が起こるのだらうと思います。

面白いのは、それぞれの患者はSWI/SNF 複合体サブユニット遺伝子のどれか1種類しかミューテーションを起こしていないということです。シーケンスしても1つのサブユニット異常を除いてほかのサブユニットは全部正常です。これはミューチュアルイクスクルーシブという相互排他的な変異という状況で、がんなどでも時々見られます。恐らく、二つ以上サブユニット遺伝子がやられると致死になるのではないかと考えています。

これを「ネーチャー・ジェネティクス」に報

告すると、そのあといろいろな先生が、私のところもこれに違いないからと、日本だけでなく世界中から解析の依頼がありました。症例をどんどん解析していったら、プラス49例と、最初の研究で解析した22例中3例のSWI/SNF複合体に異常がなかったものを加えて、もう1回全エクソームシーケンスをやり、もしくは別なやり方で、SWI/SNF複合体だけのシーケンスを異なるターゲットシーケンスという方法で、次世代シーケンサーを使って行いました。

その結果も我々の第一報と同様で、報告した五つのサブユニット遺伝子のうちの、*SMARCB1*と*SMARCA4*と*ARID1B*の新しいミューテーションが同定され、結果的に、*SMARCB1*、*SMARCA4*、*ARID1B*の変異が積みあがり、*ARID1A*、*SMARCB1*は積みあがりませんでした。最終的に71例中39例で変異が同定され大抵54%は説明がつくということになりました。

その後、欧米から同じような報告があって、ほぼわれわれのつけた五つの遺伝子のミューテーションで説明がつくことがわかってきました。これはいろいろな論文で参照されています。

ちょうど、2012年のこの発表から、このSWI/SNF複合体のサブユニット遺伝子の異常が世界中から報告され始めました。自閉症、コフィン・サイリス症候群と似て非なるクリーフストラ症候群とか、これも少し違うけれど似ているニコライデスバレイツァー症候群とかいろいろな疾患が、さまざまなサブユニットでミューテーションを起こして、知的障害を起こすことだけがはっきりしてきました。これは2013年の「ネーチャー・レビュー・ジェネティクス」から引用してきた図です。2012年、2013年というのは、SWI/SNF複合体病発見の年になりました。

次に、これはNGSで非常にクリアに解明された病気の一つで、SENDA (Static Encephalopathy of childhood with Neurodegeneration in Adulthood) という病気です。名前が長たらしいのですが、名は体を表すというネーミングで、小児期に割とステータブルな脳症を認め、それが大人になるに従ってあるポイントで急速に脳の神経変性が起こるといって、特徴的な神経変性疾患の一つです。

正常人の一生を発達という視点でとらえると、「生誕して幼少期から大人になるまで一気に発達

してステータブルになって、最後は少し落ちて亡くなる」と考えられます。この縦軸が知的レベルとか発達だと考えると、SENDAは20歳ぐらいまでは非進行性の知的障害で、一定の発達を認めます。

そのあと、20代から30代に急速に神経変性症状が出てきて、2、3年で寝たきりになってしまいます。通常、病態が固まってから患者と遭遇することが多いです。SENDAは頭に鉄が沈着する神経変性症の新しいタイプの疾患として、2011年に初めて提唱されました。

これは、全部異なる5名の患者のMRI画像です。われわれが見つけた遺伝子の変異を全員持っていました。全員、黒質が全く同じ像を示します。すなわち、T1強調画像で、黒質がハイパーで低インテンシティのスリットが入り、ちょうどカエルの顔みたいな形に見えます。T2強調画像では、この3例です。淡蒼球（たんそうきゅう）のところはこのように少し抜ける像です。これはすべて鉄沈着を表す像です。

われわれのところ、5例の女性例が紹介されましたが、これは、疾患の概念を知っていると、割と診断がつきやすいと考えます。5家系のうち、2家系は父と母が正常でかつ健常同胞がいる家系です。これに全部エクソーム解析をかけて、そしてそれぞれの患者には大体600個ぐらいのバリエーションの候補があって、その中で特にレアなもの、珍しいもの、正常コントロール等でみられるバリエーションを引いていくと、既に180個ぐらいに絞れます。

そして、この家系の構成を見て、デノボ変異もしくは劣性変異を想定しながら（劣性変異なら一つの遺伝子に2個異常がある）解析をしていきます。新生突然変異だったら親にない変異を探します。この結果この左家系からはたった三つの遺伝子に絞られて、この右家系では一つしか残らない。しかも、この二つの家系で共通なのは、一つの遺伝子、*WDR45*でした。

今度は*WDR45*を、残りの3家系を含めてサンガーシーケンスで解析をすると、全部に変異があって、ほとんどがフレームシフトとか、スプライシング異常とか、ストップコドンがあります。親が得られたものは全部デノボで、突然変異でした。2例では親がなくてわかりません。

今回解析した症例は5例とも女性の患者でし

た。実は *WDR45* は X 染色体の上の遺伝子なので、X 染色体だと女性で不活化が起こります。そういうことも考慮して、患者由来の株化リンパ芽球でこの遺伝子発現を見ると、RT-PCR (リアルタイム PCR) では、異常産物のみの発現を示すものが3例ありました。

一例では、正常と異常産物が二つとも見えます。X 染色体不活化を見ると非常に偏っています。これはどういうことかという、患者のリンパ芽球では、リンパ芽球にとって都合の悪いような不活化に偏って、異常産物のみが基本的に観察されます。

ウエスタン等もやると、正常な産物のみならず異常産物もほとんど出ていない状況です。機能的なことは細かく述べませんが、*WDR45* という遺伝子が何をしているかという、*WIPI4* というたんぱく質を作ります。*WIPI4* たんぱく質というのは、実は酵母の *Atg18* の相同遺伝子です。これはヒトでは 1 から 4 までの相同遺伝子があり、実はオートファジー (自食作用) の中で超有名なコアたんぱく質の一つです。

オートファジーは、東大の水島 (昇) さんとか、大隅 (良典) 先生とかが世界をリードするかたちで研究を進めておられますが、「自食作用」とも呼ばれます。オートファジーというのは、まず隔離膜ができて、隔離膜が細胞内の小器官とかたんぱく質とかを包含するオートファゴゾームを形成します。これにライソゾームがフュージョンし、オートライソゾームというかたちになり内容物を消化します。消化物からのアミノ酸は再利用されます。

このほかにもオートファジーはありますが、ここではとりあえずマクロオートファジーに特化した説明をします。このオートファジー機構で最も大事なオートファゴゾーム形成の中心的な分子の一つが *WIPI4* です。

今回の発見で何が大事かという、神経変性疾患で、オートファジー異常の関与はずっと言われていました。それはいわゆる脳神経で観察される凝集体とかを掃除するために、オートファジーが発動され、疾患へのオートファジーの関与が指摘されてきましたが、われわれが見つけたオートファジーのコアたんぱくの異常は、生まれたときから既に最初からオートファジーがやられているわけです。

すなわち、プライマリーにオートファジーの異常があって、これがダイレクトに脳のいわゆる変性につながっているというヒトで初めて証明されたオートファジー病になったわけです。この発見でオートファジー研究者コミュニティからすごく喜ばれた仕事になりました。

実は僕はあまり感覚器という仕事をやっていないので、今日その話は直接できませんが、次に小児のてんかんの話を少しさせてください。小児のてんかんの中でも最重症型に位置する、難治性てんかん性脳症という多くが知的障害に至る病気があります。なかなか治療が難しい疾患です。これは山形大学の加藤 (光広) 先生と一緒にやっている研究です。非常にまれな疾患ですが、これまでに加藤先生とわれわれのグループでいくつか病気の遺伝子を決めてきました。

ARX という遺伝子異常が、難治性てんかんのうち大田原症候群とウエスト (WEST) 症候群の原因になったり、*CDKL5* や *STXBP1* 異常が、これらの病気の原因だと証明して、2008年に「ネチャー・ジェネティクス」等に報告しました。加えてとても稀な民族的なてんかんの原因遺伝子もありましたが、これらの遺伝子異常だけでは難治性てんかん性脳症のせいぜい数%しか説明することができませんでした。

この難治性てんかんの最重症型の大田原症候群12例にエクソーム解析をやりました。すると、ぼろぼろ意外な遺伝子異常が見つかりました。*KCNQ2* という良性家族性新生児けいれんで見つかった遺伝子の異常が3例に見つかったり、*SCN2A* という、これもどちらかという良性のけいれんで見つかった異常がデノボで採れてきたり、思いもよらない遺伝子のデノボの変異が二つずつ採れてきたりということで、続いて数百例の難治性てんかんでスクリーニングをやると、それぞれ12例とか15例とか、さらに1例とか、4例とかどンドン見つかってきて、結果的に大田原症候群の責任遺伝子として12例から四つも責任遺伝子が採れました。

KCNQ2 というのはチャンネルの遺伝子で、これはチャンネルを模式図で表しています。*KCNQ2* は、いわゆるカリウムチャンネルの一つを形成しています。何よりも大事なものは、良性の新生児けいれんで、治るタイプのチャンネル異常症として考えられています。実は、重症型の大田原症

候群で見つかった変異の場所と、良性のけいれんで見つかった変異の場所を比較すると、何も両方で異なる傾向がないのです。

ですから、表現型—遺伝型連関というような特徴づけはできません。すなわちこの遺伝子異常は多面性があるということになります。同じ遺伝子の異常で異なる病気が起こってしまうことを言います。こういう発見は次世代シーケンスをやって、バイアスなく遺伝子異常を見ていくことで、初めてわかる思いもよらない異常であり、こういうことがどんどんわかる時代に、今はなっています。

また、SCN2Aという、電位開口型ナトリウムチャンネルの異常です。これも実はタイプの異なる新生児小児けいれんの遺伝子として知られていました。次の見つかった遺伝子異常は、実は糖鎖異常と関連します。どうして糖鎖異常になるかというところ、この遺伝子はUDP—ガラクトース輸送体をコードする遺伝子で、デノボ変異が3例で見つかりました。トランスメンドレンドメインのところにもミューテーションが全部位置しています。

これが変異を起こすと、糖ヌクレオチドがゴルジ体の中に配送されないため、たんぱく質の糖鎖合成異常がうまく進みません。実際にこのSLC35A2がコードするUDP—ガラクトース輸送体が、いわゆるUDP—ガラクトースをゴルジ腔内に移送して、糖鎖の糖付加が起こる、このいわゆる糖を供給するシステムがやられるので、あらゆる糖鎖異常が起こる可能性を意味しています。

糖鎖異常は、さまざまな異常を起こします。これらの患者はすべて難治性てんかん性脳症です。細かく言いませんが、実は、3人を比較すると、顔つきが非常に似ています。広い鼻梁（びりょう）、眉毛が濃い、ちょっと開いた口、歯が癒合していたりとか、独特の奇形兆候があって、脳も萎縮を認め、さまざまな脳波異常を呈します。非常に薬の効きの悪いけいれんがおこっています。

これもX染色体上の遺伝子異常で、患者は全員女性です。男性だとX染色体上の遺伝子は1つだけですのでそれが異常を起こすと恐らく致死になります。患者の変異は、欠失のため、欠失以降のゲノムのシーケンスのエレクトロフェログラム

ではダブルピークとして観察されますが、患者さんのリンパ芽球におけるcDNAのシーケンスでは、野生型アリルだけしか観察されません。

患者のリンパ芽球ではX不活化が非常に偏っているのがわかっていて、この患者の細胞では、いわゆる細胞に有利な、異常を排除するような不活化の状況になっていました。

次世代シーケンサーで研究をやっていると、さまざまな遺伝子で機能的な異常の解析をせざるを得ないことが結構あります。例えば、図に示すようにSLC35A2遺伝子の異常は、ワイルドタイプではゴルジ体と一緒に局在しますが、ある変異ではほとんど発現がみられないとか、ある変異では局在が細胞質に変わるとか、別の変異では野生型の局在とほとんど変わりがないとかを観察していきます。

当然、糖鎖の異常が起こっているに違いないと思って、大阪（府立）母子（保健総合医療センター）の和田（芳直）先生にお願いして、患者の血清のトランスフェリンのN—グリコシレーションとか、アポリポプロテインのO—グリコシレーションを全部調べてもらいましたが、異常はありませんでした。異常のない理由は、X不活化で、正常なアレルのみを発現する細胞だけ残され、変異アリルを発現する細胞は全部排除されてしまった可能性があります。ですから、糖鎖異常が病態の基礎にあっても、血清たんぱく質の糖鎖異常は同定することが難しく、遺伝子異常だけで確定診断がつくのが本ケースとなります。

ところが、これを最初に「アメリカン・ジャーナル・オブ・ヒューマンジェネティクス」に投稿したらすぐ蹴られてしまいました。「どうしてだろう」と思っていたら、その翌月に、糖鎖研究の大家の1人のハドソン・フリーズが既に論文として発表していました。この論文の中で、1例で、5ヵ月のときに血清たんぱく質の糖鎖異常があったけれども、それが38ヵ月のときには消えてしまうというデータがあり、これはまさにわれわれの所見と一緒に、長ずるに従って糖鎖異常が排除されていたわけです。

てんかん遺伝子の最後となります。今日はこれまでチャンネル遺伝子が二つ、糖鎖異常のガラクトースの輸送体の異常が一つお話をしましたが、今度は、Gたんぱく質のサブユニット遺伝

子の異常についてです。この遺伝子は、「*GNAO1*」と言います。これは、去年「アメリカンジャーナルオブヒューマンジェネティクス」で報告しましたが、見つかった変異はすべてミスセンスのデノボの変異で、進化学的に非常に保存されたところのアミノ酸が置換されていました。

この *GNAO1* は、ヘテロ 3 量体 G たんぱく質のうちのアルファサブユニットをコードしますが、この 7 回膜貫通型受容体にくっついたかたちで、多彩なシグナルパスウエーを介して情報を伝達する役割をしています。この G アルファサブユニットをコードしています。これがやられるとどんなことが起きるか。

まず患者の症状ですが、4 例とも基本的には難治性てんかんの典型的なものが多いです。脳波の異常も典型的で、MRI では脳梁（のうりょう）がちょっと薄い、脳白質が少し少なくなっています。もともと膜たんぱく質と結合していますから、基本的に野生型は膜に局在しています。三つの変異体はすべて膜と細胞質の両方に局在するという変化を認めました。3 量体の立体構造モデルの中に変異部位を落とし込んでやって、自由エネルギーの差等でミスセンス変異の意味を探るとか、立体構造の専門家と組んで解析を進めました。

機能的に異なる各種立体構造のかたちによっても自由エネルギーが違ふとか、なかなか難しい解釈をしないといけません。基本同定された変異は自由エネルギーが高く立体構造の不安定化と関連しています。最終的に、この *GNAO1* 変異で、アルファサブユニットがやられて、ベータ、ガンマサブユニットが協調して行うカルシウムチャンネルの抑制がやられてけいれんを引き起こしている可能性があります。

以上のように積極的にエクソーム解析を行うと次々と新たな発見が期待できます。最終的に、現在判明している大田原症候群の遺伝子異常は、88 例を解析して、54 例に 10 種類の遺伝子の変異が見つかった状況です。遺伝子異常を知らないままに、経験則に基づいた治療が行われていた時代から遺伝子異常をあらかじめ把握して治療を開始することが可能な時代が近づきつつあります。

例えば、*STXBPI* の変異例では、ある薬剤が著効する例が出てくるとか、*KCNQ2* 変異例では、

既にダイレクトにそのチャンネルを開口させる薬が承認されているので、これを使えば効くのではないかと想像されます。また、*SCN2A* 異常ではナトリウムチャンネルの阻害剤が著効した例を経験したとか、まさに情報に基づいて薬の使い分けができる可能性が少しずつ示されています。

また、スチリベンツールという新しい薬が、ドラベ（Dravet）症候群に対して適用になりましたが、これは GABA の取り込み作用阻害剤です。遺伝子異常がわかったときに、新しい薬がどういうふう効いてくるのかということも興味深いところです。

要は、個々の症例における遺伝子異常を知らない医療と、知った医療は、違ふはずだという事です。

まだ、ちょっと時間がありますので、脳関係の仕事が続きますが、これが最後のトピックになります。小児期に脳委縮を示す患者がいます。遺伝性とか後天性とか片側性とか、さまざまな分類があります。臨床的には非常にやっかいで、小脳委縮を小児期に認める疾患は少なくとも 70 疾患ぐらい知られています。それぞれの異なる疾患の臨床症状はかなりオーバーラップします。

臨床症状の中で例えば失調症は 36 疾患が呈します。知的障害は 14 疾患、てんかんは 20 疾患に認めます。単純に臨床症状と小脳が委縮しているということだけで正確な臨床診断に至ることは、相当訓練を積んだ小児神経科医でも時に非常に困難だと考えられます。さらに、何が原因なのかはというところまではなかなかわからないことも多いと思います。

これは大人も含めてですが、小脳委縮と運動失調を伴う疾患の責任遺伝子は、150 個以上あると言われています。一個一個候補遺伝子を選択しサンガーシーケンスで解析するのは、全く現実的ではありません。

今の自治医（科）大の小児科に移られた小坂（仁）先生が神奈川（県立）こども（医療センター）にいたときに、小脳委縮を呈する 23 家系 25 例を送ってもらって解析するチャンスがありました。このスライドは解析方法ですが、自分たちのところにある正常例 406 エクソームの中に認められるバリエーションを除いて、基本的に既知の遺伝子、知られている遺伝子に注目しながら、まず既知の遺伝子診断をやっていこうというア

アプローチをとりました。

結果的には23家系中9家系で原因がわかりました。つまり約4割の患者で遺伝的原因がわかりました。このスライドは最初の1、2、3家系です。あまり細かくは述べませんが、葉酸受容体の複合ヘテロ接合性変異が見つかってきました。どちらかの遺伝子異常は片親から由来して、いわゆる劣性遺伝病が起こっています。葉酸受容体変異、それからジュベール (Joubert) 症候群と言われる遺伝子で見ついている遺伝子異常が、やはり複合ヘテロ性変異で見ついています。

次のスライドも同定された遺伝子です。CACNA1というカルシウムチャンネルと、POLG、TPP1とそれぞれにオリジナルの疾患の名前は付いていますが、どれも小脳の委縮がある疾患です。さらに、ITPR1、PEX16と、先に一度出てきたCACNA1Aと、それぞれが引き起こすオリジナルの疾患の名前を書いています。

このスライドは、遺伝子異常のみ見つかった9家系10例の臨床症状をまとめています。(運動)発達遅滞、小脳症状は100%にあって、知的障害、筋緊張低下、てんかんと、かなりの臨床症状がオーバーラップしていて、遺伝子診断だけが個別化を可能としています。

今まで病気に関連した遺伝子異常が採れるという話ばかりしてきましたが、採れないものも実は結構多いです。小脳委縮では14家系で原因がわかりません。原因がわからない理由は、両親検索ができないもの、見つかるけれどもバリエーションの意義がわからないもの、新規遺伝子の確定にはさらにエビデンスを積まないと結論できないもの、全くバリエーションがないものなどがありました。結果的にわかるものよりわからないもののほうが多い疾患もあります。

このスライドが小脳委縮の解析で一番言いたかったことです。一番最初に示した葉酸受容体のヘテロ接合性変異の患者は、17歳の男の子と14歳の女の子で、てんかん、(精神運動)発達遅滞、小脳失調がありました。この結果がわかって、兄の脳脊髄液の葉酸を調べたらやはり低値を示しました。これを確認したうえで葉酸の経口投与を始めたら、劇的に臨床症状が改善してきました。

兄は投与3週間で少しの介助で歩行が可能と成り発語も増加、けいれんが減少し、遺伝子異

常がわかって治療することで明らかな良い効果が出てきました。3歳年下の妹は歩けるぐらいでしたが、投与1ヵ月で歩行スピードが上昇して走れる、作業スピードが上昇、発語が改善、逆に元気になり過ぎて困るぐらいだと主治医がおっしゃったくらいに劇的に改善しています。

小児期の小脳の委縮、低形成、変性等の疾患の中に葉酸を経口投与するだけで劇的に治るものがあるということが、出口戦略への光を表しているように思います。極端なことを言うと、原因がわかる前にとりあえず葉酸だけ、これは体内では作られないので外からしかあげられないが、高い薬ではないので、小脳萎縮を呈する症例全員に経口投与だけ開始して、原因がこれだったらもう既に治療開始済みだし、薬剤として特に大きな副作用もないので積極的に投与した方がいいのではないかというディスカッションもされるぐらいに非常にエンカレッジな事象だと思います。

ちょうど5分ぐらい前になりました。これはまとめのスライドです。ホール・エクソームシーケンスを用いて、われわれのところで、「僕らのラボの中で、いったい何%原因がわかったのか。絶対確実だというものだけカウントしてくれ」とラボの全員に言ってカウントしてもらい総数を九百数十例の中でやったときには、ラボの中で紹介してもらったケースの21%で、原因がはっきりとわかったという統計結果でした。逆に言うと、8割ぐらいはまだ結論出ずだったり、全くわからないものであったりしました。僕は、あえてこれを出すようにしていますが、さまざまな反応があって、「このくらいしかわからないのか」とか、「いや、僕のところではこんなには絶対わからない」と言う方もいました。

また、これは全体を集計した割合ですが、実は、疾患によって原因解明率がかなり異なるのが特徴です。既に示しましたようにてんかんなどは非常に成績のいい疾患で60%ぐらいわかるし、コフィン・サイリス症候群もこれ以上にわかります。一方で、20例、30例で全く原因のわからない疾患があります。あと、良い点としてはホール・エクソームシーケンスをやることで、遺伝的原因の個別化が可能になってきていると感じます。

また、ある共通の症状で選んだ患者群の中で

は、遺伝的原因を調べるとさまざまな原因で構成されているものがあって、個別化をすることで治療選択が変わる可能性が出てきていることも事実です。

また、コフィン・シリス症候群のように遺伝子は全部違いますが、同じ機能異常カテゴリーに属するような疾患もあるということで、ちょうど疾患の原因を調べることで、遺伝的原因が放散していくような疾患もあれば、収束していく

ような疾患もあるということで、今、まさに次世代シーケンサーを使って、手付かずの原野が耕されている感が出てきていると考えます。ちょうど時間になりましたので、最後に謝辞です。

まず、何よりも患者さんとご家族、そして担当医の先生方に感謝したいと思います。強力にサポートしていただいた各関係省庁等のファンディングエージェンシーに感謝したいと思います。以上です。ありがとうございました。

1

遺伝性疾患におけるエクソーム解析の有用性

横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学
松本 直通



第9回感覚器シンポジウム平成26年3月14日東京医歯センター

3

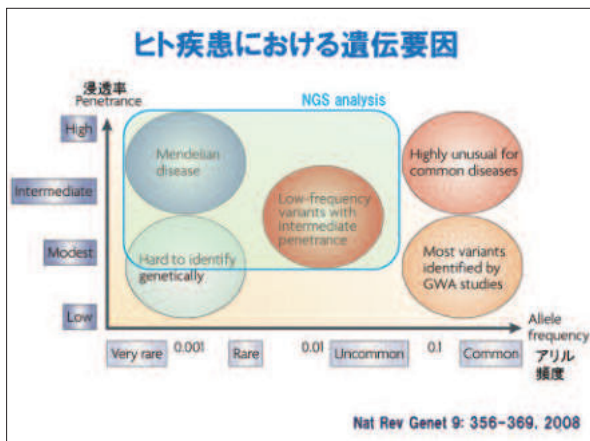
現行の次世代シーケンサー

会社	機器	リード長	リード数	ラン時間	出力
ハイスペック					
Roche	GS FLX	1000 bp	100万	23時間	700 Mb
Life Technologies	5500xl SOLID	60x2 bp	24億	7日	180 Gb
Illumina	HiSeq2500	100x2 bp	50-60億	10日	600 Gb
パーソナル					
Roche	GS Junior	400 bp	10万	10時間	35 Mb
Life Technologies	Ion PGM	400 bp	500万	3時間	2 Gb
Illumina	MiSeq	300x2 bp	5000万	27時間	15 Gb
デスクトップハイスループット					
Life Technologies	Ion Proton	200 bp	8000万	3時間	~10 Gb
Illumina	Nextseq	150x2 bp	8億	29時間	~120 Gb

1分子シーケンサー: Helicos (short read), PacBio (long read), Oxford nanopore?

PacBio: max 25000-bp read (50000 reads) (平均4500bp) ?, but accuracy is 89%
重ねて読むことでエラーを排除

5



2

キーワード

希(稀)少疾患: 国内対象疾患5万人未満

難病: 希少・原因不明・治療法未確立・生活面への長期にわたる支障

ゲノム: 細胞の中に存在する遺伝情報の総体・遺伝子とその発現を制御する情報などを含む

ヒトゲノム: 30億塩基対(3 Gb)

ヒトゲノムプロジェクト: 1990年~2003年(13年)・ヒトゲノム中のDNA配列を全て決定する・ヒトゲノム中の遺伝子を全て同定する・30億ドル

1000ドルゲノムプロジェクト: ヒト1名分の全ゲノムを1000ドルで解読(2014年を目指す)

4

責任遺伝子同定のための疾患ゲノム解析

NGS以前

病態の機能情報

- 機能的クローニング(Forward Genetics)
- ポジショナルクローニング(Reverse Genetics)

ポジション情報を提供する特殊症例が必須(症例家族の大変革、染色体異常合併等)
稀な疾患でかつ特殊な例 > 基礎が重要

NGS以降

網羅性を獲得 → 孤発例を累積(集積可能) → 変異を有する共通遺伝子探索

病態機能情報、家系情報等の付加情報は遺伝子特定に有用であるが必須ではない

解析対象が変化(疾患ゲノム解析のパラダイムシフト)

6

エクソーム解析の利点

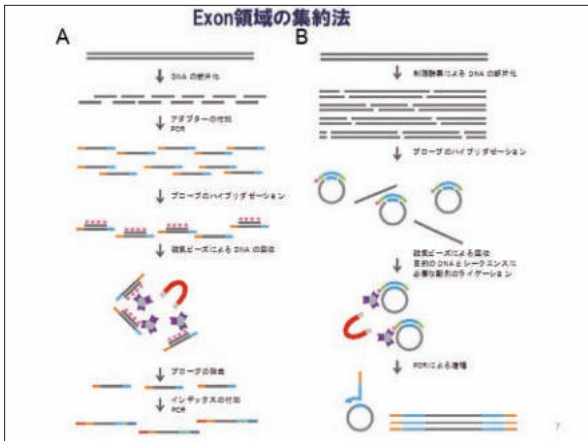
ヒトゲノムのタンパク質翻訳領域: 2%

既知メンデル遺伝病の85%はタンパク質翻訳領域の異常 (Botstein D & Risch N, Nat genet 2003)

300-400万のvariantsのうち<25000に着目すればよい

従来型解析で不可能だった孤発例等が対象(ヒト疾患遺伝学研究のパラダイムシフト)

全エクソーム解析は全ゲノムシーケンスのコストの20%程度の費用(試薬代だけ)(情報解析代は別途)



ヒト遺伝性疾患のOMIMエントリー

Phenotypes	7718
Phenotypes with genes	4134 (53.6%)
Phenotypes without	3584 (46.4%)

OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html> X Feb/7/2014)

タンパク質をコードする遺伝子の総数

22287 (complete human genome sequences, 2004)

Coffin-Siris症候群 (OMIM#135900)

Grange S. Coffin医師 & Evelyn Siris医師が報告 (Am J Dis Child 1970)

- 独立した3例の女児
- 知的障害
- 第五指爪低形成

粗な顔貌・多毛を含む多様な先天奇形兆候

遺伝形式は不明であった
 常染色体劣性遺伝モデル: 罹患同胞例や血縁家系での発症
 常染色体優性遺伝モデル: 罹患児の親に症状の一部を認める・染色体異常例

現行解析システムでの再解析 (全例孤発例でADモデル)

Subject	1	4	5	9	11
Unknown SNP variants	690	675	563	338	661
WG/SS/ In-del	458 (56)	244 (30)	394 (47)	230 (32)	453 (51)
Unknown variants (In-house database)	248 (16)	129 (9)	165 (6)	105 (5)	204 (8)
Variants not found in Parental exomes	3 (0)		6 (0)		3 (0)

excluding dbSNP135, Seg dup, NHLBI esp5400 and our in-house 655 exomes

2 reads were mapped



横浜市立大学エクソーム拠点での解析

WES解析総数: 3943 サンプル (H26・3・14時点)
 疾患責任遺伝子の同定 (新規遺伝子およびアレリックな遺伝子)

発表	疾患	責任遺伝子	雑誌
2011	AR脊髄小脳変性症	SYT14	Am J Hum Genet
2011	びまん性大脳白質形成不全	POLR3A & POLR3B	Am J Hum Genet
2012	Coffin-Siris症候群	5 SWI/SNF genes	Nat Genet
2012	大田原症候群	KCNQ2 (allelic)	Ann Neurol
2012	大田原症候群	CASK (allelic)	Epilepsia
2012	劣性体短野症	PAPSS2 (allelic)	J Med Genet
2013	Kabuki症候群	KDM6A	Hum Mut
2013	新生児代謝異常	UQCRC2	Hum Mut
2013	SENDA	WDR45	Nat Genet
2013	ネマリンミオパチー	KLHL40	Am J Hum Genet
2013	SEMD-JL1	B3GAL76	Am J Hum Genet
2013	大田原症候群	SCN2A (allelic)	Neurology
2013	大田原症候群	GNAO1	Am J Hum Genet
2013	大田原症候群	SLC35A2	Hum Mut
2013	Leigh脳症	GYG2	Hum Genet
2014	Coffin-Siris症候群	CSS (仮称)	Submitted

マイクロアレイ解析による微細染色体異常解析

9.2-Mbの常染色体着床欠失
 ⇒ 非典型例 ⇒ 典型例10例では特に異常無し

典型例5例の全エクソームシーケンス

Subjects	GA II x Version	Total Base (Gb)	% bases above 5	% bases above 10
01	Ver.4	8.2	87.5	83.5
04	Ver.4	10.9	91.9	88.8
05	Ver.3	6.2	67.2	61.8
09	Ver.4	9.6	92.7	89.1
11	Ver.4	8.5	92.0	88.2

SMARCB1変異: 22例中4例に異常 (18%を説明)

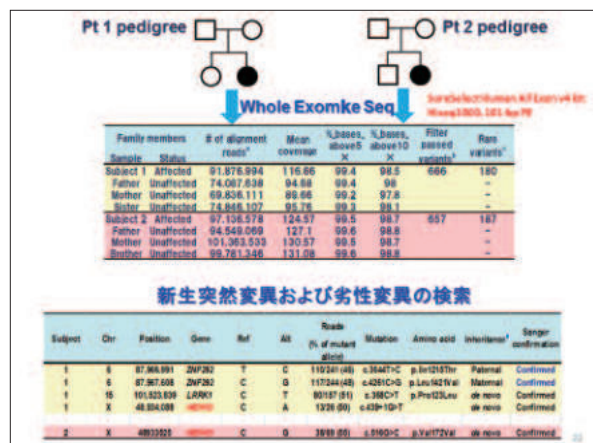
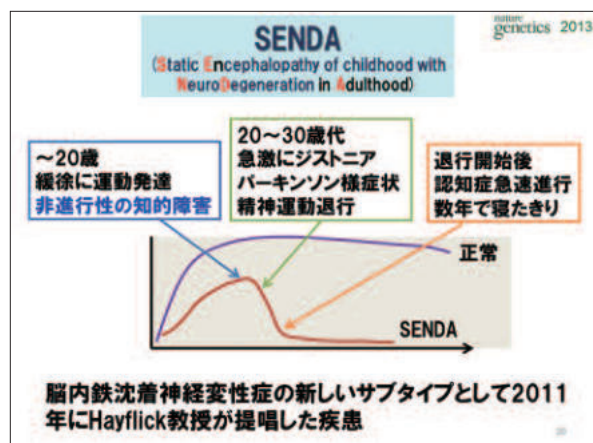
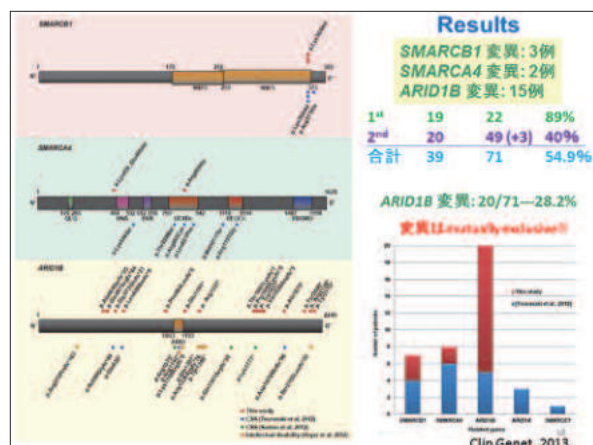
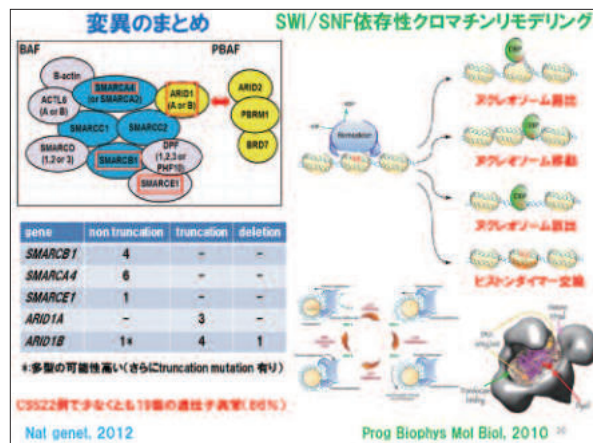
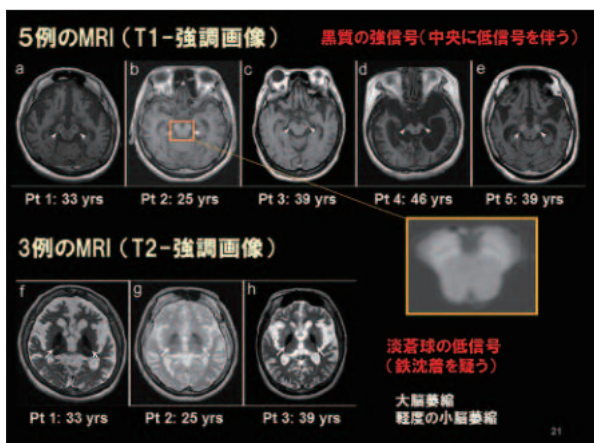
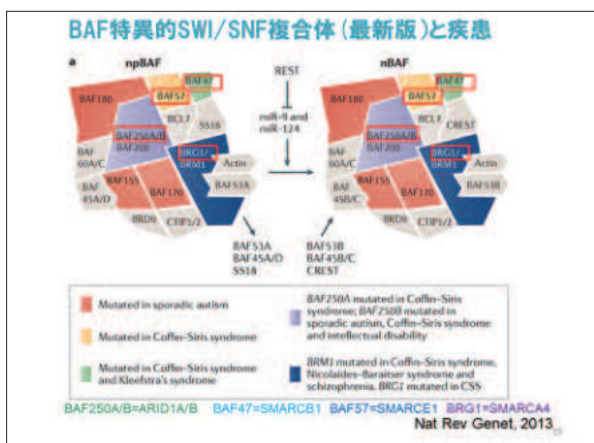
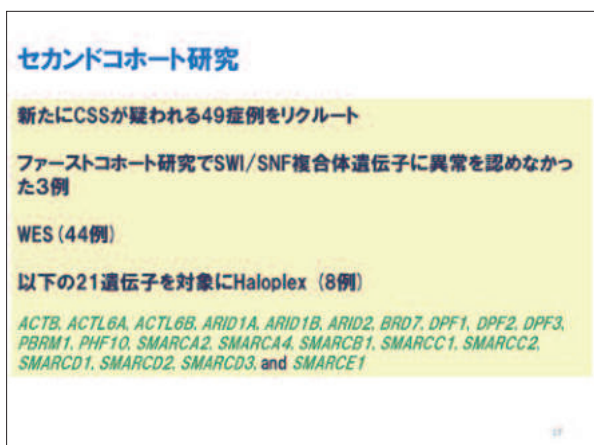
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1 c.1130G>A (p. Arg377His)

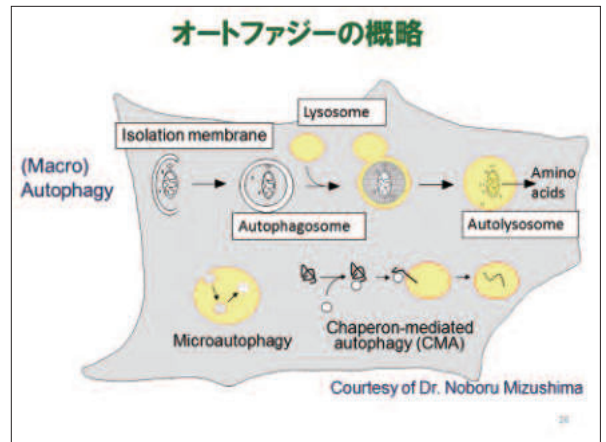
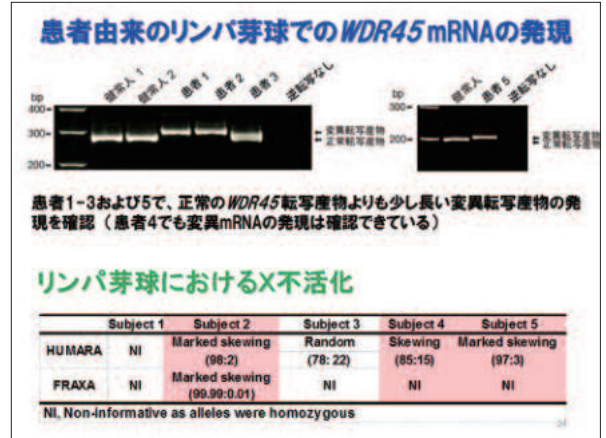
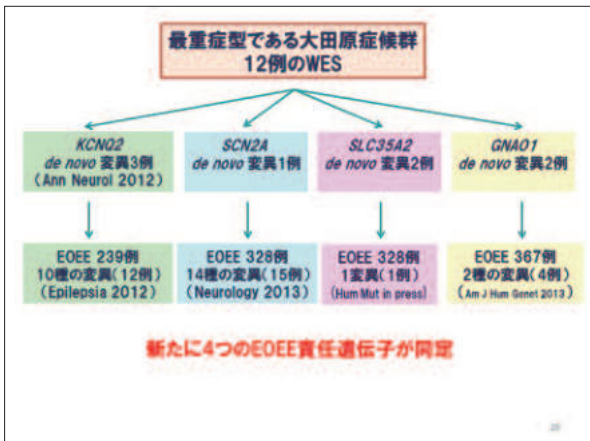
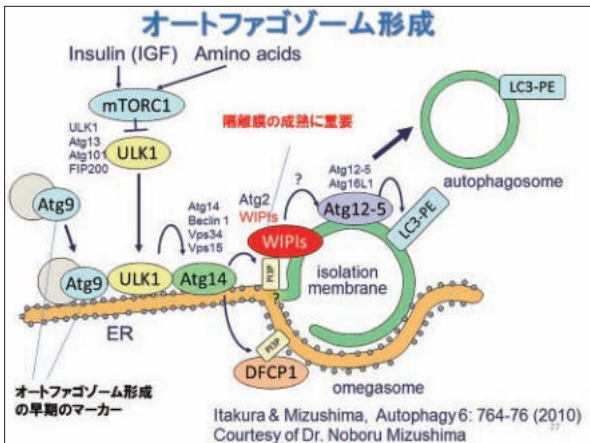
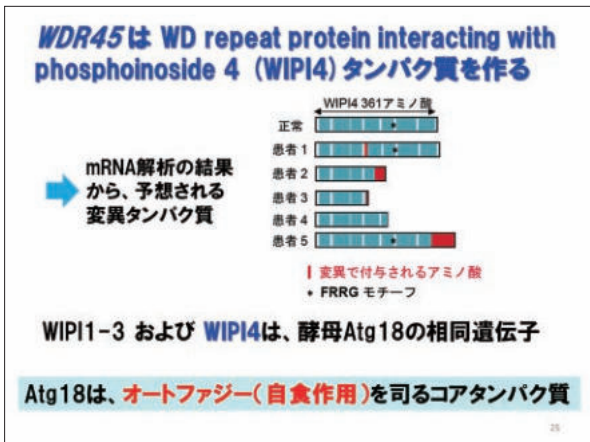
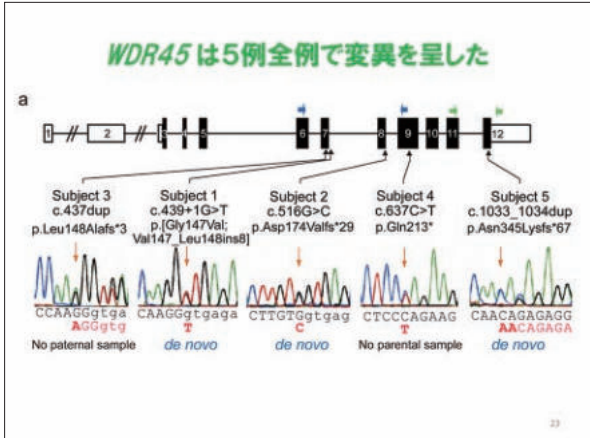
腫瘍抑制遺伝子 (体細胞変異の報告多数)
 Gemline変異: Rhabdoid tumor 胎発生症候群 Schwannomatosis c.1091_1093delAGA (p. Lys364del)

SMARCA4変異: 22例中6例 (27%)

全て de novo 変異 ミスセンス変異

c.1536_1638delAAG (p. Lys546del)
 c.2653C>T (p. Arg885Cys)
 c.2576C>T (p. Thr859Met)
 c.2781C>T (p. Leu921Phe)
 c.3032T>C (p. Met1011Thr)
 c.3489C>G (p. Arg1157Gly)





難治性てんかん性脳症
Early Onset Epileptic Encephalopathy (EOOE)
山形大学・加藤光広先生らとの共同研究

- ✓ 早期小児期発症の難治性てんかんと発達障害が特徴
- ✓ 複数の遺伝子がすでに単離されていたが、それぞれが一部の疾患を説明するに過ぎない

ARX	大田原症候群とWest症候群
CDKL5	West症候群
STXBP1	大田原症候群
SLC25A22	早期ミオクロニーてんかん

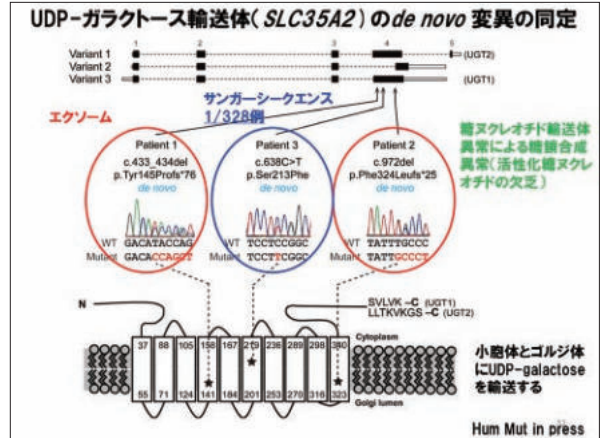
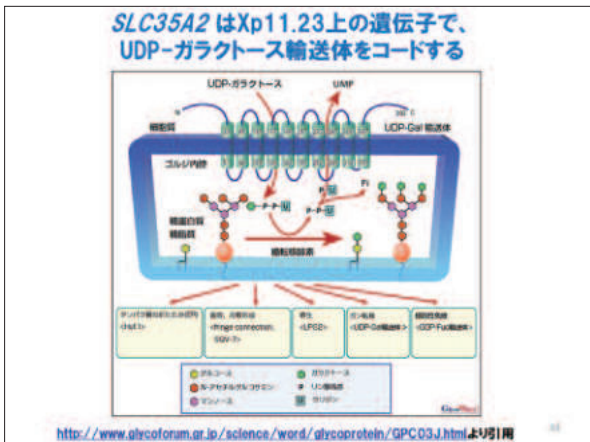
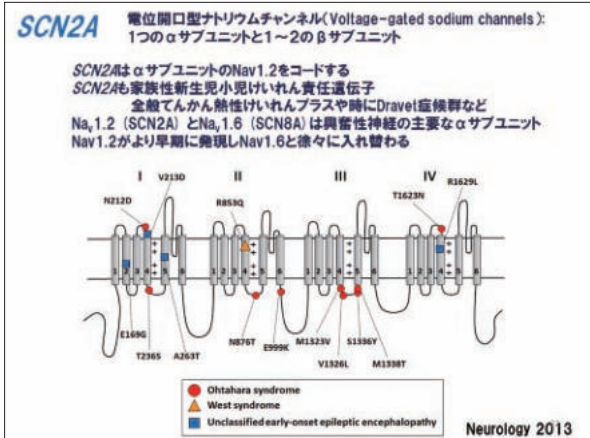
KCNQ2 (potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2)

- ・神経興奮性の調節に重要な役割を果たしているM型カリウムチャネル
- ・KCNQ3とヘテロ4量体を形成
- ・KCNQ2とKCNQ3は、椎体細胞の細胞体および樹突に共発現しており、KCNQ2は神経線維にも発現している(プレシナプスでの役割を示唆)

KCNQ2とKCNQ3は良性新生児けいれんの責任遺伝子であった

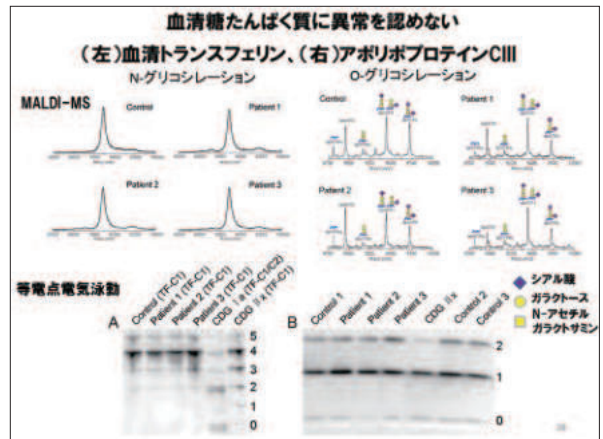
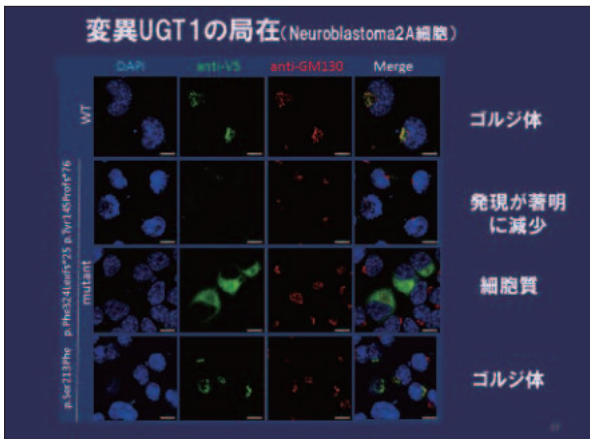
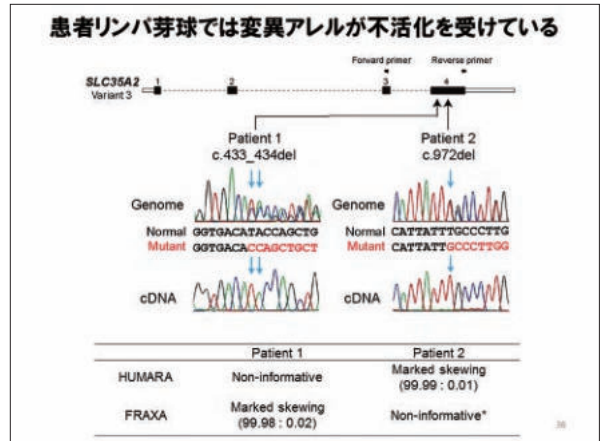
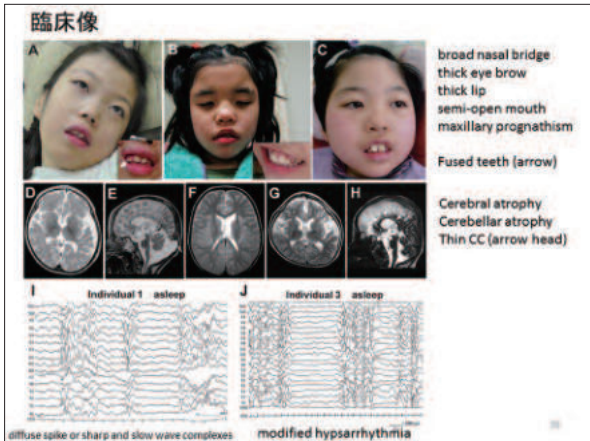
EOOEで同定されたKCNQ2変異と良性新生児けいれんのそれとの間に明確な表現型-遺伝子型連関無し

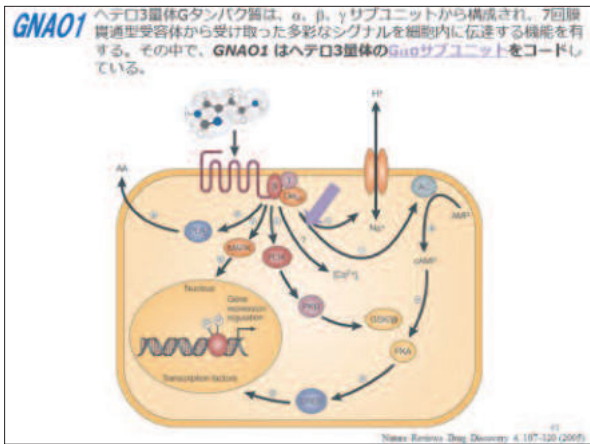
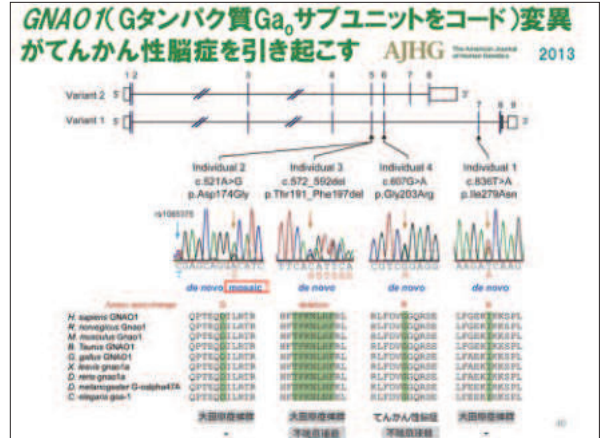
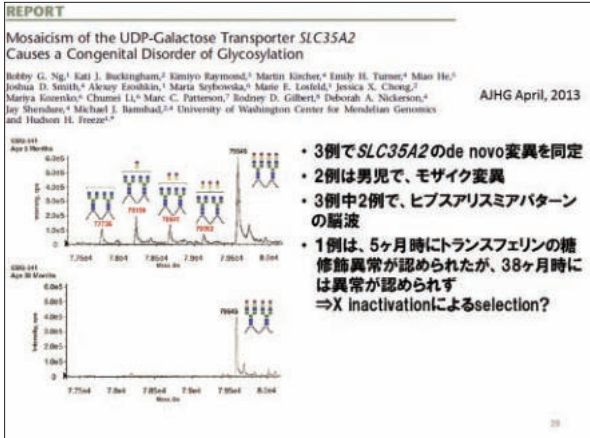
Epilepsia 2013



SLC35A2 変異患者の臨床所見

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Age	8 yr 10 mo	12 yr 8 mo	10 yr 5 mo
Gender	Female	Female	Female
Diagnosis	EOEE → West syndrome	EOEE → West syndrome	Early-onset West syndrome
Initial symptom	Tonic seizure at 6 days	Spasms at 1 mo	Spasms at 3 mo
Initial EEG findings	Diffuse spikes or sharp and slow wave complex with brief suppression	Diffuse sharp or spike and slow wave complex	Hypsarrhythmia
Transition of seizures	Spasms at 50 days, tonic seizure of upper extremities at 1 yr 3 mo	Generalized tonic seizure and spasm at 7 mo, spasm at 6 yr 6 mo, focal seizure at 12 yr	Brief tonic seizure, spasm at 1 yr 0 mo
Transition of EEG findings	Hypsarrhythmia at 2 mo, multifocal spikes at 2 yr	Hypsarrhythmia at 4 mo, diffuse fast waves at 12 yr	Multifocal spike and slow wave complex at 10 mo
Seizure control	Intractable	Intractable	Intractable
Development	No head control, no words at 8 yr	Crawling on hand and knees, no words at 12 yr	No head control, no words at 10 yr
MRI	Acrochord pouch at 2 mo, cerebral and cerebellar atrophy, thin corpus callosum, delayed myelination at 2 yr	Normal at 2 mo, spotty high intensity signal in white matter, slight enlargement of left lateral ventricle at 4 yr	Normal at 3 mo, severe cortical atrophy, cerebellar atrophy, thin corpus callosum at 8 yr
Dysmorphic features	+	+	+
Other features	Hypotonia	White spot in the eyeground, atrial septal defect, ureteropelvic junction obstruction, vesicovaginal fistula	Hypotonic quadriplegia, hip dislocation

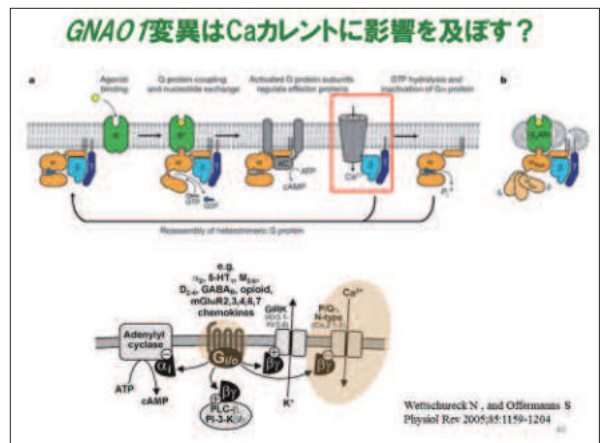
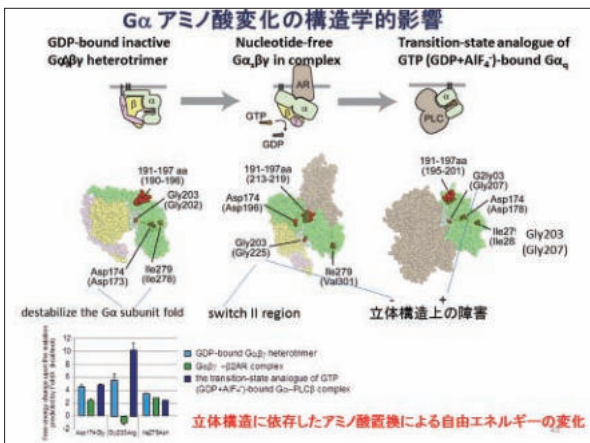
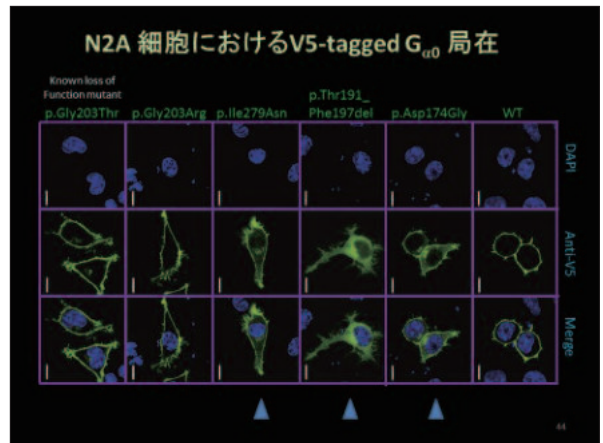
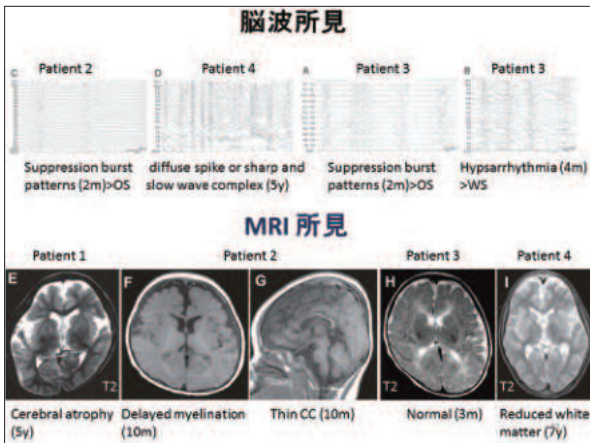


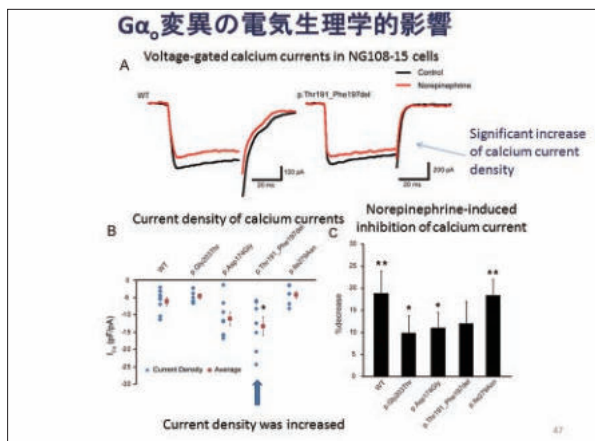


GNAO1 変異症例の臨床症状

	Individual 1	Individual 2	Individual 3	Individual 4
Age, gender	13 yr, female	4 yr 7 mo, female	dead at 11 mo, female	8 yr, female
Mutations	c.836T>A, p.Ile279Asn	c.521A>G, p.Asp174Gly	c.572_552del, p.Thr191_Phe197del	c.603G>A, p.Gly203Arg
Inheritance	de novo	de novo, somatic mosaic	de novo	de novo
Diagnosis	epilepsy with tonic seizures	epilepsy with tonic seizures	epilepsy with tonic seizures	epilepsy with tonic seizures
Initial symptom	Tonic seizure at 4 d	Series of tonic seizures at 29 d (tonic upgaze, head nodding, extension of all extremities)	Series of tonic seizures at 2 w (resemble spasms)	Epileptic encephalopathy, developmental delay at 7 mo
Initial EEG	Tonic upgaze with pattern at 4 d	Suppression burst pattern at 8 w	Suppression burst pattern at 3 w	Diffuse regular spike and slow wave complex at 5 yr
Course of seizures	Tonic seizure at 6 yr	Series of tonic seizures at 9 mo	Tonic seizure at 19 mo	Focal seizure (tonic upgaze), tonic seizure at 5 yr
Course of EEG	Multifocal sharp waves at 1 yr 4 mo	Diffuse SW at 1 yr 7 mo	Suppression burst at 4 mo	ND
Involuntary movement	-	-	Dystonia	Severe chorea, athetosis
Seizure control	ADP-502 (2.5 mg/kg/day)	Phenytoin (2 mg/kg/day)	Levetiracetam	ADP-502 (2 mg/kg/day)
Development	-	-	-	Delayed myelination
Head control	-	-	-	-
Reading	-	-	-	-
Striving	-	-	-	-
Strawing/night wets	-	-	-	-
Brain	Normal at 1 mo	Delayed myelination, thin CC at 19 mo	Normal at 3 mo	Delayed myelination at 1 yr 3 mo, reduced cerebral white matter, thin CC at 4 yr 8 mo

EEG = electroencephalography; d = days; w = weeks; mo = months; yr = years; CC = corpus callosum; ND = not done.

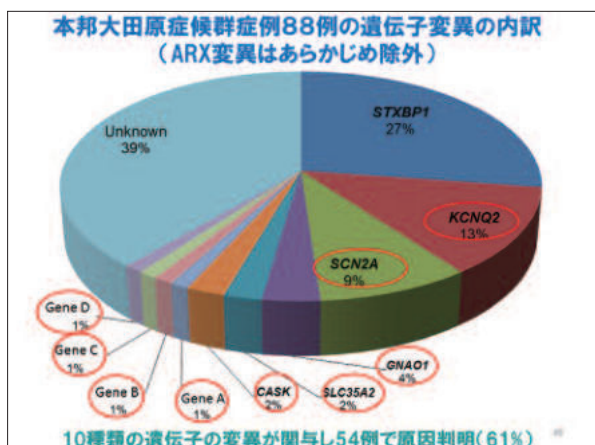




GNAO1 (c.521A>G)モザイク変異と変異アリル率

Methods Saamples	Read counts		% of Mutant alleles
	Mutant alleles	Wild type alleles	
Whole exome			
Blood #1	6	29	17.14
Deep sequencing			
Blood #1	2,996	13,430	18.24
Blood #2	2,659	11,784	18.41
Nail #1	4,167	12,174	25.59
Nail #2	2,975	14,948	16.80
Saliva	3,073	14,255	17.73
Father Blood	23*	18,154	0.13
Mother Blood	27*	14,872	0.18

Samples of blood and nail have been independently obtained twice (#1 and #2).
*These small numbers of mutant reads were considered to be PCR or sequencing errors.

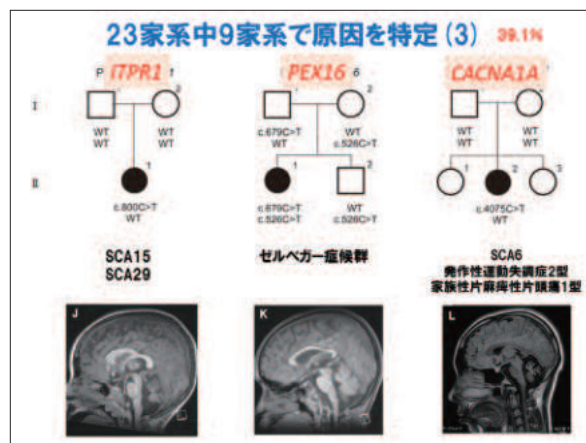
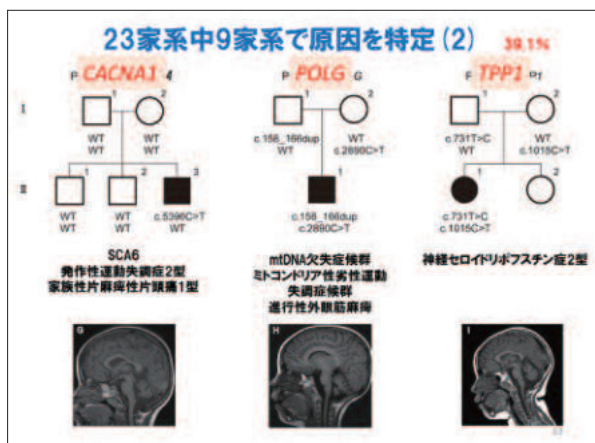
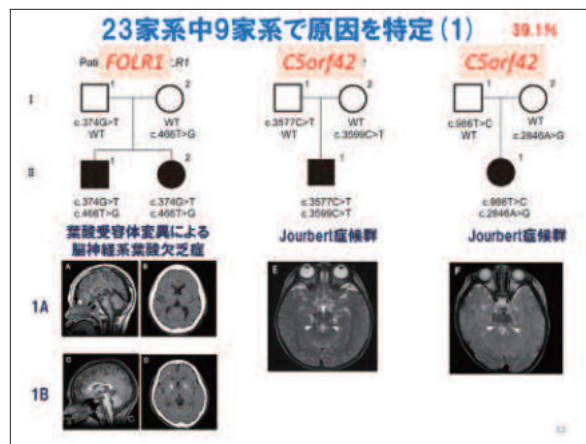


小児期の小脳萎縮について

- ✓ 小児期の小脳萎縮(遺伝性・後天性小脳萎縮・片側性)
- ✓ 遺伝性小脳萎縮は少なくとも70疾患に認められ臨床症状がオーバーラップする
- ✓ 例えば失調症は36疾患に、知的障害は14疾患に、てんかんは20疾患に認められる
- ✓ よって小脳萎縮を伴う疾患の正確な臨床診断は時に困難である
- ✓ 小脳萎縮と運動失調を伴う疾患の責任遺伝子は150以上報告され遺伝学的な診断はさらに難しい

MRIで小脳萎縮を認めた23家系25症例のWES解析 (小坂仁先生・現自治医科大学小児科らとの共同研究)

- ✓ WESのパフォーマンス
Refseq遺伝子領域を平均125カバレッジでシーケンス
ターゲット領域の94.3%を10xでシーケンス
- ✓ dbSNP135のMAF>1%のバリエーションとインハウス406エクソームに2回以上あるバリエーションは除外
- ✓ 既知の責任遺伝子には注目



臨床所見

所見	症例数 (割合)
運動発達遅滞	10 (100%)
小脳症状	10 (100%)
知的障害	9 (90%)
筋緊張低下	9 (90%)
てんかん	5 (50%)
脳MRI	
小脳半球と虫部ともに萎縮	8 (80%)
小脳虫部の萎縮もしくは低形成	2 (20%)
脳幹萎縮	1 (10%)

共通の臨床所見を呈する疾患において、複数の原因遺伝子変異が同定された

まとめ

- ✓ WESを用いた希少疾患の遺伝的原因説明は21%(ケース毎)
- ✓ 疾患により原因説明率は異なる(0~60%程度)
- ✓ 遺伝的原因の個別化が可能である
- ✓ 様々な異なる原因で構成されている疾患がある>個別化の重要性>原因説明で治療選択が変わる可能性(奏功する治療薬も)
- ✓ 異なる原因であるが、同じ機能異常カテゴリーに属する疾患もある

原因未確定の14家系の内訳

- ✓ 両親検索が困難 2家系
- ✓ バリエントの意義が不明 5家系
- ✓ 新規遺伝子の確定には十分なエビデンスが必要 6家系
- ✓ 候補となるバリエントが全く検出できない 1家系

② ゲノム解析事業の過去・現在・未来

タカラバイオ株式会社 バイオ研究所長

北 川 正 成

今日は少し宣伝じみた話になる可能性もありますが、当社のゲノム解析事業の進展といったことを話しながら、ゲノム解析からその延長上の遺伝子の診断といったことをご想像いただければと思います。

早速ですが、今日はこのように会社紹介から始めます。私がこの会社で行ってきたドラゴンジェノミクスという施設でのゲノム解析の紹介、そして松本先生からも詳しく話がありました。次世代シーケンサーを使って行っている事業の紹介、その中でゲノム文化が発展してきたことに少し触れます。そして最後に、当社の最近のゲノム事業の方向性を紹介します。

最初に、当社はタカラバイオという会社ですが、もともとは宝酒造という酒会社の発酵技術をベースにしたバイオテクノロジーを用いた会社です。最近、このバイオテクノロジーをベースにして、いろいろな機能性食品とかそういった事業も行いながら、遺伝子治療あるいは細胞医療の基盤技術を開発しながら、実際に治験とか臨床研究なんかを進めて、がんの細胞医療なども進めています。

こういった分野を合わせて CDMO (Contract Development And Manufacturing Organization) といった分野と捉えて、最近、事業を進めています。

宝酒造の時代の話です。過去ということで、バイオテクノロジーの黎明期で1979年になりますが、私も当然まだ会社に入っていないし、まだ学生というか大学にも入っていなかった時代の話です。遺伝子工学研究に必須な試薬として制限酵素を日本で初めて開発・製品化した会社が宝酒造です。

ここにあるのは当時の写真ですが、最初は7品目、EcoRI とか HindIII とか有名なところを

まず商品化しています。これをベースにして、1988年に PCR 法と言われる方法による遺伝子の増幅システムを海外の知財を独占販売権として取得して、その製品の販売を開始しました。その延長上として、今度は技術利用的なところでも知財を獲得したうえで、その周辺の製品の開発を行って、いわゆる遺伝子工学関係の試薬用キットを商売として広げてきました。こういったことが、今のゲノム解析のベースになっている技術です。

そして、2005年にはアメリカのクロンテック社を買収するなどして、事業を拡大してきました。現在では、こういう関係の製品として約7千種類の製品を扱っているという状況になっています。

そのうえで、ドラゴンジェノミクスについてお話しすると、この施設自体は、最初はドラゴン・ジェノミクス株式会社という別会社として2000年に三重県の四日市市で立ち上げました。現在もここに位置しています。遺伝子解析の受託事業をメインとした会社で、広い意味でのゲノム解析といったものを受託サービスとして行っています。先ほどの松本先生の話にあったようなゲノムの解析、あるいは遺伝子の解析を受託として行っています。

ゲノム構造の解析はもちろんですが、ゲノム変異の解析、そして遺伝子発現プロファイルの解析なども行いますし、その遺伝子機能そのものの解析なども受託としてやっています。2000年当時、このような今では古いタイプのシーケンサーを45台並べて、日本あるいはアジアの地域でも有数の非常に大きなゲノムセンターとして立ち上がりました。

これは外観で、こういったデータを処理するコンピューターのシステムも併設しています。

これは最近の次世代シーケンサーを操作しているところです。歴史的にはこの前の遺伝子工学試薬の発売から始まり、1990年にいわゆるゲノムプロジェクトといったものが始まっています。

この当時にターゲットになったのは、このころからヒトゲノム解析プランは始まっていましたが、それ以前にまず大腸菌ゲノムプロジェクトが日本で立ち上がり、それに当社が加わったのが始まりだと思います。2000年にドラゴンジェノミクスセンターを立ち上げましたが、その以前から DNA チップといったゲノム解析、あるいは遺伝子発現解析の基礎になる技術といったものの開発も行ってきました。

実は、ここに「MPSS 網羅的発現解析」と書いてあります。少し写真が小さくて見にくいですが、蛍光顕微鏡で画像を撮りながら 1 塩基ずつ塩基配列を解析する装置です。これは、今のイルミナのシーケンサーの前身になる機械で、これを海外のメーカーと共同で、日本で初めてサービスとして開始したのが2003年ぐらいの話です。そのあと、いろいろな機種次世代シーケンサーを導入して、現在に至っています。

概観すると、タカラバイオの受託サービスのポリシーは、バイオの先端技術を一般のユーザーへ届けるといったことになります。研究の支援から、最近では産業支援といったところで実用的なところを支援していきたいといった方向性になっています。次世代シーケンサーのいろいろな種類を取りそろえています。

もちろんマイクロアレーの解析装置などもそろえて、先端的な解析の場を皆さんに提供しよう、データを皆さんに使っていただくといったポリシーで行っています。

ここで、昔の話を少し振り返らせてもらいます。これはクラシカルなシーケンシングサービスで、2001年から始めているものです。当時は大腸菌遺伝子というか、ゲノム断片一個一個のシーケンスしたいものをクローニングをして、その大腸菌コロニーをピックアップして、それを培養したうえでプラスミドなり何なりのテンプレート調製して、シーケンサーにかけるための、いわゆるダイデオキシターミネーターの反応を行い、それを精製してシーケンサーにかけて、それをコンピューターで解析するといった非常に煩雑なステップがありました。

このステップをロボットを使ったりして、システムティックに行うことが、その当時の非常に重要なポイントでした。

ここでも「60プレート」と書いてありますが、いわゆる384穴のプレートなどを扱って、プレートをずっと流して行って、最後にデータにします。このひも付けが非常に重要なポイントだったということです。

これは非常にクラシカルなシーケンシングシステムでした。実際に、ヒトゲノム解析は、NGS が登場する前の話ですので、こういったシステムで行われていたわけです。ヒトゲノム計画自体は、実際には1990年から始まったというのが、先ほど先生の話にもありましたが、提唱したのは一応、(R.) シンスハイマー博士だと思います。

1990年から15年を目標にしてスタートしましたが、その間にいろいろな技術の進歩もあったので、約10年でほぼ完成したといったところで、日本も一部貢献しているもので、こんなセレモニーも行われたことは記憶している人もいます。

同時に、実はアメリカのセラ・ジェノミクスという民間企業がありますが、これと並行して独自にヒトゲノムの全配列を解析してしまっただころもあります。これらはすべて、先ほど見たクラシカルなシーケンサーで全部シーケンスされています。先ほど30億円というのがありますが、実際にはいろいろな経費を入れると、多分 1 千億円以上のお金がかかってきたと思います。

実際に行われたのはこんなシーケンサーで、実は最近では、こういうフィルムを見なくなった人もいるかもしれませんが、これは昔、RI (放射性同位元素) でシーケンスしていた頃の写真です。電気泳動した写真をオートラジオグラムで撮って、「A」の塩基、「T」の塩基、「G」の塩基、「C」の塩基というのを順番に読んでいたところから、キャピラリー電気泳動といったかたちのシーケンサーが発達して、やっとヒトゲノムの解析ができるようになったという状況だったと思います。こういう技術の進歩は、ゲノム解析のスピードに非常に貢献しています。

その当時、「ゲノムをシーケンスして何をやるんだ。わかるのはこの程度のことじゃないか」

という揶揄があったわけです。「お酒が飲める人・飲めない人の変異は、こんな1個の遺伝子で決まるんですよ」。そんなことはお酒を飲んでみればわかる話なので、ゲノムを解析しなくてもいいという話もありますが、一つの象徴でこういった変異と表現型のリレーションは、あらゆるところで付くようになります。

実は、その想像がなかなかできなかったのが、日本のゲノム解析が終わった瞬間だったと思います。日本では、実はゲノム解析を終了した瞬間にゲノム関係の予算がぐっと削られた時期があって、そこら辺が日本のゲノム科学分野の少し問題だったと思っています。

そういう中で、次世代シーケンサーの開発が海外ではどんどん進められています。残念ながら日本ではそういう技術は全く生まれなくて、今ある次世代シーケンサーはすべて海外製です。ポイントになった技術は、主にはこの二つだと思います。

一つはエマルジョン PCR という技術で、先ほど大腸菌のコロニーをピックしてクローニングしてシーケンスするという話をしましたが、その大腸菌を使わなくなった、クローニングを *in vitro* で行ってしまうようになったのがこの技術です。これは油の中に1個の水滴を作って、その1個の中で PCR を行う技術です。これによって大腸菌を使わなくてもできるようになって、煩雑なクローニングからプレート調製してみたいところが、ほぼ機械的にできるようになりました。

そして、これは先ほど見た蛍光顕微鏡で画像を撮りながらシーケンシングをする一つの例です。この場合にはエマルジョン PCR ではなく、1個の点の枠の上で PCR をするようなことをしますが、これは一つのクローンです。そのクローンの上で順番に塩基配列を読んでいます。1サイクルごとに写真を撮っていて、ここのポイントにあるこのクロンのシーケンスが「T」、「G」、「C」、「T」、「A」、「C」、「G」、「A」、「T」という並びで塩基配列が読み取られて、DNA テンプレートの配列がわかります。

これは非常に超並列に一つの画像の中に最初のころは数万個、今では数千万個から数億個の点を一遍に解析するといった技術として発達して、これによってデータ量が爆発するほどの塩

基配列のデータとして採れるようになってきたということが言えます。

当社のシーケンサー設備の変遷を少し紹介します。はじめは、こういったクラシカルなシーケンサー、これは GE ヘルスケア社、当時はアマシャムファルマシア（バイオテクノロジー社）だったかと思いますが、MagaBase というシーケンサーです。これの新しいタイプで、アプライド・バイオ・システムズ社（現ライフテック社）のシーケンサーもありますが、これもキャピラリータイプのクラシカルなシーケンサーです。

そのあと、2005年に最初に出た次世代シーケンサーで、当社に入ったのは2006年ですが、ロシュ・ダイアグノスティクス社が買収した454（ライフ・サイエンシズ）社という会社が造ったシーケンサー GSFLX、当時は「GS20」と言ったシーケンサーでしたが、こういったシーケンサーを入れました。これはエマルジョン PCR を使っているシーケンサーです。

それと並行してアプライド・バイオ・システムズ社、これも Agencourt 社という会社が開発したのですが、ソリッド（SOLiD）という機械を入れました。この機械自体は、今はもうほとんど使われなくなって、2011年には当社でも使用しなくなりました。

これは先ほど見せたリンクスという会社の「MPSS」というシーケンサーですが、シーケンサーマシンとしては発売されなくて、もっぱらインハウスでの受託として使っていましたが、Massively Parallel Signature Sequencing、要するに大量のサンプルをパラレルに、シグニチャーという非常に短いシーケンシングを行う機械でした。実は、これが進化して、今のイルミナ社のシーケンサーになっています。

イルミナ社のシーケンサーは、今は HiSEQ という機械が主力ですが、先ほど紹介がした MiSEQ という小さいシーケンサーもあります。これらのシーケンサーがある横で、アプライド・バイオ・システムズ社などは IonPGM、Ion Proton といった pH センサーを使ったシーケンサーを発売して、そのシーケンス反応自体も簡単になっているシーケンサーも出ています。

一方で、これは PacBio 社という会社のシーケンサーですが、これも当社が去年の末に導入し

ました。イルミナなどのシーケンサーが非常に短いシーケンスしか読めないことに対するアンチテーゼというか、PacBio社の装置は長いシーケンスを、そんなにはたくさんではありませんが、ある程度のリード数を取るといったポリシーで造られているシーケンサーです。非常に早く読み取れる装置です。

単純に、昔のシーケンサーと今のシーケンサーの一つを比べてみると、昔のキャピラリーシーケンサーは750ベース、長いモードですと1キロベースぐらい読めることもありますが、平均750ベースぐらいのシーケンス長で、1回に96リードのシーケンスを採るので、大体7万2千ベースのシーケンスデータが得られます。

ヒトゲノムを解析するには数年かかったものが、今の次世代シーケンサーだとシーケンス長は150ベースから、せいぜい200ベースぐらいですが、解析数として一遍に96リードに対して6億リードといった装置になっています。解析データの質が違うので一概に比べられませんが、ヒトゲノムは最速2日でシーケンスできる能力があるということで、このスピードの差を想像してください。

実際に、これはNIH（アメリカ国立衛生研究所）のホームページの図なのでどこでも見られますが、コスト・パー・ゲノムということで、こういったグラフを描いている絵があります。ムーアの法則が、実はこういうラインであるといった中で、そのムーアの法則を超えるスピードでコストダウンしていることを示しています。この次世代シーケンサーの、特にHiSEQが出てきてからグーンと下がって、今や「千ドルゲノム」がほぼ見えてきたところです。

ですので、この変化のスピードに対応するように、実は公共データベースのシーケンスのデータの登録量が、こんなスピードでグーンと上がっています。2000年ごろまでは、この当時ヒトゲノム（計画）があったわけですが、そこから数年はそんなにスピードが上がっていませんが、次世代シーケンサーが出てきてどんどんデータ量だけは増えています。

これはDDBJ（日本DNAデータバンク）のウェブサイトから借りていますが、このようにデータ増加のスピードは上がり、ゲノム・シーケンスは、決めれば決めるほど比較ゲノムとしてさらにシー

ケンスされ、またゲノムを決めるといったスピードで限りなく伸びているのが現状です。

こんなにデータが増えると、当社としても非常に困ってきたのは、つまり事業として非常に問題になってきたのは、コンピューターシステムのメンテナンスです。シーケンシングデータのプロセッシングの装置ということで必要なコンピューターシステムですが、当社におけるNGSデータは、今は多分、1日最大で数十テラバイトが出るような状況になっています。

先ほどのHiSEQを10台ほど保有していますので、大体この10倍分のデータが毎日最大量で出ていると思いますが、パフォーマンスとしては、計算機ノード数は68台の合計で865コアです。これが実際に想像できる数字かどうかはわかりませんが、メモリーとして15テラバイトです。ストレージもペタバイト単位の容量をメインテナンスしながら事業を進めないといけないのが、逆に悩みの種です。シーケンシングのコストは下がりましたが、事業としては計算機のコストがどんどん上がっているのが正直なところで、今の大きな課題です。

そういった中で、ヒトゲノム解析の様相が非常に大きく変わってきています。ヒトゲノムのドラフトが決まってから、ヒトゲノムの完全解析ということで、このドラフトをもっときれいなリファレンス配列にしていこうということは並行してずっと行われてきていました。

その中で次世代シーケンサーが登場したことによって、比較ゲノムがどんどん進められるようになりました。人種の比較とか個人のゲノム解析による比較とかができるようになって、先ほどの松本先生のような具体的なアカデミックな成果がどんどん広がってきたと思います。

さらには、最近のがんのゲノムを決めることで、組織のゲノム解析といったところでも進めるので、1人の個人のゲノムも一生のうちにジャムラインでの1回目は、遺伝的な変異というのはわかりますが、実際には組織のゲノムということで、がんの組織だと既にそこには変異が入っています。そのため、一生のうちに個人のゲノムを何度も読むといった状況が生まれていると思います。そういった意味では、事業的には下世話な話ですが、シーケンシングの対象は数限りなくあるといった感じだと考えていま

す。こうやって出た疾患関連遺伝子の同定が、どんどん進められていくと捉えています。

実際にヒトゲノム解析でどんなものが行われているかといったことについて、先ほど松本先生から具体的な話があったのにこんな抽象的な話をするのは恐縮ですが、いわゆる人種間の比較、人種の特徴とか解析とか、人種別のゲノム配列の構築みたいなことがどんどん進められています。特に、日本人特有とかアジア人特有といったリファレンス配列も最近、非常に重要であるといったことが、こういったところから叫ばれていると思います。

そして疾患と健常コントロールの比較と言っているところから疾患原因遺伝子が特定されてきたわけですし、先ほど言ったように組織間の比較といったところから、正常組織とがん組織の比較といったところからがん変異の特定といったことも進められました。もちろん、個人間の比較といった意味で、個人の特性の解析が行われていることもあります。

これは一つの典型的なお話ですが、がんの関連遺伝子の変異といったもの、これはパーソナル・ジェノテック・ダイアグノスティクスという会社のウェブサイトから少し借りてきましたが、2005年以降に次世代シーケンサーが登場して以降、がんに関連する遺伝子変異が非常にたくさん見つかり、それまではこんなレベルだったものがここからグーっと上がっています。有名な ALK の変異なども見つかっています。それに合わせて、ターゲットを絞った薬がたくさん開発されているといったことがグラフとして描いてあります。

こういったように、ゲノムの変異からターゲットを絞った薬を多数開発するといった流れの創薬といったところから、これは最初から想像されていたことですが、それが現実になってきたという状況だと思います。

そういったゲノムの解析の中で、一つ文化的にショッキングだったのが、こういったニュースだったのではないのでしょうか。これは昨年少し話題になったアンジェリーナ・ジョリーが、自分の遺伝子の変異から自分が乳がんになることを覚悟して、逆にそれを予防するために手術を行ったといったことです。こういったものは、要するにゲノムというものが文化として浸透し

てきたのではないかという典型ではないかと、私自身は捉えています。逆に、そういったところから事業としての発展性も間違いなくあると確信が持てたと思いました。

これは一つのパロディですが、「20××年のドラッグストアで、『これが私のシーケンスなんだけれども、これに合った薬をください』といったようなことがまことしやかに行われるようになるのではないか」と言われてきました。実は私はこのスライドを10年以上前から使っていて、10年ぐらい前からこんなことが現実になるのではないかと行ってきましたが、技術的には本当にこれが可能になってきたと思います。

ただ、実際にこういった状況になってみると、実はほかにいろいろな問題があることがわかります。ゲノムのシーケンス等から、もちろん原因の遺伝子がわかるとうれしいですが、それ以外のわからなくていいところまでわかってしまうという問題があります。それをどう解決すればいいのかというのがないと、実際にはこんな状況にはまだまだ遠いと、最近また逆に思い始めました。

一方で、個人のゲノムを解析するという欲求はどんどん進んでいて、次世代シーケンサーの次の次世代シーケンス、NextNGS がどんどん開発されています。先ほど、松本先生の話にもオックスフォードのナノポアシーケンサーの話が少し出ていましたが、実際にホームページで公開されている写真がこんな感じです。

こちらは少し大型の機械ですが、小型の機械として USB メモリーのようなかたちで USB ポートでつないで、ここにゲノムのサンプルをペットマンに入れてやると、ここでシーケンシングを行ってデータ解析をして、これ自身がシーケンサーとして働いてシーケンシングのデータが見られるということを示しています。ヒトゲノムはまだシーケンスされた報告はありませんが、最近、大腸菌のゲノムがこれで実際にシーケンスできることが証明されたデータなども出始めています。

そして、これもまた少し変わった機械ですが、この GnuBio、「グニューバイオ」と呼ぶそうですが、この機械などもここに DNA のサンプルをセットしさえすれば、データとしてポンと出てきます。本当にオール・イン・ワンのシステム

としてできています。ここにあるジェナプシスという会社の機械なども、本当に小さい機械で、今のPCRの装置ぐらいの大きさで、サンプルをセットすればデータが採れるかたちになってきて、まさにパーソナルな機械として病院での検査機械としてシーケンサーが使われる時代になってきていると思います。

実際にゲノム解析といっても、先ほど松本先生はエクソーム解析の話がされましたが、当社でやっているサービスは幅広く、全ゲノム解析も行っているし、ターゲットを絞ったゲノムシーケンシングも行っています。全ゲノム解析の場合には、30億塩基対の解析を全部行うので、少し領域も大きいし、エクソームなどではわからないところまで調べることができるのが、これをやる意義だと思っています。

非常に大きな欠失とか挿入などもこういうゲノムでやれば見ることができるし、染色体の転座とか逆位などのゲノムの構造変化も、これを使って見ることができます。あるいはゲノムの重複、いわゆるコピー・ナンバー・バリエーションの多型もホールゲノム・シーケンスの場合には十分に見ることができます。今後は多分、さらにコストが下がっていくので、こういったシーケンシングのデータが実際に臨床で利用されていくことが増えると思います。

そういった中で、当社がやっているサービスは、こんなかたちでやっています。ユーザーからサンプルを受け取ったら、サンプルのクオリティをコントロールする、つまり品質をまずチェックします。そのうえで、シーケンシングにかかるライブラリー作成を行って、シーケンサーのデータを採ります。そのうえで、それをコンピューターによって、データ解析をしてお返しするといった流れです。

重要なのは、当社はこういう大規模な解析をやって非常にコストを稼ぐ、コストを安く提供しようということであり、こういった先端技術を安価に提供するかたちでやっています。こういった作業の中で重要になってきているのは、シーケンスデータの信頼性です。今までドラゴンジェノミクスでシーケンシングのサービス等を行っていましたが、でも、シーケンシング自体はコストがどんどん下がっているんで、それ自体の重要性は非常に薄れています。

一方で、当社は遺伝子医療の支援サービスといったかたちで、GMP（アメリカ食品医薬品局）にも準拠したかたちでサンプルの調整とかサンプルの扱いを行ってきました。この二つを統合して、先ほど言った CDM（Contract Development And Manufacturing）といった捉え方をしています。受託センターとしては、基礎研究によるサンプルの調整から実際の臨床応用までをこの中でやっていこうと。その中に、ゲノムのシーケンシングといった作業も含めていこうといったかたちで事業を現在は進めています。

ですので、シーケンシング自体は非常に技術的に進歩して、サチュレーションしている中で、これからの付加価値は、実はこういったサンプルからデータまでのリレーションをしっかりと改めて取る。それが実際のデータの信頼性につながる、それが実用的なものになるといったことで事業の方向性が据わるといったかたちで今進めています。

当社はこういったかたちで事業を進めていますので、ご興味があれば、また声をかけてもらえるとありがたいと思います。どうもありがとうございました。

Takara Clontech

ゲノム解析事業の過去・現在・未来

タカラバイオ株式会社 北川正成

that's GOOD science!

タカラバイオは技術を売る会社 バイオテクノロジーをベースに事業展開する

遺伝子医療事業 遺伝子治療・細胞医療の基盤技術の研究 がんの遺伝医療 医薬分野

CDMO分野

遺伝子工学研究事業 安定収益事業 世界中の大学・企業のバイオ研究を支援 がんやエイズの遺伝子治療

研究用試薬 研究委託サービス

バイオテクノロジー 遺伝子工学技術 細胞工学技術 機能性食品・キノコ事業 医食品バイオ事業 第2の収益事業化 食品分野

理化学機器

Takara Clontech

ドラゴンジェノミクスセンター

- 2000年にドラゴンジェノミクス(株)として、三重県四日市市にて遺伝子解析受託事業を開始。
- 広義の「ゲノム解析」に関する受託サービスを提供
 - ゲノム構造の解析
 - ゲノム変異の解析
 - 遺伝子発現の解析
 - 遺伝子機能の解析

Takara Clontech

バイオの先端技術を一般のユーザへ

研究支援から産業支援へ

定量PCR
マイクロアレイ
▶▶miRNA解析
▶▶遺伝子発現解析

次世代シーケンサー
▶▶ヒト全ゲノム解析
▶▶特定遺伝子の変異解析

CNV/SNP/メチル化
▶▶DNA変異解析

Takara Clontech

- 会社紹介
- ドラゴンジェノミクス以前
- ドラゴンジェノミクスの事業
- 次世代シーケンサー(NGS)
 - ゲノム文化の進展
- 事業の方向

Takara Clontech

バイオテクノロジーの黎明期(1970年代)に 遺伝子工学研究事業をスタート

1979年
遺伝子工学研究に必要な試薬：
制限酵素(7品目)国産初発売

1988年
PCR法による遺伝子増幅システムの
国内独占販売権を取得し、PCR製品
を販売開始

2005年
米国Clontech社 買収

2013年
アイテム数 約 7,000 種類

Takara Clontech

ドラゴンジェノミクスセンター (ゲノム解析・発現解析)

遺伝子解析センター稼働

ドラゴンジェノミクスセンター稼働

NGS導入

1990

2000

2010

大規模ゲノムプロジェクト参加

MPSS経路的発現解析

Takara Clontech

Classical Sequencing services since 2001

Colony Picking
Pickers 60 plates / day

Culture
Fluo-Matrix

Template prep
TempIPis

Sequencing rxt
Dye terminator

Purification
60 plates / day

Sequencing


Assemble

Takara Clontech

ヒトゲノム計画

1984年 カリフォルニア大学R.シンスハイマー博士がヒトゲノム計画を発案
 1990年 ヒトゲノム計画が15年を目標とし、正式にスタート
 2000年 米国の民間企業セラ・ジェノミクス社ヒトのDNAの全塩基配列の読み取りを完了
 2000年 国際コンソーシアムとセラ・ジェノミクス社共同ドラフト配列完成を宣言
 2001年 ドラフト配列の論文発表
 2003年 ヒト・ゲノム配列解読完了を宣言

およそ10年、1千億円以上。



Takara Clontech

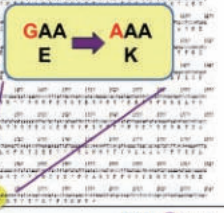
お酒を飲める人と飲めない人

Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial) (ALDH2)
 NM_000690 2445 bp mRNA
 CDS 442..1995 (1554b)
 NP_000681 517 aa Protein
 mat_peptide 18..517 (500 aa)

アルデヒド脱水酵素 (ALDH2) 遺伝子に1塩基の違い。K型になると分解活性が無い


EE型: お酒に強い
 KK型: お酒が飲めない
 EK型: 少し飲める

GAA → AAA
 E → K



Takara Clontech

Sequencers systems



GE Healthcare
 Miseq
 2000.7/2001.25~2006

Applied Biosystems
 3730xl DNA Analyzer
 2005.9~

LYNK
 MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing)
 2003~2008

Applied Biosystems
 SOLiD+
 2005.4~2011.12

Illumina
 GAIx
 2008.9~

Illumina
 HiSeq2000 x 3
 2010.5~

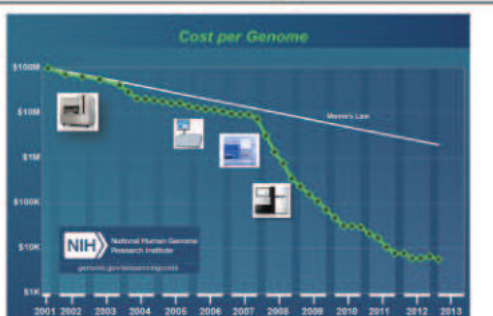
Roche/Genosystos
 GS FLX+
 2000.9~

2012.7~ 2012.7~ 2014.11~ 2013.11~

Takara Clontech

シーケンシングコストの変化

Cost per Genome



NIH National Human Genome Research Institute
 genome.gov/ncicinfo/ncisites

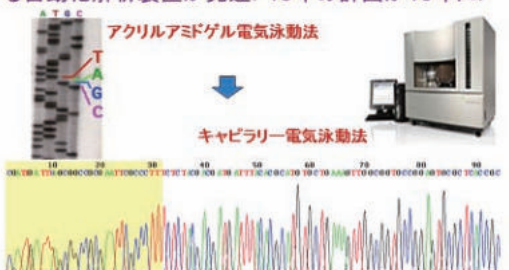
Takara Clontech

ヒトゲノム計画の中心技術

配列決定法として、サンガー法(ジデオキシ法)による自動化解析装置が発達。15年の計画が10年に。

アクリルアミドゲル電気泳動法

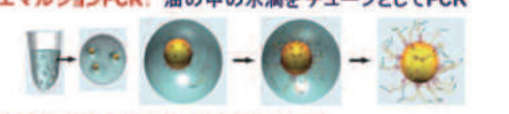
キャピラリー電気泳動法



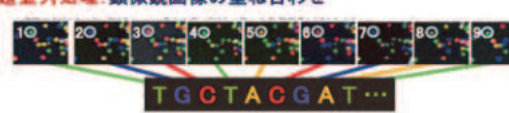
Takara Clontech

次世代シーケンサーのブレイクスルー

エマルジョンPCR: 油の中の水滴をチューブとしてPCR



超並列処理: 顕微鏡画像の重ね合わせ



TGCTACGAT...

DNAはGとC、AとTが結合する性質を利用して、一方の鎖を鋳型としてコピーを合成することにより、配列を正確に複製を作ってゆく。

Takara Clontech


シーケンサー比較

キャピラリーシーケンサー ABI3730xl	次世代シーケンサー HiSeq
750 base	シーケンス長 150 base
96リード	解析数 6億リード
72,000 base	解析データ量 90,000,000,000 base
数年	ヒトゲノム解析 2日

Takara Clontech

公共データベースへのシーケンスデータ登録量

Nucleotides




Note: CON division is not counted in statistics of DDBJ periodical releases.

DDBJ websiteより

Takara Clontech

Sequencing data processing related equipments

- Computer System
 - TANSY (TakarabioAnalysis System)
 - Including the Large storage and Memory server, Blast server, etc.
 - High performance processing
 - >2TByte/day of NGS data




Key Performance

計算機ノード数68台
合計865コア
合計メモリ 15TB
ストレージ容量 1.7PB

TakaRa C|ontech

ヒトゲノム解析では何が行われているか？

- 次世代シーケンサの登場で、ヒトゲノム解析の価格が大幅低下
- 多検体データによる統計的な比較解析が可能に
 - 人種間比較・・・人種の特徴を解析、人種別のゲノム配列構築
 - 疾患・コントロール比較・・・疾患原因遺伝子の特定
 - 組織間比較(正常組織と癌組織)・・・癌変異の特定
 - 個体間比較・・・個人の特性解析



TakaRa C|ontech

SNP解析 BRCA1の遺伝子変異

アンジェリーナ・ジョリー、がん予防で乳房切除を告白 - MSN 年経ニュース




TakaRa C|ontech

Next-NGS は Personal machine?

- Oxford Nanopore Technologies
 - https://www.nanoporetech.com/
- GnuBIO
 - http://gnubio.com/
- GENAPSYS
 - http://genapsys.com/




TakaRa C|ontech

ヒトゲノム解析



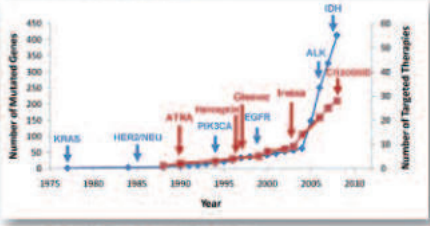
1000 Genomes
A Deep Catalog of Human Genetic Variation

ヒトゲノムドラフト解析 → ヒトゲノム完全解析 → 人種ゲノム解析 → 組織ゲノム解析

世界規模のプロジェクトが進められ、ヒトゲノムが多角的に研究されている
これらのデータをもとに疾患関連遺伝子の同定が同時並行で進んでいる

TakaRa C|ontech

癌関連遺伝子変異




PersonalGenomeDiagnostics | webble.jp
http://personalgenome.com/translating-cancer-genome-analyses

2005年以降、癌に関連する遺伝子変異が多数発見されている。
それによってターゲットを絞った薬が多数開発されている。

TakaRa C|ontech

a drugstore in 20XX,

"Here's my Sequence..."



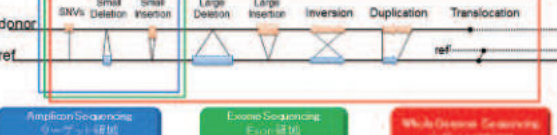
TakaRa C|ontech

ゲノム解析

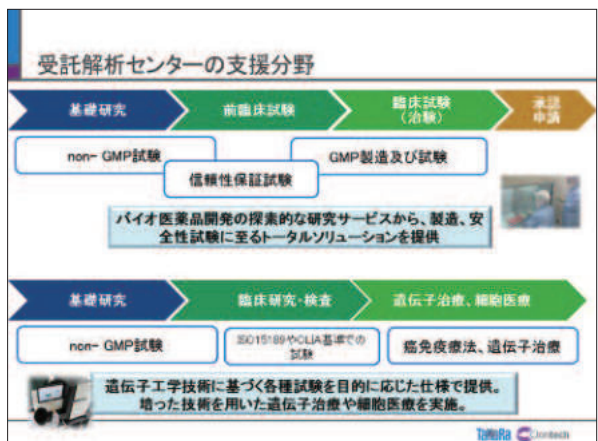
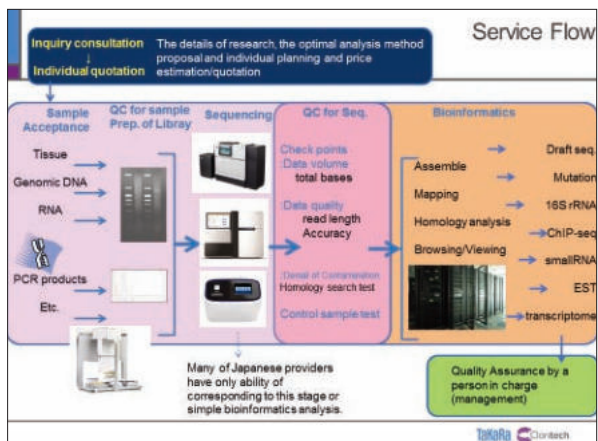
全ゲノム = 30億塩基対は“生命の設計図”であり“究極の個人情報”
オミックスを解釈する一番の基礎情報

ゲノム変異: 一塩基変異(SNV), 小さな欠失・挿入領域(indel), 大きな欠失・挿入領域(indel), 染色体転座や逆位などゲノム構造変化 (SVs), ゲノムの重複・欠失などコピー数多型 (CNVs)

Amplikon Sequencing (ターゲット特異的), Exome Sequencing (エクソーム), Whole Genome Sequencing (全ゲノム)



TakaRa C|ontech



タカラバイオ・ゲノム解析サービスの特徴

- 大規模解析設備**
 - 国内最大級の次世代シーケンサー台数保有
 - 大型計算機の併設
- 最先端技術**
 - ヒトゲノム解析の様々な手法確立
 - miRNA解析や微量検体のqPCR解析
- 遺伝子工学ノウハウ**
 - 社内規定を含めた臨床検体の取り扱い整備
 - 組織や血液/血漿などからの核酸抽出

Takara Clontech

CDMセンター

ドラゴンジェノミクスセンター **細胞・遺伝子治療センター**

2014年度より統合

CDM(Contract Development & Manufacturing)センター

- バイオ産業支援事業部門に2つのセンターを統合し、CDMO事業の効率化および品質向上をはかる。
- 拠点は、三重県四日市、滋賀県大津市及び草津市とし、2015年度の草津市での新センター開設にて全統合予定。
- 従業員数 約135名
- 基礎研究支援から遺伝子医療支援まで幅広くカバー

Takara Clontech

that's **GOOD** science!™

Takara Clontech

③ 臨床現場における遺伝子検査と 遺伝カウンセリングの課題

胎児クリニック東京 医療情報・遺伝カウンセリング室長

田村 智恵子

私の尊敬している松本先生の話も非常に最先端でしたし、北川先生の話も非常に崇高な感じで、それに比べると私は、今日は自分の普段やっていることの愚痴大会みたいになってしまいますが、あまり難しい話は出てきません。ぜひ医療者、研究者の立場の先生や一般の方々の視点でも結構ですので、私に、「もっとこうしたらいいんじゃないか」ということがあれば教えてくださいたいと思います。本日はほとんど問題提起ばかりで私の頭の中には解決法がありませんが、少し話しさせていただきます。

自己紹介を簡単にします。今、先生に紹介してもらいましたが、私はアメリカに留学していて、結構有名な人たちとちょうど会えるぐらいの時代に行っていたので、割と最先端のことも見聞きできました。私は端っこのほうで聞いているばかりでしたが、私の留学先のジョーンズ・ホプキンス（大学）は遺伝学の非常なメッカで、(ピクター・)マキューズィック先生が立てた遺伝の部がとても盛んです。

ワシントンにギャローデット大学という大学があります。耳鼻科領域の先生方をご存じかもしれませんが、ここは世界で多分唯一だと思えますが聾の人たちだけの大学です。留学中に私は、インターンシップでここの保健室の相談担当のインターンをやらされて、半年間毎週1回、ここの保健室にいました。

ここの学校は、基本的に授業は全部手話で、学生さんは聾の人しかいません。大学で知り合った聾のカップル同士が、「俺たちさ、何か仲よくなったんだけど、子どもには聴力障害が出るかな」とか言ってやってくる人たちの相手します。しかも、聾の人たちがたくさんいるので、研究者の方々も、ここの学生たちに協力してもらおうとたくさん遺伝子が集められるので、そう

いった協力を仰ぐための説明もしていました。これがギャローデット大学です。こんなところですが、日本人の留学生もいてすごいなと思っていました。

もう一つ、NIHの中に、ナショナル・インスティテュート・オン・デフネス・アンド・アザー・コミュニケーション・ディスオーダーズ（国立聴覚・伝達障害研究所）というところがあって、聴力障害とコミュニケーション障害の主な研究機関です。ここでペンドレッド（Pendred）症候群の研究のチームの手伝いもしていて、そこのインフォームドコンセントを取ったりする仕事もしていました。

これまた私にとっては結構大きな学びがありました。アメリカの中でも手話が3種類もあります。手話通訳を付けて話をするので、遺伝カウンセリングで話をするときにどの位置に座ったらいいかということも学びます。

1回は姉妹がいて、姉妹がそれぞれ違う手話を使うので、いったい姉妹間ではどうやってコミュニケーションをしているのだろうと思いつつ、2種類の手話通訳を付けて、いったい私はどこに座ったらいいかよくわからないままで話をしました。そして、人工内耳を使っている人、使っていない人、いろいろなことの話聞きながら、学びの多い時間を過ごしました。

日本に帰ってきてからは、ここから近いですが世田谷区の国立成育医療センターで仕事をしていたり、いろいろなところにいました。今は順天堂大学付属病院眼科の遺伝相談外来をそこにいらっしゃる私の高校の先輩でもある岩田先生（眼科医）と行っています。

あと、私は、2007年から気付くとこんな時間がたってしまっていますが、東京都の難病相談支援センターのピア相談、つまり患者さんご本

人同士がほかの難病患者さんの相談に乗るという仕事をしていますが、その方たちの研修の講師をずっとやってきました。

ここに非常にたくさんの網膜色素変性症の人がいて、何だか口コミで1人来ると次のときにまた1人来たりして、どんどんそのうち3、4人でまとめて来ます。視力障碍の程度も皆さんいろいろですが、遺伝のことをどのように心配しているかという話も聞かされたし、遺伝と関係なくても皆さんは実際に生活でどのようにしているかといったこともたくさん教えてもらう機会を得ました。

今、私のメインの職場は胎児クリニック東京というところで、これは主に出生前診断、妊婦さんの赤ちゃんの病気を調べる診断を扱うところです。

耳鼻科、眼科に関係ないだろうと思いつつ、実は昨日もとある血友病の遺伝相談に乗っていました。そうしたら、血友病の話をしているはずなのにどんどん違う話になってしまい、「難聴はどうですか」とか、「実は私の親戚に網膜色素変性症の人がいるんですけど、それは遺伝しませんか」とか、どんどん出てくるわ出てくるわで収拾がつかなくなったりもするので、いつ何の話が出てくるかわからないという感じです。

私の仕事は遺伝カウンセリングですが、遺伝カウンセリングとは何かというのは実は非常に難しく、私は、この言葉を使うことにちゅうちょする場面が非常に多いです。

というのは、日本で遺伝カウンセリングをしている人たちはたくさんいますが、みんなやっていることが少しずつ違います。どれがいいとか悪いとかではなく、「遺伝カウンセリングって何」というのが、「遺伝カウンセリング」と呼んでしまうことによって中身が見えづらくなっている、名前を言わないで、何をしているかを言ったほうがいいかと思ったりしています。

ちなみに、私は遺伝学的な情報の状況のアセス、つまり、ある患者さんやその家族の病気が遺伝するのかわからないのか、遺伝するとしたらどのぐらい遺伝するのかといったことを評価して、それに基づいて情報提供をして、さらにそこで皆さんは泣いたり怒ったりいろいろしますが、そういうところでいろいろな心理的なプロセスをサポートすることも行っています。

さて、本題に入りますが、今日は、網膜色素変性症編と難聴編でやってみようと思います。遺伝相談の現場で、先生たちは、そういうことはたくさん経験していると思いますが、よく聞く言葉、「網膜色素変性症なんですけど、子どもに遺伝しますか」とか、私は割と遺伝カウンセラーとして私のことを知っている先生もいますから、眼科の先生とかは、「田村さんのところに行ったらいいよ」と言って送られてきます。

来ると、「網膜色素変性症で遺伝性と言われてます。妊娠を考えているので、出生前診断、子どもに遺伝しちゃ困るから出生前検査を受けたいです」と言われたりとか、「夫が網膜色素変性症なんですけど、不妊クリニックに行けば着床前診断というのをやってもらえると聞いたんですけど、どうしたらいいですか」みたいな相談がよくあります。でも、こういうのを聞くと本当に困ってしまいます。私は何で困ってしまうかのつぶやきを皆さんに聞いてもらいたいです。

まず、「遺伝しますか」と言って、「子どもの検査をしたいんです。おなかの中の赤ちゃんの検査をしたいんですけど」とか、着床前診断は、体外受精、顕微受精で作った受精卵を調べて、遺伝子に異常がなければ子宮に戻す方法ですが、そういうことをやる以前に、まずは一番発端になった患者さん自身の遺伝子検査の結果がないと、出生前診断や着床前診断はできません。それは、出生前診断や着床前診断をしていいかどうかの倫理的な議論とかは少しまだ横に置いて、それ以前にそもそもやろうといってもできないと思います。

なぜならば、例えば網膜色素変性症の原因遺伝子は50個以上知られていて、元の患者さんの異常がいったいどこに起きているかわからないと、子どもで調べようにもわかりません。「じゃあ、調べればいいじゃないか」と言いますが、その遺伝子検査には健康保険が利きませんし、一般の検査会社はやっていないので、研究をしている先生に頼んで調べてもらわなくてはけません。

でも、研究している先生に送っても、50個以上あるものを端から端まで全部やってくれるかといったら、「よくあるものから調べましょうね」みたいな感じになったりするし、もちろん解析にはお金がかかるわけで誰が出すのかもよくわ

かりません。

結構よくあるのは、「調べました」という報告もありますが、調べても半分以上の人は何も見つかりません。ではどれだったの、何だったのだろうとわからずじまいということもあります。その発端者と言いますが、一番話のきっかけになった患者さん自身のそういった結果が出ていないと、子どもで調べることはできません。

さらには、「遺伝しますか」という話に関しても、網膜色素変性症の遺伝形式はたくさんあって、どれだかわかりません。常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝、X連鎖性劣性遺伝などがある、それぞれその患者さんの子どもに出たり出なかったり、きょうだいに出たり出なかったりします。

ぱっと聞いただけでは、「網膜色素変性症は遺伝ですよ」と言われても、「うーん、どのタイプだろう」となってしまってわからないので、私のできることとしては、家族歴を聞きます。「ご家族にほかにそういう方はいらっしゃいますか」とか、「ごきょうだいは何人いて、親御さんのごきょうだいは何人いて、誰と誰はそういうのがあって」とか「なくて」とかと聞いて、「あ、じゃあ、こういうふうに遺伝しているからこの形式かな」とかと推測しようと思います。

しかし、実際は軽くて気付いていない人もいたりするので、そうすると、本当はその人は患者にカウントしなければいけないのに、わからないと、もう遺伝形式の推測そのものが当たらなくなります。

そして、浸透率という専門的な言葉で申し訳ありませんが、遺伝子変異、遺伝子がうまく機能していないところを家族の中で受け継いでいても、その人たちが絶対に発症するとは限らないので、代々もらっていても途中の人がまるで症状が抜けて見えるのは隔世遺伝とか言われたりしますが、遺伝学的には隔世遺伝はありません。遺伝学的には遺伝子は世代を飛び越えることはありませんが、ただ遺伝子変異を受け継いでいても、発症しない人が一部います。100%ではないので持っていて脈々と次に2分の1の確率で渡しますが、発症していない人もいたりするので、それをどう考えるかもよくわかりません。

家族歴を一生懸命聞いて遺伝形式がわかる場合もありますが、誰もいないという人が多いで

す。「網膜色素変性症の人は家族に誰もいないんですけど」と言う人が多かったときに、では、それで遺伝ではないですよねと思っている人もいるし、「遺伝ですか」と言われてもどの遺伝形式かはわかりません。

通常は常染色体劣性遺伝を一番疑いますが、それもわかりません。では、遺伝子検査をすればいいかということ、これもややこしくて、遺伝子検査をしてもそもそもさっきのスライドみたいに遺伝子検査で引っ掛からないこともあるし、遺伝子検査で遺伝子の異常がわかっても、実は一つの遺伝子が違う遺伝形式をつかさどっていることもあるので、それもわかりません。

いろいろ100歩、千歩譲っても、全部できました。お金も出して、研究者がやってくれて、ここの遺伝子だってわかったといたら、「じゃあ、子どもの検査ができますか。出生前や着床前の検査ができますか」というと、今度は日本産科婦人科学会が非常に厳しいルールを課しています。

出生前診断、おなかの中の赤ちゃんを調べることに関しては、「小児期発症の重篤な疾患だけです」と言っているのも、通常は、視力の問題は本人にとってはもちろん重篤でしょうが、普段私たち遺伝相談外来が扱っている命にかかわる疾患とか重篤な知的障害があって、もう一生寝たきりという疾患と比べるとそこまで重篤ではないので、通常はやりません。

そして、着床前診断はさらに厳しいルールがあり、一例一例日本産科婦人科学会に届け出を出して審査を受けて、面接も受けて、倫理審査にかけられてOKと出ないとやってももらえませんが、まず通りません。ほかの疾患を考えてもまず通りません。

実は海外でも、網膜色素変性症の出生前や着床前の診断実施例は非常に少ないです。非常に少ない理由は、日本のように倫理的なルールがあるというよりも、もともとの患者さん、発端者の遺伝子検査自体が非常に難しいので、なかなか見つからないと、結局子どもの検査はできないというところで止まっていると思います。

この辺は、松本先生の話も聞いていても遺伝子の解析自体が簡単になってきたので、将来的にはこの前のスライドの、発端者がなかなかできない問題は解消されていく可能性があります。そうすると、出生前診断はどうするかを議論し

ていかなくてはいけないと思います。

臨床での眼科の先生たちは非常に忙しい中で大変だと思いますが、よく、「先生から何て言われていますか」と聞くと、「『遺伝ですね』とだけ言われました」とか言ってそれでおしまいのような感じだったりとか、家族歴もあまり聞いていない先生もいるし、逆に非常に熱心な先生は、「大変だから、赤ちゃんを調べてもらったほうがいいよ。出生前診断とか着床前診断とか、田村さんのところに行ったらやってくれるから」と言われてもできませんが、そのように世の中で行われていないにもかかわらず勧めている先生もいます。

あと、「子どもに遺伝しますか」と心配している人は多いと思います。網膜色素変性症で、私が難病相談の医療相談外来に行くと、「本当に子どもへの遺伝が心配です」と言う患者さんは多いのですが、慎重な先生は、「遺伝子もこんなにたくさんあって、遺伝形式もたくさんあって、下手なことは言えないからわかりません」とか、「可能性は否定できないけれども検査はできない」と言ってドアを閉ざしてしまうことがたくさん起きています。

で、「私どもでは遺伝子検査を・・・」というかどこでもやっていませませんが、そうやって言われておしまいになってしまったケースもたくさんあると思います。すみません、愚痴大会になってしまいましたが、どうしたらいいかというのが悩ましいです。

少し耳鼻科のほうに行ってみます。「難聴編」です。これは、「上の子どもが耳が聞こえていないので、次の子は大丈夫ですか」という質問はもちろんありますが、よくあるのは、「結婚を予定している相手の家族に難聴の人がいるけれど、私たちが結婚したら子どもに出ますか」みたいな話だとか、逆に遺伝ではないと信じている人もたくさんいて、「妻の弟が難聴だけれど、小さいときに熱を出したせいだと聞いているので、遺伝ではないですよ」。これは本当に皆さんがよく言いますが、実は熱は関係なかったりすることもあるのではないかといつも疑ってかからなくては行かなくて、難しいです。

あとは、「うちの息子は難聴で、聾学校で知り合った難聴の女性と結婚するのですが、子どもも難聴になるんでしょうか」というような質問もあ

ります。私は、ギャローデット大学の保健室にいたので、難聴を自分では結構勉強したつもりですが、全然覚えきれなくて、アメリカの難聴全体の遺伝学的な側面の総説を見ると、難聴の半分は遺伝ではありませんが、半分は遺伝です。

遺伝ではない原因はいろいろ書いてありますが、すみません、字がずれてしまいました。遺伝はこれという決め手があるかということ、関係している遺伝子は800種類もあって、いったいどれだかさっぱりわかりません。よくあるものはもちろんありますが、調べられないことも多いです。

遺伝性の難聴には、症候群性のものと非症候群性のものがあります。70%は非症候群性ですが、30%は症候群性です。症候群性は何かを言わなければいけません。難聴以外にほかの症状を伴う疾患がここに書いてありますが、ワーデンバーグ (Waardenburg) 症候群とか BOR (鰓弓耳腎) 症候群とかスティックラー (Stickler) 症候群とか、(神経線維腫症) NF2 とかたくさんあります。

それを全部、この症状とこの症状があったらどの遺伝形式で何とか症候群とかというのを覚えておかないと、家族歴を採るときに、「髪の毛に白いところがありますか」と聞いたら、ワーデンバーグ (症候群) とかと思わなくては行かれません。

でも、それぞれの症候群の診断基準も、これはワーデンバーグ I 型の診断基準ですが、結構面倒臭いです。私もいつも覚えられないのでアンチョコを見ながらやりますが、このワーデンバーグ症候群は英語で申し訳ありませんが、少し目が離れていますが、ぱっと見離れていたらいいかということ、ちゃんとここここをノギスで測って、ここに計算式が出ていますが、何分の何、いくつ以上だったら、1.95以上だったら診断していいとか、非常に大変です。難聴だけ調べればいいのかと思ったら、そうでもありません。

しかし、症候群ではないものもたくさんあって、難聴だけという場合の 8 割は常染色体劣性遺伝という、親同士が保因者でダブルで遺伝的な要因がそのお子さんに行ったときに難聴になるというスタイルを取ります。でも、ほかの遺伝形式もたくさんあって、網膜色素変性症並み

に大変です。

これが総説に書いてありますが、言葉話す前の子どもの難聴は、千人に1人ぐらいありますが、そのうち半分はジェネティック（遺伝性）で、そのうち症候群性が3割、非症候群性が7割、そのうちの8割前後が常染色体劣性遺伝で、その中で特定の遺伝子がある程度多いものはわかっていますが、ほかのものもあって、全部で800種類ぐらいあるという状況です。

来談する方々の理由も皆さんいろいろで、子どもの遺伝が心配とか、自分のを知りたいとか、あまり心配していませんが医者から言われたとか、いろいろな方がいます。難聴の人也非常に難しく、最近は社会的に難聴のことがいろいろ出ていますが、中途失聴の人とかそうではない人とか、進行性の人とか、それによって受け止め方も全然違います。

そして、今日はこれを話し出すと終わらないのでやめますが、聾とか難聴とか聴力障碍とか、どの言葉がいいとか嫌いだとかというのも一人一人違うし、大文字の「Deaf」か小文字の「deaf」かで聾の文化の問題のコミュニケーションそのものですから、手話を使うか手話ができないか、手話も日本手話と日本語対应手話と、それぞれ皆さんの主義・主張がありますから、非常に難しいです。

ゲノム時代になって、松本先生のお話を聞いていて本当にいろいろなことが動いていると思います。全ゲノム解析が、とうとう今年に入ってイルミナ社が発表しましたが、10万円で人間の全ゲノムを見ようとずっと言っていたのがやっとできましたが、すごいです。「10万円だったら出す」と言う人がいるかと思いますが、エクソームも、今日の松本先生のお話にあったように少しずつ普及してきました。

これらは、今話したような網膜色素変性症とか難聴のようにたくさん遺伝子があってどれだかわからなくて、どこから手を付けていいかわからないときに、今までは一つの遺伝子をちまちま順番に調べていると終わりませんが、それが一遍にがっとならば調べられるようになったのは大変朗報だと思います。

そうすると、遺伝形式も決まるかもしれないし、薬の選択にも役立つかもしれないし、ある程度これだとわかったら、これはあまり進みま

せんがこれは非常に進むとか、疾患予防の予測も立つし、それぞれの状況に応じた個別化医療もできるようになってくるので、非常に期待ができるいいことだと思います。

しかし反面、一遍にたくさんの遺伝子をまとめて解析したときにどうやってインフォームドコンセントを取るか。今までは、「この遺伝子を調べますよ。この遺伝子で何かわかったらこういうことが予想されますから、調べてもいいですか」と言ってやっていたのに、このまま一遍に100個とか調べるときに、これがわかったらこうだし、これがわかったらこうだし、これがわかったらこの遺伝形式で、こちらをやったら違うみたいな話はできません。どのようにしたらいいか。

そして、全エクソン、全ゲノムをもたらした私たちの大変大きな課題です。今までは症状のある人、難聴の人とか網膜色素変性症の人の遺伝子解析をしていたのが、全然関係ない心筋梗塞の人で全ゲノムをしたら、網膜色素変性症の原因になる遺伝子の変化が見つかったということが起こります。

そうなったときに、「あなた、どうですか」と言って眼科に急いで行ってもらいましたが、どこも全然視野狭窄も起きていなくてどうしようとなったときに、もしかして今まではこの遺伝子がこのように変化したらほとんど100%視力に影響すると思っていましたが、症状が出ない人がいるのではないかという話になってきました。

それが今、全エクソン、全ゲノムの解析が行われるようになってきて、いろいろな病気のいろいろな遺伝子の浸透率、遺伝子がうまく働かないときにどのぐらい発症するかが思っていたより低いかも、健康な人でもここの遺伝子異常を持ったまま健康に過ごしている人もいるのではないかという話になってきました。そうすると、インフォームドコンセントもますますややこしくなってきた、「全部調べます」みたいな話をしますが、何かわかってても発症するかもしれないし、しないかもしれないみたいな話もしなくてはいけなくて、どのように説明するのか、私も想像が付きません。

医療者、研究者、患者の間でも遺伝子解析をしたい人、したくない人がうまくかみ合わないことがあります。医者が調べたいけれども、患

者がほかの家族に言い出せなかったり、あるいは患者さんが「調べたい」と言っているのに、先生たちがあまり関心がないときもあります。疾患研究には遺伝子解析が欠かせませんが、どうやったら疾患背景のそろった人たちの遺伝子を集められるか、研究者が困っていることもあると思います。

臨床現場で混乱しがちなこともたくさんあります。一番は、研究なのか臨床なのか、ここが非常に難しいです。研究ならば研究費でただでやってもらって、でも研究だから何をしてもいいというわけではないかもしれません。臨床はその人の診断とか家族の遺伝の相談とかに使うもので、どこまでが研究なのかどこまでが臨床なのか、その線引きが曖昧です。

倫理審査はどうするのか。研究とも言えませんが、個人の遺伝子を調べるのは研究なのか臨床なのか。結果は、はっきりしている結果はいいですが、変化していても病気になるかどうか曖昧だとかいうのも全部言うのかとか、家族や血縁者もどンドン呼んで、未成年も呼んで検査していいのか、でも、「調べたい」と言ったらやってあげていいのか、「子どもを調べてください」と言う人が来ますが、それはいいのか。

結果の解釈も非常に難しく、どのくらい発症するかもわからないし、費用の問題も、患者さんがお財布を持ってきて、「これで出すからやってください」と言われたらやるのか。あるいは、この間もある患者さんが研究費で調べてもらっていたんですけど、研究費が止まってしまいました。それで「そこから先を調べてくれない、もっと調べてくれないか」と言ったら、「何か国庫の予算が足りなくなったので、やってくれません。どうしたらいいでしょう」と言われて私も困ります。

DNA 検体を保存しておいて、1 個何かわからなかったら取っておいて、また新しいことがわかったらどンドン調べていいのか。そのたびに患者さんに、「次調べていいですか、次調べていいですか」と聞かなければいけないのか。それをやっているのは大変なので、「全部お任せします」みたいな包括的同意を取っていいのか。

また、よく言われる遺伝カウンセリングが必要なのか。遺伝カウンセリングは何かわからないので、遺伝カウンセリングなのか、それとも

インフォームドコンセントなのかわかりません。

遺伝カウンセリング外来にも問題があります。大きな大学病院には遺伝子診療部というところがあって、臨床遺伝専門医と遺伝カウンセリングの専門のドクターがいますが、多くは小児科や産科医なので、あまり眼科疾患とか耳鼻科疾患のことを知らないことが多いです。知っていても、結局遺伝子検査もできないし、遺伝形式もわかりませんとなってしまいます。

さらには普段そういう遺伝カウンセリングをしている先生たちが見ている疾患に比べると、視力や聴力の問題は、「そのぐらい受け入れて、そんな子どもの検査とか言わないで」みたいに論されて、せっかく心配だから相談に行ったのに、何だか満足のいかないままで患者さんや家族が帰っていくことも多々あると思います。

遺伝カウンセリングとは何かというので、私が所属しているアメリカの遺伝カウンセラー学会の遺伝カウンセリングの定義を出してみました。いろいろ疾患何とかが書いてあります。私がここで言いたいのはこの中身ではなくて、どうやってできてきたかというプロセスに私もかかわっていますが、これは後付けです。

遺伝カウンセリングは、実はこういうのが遺伝カウンセリングと決まっているものではなく、何となくアメリカは遺伝カウンセラーが、日本では臨床遺伝専門医の先生たちが手探りでいろいろ試行錯誤しながらやってきたことを、「自分たちのやっているのはこんなことかな」と言っていてあとから定義をまとめています。そう考えると、定義などはある意味どうでもよくて、まずは何をやるかではないか。

最後ですが、私たちは何をすればいいかです。非常に混沌としてわけがわからないので、全部一から「がらがらぼん」として態勢を作らなければいけないかということ、それもあまり現実的ではありません。私の私見をまとめて書いて述べます。「遺伝子検査の前後に遺伝カウンセリングが大事」と言う先生は多いですが、「遺伝カウンセリングが大事」と言う前に、遺伝子カウンセリングはこのようにわけのわからないものもあります。

まず大きなゴールは何か、研究が大事なら患者さんにそう説明すればいいし、臨床的にこれと薬選びができるのであれば、臨床上の意義を

きちんと言えばいいし、遺伝カウンセリングのためにやっているわけではありませんから、本当のゴールは何かを医療者、研究者、患者で共有できるといいと思います。

いろいろな施設に遺伝カウンセリング外来が既に設置されているところは上手に使いながら、でもあまり遺伝カウンセリングの場がない病院では何もできないというのではなく、遺伝カウンセリングという名前だとか枠組みにこだわらないで必要な説明だとか情報提供がちゃんとできるような柔軟な仕組み作りをしたいと思います。

遺伝は誰が悪いわけでもないのです、もう少しオープンに語り合えるといいかと思っています。患者さんは心配して聞きたい人がたくさんいますから、ぜひドクターからも、「遺伝について心配していますか」という一言を先生方にかけてもらいたいと思うし、遺伝は嫌だという気持ちもお互いに認めたいです。そして何より私たちは価値観が非常に違うので、アメリカと日本で国の違いよりも、日本の中の個人差のほうが私は多いと思っています、そういったお互いの多様な気持ちや価値観を尊重し合う社会になるといいと考えています。

そして、一般の方々が、自分も含め私たちの能力をお互いに信じ合って大人扱いしてほしいと思います。過保護に、「こんなことを言っちゃったら患者さんがパニックになっちゃうんじゃないか」とかではなくて、大人扱いして話をすべきことはしていてもいいと思うし、そして何より、臨床に必要な遺伝子検査が今、まだ全然できないと思いますが、それが本当に必要で、もし薬剤選択等に使えるのであればちゃんとできる態勢も作っていかなくてはいけないと思っています。

最後に、これが大人扱いですが、これは（マルコム・）ノールズという人が言っていますが、「大人は、子どもと違ってものごとを学ぶときに大人扱いされたい」と。「難しいですよ。遺伝子ってわけわからないですよ」とかと言うのではなくて、ちゃんと大人として必要があることは学びます。

大人は子どもと違って、必要のないことは、「九九を覚えろ」と言われても覚えられないし、「都道府県名を覚えろ」とか「微積分をやって」と言っても嫌なことはやりませんが、自分の病気にかかわることや家族に病気が起こるかもという動機があれば、しっかりやろう、勉強しよう、情報を集めようという意欲が湧くのが大人です。

ですので、あまり子ども扱いしないで、上から目線ではなくて大人として尊重するが故に言うべきことは言うし、伝えることは伝えてちゃんと情報提供していきたいとも思っています。すみません、何か雑駁な意見ばかりで申し訳ありませんが、ありがとうございました。

です。すみません、何か雑駁な意見ばかりで申し訳ありませんが、ありがとうございました。

④ 聴覚障害における原因遺伝子の新たな解明

感覚器センター 聴覚障害研究室長

松 永 達 雄

私のほうは耳鼻科ということもあり、「聴覚障害における原因遺伝子の新たな解明」ということで講演します。簡単にこれは耳の絵ですが、外耳、中耳、内耳で、内耳にはカタツムリの形をした蝸牛（かぎゅう）という場所があります。そこから蝸牛神経を伝わって脳に音が伝わっていきます。今日のメインテーマである遺伝子のかかわる遺伝性難聴は、ほとんどがこの蝸牛に問題があって難聴を起こしています。遺伝と難聴の関係は非常に深く、特に子どもの難聴でその関係が強いです。千人のお子さんが生まれると、そのうちの1人か2人は生まれたときから難聴があります。その数は4歳になるまでにさらに増え、4歳の時点では千人に3人、330人に1人という数ですので、ダウン症などのよく聞く遺伝性疾患より、実はさらに数の多い疾患です。また、遺伝の関与ですが、生まれたときから先天性の難聴がある場合には、約7割が遺伝子に原因があると言われていています。4歳までの間に発症してくる方たちを含めると、遺伝以外の関与で難聴になってくる方も増えてくるので比率は減りますが、それでも半分が遺伝性であるということで、子どもの難聴と遺伝の関係は非常に深いことがわかっています。大人になると、年齢とともに難聴の数は増えていきますが、遺伝の関与の率は徐々に減っていきます。ただ、大人になってから発症するような難聴であっても、その中のいくらかは遺伝が関与しているものなので、決して小児難聴だけの問題ではありません。これは、25年前の私が研修医だった頃の小児難聴医療の思い出です。非常に進行性で重度の難聴となった小学一年生の女の子を受け持つ機会がありました。難聴が検査でわかったあと入院してステロイドの点滴で治療をしましたが、結局効果がありませんでした。そして、

原因もわからず、治療もできず、住まいのあった大阪に戻ったという、本当に何もできなかった無力感だけが残ったのが当時の小児難聴に対する印象でした。ですが、その後は徐々にいろいろな進歩がありました。例えば治療に関して言うと、根本から治る治療はまだありませんが、少なくとも、重度の難聴の方でも、人工内耳という機械を耳の中に入れることによって会話ができるように、言葉が覚えられるようになる時代になっています。

ただ、こういう治療をするにおいては、難聴を早期発見、早期療育、治療開始を早くする必要がありますが、遅くなると効果が出ません。その早期発見、早期診断の普及も、やはりこの十数年で目覚ましく進んでいて、生まれた子どもにも新生児聴覚スクリーニングをします。それで、早期発見、早期診断につなげる体制が、日本国内でも普及してきました。今、大体6、7割のお子さんで、生まれた子はこの検査を受けているということです。また、遺伝的な原因の解明も徐々に進み始め、1990年代の中旬ぐらいから特に進展がありました。最初の難聴の遺伝子としては、1993年のミトコンドリアの変異でした。そのあと常染色体上の遺伝子座が毎年5-10個という数で増えてきて、既に100個以上あります。そして、その中で実際に遺伝子が発見されたものも50個以上あるという状況です。そしてまた、その遺伝子の働きについてもいろいろと解明が進んでいます。これは、先ほどお話しした蝸牛を輪切りにした断面ですが、音を聞くためにはさまざまな細胞が働いています。異なる細胞でいろいろな遺伝子が働いて聞こえが成り立っています。そして、逆に、どの遺伝子に変異があるかによってそれぞれ異なる遺伝性難聴が起きていることがわかって、耳の聞こえの

メカニズムも判明してきたということも起きています。私は、1999年から2年間、小児難聴の専門の医療施設で働いていました。最初に難聴が診断された両親ですと、「どうして難聴になったんでしょうか」、「聞こえるようになるのでしょうか」と聞いてきました。25年前と比べると、この頃は、原因に関して少しはわかるようになってきた時代で、子どもの人工内耳も徐々に行われるようになってきた時代でしたので、この頃から遺伝性難聴の研究に取り組むようになりました。先天性難聴は大体70%が遺伝性で、非症候群性、難聴だけを示すタイプが7割、症候群性、難聴以外の症状を示すタイプが3割です。非症候群性の中で劣性遺伝というタイプ、典型的には両親に難聴がないようなタイプですが、8割と圧倒的に多く、その中でもたった一つのGJB2という遺伝子が、その中の3分の1から半分近くを占めています。これは、小さい遺伝子でしたので、比較的簡単に調べることができます。ミトコンドリアの1555変異、3243変異は子どもでは非常にまれですが、大人の中では割と頻度が高くて、それぞれ3%あるいは5%ぐらいあると言われています。ですので、まずはこういったものを手掛かりとして調べ始めました。その結果ですが、100家系を調べ終わったところでまとめてみると、報告されていたとおりの結果が出て、GJB2遺伝子が25家系、ミトコンドリアが2家系、1555変異が2家系、3243変異が2家系というかたちで、この三つを調べるだけで、30%の原因が判明する状況でした。これは、それまで全く原因がわからなくて手探りだった状況から比べると、3分の1近くの方で原因を理解して説明して、そのうえで治療を続けられるという、私にとっても、そして恐らく多くのほかの医師にとっても画期的な出来事でした。

実際に耳鼻科での遺伝カウンセリングはどんなことを行うかということ、どこに問題、どのような問題があって難聴が起きているかということをお話します。そして、その難聴は、例えば、低い音の聞こえが悪くなるタイプなのか、高い音の聞こえが悪くなるタイプなのか、さらに、これから進んでいくのか進まないのかといったことをお話します。難聴によっては、特定の薬でさらに悪くなるとか、あるいは頭部に衝撃のある運動を避けたほうが良いタイプもありま

す。悪化を予防する方法を説明したり、あるいは急に悪化したときの対応方法をお話しします。また、田村先生からもお話が出ましたが、初めは難聴しか症状がなくても、あとから甲状腺腫が出てくるペンドレッド症候群とか、糖尿病が出てくるミトコンドリア3243変異とか、目が悪くなってくるアッシャー（Usher）症候群とか、いろいろそういうこともありますので、あらかじめそういうことについてお話ししておくこともできます。また、治療法として、補聴器、人工内耳という、その効果は確かに大きいものがあります。それぞれについて効果のあるタイプ、あるいは低いタイプもありますので、そういったことを説明したうえで、よりよいものをより早く選択してもらうこともできます。そして、次のお子さんが難聴になる確率、あるいは、難聴で生まれたお子さんが将来子どもを作るときに、その子が難聴になる確率、そういったことを知りたいと希望する方に伝えます。

その後、調べられる遺伝子も徐々に増えました。増えたのは、あまり大きすぎない遺伝子、あるいは、多少大きくても、症状からその遺伝子である確率がかなり高いと予測されるようなタイプの遺伝子でした。症候群性難聴は、難聴以外の症状の組み合わせで、かなり高い確率で原因が予測できますので、こういったものもかなり多く調べることができるようになりました。ただ、これだけ増えてくると、どういう順番でこれを調べていくのが最も効率的なのかという問題が生じてきました。そこで、症状の組み合わせ、あるいは問診、家族歴、聴力検査の特徴から最も効率がよいと考えられる遺伝子をアルゴリズムとして組むことによって検査を進めていました。特に2007年からは、今回座長を務められている加我先生が当院に赴任され、小児難聴・言語障害クリニックで、たくさんの難聴のお子さんを検査することになりました。その結果、検査遺伝子のリストが50くらいに増えました。これは、以前に途中経過をまとめたときのデータです。例えば1,450人の難聴者の中で、実際に原因確定に至った方は、それでも3分の1でした。確定に至った遺伝子はこのように多種多様ですが、GJB2が圧倒的に多くて、SLC26A4も比較的多いです。これを、年齢別にどのくらい判明するのかをまとめてみました。そうすると、

やはり小さいほど原因が確定する頻度は高く、4歳までですと4割ぐらい、19歳までだと2割ぐらい、成人だと15%ぐらいで、逆に言うと、疑わしいのは、それプラス、このくらいありますが、全く不明という方も、まだまだこれだけたくさんいるということでした。

これをさらに診断率を高めるためには何が問題かということですが、一つは、原因ではないかと思う変化が見つかったとしても、確定できないというのがよくあります。アミノ酸が一つだけ違ったものになってしまうミスセンス変異、あるいは、1個とか2個とか新しいものが加わったり、あるいはなくなったりしている挿入・欠失です。あるいはスプライシングと言って、DNAからメッセンジャーRNAができていくプロセスがありますが、変異の場所が、エクソンというたんぱく質をコードをしている場所の区切れ目から二つ目よりも離れると、影響を与えているのだろうかいないのだろうか、判断困難な場合があります。中には、それがイントロンだけではなくて、エクソンの中に、しかもアミノ酸の変化を起こさないような変化として起こる場合もあったりして、こういうのがなかなか判定できない変異でした。そういう場合には、まず、コンピュータソフトを駆使して検出すること、そして、データベースを使って絞り込んで、家系の中での整合性を合わせたりしますが、それでも明確にならないことも多々あります。その場合は細胞での実験、できれば、人の内耳での細胞で検討したいわけですが、これまではそれは難しい状況にありました。ただ、今は人の内耳の細胞も、iPS細胞等を使ってできるようになってきつつありますので、今後は、より精度の高い検証も可能になってくるのではないかと考えています。

もう一つは、普通のサンガー法のシーケンスでは検出ができないコピー・ナンバー・バリエーションというタイプがあります。例えば、染色体異常だと、いわゆるギムザ染色は、染色体検査でわかるし、もう少し小さくても、FISH法（微生物迅速検出法）あるいは、さらに小さければCGH（比較ゲノムハイブリダイゼーション）アレイ、SNPアレイといった方法で調べる方法があります。しかし、恐らくそういうのでわかるような変化は、難聴だけではなくて、ほかに

も症状があるタイプがほとんどで、難聴だけでそういうコピー・ナンバー・バリエーションが起こるようなタイプは、もっと小さい変化である場合が多いと考えられます。なぜそれがサンガー法で見つからないかということ、一見、そういうエクソンが1個丸ごとなくなっているような方でも、シーケンスをしてみると健常者と何ら変わらない配列に見えてしまうからです。一つ残っているほうのエクソンを読んでしまって、その大きさの区別は、普通のサンガー法では区別がつかなくなってしまっているからです。ただ、こういったものに対しても、ある程度原因が絞り込めれば、その遺伝子に対するMLPA法というキットがある場合もありますし、なければ、リアルタイムPCR法という方法を使って、自分でプローブを作って定量することも可能です。そうすると、健常者と比べてDNAの量が半分しかないこともわかってきます。これは、シーケンスでは正常に出ましたが、実際にMLPA法でPAX3遺伝子の欠失がわかり、しかもさらにその範囲をいろいろなプローブで広げて調べてみると、実は欠失しているのは難聴の原因となるPAX3だけではなく、その前後の遺伝子が何個もなくなっています。この方の場合は、ワールデンブルグ症候群だったので、色素異常という症状もありましたが、家族の中には伴っていない方もいました。

他にも原因診断困難な解析対象の遺伝子があります。それはどういうタイプかということ、先ほどは、臨床像に特徴がある遺伝子を調べる方法を述べましたが、それ以外にも臨床像に特徴がない何十という原因遺伝子があります。そうすると、いったいどこから手を付けて調べたらいいのか。一つ一つはとてもではありませんが無理です。そういうのをどうしたらいいか。そして、もう一つは、ある程度は絞れるけれど、でも複数の遺伝子が残って、しかもその一つ一つが、非常に大きい遺伝子の場合です。例えばアルポート（Alport）症候群では大変な場合があります。臨床的特徴が乏しいけれども、希少で多数ある遺伝子を調べるということ、そして、複数の巨大な遺伝子も調べる必要が生じることがあります。このように遺伝子のターゲットがわかっていても調べられない状況がしばらく続いていました。これが、先ほど松本先生からも

説明のあった次世代シーケンサーを使って、一気に調べることが可能となってきました。これは、私たちがパネルとして作った既知の難聴遺伝子です。一部の症候群と非症候群性のターゲット遺伝子を調べると、一人当たりでたくさんの変化は見つかるのですが、さまざまな条件で絞り込んでいくと原因が一つに絞り込める場合があります。実際にどれくらいかというところ、例えば、家族歴のあるような難聴の家系ですと、15家系でやったところ7家系で原因診断が可能となりました。あと、孤発例を含めた30家系でやった場合には、それでも4割が原因診断が可能であったということで、これまで、もうそれ以上調べる方法がなかった家系の半数近くで原因がわかるようになってきました。もう一つ画期的なことは、これも先ほど松本先生が言われていた、いわゆる診断のパラダイムシフトです。これまでは、その症状から原因はこの遺伝子ではないかと思って調べて、やっぱりそうだったという流れでした。ところが、次世代シーケンサーになると、とにかく原因がわからないから調べて原因が判明し、それからもう一度症状を見てみると、確かに報告されていた症状と一致している。診断の流れが変わってきました。これは、経験してみても本当に驚きでした。このように、このパネルによる難聴遺伝子診断は非常に役に立つことがわかってきたのです。ただ、それをどう診断まで道筋を付けていくかです。先ほど言ったように、1個に絞れてしまえばいいですが、例えば複数の場合とか、あるいは1個だけけどやや疑わしい場合があるときとか、この辺はまだまだ今後の検討が必要かと考えています。

既知の遺伝子を調べて、それでもわからない場合は、残るのはまだ発見されていない遺伝子です。これを調べるためには、先ほど松本先生の話にありましたエクソーム解析が必要になってきます。今、難聴の遺伝子は、一部は保険でも調べることができるようになって、大体3割ぐらいはそれで原因がわかります。従来、私たちがやっていたサンガー法の候補シーケンスをやると、半分ぐらいがわかって、そこにNGS(次世代シーケンサー)を加えると、7-8割がわかります。でも、まだわからない未知の遺伝子がある。今度はこれを見つけていくという過

程になります。実は、この遺伝子を調べるために解析しなくてはならない領域はとてつもなく広い領域で、次世代シーケンサーで百個の遺伝子を調べたのがゲノムの情報の0.3%に相当し、残りはまだ99.7%の情報量があるということです。

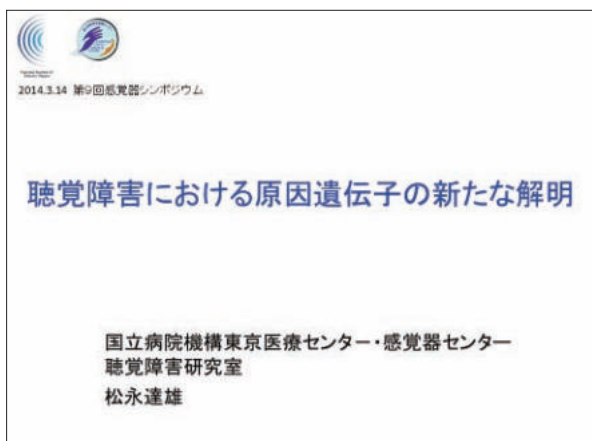
難聴の遺伝子の診断が、どう治療につながってくるかという話をこれからします。一番顕著な例が、このAuditory Neuropathyという難聴です。これは、座長を務めておられる加我先生が、1996年に報告された新しい難聴の疾患概念です。通常は、遺伝性難聴や感音難聴はOAE(耳音響放射検査)という検査で異常となります。ABR(聴性脳幹反応)という検査も異常となります。しかし、このAuditory Neuropathyという難聴は、このOAEという検査が正常となります。その特徴として、言葉の聞き取りが非常に悪いです。そして、補聴器の効果がほとんどありません。一方、人工内耳の効果は、悪い例も通常よりは多いけれども、効果のある例もあるという特徴があります。その理由は、わかりやすく言うと、やられている場所が、マイクに相当する内有毛細胞、あるいはコードに相当する蝸牛神経に変化があるため、いくら音を大きくしても、伝わらないというメカニズムです。このAuditory Neuropathyの原因遺伝子は、報告されていたので、私たちも調べてみましたが、OTOF遺伝子を調べるだけで、6割ぐらいで原因が確定して、疑い例が1割ぐらいで見つかる状況にあることがわかりました。さまざまな変異が見つかりますが、その中のある特定の変異が非常に頻度が高い結果でした。そして、このOTOF遺伝子が見つかり、その障害部位が内有毛細胞にあって、蝸牛神経が正常だということがわかります。この蝸牛神経は人工内耳から音を電気信号で伝える場所ですので、人工内耳の効果は非常にいいわけです。補聴器の効果が悪いことがわかっていましたから、早い段階で人工内耳をしようという一つの大きな根拠になります。古いデータで恐縮ですが、OTOF遺伝子に変異があって人工内耳をやった方が得られた方は、ことごとくいい結果でした。一方、OTOF遺伝子の変異はなかったけれど、希望があって人工内耳をやった方も何人かいますが、やはり効果が低い比率は高かったです。

もう一つ、幹細胞治療の研究と遺伝性難聴の話を少ししたいと思います。遺伝性難聴の中には、蝸牛の外側壁の線維細胞の障害を起こすタイプもあります。線維細胞の障害では、蝸牛ではイオンの輸送が非常に重要ですが、それが障害されてしまいます。私たちは、ミトコンドリア障害の難聴の研究をしていて、ミトコンドリア障害難聴モデルを作って、その病態を調べていました。そして、3NP というミトコンドリア阻害薬を投与すると、蝸牛の外側壁が選択的に障害されることがわかりました。そのモデルを使って、骨髄間葉系幹細胞を使った移植による治療を試みてみました。そうすると、障害を受けた場所に移植した細胞が生着して、かつ望んでいる機能分子を発現して、失われた細胞に近い性質を持った細胞に分化しました。そして、聴力も有意差を持って向上が得られました。移植した骨髄間葉系幹細胞が障害部位にたどり着いて、直接あるいは周囲の細胞の再生を促すことによって間接的に治療につながったのではないかと考えました。遺伝性の場合ですと、骨髄の細胞等にも遺伝子の変異はありますので、すぐにはそのまま使えないわけです。最近、ゲノム編集技術という技術が出て、幹細胞でも変異ありから、変異のない正常なタイプに戻すことができるので、正常化した幹細胞を内耳に移

植することで難聴をよくすることができる可能性も、道として開けてきたのではないかと考えています。

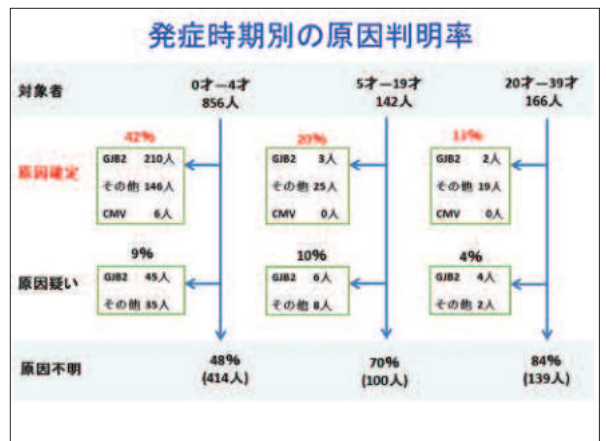
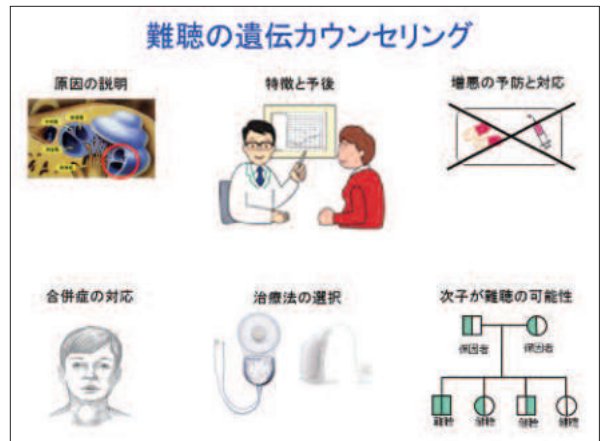
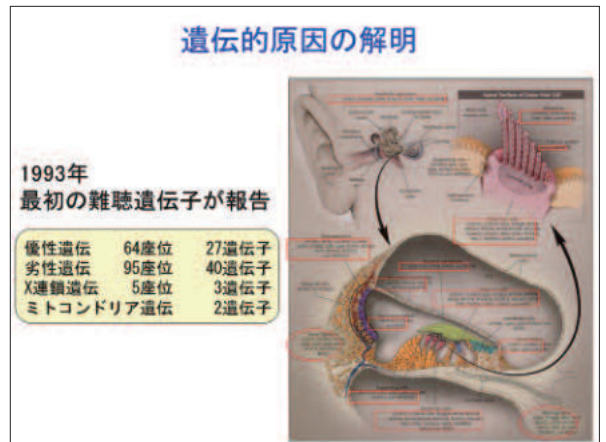
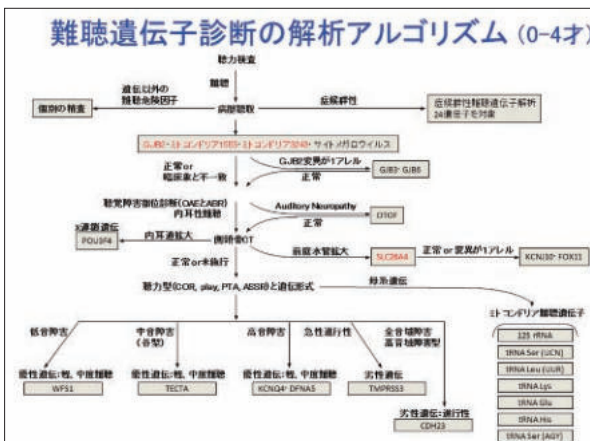
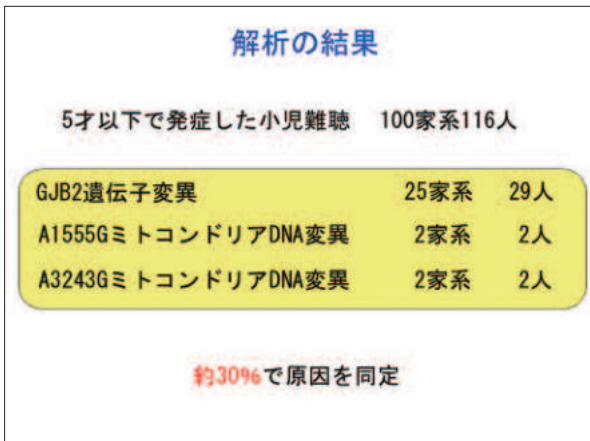
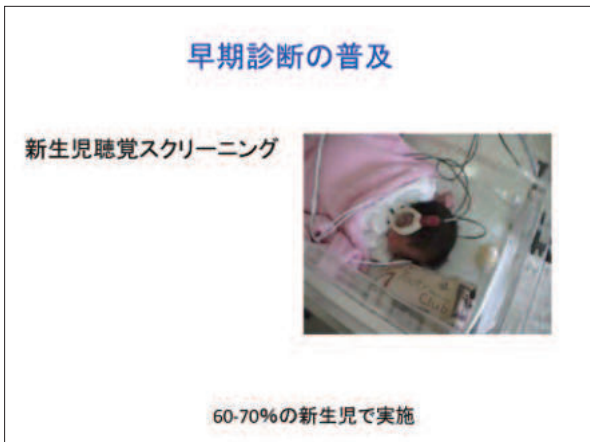
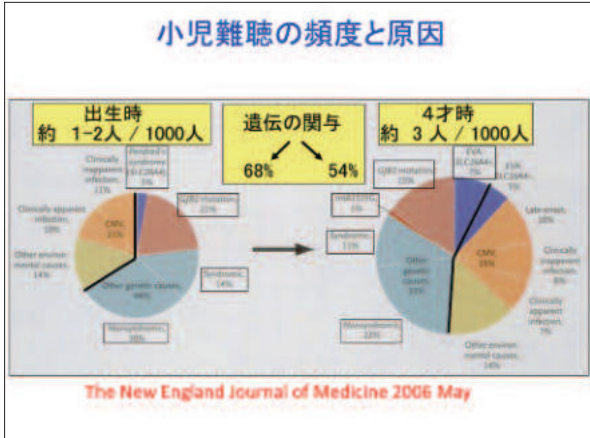
最後に、本当に少しだけですが、疾患特異的 iPS 細胞と創薬研究についてです。病気を持っている方の iPS 細胞とそうでない方の iPS 細胞を知りたい細胞に分化させて、その原因を調べたり、あるいはいろいろな薬を使ってその効果を見たりすることができます。私たちは、ペンドレッド症候群という病気で、疾患特異的 iPS 細胞研究のグループに入っていて、今、研究を行っています。特殊な内耳奇形を持って徐々に進行していく難聴です。生まれた時から難聴だと、すぐに人工内耳という治療はありますが、やはり徐々に進行していくので、何とか薬で止めたい、できればよくしたいという気持ちが強い疾患です。この原因は、*SLC26A4* 遺伝子、陰イオンの輸送に関係するたんぱく質で、ペンドリンを作っている遺伝子の異常です。内耳のさまざまな部位で発現しています。私たちがこれまでにペンドレッド症候群で調べた遺伝子の変異は、さまざまなタイプが見つかっています。小児難聴あるいは遺伝性難聴の医療にも、希望が見えてきた状況です。どうもご清聴ありがとうございました。

1



2





判定が困難な変異

- ミスセンス変異
少数アミノ酸の挿入、欠失変異
- スプライシングに影響する変異
イントロン
エクソン(アミノ酸変化なし)

今後の対策

検出	---	コンピュータソフト
絞り込み	---	データベース
確定(検証)	---	細胞実験(ヒト、内耳)

PAX3遺伝子のMLPA解析

(multiple ligation-dependent probe amplification)

発端者

健常者

新たな遺伝子解析技術

通常の遺伝子解析 → 数遺伝子の解析が限界

次世代シーケンサー → 全難聴遺伝子の解析が可能

結果

(家族性難聴) 15家系中の7家系で原因診断が可能

ACTG1, POU4F3, SLC26A5, SIX1, MYO7A, CDH23, PCDH15, USH2A

(孤発例を含めた30家系の検討では40%で原因診断が可能)

検出が困難な変異

CNV (copy number variation)

健常者

発端者

正常な配列

大欠失の可能性

難聴では現在のCGHアレイ、SNPアレイでは検出できない可能性が高い

染色体上の欠失領域の探索

chr2 (q36.1)

No deletion | Border | Deletion

2,554kb

1,759kb

RH46518, RH30035, PAX3, DD412607, CCDC140, LOC44093A, SORP2, U6, FAR5B, MGC471, ACSL3, RONE4, SCG2, AP153, WDFY1, MRP144, SERPINE2, RH35885, RH116314, RH92249

PAX3を含む1,759kb-2,554kbの欠失

原因遺伝子変異の絞り込み

検出バリエーション数(1人あたり) 539-607

アミノ酸配列に影響を与えるもの ↓ 180

データベースで頻度 > 1%などを除外 ↓ 13

家系内遺伝形式と一致 ↓ 2 (1遺伝子)

実例

臨床像(家系1-4)

家系1 ACTG1 p.G268S; -ヘテロミスセンス変異

家系2 POU4F3 p.A336Vfs; -ヘテロフレームシフト変異

家系3 SLC26A5 p.W70K; R130S 複合ヘテロ変異

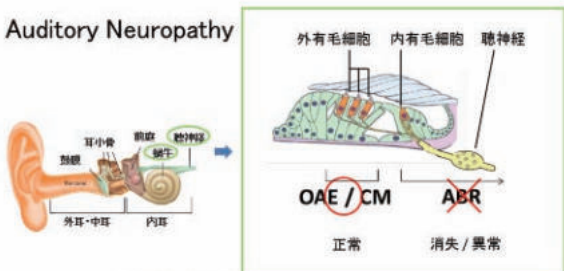
家系4 SIX1 p.R110W; -ヘテロミスセンス変異

45y 進行

2y 非進行

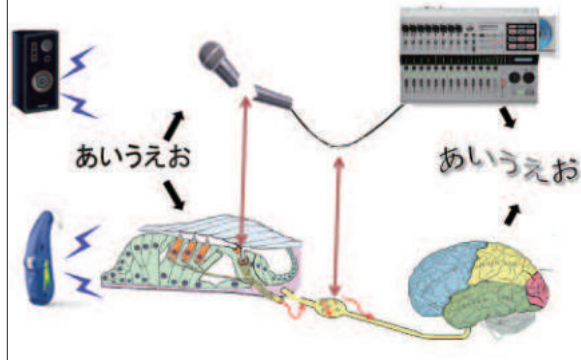
遺伝子診断と治療法の選択

Auditory Neuropathy



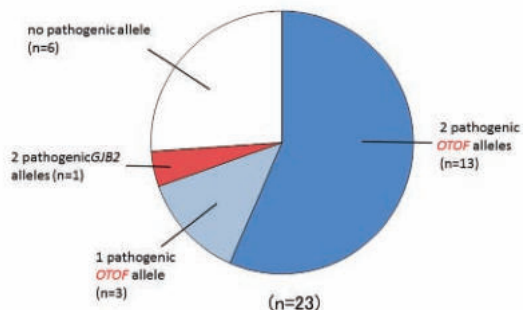
言語聴取能が著しく低い
補聴器の効果がほとんど得られない
人工内耳効果不良例が多い

Auditory Neuropathyの病態

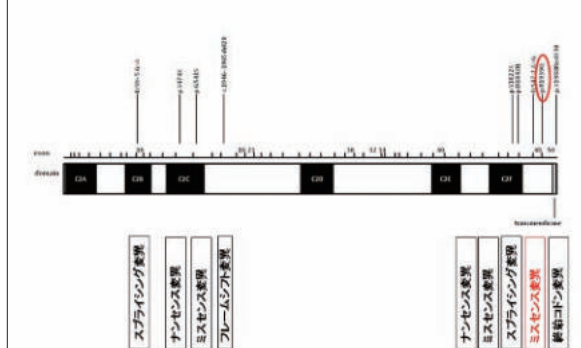


Auditory Neuropathyの遺伝的原因

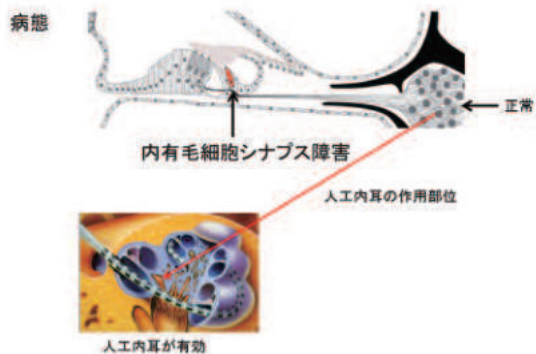
既知遺伝子の解析結果 (n=23)



日本人OTOF遺伝子変異の種類



OTOF遺伝子変異によるAuditory Neuropathy

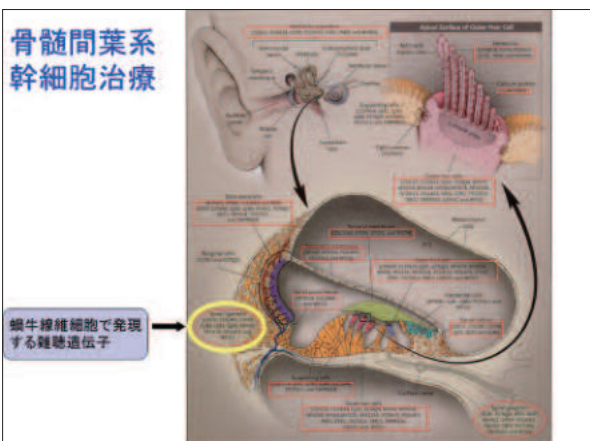


人工内耳が有効

人工内耳効果

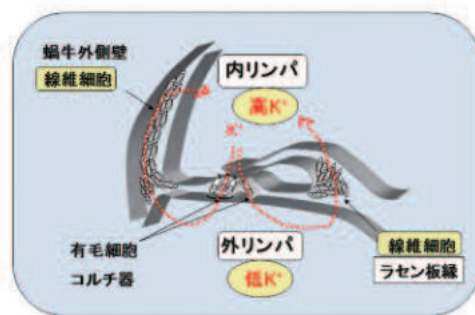
OTOF変異あり(9例)		OTOF変異なし(4例)	
手術時年齢	効果	手術時年齢	効果
2才0か月	高い	4才8か月	低い
3才4か月	高い	3才2か月	低い
2才11か月	高い	4才6か月	高い
3才4か月	不明	2才3か月	高い
1才11か月	高い		
3才0か月	高い		
2才2ヶ月	高い		
2才5ヶ月	高い		
6才0ヶ月	高い		

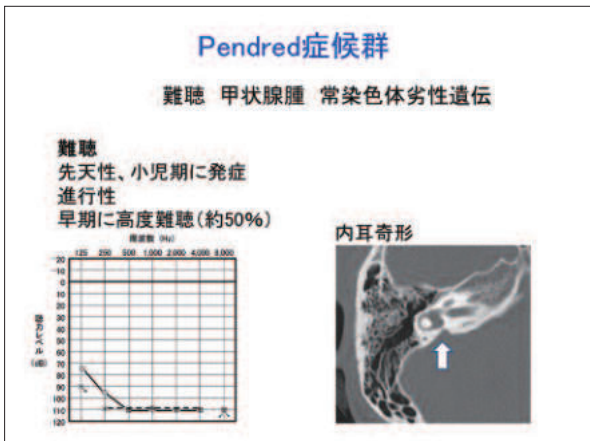
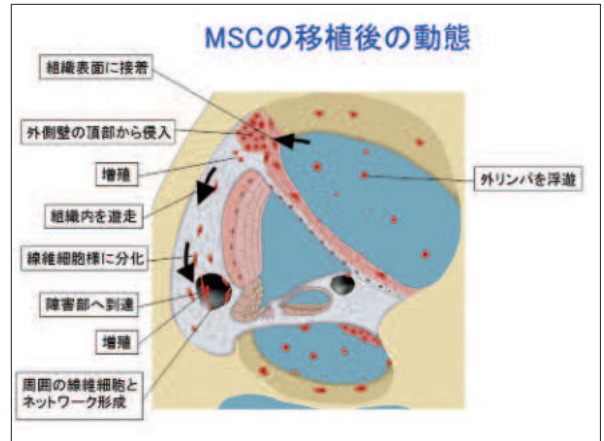
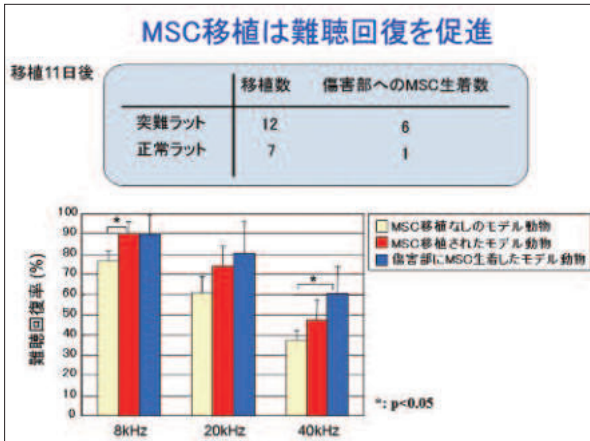
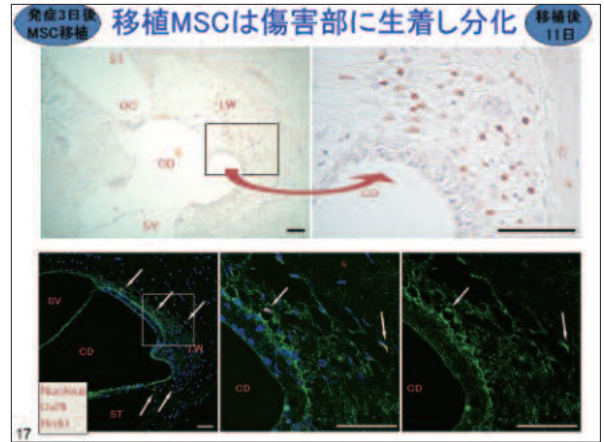
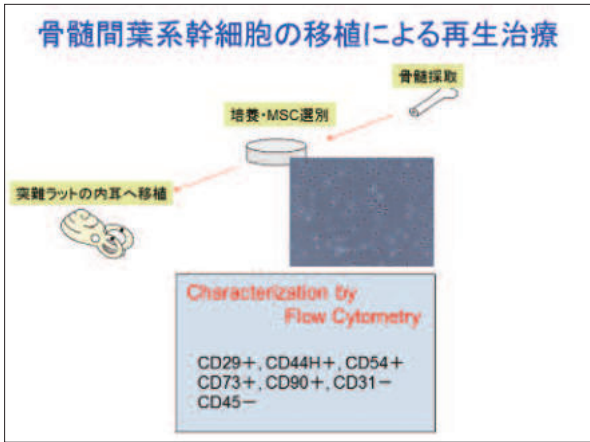
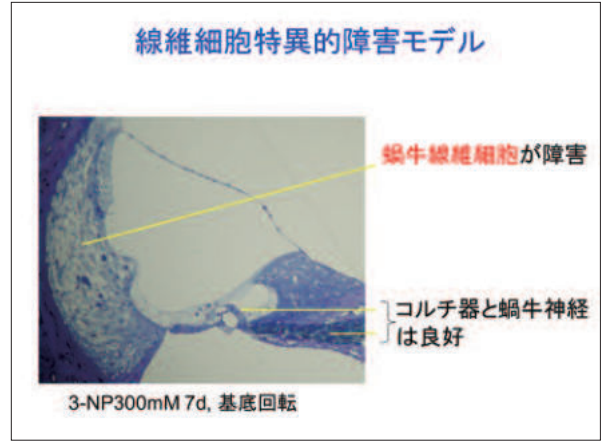
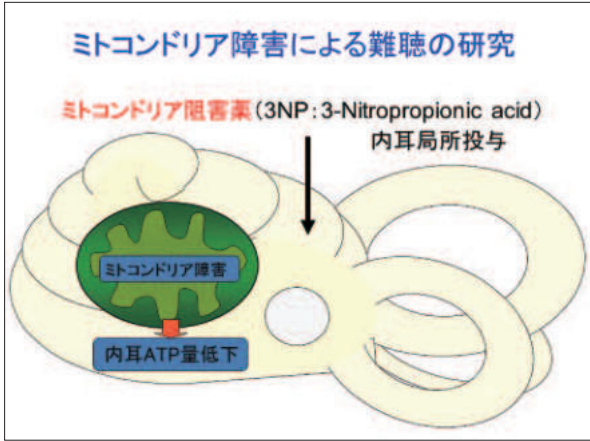
骨髄間葉系幹細胞治療



蝸牛線維細胞で発現する難聴遺伝子

K⁺のリサイクルによる内耳液恒常性が聴覚に重要





⑤ 視覚障害における原因遺伝子の新たな解明

感覚器センター 分子細胞生物学研究部長

岩 田 岳

岩田 過分なご紹介をありがとうございます。本日は視覚分野ということで、先ずはこのようなスライドから始めさせていただきます。視機能をつかさどる眼は、極めて特徴的な構造をしており、最初は光を感じる細胞から始まり、生物の進化では常に重要な臓器でした。この臓器の特徴は、一生透明性を維持しなければならないことです。角膜を通過した光が、屈折し、さらに水晶体で屈折を受けて、この黄斑と言われる部分に届きます。ここは極めて霊長類に特徴的な構造で、黄斑は一般的に実験で使われているマウスやラット、ウサギとかそういったものには存在しません。

この黄斑部分は、網膜のほぼ中央がこのようにくぼんでいて、拡大して観察すると、視細胞が集中し、露出しています。この集中によって解像度が極めて高い視覚を得ることができ、細かい文字や遠方の景色を見たりすることができます。光が視細胞で電気信号となって、複数の細胞に伝わり、その信号が選別され、処理されて、最終的に脳へと届きます。本日は、この視覚処理の最初の機能を担う網膜に焦点を合わせ、網膜の3つの疾患について報告させていただきます。先ずは加齢黄斑変性という黄斑が障害される病気、次は緑内障と言われる網膜神経節細胞が障害される病気、そして最後に遺伝子性網膜疾患の次世代 DNA シークエンサーを用いた全エクソーム解析について報告させていただきます。

これは、松本先生のスライドにもありましたように、遺伝的な要因が非常に強い病気から、ほとんど遺伝が関係しない、例えばつまずいて転んだという100%環境的なものまで、いろいろな割合で遺伝子が関与しているものを表しています。眼の病気にも極めて稀で、遺伝的な

要因が強い病気があります。遺伝性の網膜疾患には多いのですが、患者数としてはそれほど多くはありません。その一方で、患者の多くが持っている遺伝子多型については、持っているからといって必ず発症するわけではなく、他の要因が強く関係する病気もあります。加齢黄斑変性や緑内障が当てはまります。

このスライドは見方を変えて、遺伝子変異の現れる頻度を表しています。これは5%以上の頻度で現れるということで、極めて一般的な遺伝子多型です。それが、だんだん稀な変異になってくると、遺伝子の機能に極めて強い影響力を持つものが現れてきます。この遺伝子変異は誰でも持っているわけではありません。では、患者に多いけれども、健常者にも多い遺伝子多型が機能的に全く影響しないかということ、そうではないことを我々の実験データを使ってご紹介します。

最初にご紹介するのは加齢黄斑変性です。遺伝子配列と病気が1対1で対応しているわけではないけれども、その遺伝子多型を持っていると病気にかかりやすいという眼疾患です。神経網膜とその背後にある血管が豊富な脈絡膜という組織があります。神経網膜と脈絡膜を仕切るのが網膜色素上皮細胞です。これが障害されると、ドルーゼンの沈着物や、輸送系の低下によって視細胞が障害されます。これは委縮型の加齢黄斑変性と言っています。さらに、日本人に多いのは滲出型と言われるもので、脈絡膜からこういった血管新生がおこる病気です。日本人にはこのタイプが非常に多く、これが黄斑で起こると、中心視野が障害されて一番見たいところが見えなくなり、文字が読めなくなる、子どもの顔が見えなくなるようになってしまいます。この病気に関しては、環境、習慣、遺伝、加齢

などの要因が関与することが疫学調査から明らかになっています。例えば生活習慣については、喫煙している人に多いとか、肥満の人に多いとか、環境ですと、青い光に暴露した人は発症しやすい。これは、動物のモデルでも証明されています。近年、遺伝的な関与について感受性遺伝子がいくつも見つかっています。このスライドは最近発表されたもので、各国で行われた全ゲノム相関解析の結果をまとめたものです。横軸に染色体1番から22番までが表示されており、縦軸がP値です。P値は0.05以下であれば相関することを意味していますが、解析チップには100万種類の遺伝子多型解析を同時に行うので、このラインよりも低いP値でないと相関しないこととなります。縦軸にそってだんだん上を見ていくと、どんどんP値が下がってきますが、こちら辺に来るとP値が10のマイナス353乗という数値になります。次にマイナス283乗という遺伝子多型 (SNP) があります。

これは赤堀正和くんの研究ですが、東京医療センター眼科と順天堂大学浦安病院眼科の加齢黄斑変性検体について解析したものです。その結果、やはり滲出型の加齢黄斑変性では、染色体10番の領域に非常にシャープなピークが検出されました。このSNPsがどこに存在するのかわからず少し拡大すると、染色体10番の *ARMS2* と *HTRA1* という遺伝子領域です。もう少し詳しく調べると、ここには *ARMS2* のエクソン1番と2番があって、*HTRA1* のエクソン1番も含まれています。日本人の加齢黄斑変性についてはこの領域がきわめて重要です。この領域の塩基配列を調べることで、我々は226人の白内障検体を対照群とし、228人の加齢黄斑変性検体について、サンガーシーケンスで塩基配列を決定し、比較しました。これは板橋剛くんの仕事です。

そうすると、加齢黄斑変性の方は、塩基配列が途中からなくなってしまって大きな欠損 (デリレーション) が生じていることがわかりました。この星印が一致している場所ですが、真ん中の辺りは全く星印がありません。すなわち大きなデリレーションが起きていて、インサクションとデリレーションが起きているということで、われわれは、この領域を「インデル (indel insertion/deletion)」と呼んでいます。このインデル領域を持っている人は、加齢黄斑変性に非常に

なりやすいです。どのくらいなりやすいかというと、大体5から6倍くらい、発症しやすいことがわかっています。

インデル領域には *ARMS2* という遺伝子という存在するか不明な遺伝子と *HTRA1* という昔から研究されている遺伝子があります。インデル配列によってこの遺伝子の転写量が変化しているのではないかと我々は予測しました。そこで、インデル領域を持っている加齢黄斑変性の患者に対して持っていない白内障の患者の転写の活性を比較した結果、面白いことがわかりました。ヒト網膜色素上皮細胞由来の細胞株 ARPE19だとほとんど差はありませんが、視細胞由来の細胞株で調べると、このように白内障と加齢黄斑変性の間では、大きな発現の差があります。インデルを持っているほうが、転写が上がっていることとなります。

さらに RGC5 と呼ばれている神経視細胞由来の細胞株でも同様に *HTRA1* の発現上昇が観察されました。インデルの部分よりもさらに短くなった部分でのプロモーターにおいては、どの細胞で測定してもほとんど差はありません。

次に家島大輔くんの仕事ですが、加齢黄斑変性の患者から iPS 細胞を作りました。スライドの1番眼の方は健康者、2番眼の方はインデルのアリルを一つ持っていて、白内障のアリルを一つ持っています。そして、インデルを持っているけれども発症しなかった人、インデルを両アリルで持っていて緑内障になっている人、また、インデルを両アリルで持っていて発症している人。これらを比較すると *HTRA1* の活性が顕著に上がっている人が加齢黄斑変性を発症しています。これが、iPS 細胞のレベルです。観察されることが、興味深い。iPS 細胞のような幹細胞のレベルにおいて既に *HTRA1* の転写活性が上昇しているということは、加齢黄斑変性の方は、発生の段階から遺伝子発現上昇が続いており、加齢黄斑変性への下準備が生まれる前から起きていることがわかってきました。

では、*HTRA1* が眼のどこに発現しているのかを確定しないといけないということで、奈良先端大学の岡千緒先生から、ノックアウトマウスをいただきました。このノックアウトマウスは、*HTRA1* が発現しなくなるように作られています

が、その作り方に少し注目すると、岡先生は、エクソン 1 番を別の配列で置き換えています。置き換えることによってエクソン 1 はなくなりますから、*HTRA1* というタンパク質は発現しなくなります。岡先生は、そのエクソン 1 に代わって、*LacZ* という β -Gal (ベーターガラクトシダーゼ) を発現する遺伝子にすり替えています。すり替えたことにより、この *LacZ* を追跡することによって、どこで、どれだけ転写が起きているかを観察することができます。家島君が行った β -Gal の免疫染色の結果は、このように視細胞での発現が圧倒的に多いのです。網膜色素上皮細胞ではなく、神経節細胞でもなく、視細胞での発現が非常に多いです。そうすると、先ほどまでご紹介した全ての実験のデータとマッチします。

さらに、発現したあとは、そのタンパクはどこに移動するのか、こちらは、実際に *HTRA1* の免疫染色を行うと、視細胞の内節、外節へと移動していました。すなわち、*HTRA1* は視細胞で主に発現するけれども、最終的には内節、外節、視細胞の末端へと運ばれていることがわかってきました。

さらに家島くんがプロモーター (転写領域) を細かく解析して、どの部分が活性に重要な部分か調べると、白内障の人たちは、二つの抑制因子が相互作用して *HTRA1* の発現が抑制されているのに対してインデルを持つ加齢黄斑変性の人たちは、抑制因子の一つが活性因子によって置き換わり、結果的には一つの抑制因子を失って、活性因子が 1 つ追加されることによって、*HTRA1* という遺伝子は、iPS 細胞のレベルから発現していることになります。では、転写を制御している抑制因子や活性因子はどのような物なのか、我々はプローブというものを作成して、抑制因子や活性因子が存在するか調べてみました。これが、「1」、「2」、「3」のプローブです。このように転写因子が結合しています。そして「4」から「8」、そして「9」と「10」、要するに、このインデル領域には確かにタンパク質が結合していることがわかります。このタンパク質を同定することによって、*HTRA1* がどういうシグナル伝達系を使って転写制御しているのかわかるようになります。

セリンプロテアーゼ1というのが *HTRA1* の正

式名称ですが、このタンパク質は、バクテリアのシャペロンと言って、タンパク質を保護するタンパク質として発見されましたが、後に脳の微小管の血管新生を誘発する病気の原因として「ザ・ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン The New England Journal of Medicine」に2009年に報告されました。従って、この遺伝子は血管と全く関係がないというわけではなくて、血管新生に正に関係する遺伝子だということが別の病気でわかってきたのです。では、*HTRA1* が実際に患者の中で増加していることがわかり、その仕組みもある程度わかってきたわけですから、マウスを使って人と同様な加齢黄斑変性を再現できるか実験してみました。このマウスは、赤堀くんが作ってくれて、中山真央さんに解析してもらいました。このマウスを解析するためには患者に使う OCT (光干渉断層像) の測定機器や蛍光眼底造影の機器を使って網膜断層などを見ながら解析しました。その結果、蛍光造影を FA (フルオレイセン蛍光眼底造影) で網膜側の血管は過蛍光になっていて、ICG (インドシアングリーン蛍光眼底造影) で脈絡膜が低蛍光になっていて、その領域を OCT で観察すると確かに血管の断面のようなものが見えています。マウスを高齢化させ、網膜切片を作製すると脈絡膜側からの血管新生が観察できました。

このようにして、*HTRA1* に変異を入れることなく、ただ全身で高発現させただけで脈絡膜血管のモデルができてしまったことになります。このようなモデルは今まで作られたことがなかったので論文を投稿中です。このマウスを積極的に利用してもらえることを期待しています。これまでの血管新生モデルは、ブルッフ膜にレーザーで穴を開けて血管新生を誘発させていますが、今回作製したマウスは高齢化でどんどん血管新生が出てくるモデルなどで利用しやすい。

本当に血管新生なのかを確認するために、いくつかの免疫染色をやって、確かにこれは血管新生であることがわかってきました。血管新生にかかわるもう一つの因子としては、環境因子があります。その中でも最たるものが喫煙です。喫煙をすると、論文によっては 2 から 20 倍ぐらい発症率が上がると報告されています。日本人で発症している人には喫煙者が多いと言われて

いますが、本当なのか。

多くの喫煙動物実験は、タバコの副流煙と言われる比較的濃度の低いタバコ煙にマウスを入れて暴露させます。この条件で血管新生や網膜色素上皮細胞に異常が発生するか実験しますが、これまで血管新生を誘発させた実験例がないので、やはり主流煙でないといけないと考えるようになりました。実際にタバコを吸っている濃度でマウスに暴露するために、日本タバコ協会や喫煙科学研究財団など、あちこちに連絡しましたが、誰もタバコ主流煙発生装置を持っていませんでした。ところが、さらに詳しく調べると、星薬科大学の亀井淳三教授がお持ちであることがわかりました。この装置はおそらく関東で唯一だと思います。

この装置の仕組みを説明すると、ここにタバコを1本ずつさして、1カートン分をセットします。ここが発火装置になっていて、発火させると主流煙が出ます。ここで空気と混合し、マウスをここに入れると、どんどん主流煙が流れてきます。暴露時間があまり長いと死んでしまうので、30分という時間に制限して実験しました。すると、正常なマウスでも主流煙の暴露によって血管新生が出てくるのが観察されました。網膜切片でも確かに血管新生が確認されました。しかし、匹数から言ってそれほど多くなくて、正常なマウスでは13匹中1匹で血管新生が観察され、*HTRA1* マウスだと10匹中で2匹ということで、極めて少ない数です。やはり環境因子としてのある程度の影響力があるのではないかと考えています。

このスライドは小括ですが、*ARMS2*、*HTRA1*のプロモーター領域にインデルが見つかった。それは、プロモーターの活性を上昇させ、視細胞に存在し、何らかの転写因子が結合していることまでわかり、現在それを解明中です。これらの事実に基づいて、*HTRA1*をマウスで高発現すると新生血管が誘発され、さらに環境因子であるタバコ、しかも主流煙をマウスに暴露すると、*HTRA1*高発現マウスと正常マウスの区別なく、血管新生が誘発されることが観察された。我々は視細胞で特異的に*HTRA1*が高発現するマウスを作製し、10週齢になっています。これは、さらに強力な血管新生モデルになるのではないかと予測しています。今まで私が話したこ

とが全部正しいとするならば、このマウスこそが、将来、加齢黄斑変性の血管新生モデルになると考えています。

第二部では緑内障の話しをします。緑内障の大きなリスクは眼圧です。眼圧は房水の流出が不十分なために眼内圧が高まり、その眼内圧力によって神経乳頭を障害し、陥凹（かんおう）ができてしまい、視神経を圧迫し、その視神経にそって障害され、視野の周囲から欠損していく病気です。緑内障のゲノム相関解析や家系解析は、20年ほど行われていますが、ゲノム相関解析に関しては、複数の遺伝子領域が明らかになっていますが、特定の遺伝子までは明らかにされていません。このスライドは家族性の緑内障に関してジェニー・ウィグス、アメリカの緑内障遺伝子解析を統括しているハーバード大学の先生が、2007年の論文で発表した原因遺伝子のリストです。この中で再現性のあるものは、ミオシリン（MYOC）と言われる染色体1番の遺伝子と、*OPTN*（*OPTN*）という染色体10番の遺伝子の二つくらいで、ほかの遺伝子に関しては、まだクエスチョンマークです。そこでわれわれは *OPTN* という遺伝子に注目しました。*OPTN*が最初に紹介された *Science* の論文で、マンソー・サルファラージという人が報告しました。世界中で追試されましたが、結局、緑内障患者の千人に1人ぐらいの割合でしか変異は検出されず稀な遺伝子変異です。報告されている複数の変異の中で、特に E50K という50番目のアミノ酸がグルタミン酸からリジンへ変異したものについては再現性があることがわかってきました。その一つの理由は岐阜大学眼科の調査によって *OPTN* E50K の緑内障家系が発見されたためです。これは17歳の患者で、視野はほとんど大丈夫ですが、そのお父さんは半分ぐらいの視野がなくなっていて、70歳のおじいさんはほとんど見えません。進行性であることがわかります。眼圧はほとんど変化しません。

*OPTN*は、もともとはサルファラージ先生が発見したものではなく、マーシャル・ホルウィツ先生が発見した遺伝子です。たまたま来日されたときに研究室に来ていただき、記念撮影しましたが、残念ながらこの2ヵ月後に心臓麻痺で亡くなってしまいました。そのときに *OPTN* の機能についてあれこれディスカッションしたこ

とが今の方向性を決めています。*OPTN*に関して現在わかっていることは、ゴルジ体から細胞膜へ生体分子を移動させることに関与していることです。細胞内をタンパク質が移動するときには、ふわふわと細胞液中を移動しているわけではなく、小胞顆粒に収まって、アクチンフィラメントに沿って移動していく、ここに *OPTN* は関与しています。*OPTN* 単独で関与しているわけではなくて、複数のタンパク質と相互作用して、小胞顆粒をアクチンの線路に沿って細胞膜へと移動させていることがわかっています。これは簡単な図では *OPTN*、Rab8、ミオシン 6、またハンチントン病のハンチントンというタンパク質とも相互作用しながらアクチンフィラメントを滑走しながら小胞顆粒を移動させる機能を担っています。

さらに最近わかってきたことは、*OPTN* がオートファジーにも関与していることです。このオートファジーのレセプターにいくつかのタンパク質がありますが、この中の一つが *OPTN* です。この模式図では、青い部分が *OPTN* です。これがオートファゴゾームと言って、隔離された膜です。分解したいタンパク質を隔離する膜の表と裏に *OPTN* は存在していて、外側はアクチンフィラメントと結合しながらオートファゴゾームを移動させます。オートファゴゾームを移動させる機能をしながら、内側ではユビキチン化されたタンパク質と結合し、やがてライソゾームと融合して内部のタンパク質を分解してしまいます。余談ですが、今から 2 週間後の世界眼科学会 (WOC2014) でも、「緑内障とオートファゴゾーム」というセッションが開かれる予定です。

2010年に広島大学のグループによって *OPTN* が筋委縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であると発表されました。非常に稀な劣性と優性型の遺伝子変異のようです。ここで彼らが着目したのが *OPTN* の二つの機能の一つ、NF- κ B 経路を抑制する機能です。遺伝子変異によってその抑制機能が消失するのです。ところが E50K の変異では抑制機能は正常です。ALS と緑内障が別経路で発症していることを示唆するデータです。

ここからは峯岸ゆり子さんの仕事ですがけれども、*OPTN* の *in situ* hybridization をマウス網膜について行くと、特に神経節細胞に発現してい

るわけでもなく、むしろ視細胞での発現が多いことがわかっています。このように網膜全層で発現しているということであれば、ユビキタスなプロモーターを使って *OPTN* 変異体を発現するマウスを作製することになりました。変性はなぜか網膜でしか観察されず、角膜や水晶体には構造的な問題はないようです。網膜のどこに障害があるのか調べたのが池在龍くんです。彼は網膜の外顆粒層にポジティブなシグナルが出ていることを発見しました。後に峯岸さんは網膜の幅を測定し、外網状層の幅が小さくなって変性していることを明らかにしました。このスライドは *OPTN* E50K がどこに存在するかを示したものです。外網状層のところは陽性です。

そこで、*OPTN* E50K の家系に戻り、患者の iPS 細胞を家島くんが作製しました。iPS 細胞の作製に関しては、慶応義塾大学の福田恵一教授のご協力をいただき、通常の採血から得られるリンパ球を用いて iPS 細胞を作製する方法を用いました。さらに、その iPS 細胞を神経細胞に分化誘導させて観察しました。そうすると、核の周辺には通常拡散して粒状になっている小胞体が患者の神経細胞では委縮していることがわかりました。

このスライドは *OPTN* が発表されたときの *Science* 誌に掲載された内容ですが、患者の皮膚の上皮細胞では *OPTN* の発現が正常な人と比較して半分しかないことを報告しています。そこで、峯岸さんは、HEK293 という細胞株に正常な *OPTN* と変異体の *OPTN* をそれぞれ同量遺伝子導入 (トランスフェクション) して発現させたときに、やはり E50K の発現量が減っていることを確認しました。減った分はいったいどこにいったのか? 発現している mRNA 量は全く同じですが、タンパク量が半分以下になっているということで、もう少し詳しく彼女が調べていくと、どうも沈殿しているということが明らかになりました。これが上澄みの写真、これが沈殿の写真です。変異体をトランスフェクションすると沈殿してしまいます。正常なものだとちゃんと可溶化しています。この可溶化から沈殿への移行が小胞体で起きていることが、緑内障の原因と考えられます。これは、実際にトランスフェクションしているプラズミッドの量を 5 倍にしても、やはりドーズディペンデント (濃度依存)

で沈殿量もどんどん増えていくことを示しています。

このスライドは *OPTN* E50K のウエスタンブロットです。これがコントロールの iPS 細胞のウエスタンブロットですけれども、iPS 細胞ですと、まだ *OPTN* は発現しておらず、しっかりとしたバンドは検出できていませんけれども、これを神経細胞に分化誘導させると、*OPTN* はしっかりと沈殿してきて、上澄みには少ないことがわかってきました。この *OPTN* の E50K と正常なものは、いったい何がどう違うのか、どうして沈殿してしまうのかというのが次の質問です。そこで、E50K の変異体と正常体では、タンパク質の相互作用が違うのではないかとすることで (gain of function)、免疫沈降と言って、細胞に E50K の変異体と正常体をそれぞれ発現させて、それを餌 (bait) として、それに引っついてくるものを引っ張ってきます。それを質量分析計で解析しました。それがこの結果です。これが E50K から引っ張ってきたタンパク質、これが正常な *OPTN* が引っ張ってきたタンパク質です。これは分子量順になっていますが、比較をすると異なるバンドが見えてきました。E50K の変異を持っていると、TBK1 というタンパク質と結合しているということです。この TBK1 と結合することによって、小胞体で沈殿し、それが視神経細胞で起こっているということが明らかになりました。では、この TBK1 の阻害剤を使えば、それを防ぐことができるかということを峯岸さんはやってみました。

この BX795 という薬を 1 倍と、10 倍量で E50K をトランスフェクションした HEK293 細胞株に対して投与すると、3 時間後では沈殿物が消失してきました。さらに 6 時間後では消失しています。消失した分、このように上澄みに戻っています。この阻害薬を使うことによってこの沈殿する *OPTN* を抑制し、将来治療に利用できないか、少なくとも E50K の患者については可能性が見えてきました。変異体の機能解析をすることによって、このように創薬に結びつきます。

さらに面白い事実をお話ししますと、この TBK1 そのものが緑内障と関係しているという論文が発表されました。これは 2011 年ですが、この TBK1 というコピーナンバーバリエーショ

ン (CNV) が緑内障と強く相関しているという論文が発表されたのです。日本人の緑内障患者を調べたところ、やはり同じような解析結果になったということで、*OPTN* 50K が相互作用する TBK1 も、実は緑内障と直接関係していたということで、*OPTN* から新たな緑内障の遺伝子が見つかる展開になっています。この部分を総括すると *OPTN* E50K 変異体が TBK1 と結合して、小胞体で沈殿して機能障害がおこります。ALS の場合では、*OPTN* が NF- κ B の活性を抑制できないのが原因のようです。緑内障の場合には、*OPTN* のオートファジー機能とか小胞顆粒による分泌機能への障害についてさらに解析が必要です。*OPTN* ノックアウトマウスを作製しましたが、特に症状は出ていません。そこで峯岸さんは、ノックインマウスを完成させ、世界で初めての人間の緑内障をマウスで再現する、開放隅角緑内障動物モデルの研究を行っています。

第三部として、遺伝性網膜疾患のエクソーム解析を紹介します。これは、遺伝性網膜疾患の RetNet の最新データです。私がアメリカに留学したのは 1988 年 9 月ですが、そのころに脳回転状萎縮症 (gyrate atrophy) という網膜変性の原因遺伝子を発見した研究室に私は留学しました。この遺伝子は眼科では初めての発見でした。それからこれまでに 200 以上の遺伝子が発見されています。この青い部分は、遺伝子の遺伝子座が決定された数で、赤い部分が遺伝子が決定された数です。このグラフを見る限りにおいて、近々プラトーに達するような雰囲気ではありません。今後、どんどん増えていくと思います。なぜそのように考えているのか今から説明させていただきます。

このスライドは遺伝性網膜疾患の病名と遺伝子座、遺伝子数が記載されています。遺伝子座が「225」、遺伝子が「185」になっています。我々も 4 年前、三宅先生と角田先生との共同研究によって、日本で初めての遺伝性網膜疾患の網羅的な解析による、*RP1L1* という遺伝子をオカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子として発見しました。眼科疾患における全遺伝子の中で、日本人のみで発見された遺伝子は *RP1L1* だけで、他の遺伝子はアメリカやヨーロッパで発見されたものです。基調講演された松本先生の

ような研究状況ではないということで、何とか松本先生のような成果を出したいということで、3年前に研究班を立ち上げたのがこれです。臨床部分は角田先生に総括をお願いして、次世代シーケンサーの部分を理化学研究所の古野正朗先生、そして遺伝子解析は、国立遺伝学研究所の池尾一穂先生をお願いして始めました。

研究当初は、どの病気を解析すべきか議論しました。もちろん網膜色素変性は3万人ぐらいの患者がいるということで、当然トップです。そのほかに日本人における遺伝子情報が欠落していたレーバー先天性黒内障と、オカルト黄斑ジストロフィー以外の黄斑ジストロフィー、錐体ジストロフィー、錐体桿体ジストロフィー、先天性夜盲症、これらの遺伝性眼疾患が解析の中心となりました。

最初は、各家系について、代表の患者を1人だけ調べれば、少なくとも既知の遺伝子変異が検出されると考え、実施しましたが、既知遺伝子変異はほとんど見つかりませんでした。これはいったいどういうことか。答えの得られなかった家系については親兄妹の検体もシーケンスして解析してみました。また、優性遺伝の家系に関しては、必ず3世代について診断と採血を行い、さらに親戚の中で発症している人の検体も含めました。すなわち「6人+2人」で、8検体をきちんと解析するということになりました。

そのスライドでは検体提供体制を紹介しています。複数の眼科の先生に協力いただき、症例情報が届きます。送られてくる血液を当院でDNAに精製して、理化学研究所に送り、さらに理研から塩基配列が遺伝研に送られて遺伝子解析が行われます。この結果が我々に送られてきます。この時点ではまだリストになっているだけで、どれが疾患と関係している遺伝子変異かわかりません。このリストについていろいろと調べ、機能実験をすると最終的に原因遺伝子が明らかになってきます。この情報を担当医に戻して患者に伝えることをこの3年間やってきました。

このスライドは角田先生にお借りしたのですが、網膜色素変性、レーバー先天盲、スターガルト病の眼底像です。網膜色素変性に関しては、劣性、優性、孤発例、ダイジェニックなどの遺伝形式があります。その他、遺伝子治療が

始まっているコロイドレミア、オカルト黄斑ジストロフィーの眼底像です。このような遺伝子解析において、同じ疾患のグループ分けは重要です。電気生理学的な診断があるので、細かく分類が可能なのです。

我々は、オンライン症例登録システムを作り、担当医のみが記入できる部分、ここに症例情報が入ります。そして、遺伝子解析を行う者が記入できる部分、ここにはDNAの精製状況、シーケンス状況、解析状況がプルダウンメニューで選択できます。遺伝子変異が決定するとここに書き込みます。班員との間でメールでのやり取りをするかわりに、このシステムを使って、自分の都合でログインして情報をやり取りできるシステムになっています。

このシステムでは遺伝形式、施設名、遺伝子などの項目で検索する機能があります。

エクソンのキャプチャーキットは、松本先生のお話しにもありましたが、どのキャプチャーキットがいいのかを理研の古野先生に調べていただいた結果、アジレントのSureSelectが一番良さそうだということで、我々の解析はすべてアジレントのSureSelectで行っています。このスライドは遺伝子の解析手法を表したものです。この3年間で収集した検体の多くは網膜色素変性で、特に劣勢のものを集中的に収集しました。そのほか、オカルト黄斑が64家系です。さらに錐体ジストロフィー、黄斑ジストロフィー、スターガルト病、レーバー黒内障、先天性夜盲が中心となっており、808検体集まりました。

これらの検体についてエクソーム解析を行った結果がこのスライドでまとめられています。日本人の遺伝性網膜疾患家系における既知遺伝子変異は17%ぐらいです。患者のほとんどが論文で発表された遺伝子変異を持っていないということです。既知遺伝子ではあるが、未知の遺伝子変異が発見された家系が14%ぐらいあり、これを合わせても約30%、で、その他の7割の家系では新規原因遺伝子の可能性があります。あるいはエクソン以外の変異による可能性もあります。この「不明」の中には、親子4人を解析すべき劣性家系において患者1人しか検体収集されていない場合や、親子4人を解析しても候補として遺伝子が残らなかった場合を含んでいます。今回、新規遺伝子が10個ほど見つかり

機能解析が進行中です。

このスライドは既知遺伝子について我々が発見したものを列記したものです。このスライドは3年前に厚労省に申請した計画表です。平成25年の末までに実行すべき内容が記載されています。この中には遺伝子診断システムの開発や製薬企業との連携が計画されていますが、すでに計画どおりに計画は実行されており、近々成果を発表できると思います。

遺伝子診断についてはアメリカやヨーロッパでは既に実施されていますが、日本では行われていません。今回お示ししたように、7割の家系で欧米人にはない遺伝子変異が疑われており、欧米の遺伝子診断では検出されることはありません。しかし、日本人の情報は将来、韓国、台湾、中国、インドの患者に利用される可能性があります。この点については力を入れていきたいと思っています。

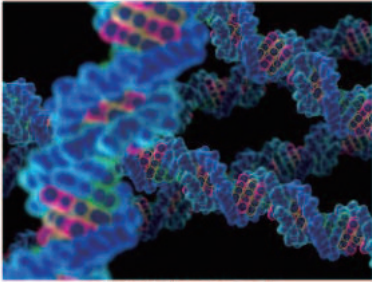
また、治療に関して大手製薬企業と共同研究しています。希少疾患の治療に関して採算がとれないことが予想されますが、海外で高価な治療が認められたとの情報があります。治療でき

るのであれば、いくらでもお金を積んでもいい、と考える患者様もいるわけで、そのような人たちを無視することはできない。治療費が高くてでも支払うことができる患者がいれば、十分採算がとれると考える大手の企業もあり、共同研究しているわけです。


これが全体のまとめになりますが、第一部で *HTRA1* でこのような血管新生モデルとそのメカニズムがわかってきました。また、第二部では *OPTN* で E50K を中心に *TBK1* という分子との相互作用によって小胞体で沈殿し、それが網膜障害を起こす話しをさせていただきました。第三部では遺伝性網膜疾患のエクソーム解析について、約800検体を集めて、約7割の家系について、既知遺伝子が検出されなかったことを報告させていただきました。このスライドに書ききれないほど多くの先生方にご協力いただきました。この場をお借りしてお礼申し上げます。また、これらの研究には国のファンディングがなければできませんでした。文科省、厚労省、国立病院機構、NIH に感謝いたします。

どうも長い間ご清聴ありがとうございました。

視覚障害における原因遺伝子の新たな展開



国立病院機構東京医療センター
感覚器センター
分子生物学研究部
岩田 岳



内境界膜
神経線維層
神経節細胞層
内網状層
内顆粒層
外網状層
外顆粒層
外境界膜
桿体錐体層
網膜色素上皮層

光

網膜

黄斑部

角膜

晶状体

水晶体

網膜色素上皮層

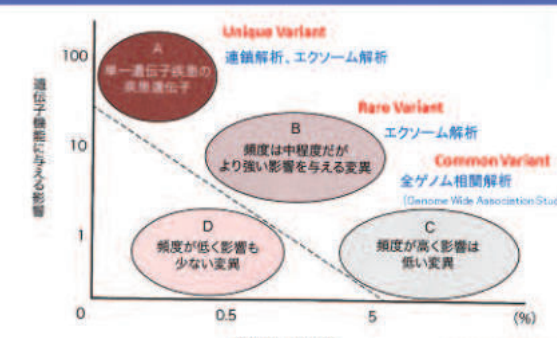
網膜

網膜色素上皮層

遺伝因子と環境因子

	環境要因 Environmental factor	
遺伝要因 Genetic factor		
変異頻度	まれな頻度	高い頻度
疾病	Rare Disease- Unique Variant	Common Disease- Rare Variant
遺伝子	原因遺伝子	感受性遺伝子
解析法	連鎖解析 エクソーム解析	全ゲノム相関解析

変異アレルの頻度と遺伝子機能への影響



Unique Variant
A
単一遺伝子疾患の
原因遺伝子
連鎖解析, エクソーム解析

Rare Variant
B
頻度は中程度だが
より強い影響を与える変異
エクソーム解析

Common Variant
C
頻度が高く影響は
低い変異
全ゲノム相関解析
(Genome-Wide Association Study)

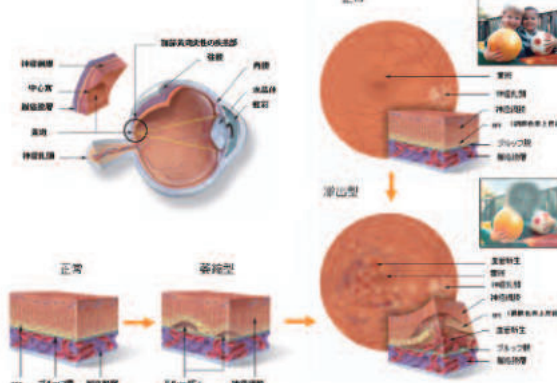
D
頻度が低く影響も
少ない変異

遺伝子機能に与える影響

変異アレルの頻度 (%)

本日の講演内容

- 1) 感受性遺伝子と加齢黄斑変性
- 2) 家族性の正常眼圧緑内障
- 3) 遺伝性網膜疾患のエクソーム解析



正常

異常

正常型

萎縮型

正常

萎縮型

正常

萎縮型

正常

萎縮型

加齢黄斑変性のリスク要因

多因子疾患

環境
光曝露

生活習慣
喫煙、食事(高脂肪)

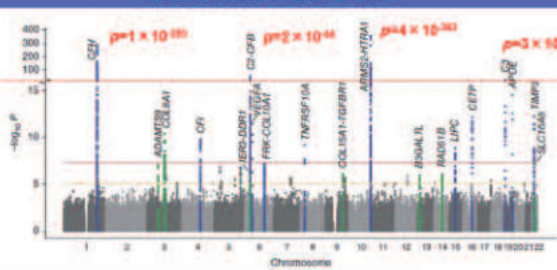
遺伝
ARMS2-HTRA1, CFH etc.

加齢

様々な要因がリスク因子となり発症する

Chakravarti et al. BMC Ophthalmol 2010;10:31

加齢黄斑変性の感受性遺伝子



Chromosome

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

CFH p=1 x 10⁻⁸⁰

ARMS2-HTRA1 p=2 x 10⁻⁴⁴

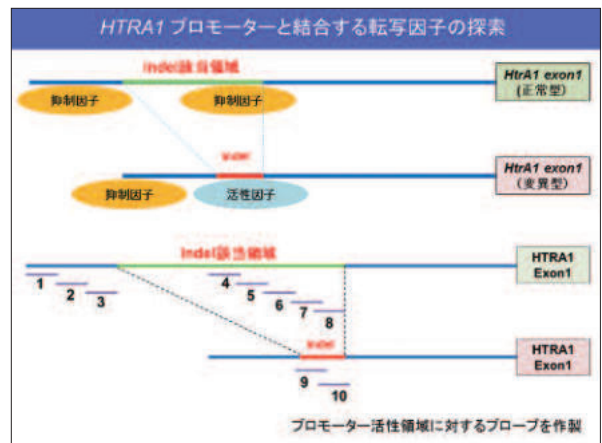
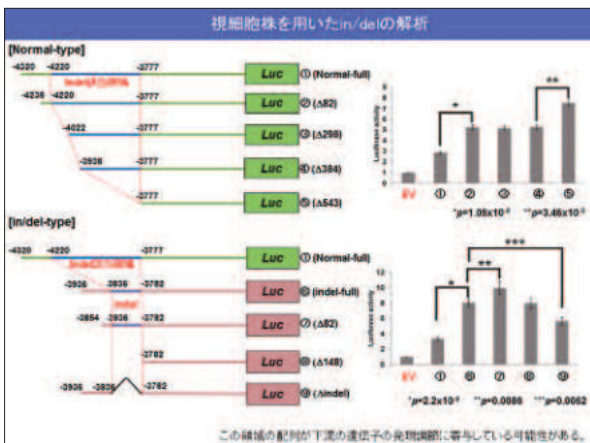
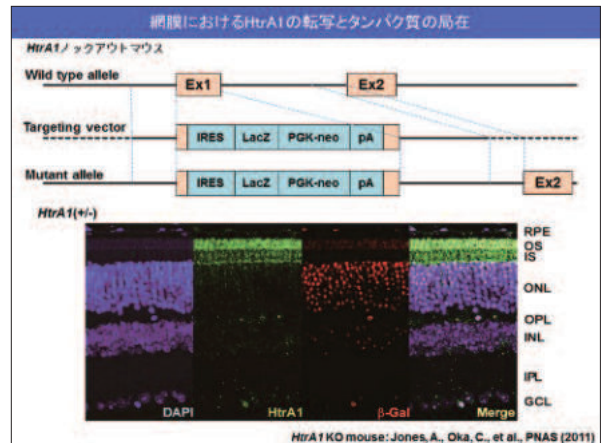
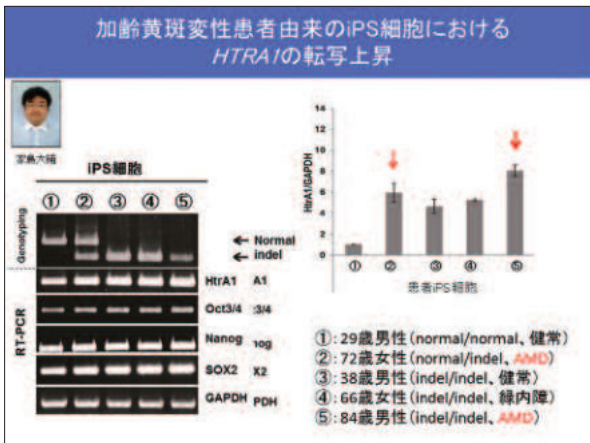
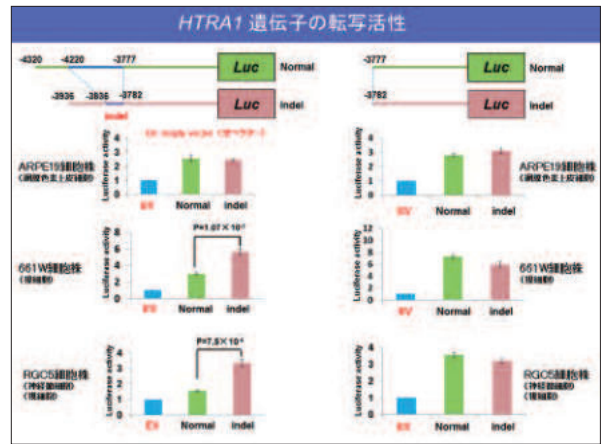
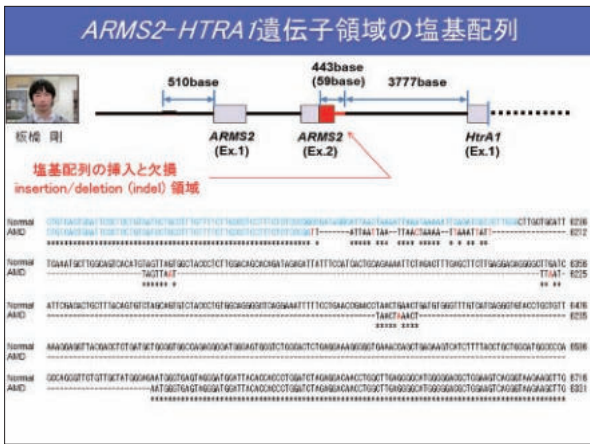
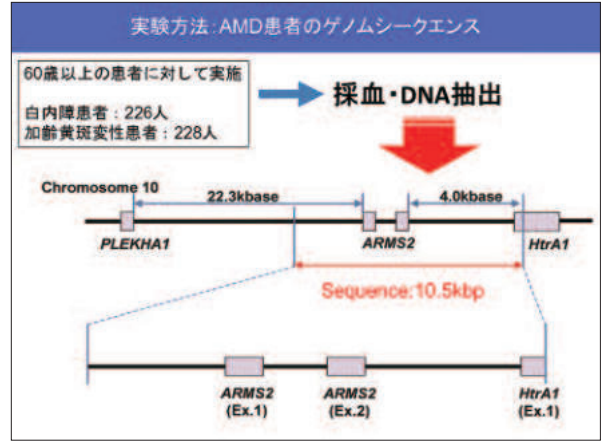
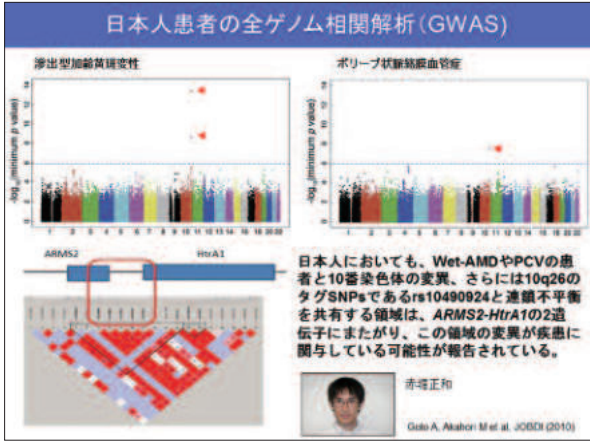
CFH p=4 x 10⁻³⁰³

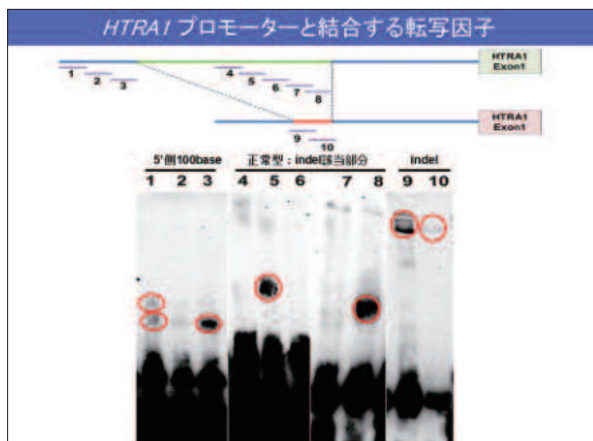
CFH p=3 x 10⁻⁶⁹

Highly associated SNPs	SNP rs ID	EBV z score	SNP rs ID	EBV z score
Complement system	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
Microtubule organizing	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
ADP-ribosylation	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
Protein tyrosine phosphorylation	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
Protein tyrosine phosphorylation	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
Protein tyrosine phosphorylation	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
Protein tyrosine phosphorylation	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
Protein tyrosine phosphorylation	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
Protein tyrosine phosphorylation	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015
Protein tyrosine phosphorylation	rs1044398	0.0015	CFH rs1044398	0.0015

様々な遺伝子の変異がAMDのリスク因子として報告されているが、CFHよりARMS2-HTRA1の二つの遺伝子の変異が、発症しやすさの線形性が高いことが知られている。

Nat Genet 2013;45:433





HTRAセリンプロテアーゼ1の機能

(High temperature requirement factor A1)

- 酸化ストレスに反応して分泌されるセリンプロテアーゼであり、バクテリアにおいてタンパク質の折りたたみを補助するシャペロンとして発見された。
Chen T, et al, Molecular Cell 2002
- 常染色体劣性遺伝性脳動脈症 (CARASIL) の原因遺伝子として報告される。
Hara K, et al, N Engl J Med 2008
- 内皮細胞や平滑筋細胞の分化と増殖に関するTGF-βの前駆体に作用し、成熟性TGF-βの産生を抑制する。遺伝子変異によってプロテアーゼ活性が低下し、TGF-βシグナルの充進がおこる。
Ueda A, et al, Hum Mol Genet 2011

CAG プロモーター-Htra1トランスジェニックマウスの作製

赤塚正和 中山真央

Htra1を全身で発現するTgマウスを作製し、生後1年まで老化させ、喫煙暴露による病態変化を観察。

brain retina

	Wt	Tg	Wt	Tg	
Htra1	[band]	[band]	[band]	[band]	51kDa
Actin	[band]	[band]	[band]	[band]	

マウスの眼底、蛍光造影、および網膜断層像の観察

網膜血管造影 網膜断層像

眼底カメラ (Goetzale HRA+OCT, Heidelberg Engineering, Inc.)

蛍光造影 (血管新生の観察)

光干渉断層像 (OCT, 網膜断層の観察)

Htra1 Tgマウスにおける脈絡膜血管新生

中山真央

網膜血管透過性増加、出血による過蛍光

網目状脈絡膜新生血管

GC	INL	ONL	RPE	CHO
Wt	[OCT]	Htra1 Tg	[OCT]	

Htra1 Tgマウスにおける脈絡膜血管新生

Wt Htra1 Tg

INL ONL

脈絡膜新生血管 (CNV)

HTRA1 Tgマウスでは脈絡膜新生血管の層が観察される。

Htra1 Tgマウスにおける脈絡膜血管新生

CD31 Fibronectin Merge

	Wt	Htra1 Tg
12ヶ月齢実験マウス数	20	22
CNV 発生個体数	0	4
	0	18.2 (N)

喫煙と加齢黄斑変性との相関

- 喫煙はAMDの発症率を約2~3倍上昇させる。
Thomson J, et al, Eye 2005
- 喫煙はヒト網膜色素上皮のVEGF/PEDF比率を上昇させ脈絡膜新生血管を誘発する。
Pons M, et al, IOVS 2011
- たばこ副流煙によってマウスの網膜色素上皮細胞に蓄積物が生成する。
Espinosa-Heidmann DG, et al, IOVS 2005
- たばこ副流煙によって虚血障害を起こし、マウス網膜色素上皮細胞のアポトーシスが誘導される。
Fujihara M, et al, PlosOne 2006

たばこ副流煙による脈絡膜新生血管を誘発する報告はない。

たばこ主流煙暴露実験

- 対象マウス: Wt, *HtrA1* Tg 12ヶ月齢
- たばこ種: ハイライト
- たばこ成分構成: タール 12mg/本, ニコチン 1.5mg/本
- たばこ吸引流量: 0.35L/min
- ※たばこ主流煙を1:7(空気)に希釈して暴露
- 暴露暴露期間: 30分/日, 週5日, 12週間
- 暴露暴露後: 網膜色素上皮造影, 網膜蛍光造影, 網膜色素上皮染色, 網膜組織観察

たばこ主流煙発生装置 (INI-06-CIGR02A, MIP5社)

ご協力: 屋敷科大学 亀井洋三 教授

たばこ主流煙による血管新生の誘導

Wt Cigarette smoke (-) Cigarette smoke (+) *HtrA1* Tg Cigarette smoke (-) Cigarette smoke (+)

FA IA

Wt *HtrA1* Tg

Cigarette smoke (-) Cigarette smoke (+)

scale bar: 200µm

Wtマウス, *HtrA1* Tgマウスの何れにおいても主流煙による血管新生が観察された。

たばこ主流煙による血管新生の誘導

Wt Tg

INL CNV INL

ONL RPE ONL RPE

たばこ主流煙によってWtマウスにおいても血管新生が誘導された。

たばこ主流煙による血管新生の誘導

CD31 Fibronectin

Wt Wt Wt

HtrA1 Tg *HtrA1* Tg *HtrA1* Tg

血管新生マーカーCD31, Fibronectin陽性の細胞が確認された。

喫煙実験結果

	Wt	<i>HtrA1</i> Tg
12ヶ月齢マウス	13	10
CNV 発生個体 (主流煙暴露)	1	2
網膜下蓄積物発生個体 (主流煙暴露)	0	1

小括 (加齢黄斑変性)

1. 遺伝型別加齢黄斑変性の患者の多くはARMS2と*HtrA1*のプロモーター領域Cis座型配列が検出された。
2. ARMS2のプロモーター活性は検出されなかったが, *HTRA1* プロモーターでは*Indel*型のプロモーターに活性上昇が観察された。
3. *HtrA1* プロモーターは主に精細網で転写され, シンパグ質の局在が観察された。
4. *Indel*およびその周辺において, 転写因子の結合が確認された。
(進行中) 質量分析計による転写因子の同定。

1. *HtrA1* を全身で発現するマウスを交配すると約20%の個体が生後1年で血管新生が誘発された。
2. 全ての *HtrA1* トランスジェニックマウスにおいて新生血管が誘発されないことから, *HtrA1* 遺伝子以外の因子の関与が考えられる。
3. 過去の研究ではタバコ副産物によるマウスの網膜新生血管は報告されていないが, 本研究ではタバコ主流煙によるトランスジェニックマウスおよび野生型マウスにおける網膜新生血管が初めて観察された。
4. *HtrA1* トランスジェニックマウスとタバコ暴露マウスではブループレックの形成および消滅が観察された。 *HTRA1* および受容体はブループレックの脱硝化を誘起し, 新生血管を誘発すると考えられる。
(進行中) 視細胞で特異的に*HtrA1*を発現するマウスを作成し(現在10歳齢), その病態を解析中。

本日の講演内容

- 1) 感受性遺伝子と加齢黄斑変性
- 2) 家族性の正常眼圧緑内障
- 3) 遺伝性網膜疾患のエクソーム解析

緑内障

緑内障

家族性の緑内障と遺伝子

Table. Chromosomal Locations of Genes Associated With Glaucoma

Chromosome Location	Condition	Locus (Gene)	Inheritance Pattern
1q23	Early and adult-onset POAG	GLTA (MYO3)	Early-onset: AD Adult-onset: complex
1p35	Congenital glaucoma	GLC3R	AR
2p21	Congenital glaucoma	GLC3A (CYP11B1)	AR
2cen-q23	Adult-onset POAG	GLC7B	AD
3q21-q4	Adult-onset POAG	GLC7C	AD
4q28	Rieger syndrome	RSD1 (PITX2)	AD
5q22	Adult-onset POAG	GLC7G (WDR36)	AD; complex
6p25	Iridocyclitis	RND1 (FOXC1)	AD
7q35	Adult-onset POAG	GLC7F	AD
7q35-q36	Pigment dispersion syndrome	GPD1T	AD
8q23	Adult-onset POAG	GLC7D	AD
8q22	Early-onset POAG	GLC7E	AD
9q34	Glaucoma associated with nail-patella syndrome	(LMY1B)	AD
10p15-q14	Adult-onset POAG; rare familial glaucoma	GLC7F (OPTN)	AD
11p	Nanophthalmos	AB21	AD
11p13	Acromia	ANP (PA06)	AD
11q12	Nanophthalmos	WDR9	AD
11q23	Nanophthalmos	MRP8	AR
15q14	Rieger syndrome	RSD2	AD
16q11	Adult-onset POAG	Locus pending	Complex
16q11-q13	Adult-onset POAG	GLC7I	Complex
20p12	Early-onset POAG	GLC7K	AD

Abbreviations: AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; POAG, primary open-angle glaucoma.

Janey L. Wiggs, JAMA Ophthalmology 2007

開放隅角緑内障の原因遺伝子
Optineurin (OPTN)の発見

Adult-Onset Primary Open-Angle Glaucoma Caused by Mutations in Optineurin

Tayebeh Rezaie,¹ Anne Child,^{2,3} Roger Hitchings,³ Glen Brice,^{2,3} Lauri Miller,⁴ Miguel Coca-Prados,⁵ Elise Héon,⁶ Theodore Krupin,⁷ Robert Ritch,⁸ Donald Kreutzer,⁴ R. Pitts Crick,⁹ Mansoor Sarfarazi^{1*}

Primary open-angle glaucoma (POAG) affects 33 million individuals worldwide and is a leading cause of blindness. In a study of 54 families with autosomal dominantly inherited adult-onset POAG, we identified the causative gene on chromosome 10p14 and designated it *OPTN* (for "optineurin"). Sequence alterations in *OPTN* were found in 16.7% of families with hereditary POAG, including individuals with normal intraocular pressure. The *OPTN* gene codes for a conserved 66-kilodalton protein of unknown function that has been implicated in the tumor necrosis factor- α signaling pathway and that interacts with diverse proteins including Huntingtin, Ras-associated protein RAB8, and transcription factor IIIA. Optineurin is expressed in trabecular meshwork, non-pigmented ciliary epithelium, retina, and brain, and we speculate that it plays a neuroprotective role.

Science 2002

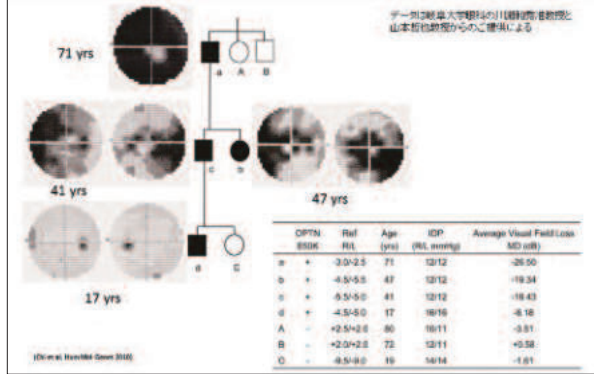
開放隅角緑内障におけるOPTN遺伝子変異

論文筆頭著者 緑内障の原因遺伝子変異

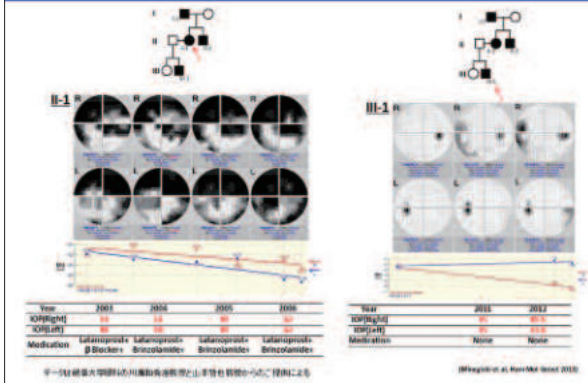
Rezaie et al.	P16A, E50K, K66R, E92V, H228Y, 2-bp Insertion, A466S, R545Q
Aung et al.	E50K (Glutamic acid > Lysine)
Funayama et al.	H26D
Fuse et al.	H26D, R545Q
Leung et al.	E103D, H486R
Willoughby et al.	H486R
Weisschuh et al.	A336G, A377T
Yao, et al.	V161M, I407T
Hauser et al.	E50K

Mansoor Sarfarazi, Mechanisms of the glaucoma, Humana Press (2008)

OPTN (E50K) 変異による正常眼圧緑内障の家系



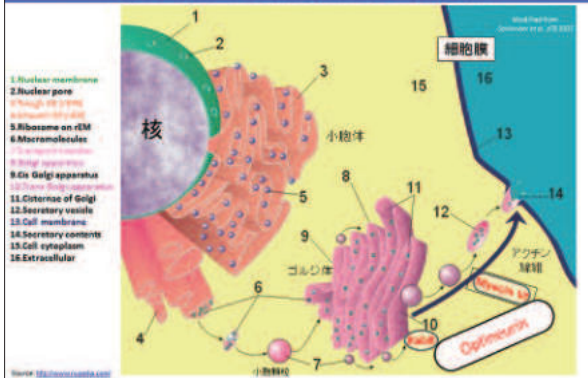
OPTN (E50K) 変異による正常眼圧緑内障の家系



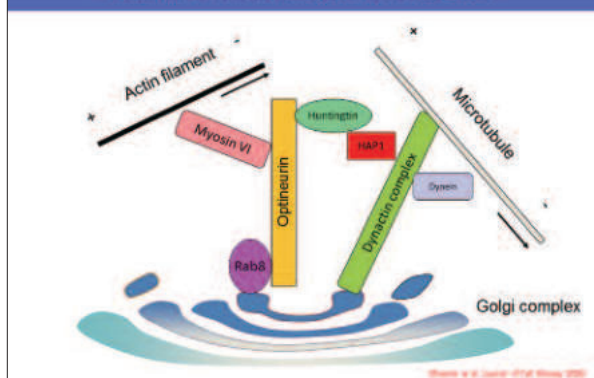
オプテニューリン (OPTN) 遺伝子の発見
Marshall S. Horwitz

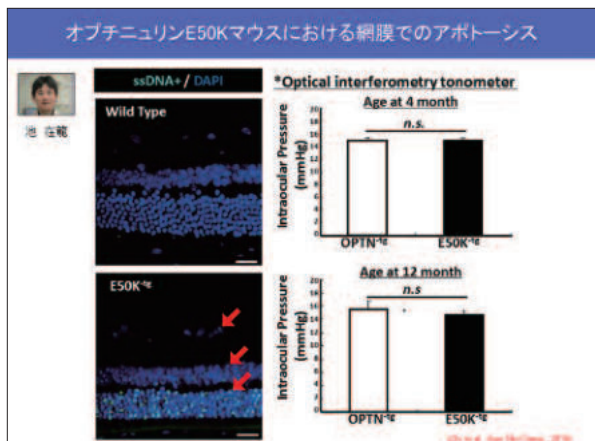
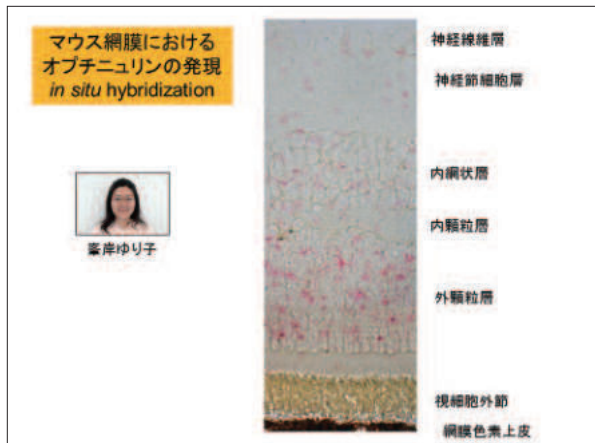
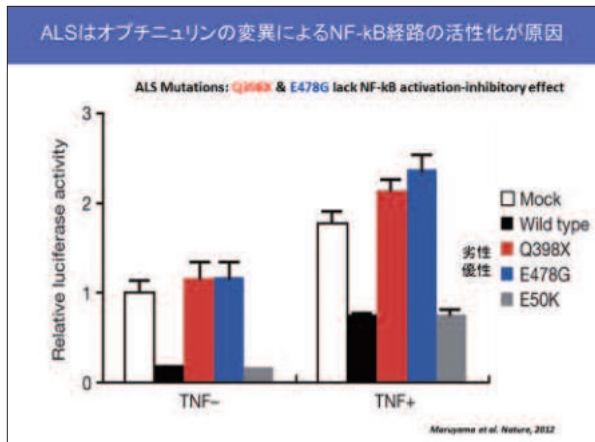
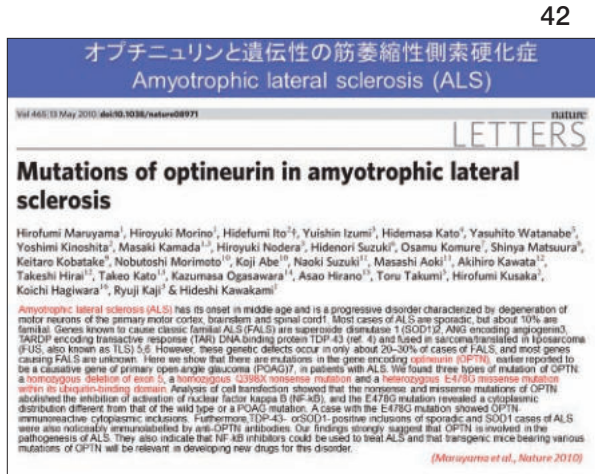
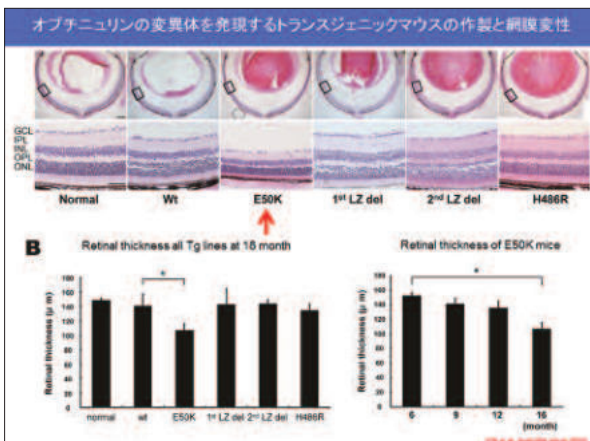
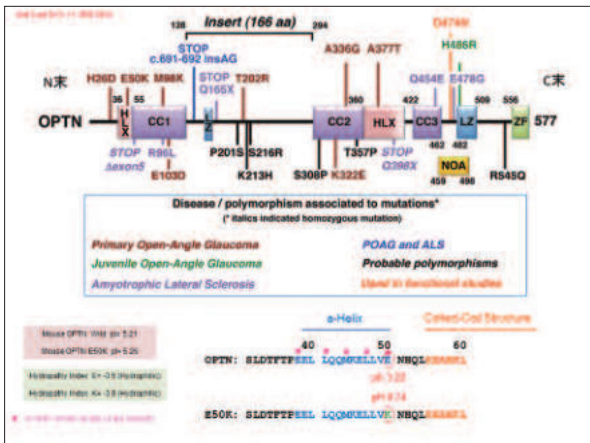
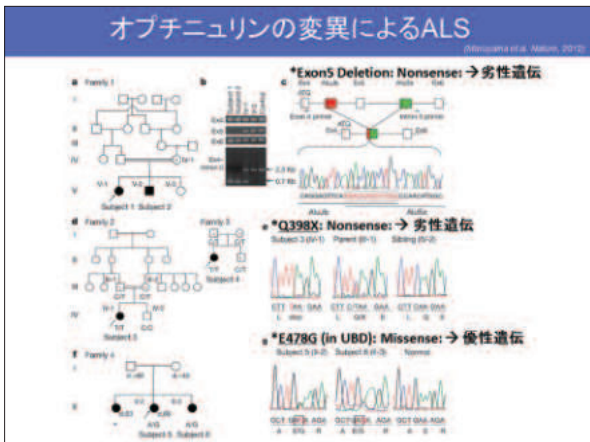
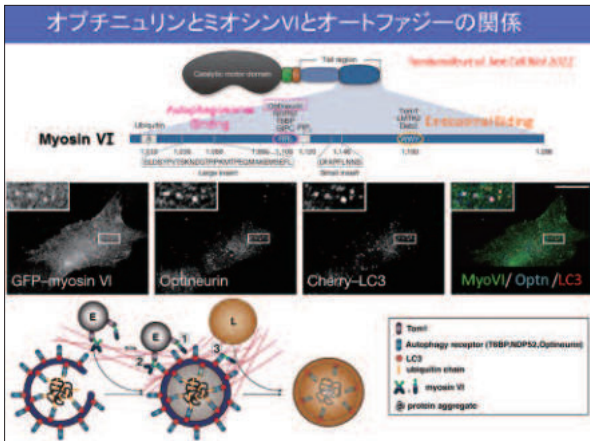


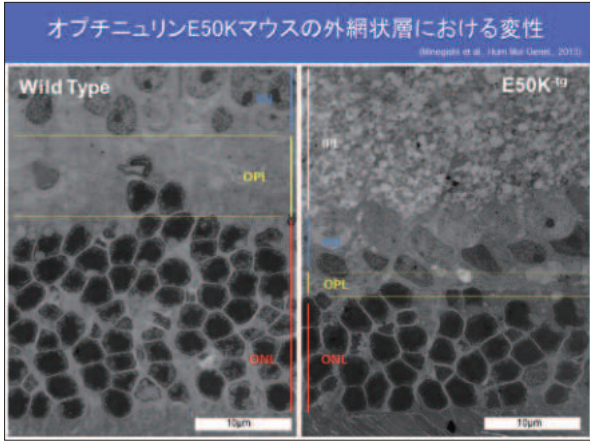
オプテニューリン、ミオシンVI、Rab8による
小胞顆粒のゴルジ体から細胞膜への輸送経路



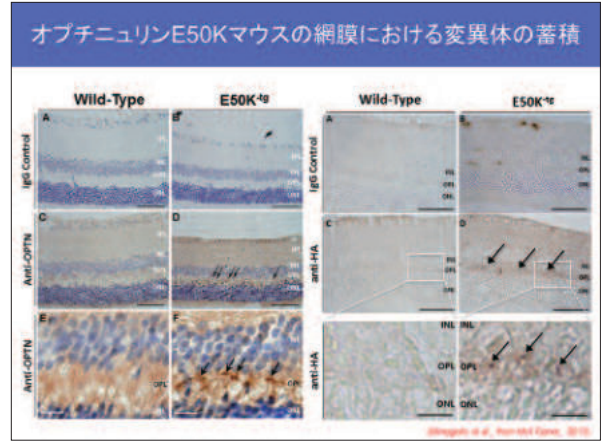
オプテニューリン、ミオシンVI、Rab8による
小胞顆粒のゴルジ体から細胞膜への輸送経路



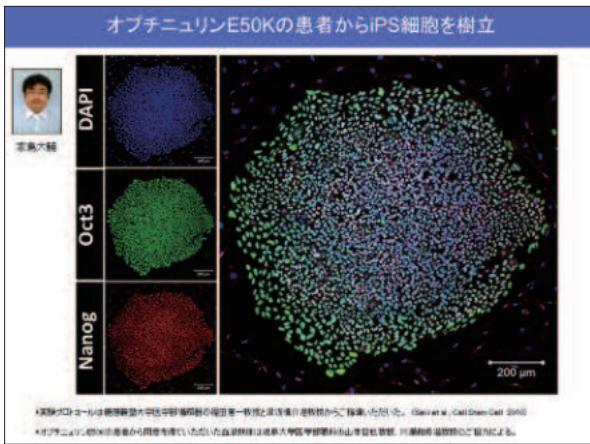




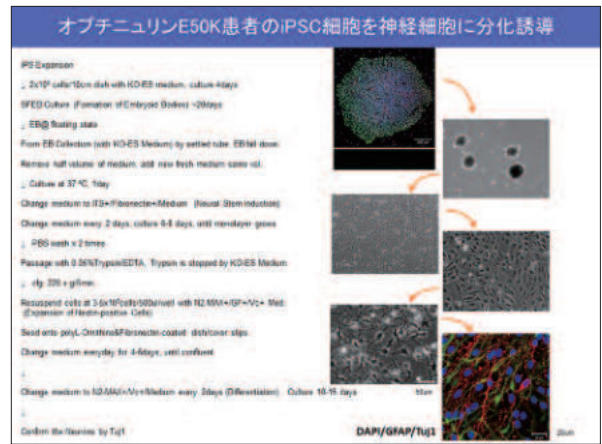
51



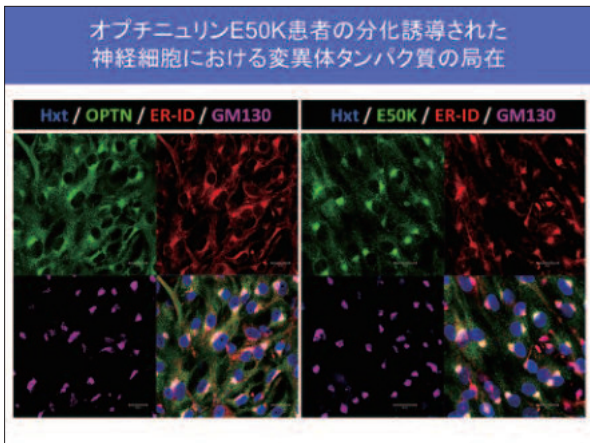
52



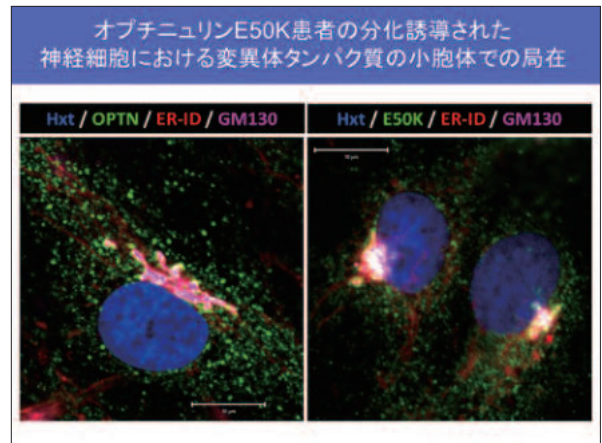
53



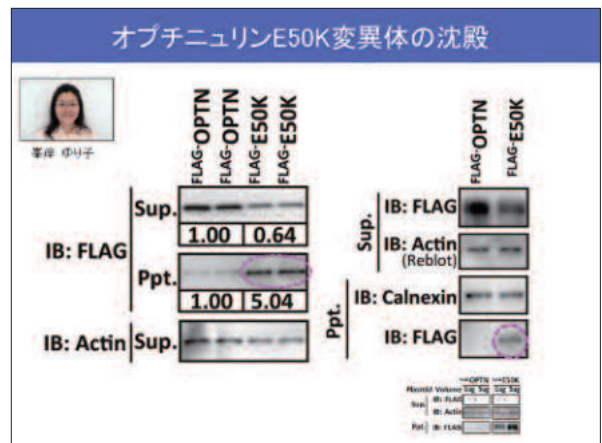
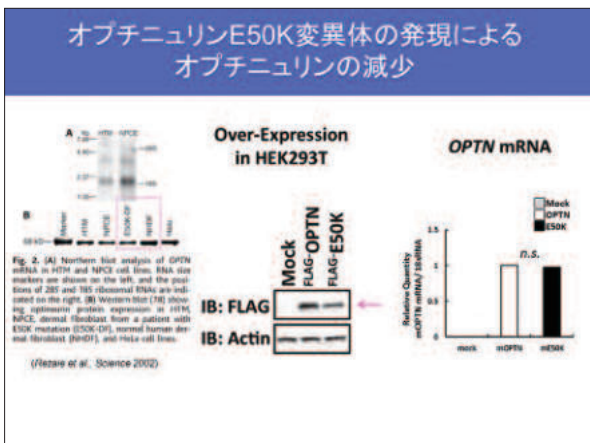
54

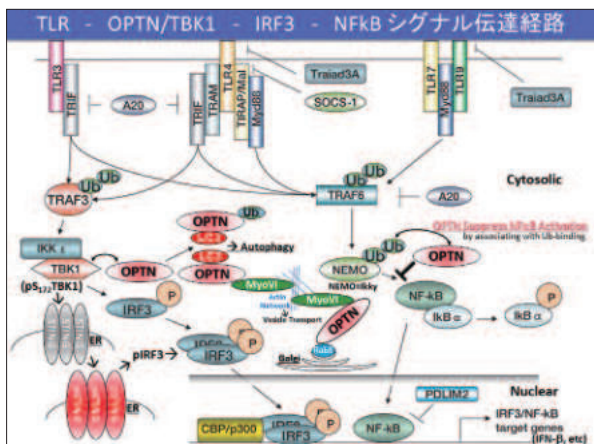
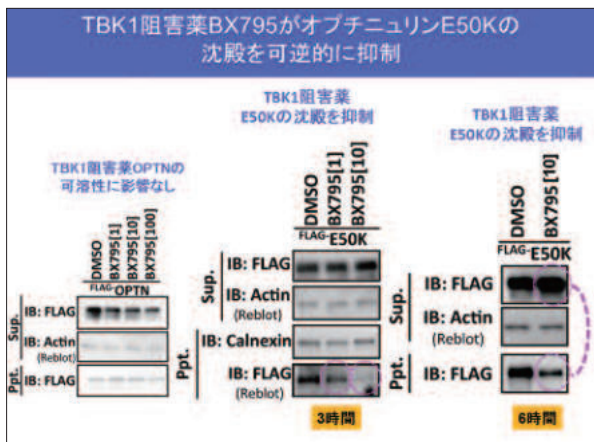
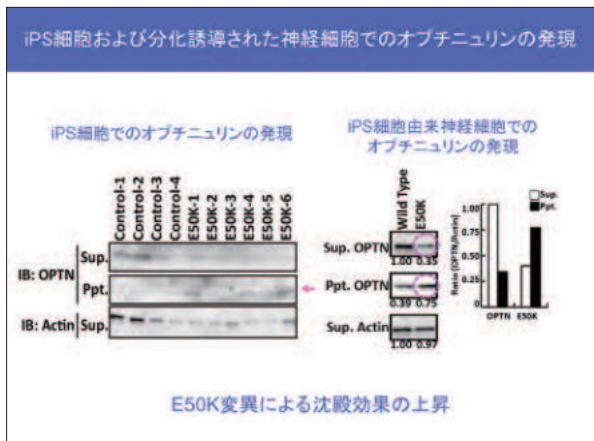


55



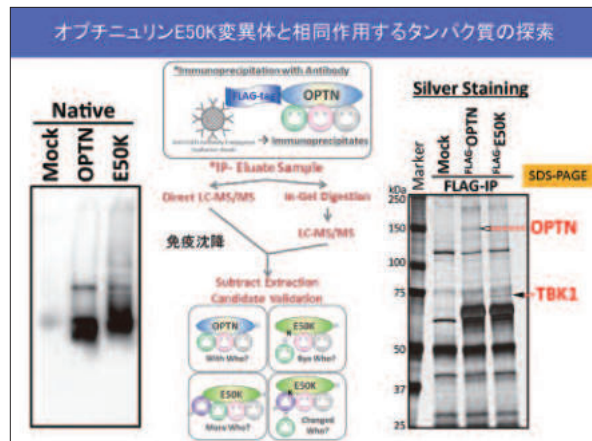
56





本日の講演内容

- 1) 感受性遺伝子と加齢黄斑変性
- 2) 家族性の正常眼圧緑内障
- 3) 遺伝性網膜疾患のエクソーム解析



TBK1コピーナンバーバリエーションと緑内障

Glaucoma (Davis et al., *IOVS*, 2011)

Copy Number Variations and Primary Open-Angle Glaucoma

Lea K. Davis^{1,2}, Kacie J. Meyer^{3,3}, Emily L. Schindler³, John S. Beck⁴, Danielle S. Ruid⁵, A. Jason Grandstad², Todd E. Scheetz^{5,6}, Terry A. Braut^{5,6}, John H. Finger^{7,8}, Wallace L. M. Alward⁹, Young H. Kwon⁹, James C. Folk⁹, Stephen R. Russell⁹, Thomas H. Wassink⁹, Val C. Sheffield^{9,10} and Edwin M. Stone^{9,10}

Human Molecular Genetics, 2011, Vol. 20, No. 12, 2482-2494
doi:10.1093/hmg/ddr122
Advance Access published on March 29, 2011

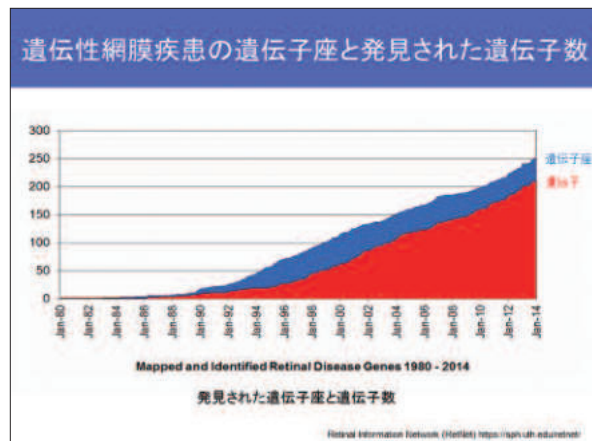
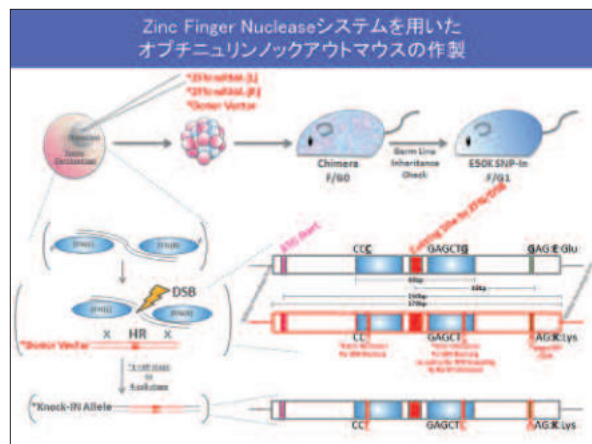
Copy number variations on chromosome 12q14 in patients with normal tension glaucoma

John H. Finger^{1,1}, Alan L. Robin^{4,5,6}, Jennifer L. Stone¹, Ben R. Roos¹, Lea K. Davis¹, Todd E. Scheetz¹, Steve R. Bennett¹, Thomas H. Wassink¹, Young H. Kwon¹, Wallace L. M. Alward¹, Robert F. Mullins¹, Val C. Sheffield^{1,8} and Edwin M. Stone^{1,8}

¹Department of Ophthalmology and Visual Sciences, ²Department of Psychiatry and ³Department of Pediatrics, Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA, USA and ⁴Glaucoma Specialist, Baltimore, MD, USA, ⁵Department of Ophthalmology and International Health, School of Medicine and ⁶Bromberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA, ⁷Department of Ophthalmology, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA and ⁸Howard Hughes Medical Institute, Iowa City, IA, USA (Finger et al., *Hum Mol Gen*, 2011)

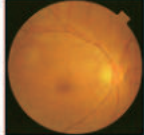
Confirmation of TBK1 duplication in normal tension glaucoma

(Kawase et al., *Exp. Eye Res.* 2012)




さまざまな遺伝性網膜疾患 ②

オカルト黄斑ジストロフィー (AD)



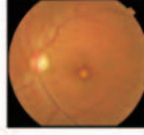
症状: 視力不良、
原因遺伝子: *RPL11*

X染色体劣性網膜分離症



症状: 視力不良
原因遺伝子: *RS1*

Best病 (AD)



症状: 視力不良
原因遺伝子: *BEST1*等

その他、先天性静止性夜盲、クリスタリン網膜症、白点状網膜炎、嚢状ジストロフィー、脈絡膜ジストロフィー、etc

感覚器センター オンライン症例登録システム



担当医書き込み権限

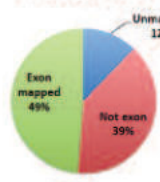
遺伝子解析研究者書き込み権限

全員書き込み権限

Exon Capture キットの比較

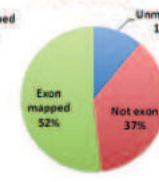
- 3社のExon Capture kitを用いて、ライブラリー作製および次世代シーケンス(Illumina, HiSeq2000)を行った結果を比較した。
- Agilent SureSelect kitは、RefSeq 遺伝子のExon領域に対して、最も高いキャプチャー率を示した。

Roche SeqCAP v3.0



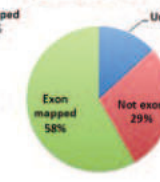
64MB

Illumina TruSeq



62MB

Agilent SureSelect v4.0



51MB


検体収集

2018年12月


疾患	家系数	検体数
網膜色素変性 (劣性 後生)	208	250
その他	72	7
オカルト黄斑ジストロフィー	84	75
嚢状ジストロフィー (地底正濁)	42	48
黄斑ジストロフィー	34	39
スターガルト病	26	28
レーベル線内障	23	29
先天性盲盲症	17	23
遺伝性ブルーゼン	3	3
錐状網膜ジストロフィー	3	5
脈状網膜変性	3	3
斜視性黄斑ジストロフィー	1	1
家系内の発症者		297
合計	496	808

遺伝性網膜疾患の臨床診断法

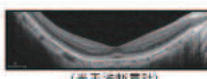
- 1) 自覚的検査 ... 視力、視野、色覚等
- 2) 眼底検査、蛍光眼底造影検査
- 3) 網膜電図(ERG)
- 4) 画像診断(光干渉断層計、網膜自発蛍光)




(眼底検査)



(ERG)



(光干渉断層計)

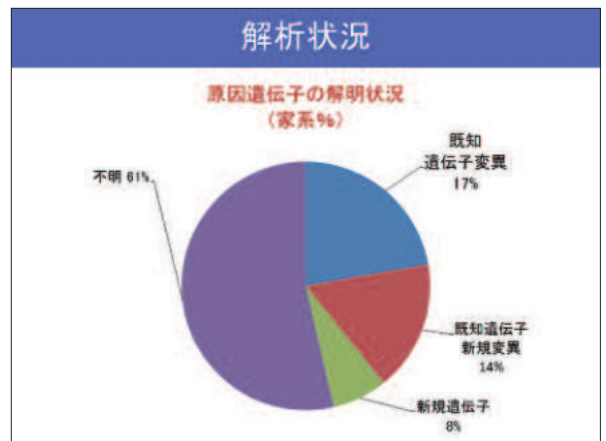
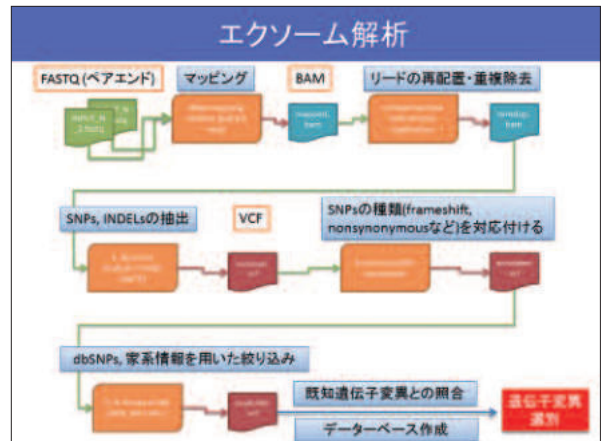


(網膜自発蛍光)

上記の検査をすべて用いても、臨床像のみから遺伝子型を正確に推定することは困難である

遺伝子型一覧 (遺伝性網膜疾患)

患者ID	疾患	遺伝子	変異	臨床経過	検査結果	治療	備考
001	網膜色素変性	USH1B	c.100G>A	進行性	ERG異常	手術	
002	網膜色素変性	USH1B	c.200G>A	進行性	ERG異常	手術	
003	網膜色素変性	USH1B	c.300G>A	進行性	ERG異常	手術	
004	網膜色素変性	USH1B	c.400G>A	進行性	ERG異常	手術	
005	網膜色素変性	USH1B	c.500G>A	進行性	ERG異常	手術	
006	網膜色素変性	USH1B	c.600G>A	進行性	ERG異常	手術	
007	網膜色素変性	USH1B	c.700G>A	進行性	ERG異常	手術	
008	網膜色素変性	USH1B	c.800G>A	進行性	ERG異常	手術	
009	網膜色素変性	USH1B	c.900G>A	進行性	ERG異常	手術	
010	網膜色素変性	USH1B	c.1000G>A	進行性	ERG異常	手術	



総合討論

座長 岩田 岳、松永 達雄

加我 それでは、最後の総合討論になりますので、演者の先生方は壇上にお上がりください。座長は、岩田先生と松永先生にお願いします。

岩田 それでは、残りの30分ほど総合討論させていただきます。まずは発表順で基調講演の松本先生に対して、シンポジストあるいは会場から何か質問がありましたらどうぞお願いします。

角田(和) 視覚研究部の角田です。先ほど、岩田先生からお話のあった黄斑ジストロフィーの診察をしています。先生のお話の最後に小脳変性が出てきましたが、小脳変性は非常に診断が難しく、いろいろな表現型が混ざっているとのことですね。網膜ジストロフィーも同様に小脳変性のような感じで、一つの遺伝子からいろいろな病気が発症するし、また、ひとつの病気の原因遺伝子が複数個あったりして、候補遺伝子を探すのはほとんど手探りです。

このため原因検索の中でも特に大事なのが臨床診断です。主に眼底診断と、画像診断、電気生理的診断が重要となりますが、網膜ジストロフィーについてそれらをきっちりと診断できる眼科医は、厳しく見積もると全国で10名もいません。

ですので、これをこれから残りの70%の原因遺伝子を埋めていくにあたって、一つは、共同研究者をたくさん増やさなければいけないのですが、共同研究者を増やせば増やすほど、診断のレベルがどんどん下がっていくというジレンマを感じています。先生もそういった点について何か考えていますか。

松本 とても大事な問題だと思います。結局われわれが対象にしている疾患は希少疾患と言われるもので、頻度を考えると、網膜疾患変性とか、大体数千例から数万例に、例えば1万例に1例ぐらいだと、毎年100人ぐらい生まれてきて

もおかしくないです。すると、それを例えば、どうかたちで研究まで結び付けていくのかを考えると、なかなか心もとないです。

例えば、いわゆるそういうシステムティックな登録システムもない状況で、あと、全く患者の診断のクオリティーコントロールが大事ですが、診断クオリティーを厳しくして間違っている可能性のある症例を全く含めないとして、はねつけていると、全く症例が集まらないので、その辺は痛しかゆしです。

基本、僕らは外から依頼を受けて受け付けることがほとんど、もしくは、大体各種一般病院から専門病院へのルートがあって、それから横串の何かの勉強会とか、学術団体とか、専門医グループとか、そういう比較的、ある意味、緩い結びつきだけどかなり専門性の高い集団から受け付ける、あるいは個人的なつながりでリクルートしてくるとか、そういうことの中で貴重な症例を何とか集めるのですが、そこにやっぱり、ゲートキーパー的なキーパーソンみたいな人がいる場合は、すごく効率がよくなります。

それでも、これだけ網羅性の時代になって、何でも見えてしまう時代になってくると、例えば目なら目、脳なら脳の疾患ということに特化しても思いもかけないような発見もたくさんあります。またさじ加減は難しいですけど、逆に、少しはずれた症状の患者を診ると、また別の発見があることもあるので、厳しく疾患を限定して解析していくか広く多様な疾患に対応していくかは意見が分かれるかもしれません。あと、いわゆる自分たちのキャパシティとかも考えながら現実的に対応していくしかないのかなと思います。

あと、診断と研究の区別がだんだんつかなくなってきている感じがします。また、遺伝子が

20個も30個もあるような疾患も多いので、10年以上診ていて診断がつかないような症例を診ていらっしゃる先生が、研究か診断かよくわかりませんが、「解析してもらえませんか」という依頼も、最近は結構増えてきています。そういうものにも「ノー」とは言っていない。

基本は、割と鷹揚にやって、その結果、いつの間にか4千サンプルぐらいエクソーム解析をやっていました。まず何をやらないといけないのかというプライオリティーの問題と、たくさん集めないといけないときは、やっぱりある程度臨機応変にやっております。

ただ、岩田先生のお話にありましたが、非常にシステマティックに患者さんをリクルートされているので、そういう意味では、ある種、ゲートキーパーの先生たちがたくさんいる中で、二次スクリーニング的な、クオリティーコントローラーがいらっしゃれば、かなり助かるかもしれません。

角田(和) ありがとうございます。おっしゃるとおりで、実際には共同研究先の診断能力を加味しつつ、なるべく自分で各症例の診断精度を把握しようと思っています。ただ、症例数が多くてなかなかできないのが現状で、それでもそれをやるしかないのかと思っています。どうもありがとうございます。

松永 遺伝子の解析、特に先生が扱われているように、知的障害あるいは奇形が伴っているような場合だと、変化のタイプはすごく幅広いと思います。それこそ染色体でわかるようなものから、一塩基のレベルの変化。今は、調べる技術の手順としては、診断がつかないけどそういう幅広い範囲があるときというのは、一気にエクソームから入るのでしょうか。

松本 もちろん、染色体解析やマイクロアレーをやってからエクソームに入るほうが望ましいですが、最近は、今日の北川先生のお話で、ホールゲノムだけが、例えばゲノムのコピー数上、染色、コード状況とかを含めてわかるというやり方でしたが、エクソームのデータでコピー数解析もできるようになってきています。私たちのインターナルなデータでは、大体、マイクロアレー100キロベース以上のコピー数変化であれば6割ぐらいはエクソームのデータでもわかるようになっています。

また、エクソームの利点では、10キロ以下の欠失とかも採れることです。だから、エクソームのデータの守備範囲は徐々に広がりつつある状況です。最近は、たくさんの患者の紹介があると、やはりある程度エクソームをやらなければいけないところもあります。エクソームは月に100例、200例というかたちでどんどん回っているんで、エクソームの中に入れて、それで原因がわからないやつに関してはアディショナルの解析までやるということですかね。答えになっているかどうかわかりませんが、コピー数解析まではそこそこできます。そのような感じで、ほとんどはエクソームを中心にやっています。

岩田 他に会場から松本先生に対して質問はありませんか。

藤井 私は、解析の実際の現場はよく知りませんが、施設による解析の精度というか、そういう誤差はあるものですか。機械でやるから誤差はゼロではないかという錯覚というか、そういう思い込みがあるのですが、もし誤差が生じるとするとどこにあるのか、先生がわかっていたら教えてほしいです。

松本 わかりませんが、自分たちのところのデータはそれなりの自信を持っていますが、実際問題として、われわれのところのネガティブなデータをほかのところが解析してポジティブな結果が出たという経験値を持っていないので、自己満足的なところもあるのかなと思いますが、あらゆるいろいろな疾患を含めて20%は確保していて、ものによっては70%ぐらいの診断率を上げることができるので、レベルとしてはそこそこあるだろうと考えています。

一方で、診断率とかシーケンスのクオリティーが上がらない検体というのも結構あります。一つは、DNA量が少ない場合。DNA量が少ない場合、われわれは一部増幅したものを混ぜ込んだりして、いろんなことをやりながら診断率を上げようという工夫をやっていきます。それもある程度経験値に基づいたところで、まず、DNAの質とか量の担保が必要になると思います。

また、どのぐらいシーケンスをするかというところも自分たちの中である程度の基準を設けています。タンパク質コーディング領域を平均100Xぐらいでカバーすると、今のキットだと同領域の大体95%が20回ぐらいは読めるということ

ところで、シーケンスの量を担保します。

質に関しては、われわれが病気だと結論するまでは、基本的に、その NGS データを IGV を用いて目視を観察するのと、サンガー法とかほかのメソッドで必ず確認をします。遺伝子変異の候補を10個ピックアップしサンガー法で検証すると、2 個ぐらいエラーが含まれています(実際には存在しない変異がある)。

これは、シーケンスのエラーとマッピングのエラーが影響していると思います。各ステップで、ある程度の質を担保し、原因が解るまで繰り返しやり直すことも多いです。とにかく、研究なので原因を捕まえるまでとことんいろんなことをやっています。

だから、ほかのところはどのぐらいの規模とクオリティーでやっているかはわかりませんが、多分、スモールスケールでやった場合はそこまで突っ込まない場合も多いかなと思います。でも、何とも言えないので、どうでしょう、岩田先生。

岩田 次世代 DNA シーケンサーは、みんな同じものを使っているわけですよ。エクソンのトラッピングに関しても、みんな同じキットを使っている。違いは最終的な解析ソフトウェアの種類やパラメーターの設定が異なると思います。

松本 あとは、コントロールのデータベースがすごく有用なので、そのコントロールのデータベースも、実は私たちも厚労省の NGS5 拠点の一つです。京都大学の松田(文彦)先生を中心に、ほかの拠点班の先生たちのデータと合わせて1,208名分のノーマルコントロールのデータをデポジットしています。

今は誰でも見られる状況になっているので、そういう意味では、このデータベースをしっかりと活用している先生は、絞り込みとかもかなり上手にやっておられると思います。多少の差があるかもしれませんが、3 年前と比べると皆さんの解析レベルが随分上がって、均一化しつつあると思います。

岩田 そのほかにありませんでしょうか。

松永 遺伝の原因を調べる研究というと、昔は大家系を集めて、特に、一つの家系の中で、優性遺伝の患者10人、健常者10人という人数でないと判明しない、ロッドスコアが上がらないというのがありましたが、今、次世代を使うこと

で、その数を減らしても優性遺伝の原因を突き止めることができるようになってきているのでしょうか。

松本 まず、先生の御発表に対して、私は非常に親和性がありました。私は、20年以上前に、疾患の原因を探る目的でさまざまな候補遺伝子を調べる等、一見無駄なあらゆる解析をやっていました。先生が言われましたように、SNP タイピングができるようになって、いわゆるゲノムの中での多型部位が増えましたよね。1 万とか、場合によっては、50K とか、100K とか、5 万、10 万とかのポイントになったことで、小家系である程度マッピングができるような時代になってきました。

結局、小家系マッピングをすると、ロッドが少し上がるところが10カ所とか20カ所とか、今はいくらでもゆるく採れるわけです。10カ所、20カ所を採っても、例えば、20カ所であっても全部を足しても300Mb ぐらいのサイズであれば、ゲノム全体の10分の1なわけです。10分の1の領域に絞れたということは、見る候補バリエーションの数が10分の1になります。だから、まさに先生の御質問に対しては「イエス」という答えになります。

難しいのは、恐らく小家系の優性遺伝病だと思います。なかなか絞れないというところは事実です。特に、核家族で、父が罹患、患者も罹患、母1人ぐらいが正常という家系は、バリエーションを絞るのがなかなか難しいところがあります。

岩田 次は、北川先生に移りたいと思います。北川先生に対して、会場もしくはパネリストの方から質問はありませんでしょうか。それでは、私から伺いますが、ずばり、今後シーケンス費用はどこまで価格が下がるとお考えでしょうか。

われわれが今解析しているのは希少疾患なので、例えば遺伝性網膜疾患については合計5万人ほどの患者ですので、5万人だったら全員解析してもいいのではないかと思うときもあります。シーケンス費用が例えば2千円とか3千円のコストまで下がってくれば、5万人全員をエクソームして、日本人患者の原因を速やかに解明することもできると思います。すでに技術はあるわけですから、価格が下がれば実施できますが、タカラバイオとしてはいかがでしょうか。

北川 厳しい質問ですが、実際問題として、ホー

ルゲノムは、今、10万円、千ドルというかたちで、いろんなところで新たに始められていて、現実的にそのぐらいの金額になりつつあるというところ。エクソームというのは、実は操作自体にちょっと煩雑なところがあって、解析の金額はエクソームとホールゲノムとあまり変わらなくなってくる気がしていて、エクソームだから安くできるとは限らない部分もありますよね。

岩田 エクソンのキャプチャー代が高い。

北川 ええ。そういう面がありますよね。ですので、そういう意味で、ホールゲノムが10万円になったからエクソームが何千円になるだろうというのは考えにくくて、ただし、データ解析のコストという意味で言えば、ホールゲノムよりエクソームのほうが圧倒的に安くできますから、その辺は安くはできていくと思います。ずばりいくらかというのは、申し訳ありませんが今は言えない状況です。

岩田 1分子シーケンサーのテクノロジーは、DNAを入れるだけで、どれぐらいのシーケンスが可能な装置なのでしょう。

北川 そうですね。ナノポアなどでも、大型の方の装置であれば、多分、本当に数時間で全ゲノムデータ自体は出ると思います。ただし、出てきたデータを計算して、その変異をコールするといった作業自体は、そう簡単には早くならないと思います。

数をこなすということであれば、ナノポアとか、あるいはそういった、DNAを入れればデータが出てくるという装置が、これからは主流になってくると思います。

松本 タカラさんの場合も、シーケンスの解析コスト、いわゆるウエットの解析コストではなくドライの解析コストがすごく重要な点だと思います。例えば、ものによるかもしれませんが、料金の中にドライのコストはどのぐらい見積もられているのですか。

北川 そうですね。ものによりますが、今、現実的には、多分3割から4割ぐらいはドライのコストがかかっているのではないかと思います。一番かかるのは、コンピューターのシステムもそうですが、実際に解析する場合にはやはり人の能力がかかるので、バイオインフォマティクスと言われるようなところで作業をする人件費

とか、そういった部分はなかなか簡単にはカットできない部分があります。

松本 多分、本格的にやられているので、バイオインフォマティクスの数もある程度確保しないと難しいと思いますが、どうやって確保されていますか。

北川 実は、人の確保は非常に大きな課題で、募集をかけるのですが、バイオインフォマティクスというのはちょっと特殊な分野で、一言でバイオインフォマティクスと言っても、ゲノムが得意な人もいれば、そうでない人もいます。計算機を使えるだけではバイオインフォマティクスとは言えないので、そういう意味では、きちんとした教育を受けた人をこれから育ていくようなシステムを、大学とかそういうところで作っていただかないと、将来的には非常に困ることになるなど。

岩田 会場からはいかがでしょうか。シーケンス技術について、何かありますでしょうか。なければ、次に田村先生について質問をお願いします。

角田(和) 田村先生、素晴らしい話をありがとうございました。結局、こういう遺伝子の研究というのは、最終的には病気の治療に持っていければいいと思いますが、なかなか治療にまでは至っていません。現状では事前にそういう病気から避けたがるというか、そういうことで相談に来る方もいるかもしれません。

今、先生が唯一、日・米でやっていらっしゃる。日本では、各病院にそれぞれ専門の人がいるのかもしれませんが、そうすると、倫理面等で整備、統一・標準化も必要になります、あるいは今後、カウンセリングする場所の基準みたいなものが必要になってくるのかとかと考えます。

松永先生もよく相談に乗っていらっしゃると思いますが、傍から見ていて非常に苦労されています。場所の確保にしても、家族の人たちを見ていると本当に気の毒になるぐらいの感じで、松永先生も、相談する場所とかそういうのが法的になって、「ここでやらなければいけない」とか、それなりの部屋とか決まった基準があればいいのでしょうかけれども、そういう取り組みは社会的に進んでいるのでしょうか。

研究はどんどん進んでいきますが、実際問題、

相談する患者、家族が最初の原因になった人を後から知ったとき等、いろいろ考えた場合に、そちらのほうの患者家族の心境やストレスも同時に急展開していった、医療施設がその急展開についていけるのかなと思ったのです。先生が一番そういう面で苦勞されていると思います、その辺のことも含めて現状を教えてくださいなればと思います。

田村 そうですね。多分、何も整理できていないのが現状ではないかと思いますが、松永先生のような先生のところにはいらした患者や家族は本当に幸せで、実際にはそういったことがうまくサービスとして利用できない状況にいる方も大勢いると思います。

いろいろ難しい中の一つは、話の中でも言った「遺伝カウンセリングとは何か」といったときに、例えば臨床で、眼科の先生、耳鼻科の先生が普通に話をして、「これって、何で難聴になったんでしょ」とか、「何で網膜の疾患が起きたんでしょ」といったときに説明するのは遺伝カウンセリングではないのかということ、多分、そこも部分的には遺伝カウンセリングでしょうし、遺伝カウンセリングの態勢が調っている病院では本当に充実しているかということ、言葉は悪いですが、実は全然違う疾患領域の専門の先生が片手間でやっていることもあります。

実際、私だけではなく、日本には千人以上の臨床遺伝専門医の先生方いますから、遺伝カウンセリングがすごく充実しているところもたくさんあると思います。私自身が自分を振り返ると、何百例にもなっていて、出生前診断も、ダウン症候群の話から、筋ジストロフィーの話から、血友病の話から、ハンチントンの話から、網膜色素変性症の話から全部していると、がんの遺伝もやっているのですが、勉強も全然追い付かないので、これは本当はよくない、このように幕の内弁当みたいな仕事の仕方をするのはあまりいいことではないと思っているので、もう少し遺伝カウンセリングという・・・。

日本では、今、どちらかということ中央診療部門的な感じになっていることが多くて、そこに全科から行くという感じですが。アメリカは全然違って、眼科には眼科の遺伝カウンセラーが付き、神経内科には神経内科の遺伝カウンセラーが付く感じで、その疾患領域のことを勉強

した人が遺伝カウンセリングをしています。そうならないと、充実した情報提供とか患者の対応はなかなか難しいと思いますが、そのために日本でどうしたらいいかというのは、それぞれ先生が言われる部屋一つをとっても難しいことですよね。

私が遺伝子検査も難しいと思っているのは、ここにいらしている先生方はすごくたくさん遺伝子検査をされていると思いますが、例えば、普通の遺伝子相談の外来でたまたま何かの患者が来て、「私も今日お会いしたから、先生方のところに検体を送ってみようかしら」といったときに、スピッツ一つありません。

これが普通の臨床検査会社であれば、例えば、エスアールエルならエスアールエルのスピッツがちゃんとあるから、そこに伝票もあるし、スピッツもあるし、そのまま行けばいいですが、じゃあ、岩田先生のところへ送るのにどうしたらいいか。発泡スチロールもスピッツも探してこなければいけないし、伝票は普段と全然違う流れで、どこに検体を置いておいて誰に取りに来てもらったらいいかという、それだけで1日仕事になって全然できないので、先生たちの近いところにいる方しかいろんなことの恩恵を受けられない状況にあるかなと思います。

しかも、遺伝カウンセリングそのものも保険が利きません。私が1時間話したら普段は1万円ぐらいいただかなければいけないと、皆さん、「いいです」となってしまうこともありますし、どうしていいかわかりません。

私が思うのは、すごく遠い道のりかもしれませんが、あまり「遺伝カウンセリング、遺伝カウンセリング」とがなじがらめにならないで、それぞれの臨床の先生方が今なさっている現場をもう少し充実させていくことも一つの道だと思います。

そこと大学病院の遺伝部の先生とが密にコミュニケーションを取って、「眼科の先生は遺伝のことはわからないから、こっちに頼んだ」ではなくて、こっちの先生が遺伝の話をする。こっちの遺伝の先生も眼科の話をする、耳鼻科の話をするというように、お互いに重なり合った感じでやっていって、少し柔軟に態勢を考えて、臨床の中でももう少しできることをやっていく。

保険適用ではないところの遺伝カウンセリン

グで患者の負担がどんどん増えてしまうことはあまりいいことだと思えないので、そんな柔軟性も必要かなと思っているのですが、あまり答えになっていないかもしれません。すみません。松本 今日先生のお話をすごく興味深く拝聴していたのですが、例えば、日本とアメリカで、遺伝カウンセラーとしてのやりやすさ、やりにくさの文化比較ではありませんが、一方で、遺伝子のクリニカルダイアグノシスがすごく進んでいる国と、ある意味、日本は保険適用がほとんどで、現実には即した遺伝子診断がない国なのですがそのような国とで、やりにくさみたいなものを感じていらっしゃると思いますが、いかがでしょうか。

田村 いろんな方によく日米の違いを聞かれますが、患者や家族が話すことは疾患ごとにかなり似ている気がしています。いろんな疾患の患者で、アメリカ人と日本人は違うのではないかと聞かれますが、言うことは割と同じだなというのが私の印象です。

一方で、すごく違うと思うのは医療側の態勢で、それは、保険適用の問題でもあります。私は自分で遺伝カウンセラーは補助職だと思っているので、補助の立場ですが、補助職としてアメリカですごく働きやすいのは、医療がすごく標準化されているのです。個性はあるにしても、先生方の診断の仕方とか、こういう状況だったら何と何の検査をするというところは、基本的にどこの病院に行っても同じなので、私たちが学校でトレーニングされたことさえ学んで持っていけば、どこの病院に行っても割と同じような感じでできます。

日本だと、「この先生はここまで話すから、これは言わないようにしなくちゃいけない」とか、「こっちの先生はここまで検査をしたがっているから、この先生のとときにはこの話をしなくちゃ」とか、補助職としてはその辺が……。一般の方もいる前でこういうことを言うのはどうかと思われるかもしれませんが、すごく働きにくいので、結局、先生方の状況を伺いながら仕事をするようだとものすごくやりにくいです。

そうすると、結局、先生方も任せきれないから、「やっぱり先生が全部しなくちゃ」となって、先生方の仕事がどんどん増えてパンクしてしまうのではないかとというのが私の私見です。

もう一つ、カナダに行ったときにこんなに違うんだと思ったのは、遺伝子検査をする北米の企業は、国の審査を受けたところがやっています。「クリア」という審査があるのですが、その検査会社から出てきた結果と大学の研究室から出てきた結果を遺伝相談外来が使うと、使い方は全く違います。

患者が、「私は遺伝子変異が見つかって、この遺伝子はこうだったんです」と言ったときに、私も見学していたのですが、向こうの遺伝カウンセラーが見て、「これは大学の研究室だからだめ。もう1回やり直し。これは質が担保されていない」と言って、そんなにひどいことを言っているのかなと思ったのですが、「臨床上、きちんと質が担保されている、試験を通過している検査会社の結果しか使わない。研究は研究でもらってもいいけど、それを参考情報にしてもいいけれども、それはやっぱり違うよ」という感じで検査を扱っていました。

大学の研究室も、検査会社の基準を取っています。だから、大学がだめということではなくて、臨床上、使ってもらうためには、大学でもちゃんとそういう資格を取って、基準をクリアしたところがデータを出しています。その代わり、きちんとやっているお金も取っています。いいか悪いかわかりませんが、そこはすごく違っていました。答えになりましたでしょうか。**岩田** 日本では人にお金をかけません。例えば、アメリカの眼科の研究室で遺伝解析の教室に行くと、そこには家族調査をするためのチームが専属にいて、教授クラスのポジションも用意されています。その人たちが調査に向いて、ちょうど角田先生が佐渡に行かれていろいろ調査されたようなことを、チームとして出張し、採血して、診断して帰ってくるというような人をアメリカはシステマティックにやっています。日本はそのあたりの考えがいつも欠けていて、どの分野においても少人数でやらなければいけない。いつまでも人が増えない状況で仕事をやらなければいけない。

田村 遺伝子検査も、どこまでが研究でどこまでが臨床かというのはいつも悩ましいと思います。どういうときに悩ましいかということ、例えば、子どもへの遺伝とか家族への遺伝を心配している人に遺伝子検査をしてあげると、そのせ

いで遺伝の話ができることがありますよね。でも、それとは別に、研究として、未知の領域の、「この人の疾患が何で起きているかの遺伝子解析をしたい」といったときに、その人は独身で、家族もいなくて、「私は別に私だけだからいいです」みたいなときに、でも、研究としてはこの人を調べたいということがあります。

そのとき、アメリカではそれがきちっと区別されていて、「これは研究者が知りたいから、こういう疾患の遺伝子解析のためにちょうだい」と堂々と言っていて、そのことと、「あなたが遺伝の心配の答えを出すためにやるの」ということの線引きは割と見えていたと思います。

日本では、遺伝の相談のときに、聞きたい人に遺伝子検査をしてあげて、それを研究にも使わせてもらっているという感じになっているので、先生方はもうちょっと堂々と、遠慮しないで、患者を信用して、「別にあなたの遺伝の心配と関係ないけどやらせて」と言ってサンプルをもらってもいいのではないかと思ったりしています。

松永 日本の場合だと、倫理審査があって、患者への説明の仕方とかも決められているので、基本は明確だと思います。保険の検査をやって、一緒に、「研究の検査に協力してもらえますか」というように、両方やる方もいます。

田村 ありがとうございます。

岩田 もう時間がなくなってきましたが、次に、松永先生と私に対して質問があったらお願いします。

藤井 では、最後に。私は、久しぶりに岩田先生の話をお聞きして、非常に印象深かったのですが、やはり、先生が言われていたように、病態をいろいろ把握して、そのうえで原因遺伝子を見つけることが非常に重要だということでしたね。

岩田 はい。

藤井 私の専門はがんですが、聴覚の研究もしています。聴覚に関しても、やはり病態を分類することが必要です。

岩田 細かく分類して。

藤井 細かく。もう一つお聞きしたいのは、例えば緑内障でも、一つの疾患とはいえ非常に再発性が高かったり、治療の抵抗性が強かったりという病態もあります。そういうものも考慮し

て、いろいろな原因遺伝子とか、遺伝子的な変化というものはどのように考えてやられていますか。

岩田 まさに緑内障に関しても病態を細かく分類していただきたいのですが、その点については宇治先生のほうがお詳しいので。

宇治 突然言われたのでちょっと面食らっていますが、現実問題は、続発性は除いたとして、原発性の緑内障の場合は、眼圧というものの要素を第一義的には捉えられなくなってきています。代表的なものとしては血流でしょうし、あるいは遺伝でしょうし、緑内障というのはマルチプルに病態ができあがっているというようにみんなの考えが変わってきていますから、そういう意味で言うと、これからいろんな要素で緑内障を分類する方向になってくると思います。

ただ、現実には、われわれは力がないので眼圧を下げることになっていますが、現実の治療法に立脚して緑内障を分類するのではなくて、緑内障はいわゆる多因子性の疾患ですから、これからは当然、その多因子という概念から緑内障を分類していく方法になっていくと思っています。

田村 素人みたいな質問ですみません。多因子から戻って申し訳ありませんが、単一遺伝子病で浸透率が100%でないときに浸透率のデータが欲しいのですが、それはちゃんと採れるのでしょうか。結局、未発症の人をやらなければいけないので。

岩田 それを調べている人は、多分いないと思いますね。一見、劣性家系に見えて、見つかった変異が優性で、しかも、極めて有名な優性遺伝子の変異だったとことは我々も経験しています。

田村 聴力ではどうですか。

松永 遺伝子によっても違いますし、原因によってもきっと違うと思いますし、家系によっても違うので。ただ、ほぼ100%のデータが多いですが、そうでないものもあります。

田村 私の恩師がいたアメリカのところで、クリーンシークというスタディーを、心筋梗塞リスクがある人たちでホールゲノム・シーケンスをして、何が起こるか、トラブルが起きないか臨床で見てみようというプロジェクトをやりました。そうしたら、網膜色素変性症の遺伝子の変異を持っている人が見つかって、何も全然悪

くなくてどうしようみたいなことがありました。

そのように、これからは違う目的でホールゲノムとかエクソームとかをやったときに、たまたま別の疾患に関係するものの変異が見つかることがあると思います。そのときに、将来どのぐらい症状が出るかもというのは、何を言っているかわからないので、その情報はすごく必要とされると思います。その情報はどこから出てくるのだろうと。

岩田 我々が発見したオカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子変異 RP1L1 (R45W) について言えば、10家系、20家系、30家系と集めて初めて浸透率がわかってくるだろうし、この変異によって最終的に病態がどこまで進行するかわかります。少なくとも、その変異についての診断基準みたいなのができる可能性があります。

藤井 眼科では、バイオバンクのようなシステム、先生とかはご存じですよ。全国的なオフィシャルなバイオバンクがありますか。

岩田 来年度に向けて研究費を申請させていただいたところですよ。

松永 では、そろそろ。

岩田 そうですね。松永先生、最後に一言お願いします。

松永 今日はだいぶ時間をオーバーしましたが、最後まで大勢の方に残っていただきありがとうございます。最後に加我先生に閉会の言葉をいただけたらと思います。

加我 演者の先生、どうもありがとうございました。今日は大変ユニークで、かつ、最先端の動向がわかった大変いいシンポジウムになりましたことを御礼申し上げます。

あ と が き

東京医療センター・臨床研究（感覚器）センターが企画する、伝統の「感覚器シンポジウム」は、第9回を迎え、「視覚障害および聴覚障害における原因遺伝子の新たな解明と新治療への急展開」を主題に、2014年3月14日、大会議室で開催されました。2014年は、国立感覚器研究所への発展を願って東京医療センターに「感覚器センター」が開設された節目の10年目となることを記念し、「東京医療センター・感覚器センター設立10周年記念」と銘打ち、同時に初めて市民公開講座とし、一般の関心のある人々の参加の機会を作りました。

今回の感覚器シンポジウムには、現在の臨床医学の発展を支える大きな原動力となっている、疾患の原因遺伝子研究の過去・現在・未来について、わが国を代表する招待講演者として3名の先生方に解説していただくと同時に、「今日の問題と課題」について有意義のあるお話しをしていただきました。この講演の内容は東京医療センターに現在開設準備中の「臨床遺伝センター」の立ち上げに大変参考になるものでした。

感覚器センターの大きな研究分野は聴覚および視覚障害です。両分野の研究の核となるのは聴覚障害と視覚障害の原因遺伝子研究です。難聴原因遺伝子研究について松永達雄先生、視覚障害原因遺伝子研究について岩田岳先生に特別講演をしていただきました。この2つの領域でも、次世代シーケンサーによるDNA解析技術の進歩で、新たな発見が次々となされていることがわかりました。

3名の招待講演者と2名の特別講演者に加え、感覚器センターの先生方が加わったプログラム最後の総合討論は熱気溢れるものになりました。

この第9回感覚器シンポジウムの記録集は、現在の疾患遺伝子研究に関心のある他領域の方々にも大いに参考になるものと思います。シンポジウムのポスターは、これまで同様、イラストレーション・デザイナーの藤井紀子様に取り組んでいただき、メッセージ性の高い素晴らしいものにしていただいたことを心より感謝申し上げます。

今回の感覚器シンポジウムの企画から運営、記録集の発行にまで尽力していただいた分子細胞生物学研究部長の岩田岳先生に感謝申し上げます。

平成26年5月31日

東京医療センター
名誉臨床研究センター長
加 我 君 孝

第9回 臨床研究(感覚器)センター

感覚器シンポジウム

東京医療センター 臨床研究(感覚器)センター 記録集 No.8

監修 岩田 岳

発行/平成26年 8月20日

発行人/武田 純三

発行所/独立行政法人 国立病院機構 東京医療センター
臨床研究(感覚器)センター

〒152-8902 東京都目黒区東が丘 2-5-1

T E L:03-3411-0111(代表)

03-3411-0379(事務室直通)

F A X:03-3411-0185

印刷所/株式会社 学術社



東京医療センターと臨床研究(感覚器)センター