[PRESS RELEASE]

2023 年 4 月 25 日

# 臨床的意義不明なバリアントを網羅的に解析することで遺伝子診断の迅速化を実現

埼玉医科大学 ゲノム医療科・小児科の大竹明特任教授、順天堂大学 難病の診断と治療研究センターの杉浦歩講師、岡﨑康司教授、近畿大学 理工学部生命科学科の木下善仁講師（順天堂大学 難病の診断と治療研究センター）、および千葉県こども病院の村山圭部長（順天堂大学 難病の診断と治療研究センター）らの共同研究により、臨床的意義の不明なバリアント[*1]（VUS[*2]）の網羅的解析により、意義付けすることで、遺伝子診断の迅速化を実現しました。

また、RNA シーケンス[*3]やプロテオーム解析[*4]を組合わせて行うことによって、従来の遺伝子診断法のパネル解析[*5]や全エクソーム解析[*6]では診断がつかなかった症例を確定診断に導くことができました。本成果により、遺伝子診断の迅速化が図られると共に評価済みの遺伝情報をデータベース登録することで公共データベースの拡充に寄与しました。

本論文は Journal of Medical Genetics 誌（Impact Factor [JCR]: 5.945）のオンライン版に 2023 年 4 月 13 日付で公開されました。

**本研究成果のポイント**

- 臨床的意義不明なバリアント(VUS)は遺伝子診断における大きな障壁となっていました
- VUS の網羅的解析からバリアントの意義付けを迅速に行うための基盤が整備されました
- 本研究において、ミトコンドリア病における遺伝子診断の迅速化を実現したことで早期治療が可能になると考えられます

## 背景

ミトコンドリアの機能異常が原因となる病気を総称してミトコンドリア病と呼んでいます。この疾患の発症年齢や症状、遺伝形式は多岐に渡っており、臨床的および遺伝的に診断が非常に難しい疾患です。

大竹特任教授らの研究グループは十数年にわたり、順天堂大学 難病の診断と治療研究センター（杉浦歩講師、岡﨑康司教授）、千葉県こども病院 代謝科（村山圭部長）と共同で、ミトコンドリア病の生化学診断や遺伝子診断に取り組んできました。

この疾患の診断は非常に難しく、その診断率はおよそ 40%です。遺伝子診断において臨床的意義不明なバリアント（VUS）は、最終診断まで非常に時間が掛かる事態に繋がり、診断における大きな障壁となっていました。これは我々が対象とするミトコンドリア病だけの問題ではなく、遺伝学的検査を行う上で共通する重大な解決すべき課題として認知されています。これらの問題を解決するため、研究グループは VUS を網羅的かつ簡便に検証することが可能な実験系を構築し、課題解決に取り組みました。また RNA シーケンスやプロテオーム解析等を組合わせたマルチオミクス解析[*7]を駆使し、原因解明に取り組みました。

**内容**

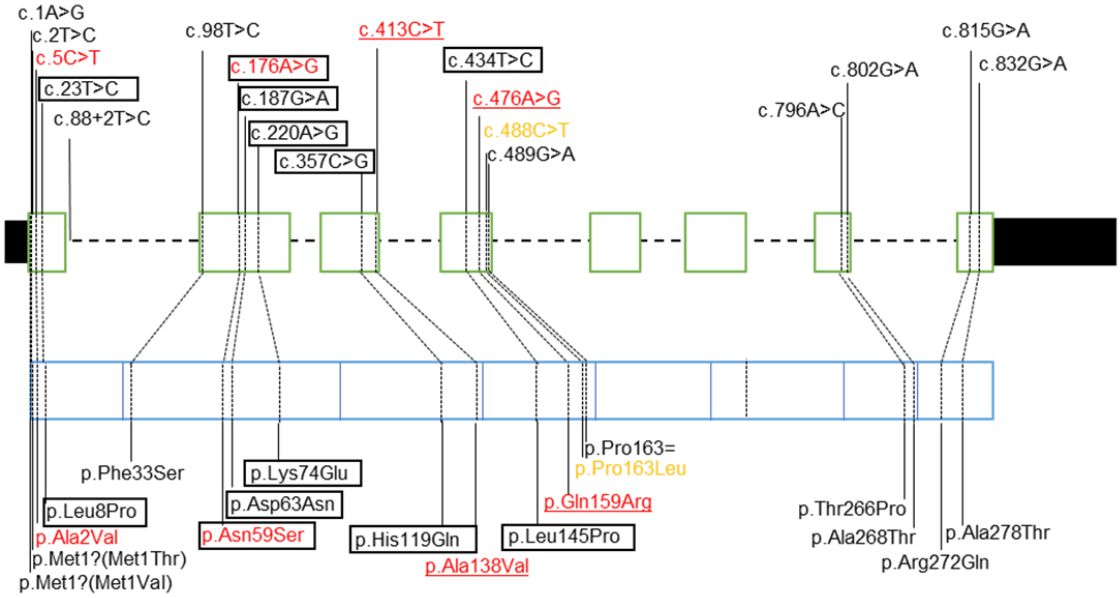
今回、ミトコンドリア病の一種である Leigh 症候群[*8]等の原因となる *ECHS1*[*9] 遺伝子を対象にして、VUS の検証を行いました。過去のゲノム解析から同定された病的バリアントあるいは VUS を対象としました。さらに我々は東北メディカルメガバンク[*10] に登録されていた健常者由来のレアバリアント（ただしヘテロ接合状態）も検証の対象としました（図１）。

まず、研究材料として、*ECHS1* 遺伝子を欠損させた細胞を作製しました。その細胞に対して、正常な *ECHS1* 遺伝子を含む遺伝子発現ベクターを導入しました。簡便な評価方法として ATP 量の測定を指標とし、正常な *ECHS1* 遺伝子が ATP 量の回復を示すことを確認しました。

さらに、既知の病的バリアントあるいは VUS を、遺伝子発現ベクターを用いて ECHS1 遺伝子欠損細胞に導入しました。VUS の遺伝子機能が失われていれば、ATP 量の回復がされないはずです。

この検証によって、これまでに VUS として留まっていたバリアントの機能的意義を決定し、いくつかのバリアントに関しては病的と判定することができました（図２）。

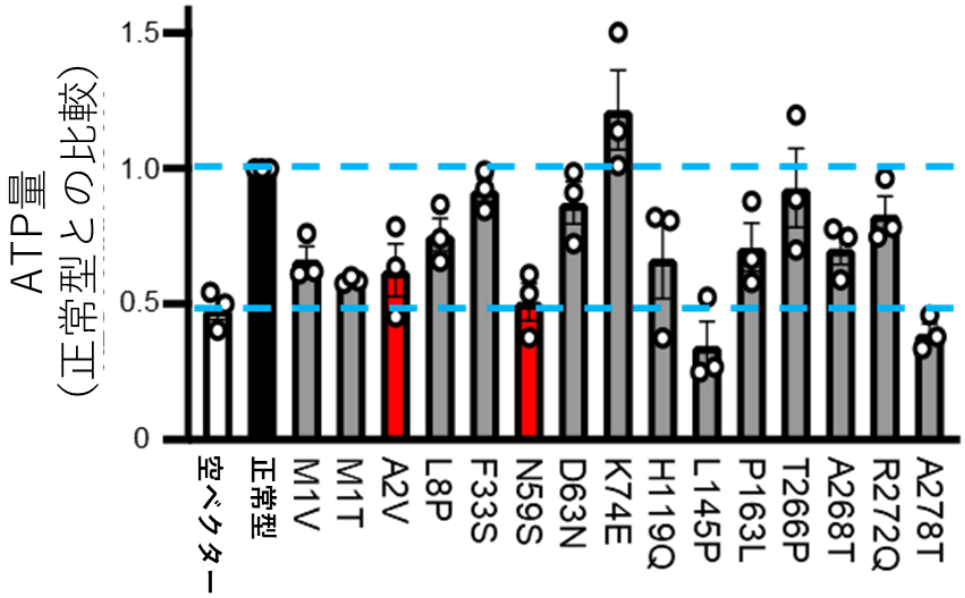
東北メディカルメガバンクに登録されていたバリアントにおいても機能喪失を示す結果を得たため、病気の発症に関与する可能性が示唆されました。




病的（ClinVarで報告あり）　おそらく病的（ClinVarで報告あり）

東北メディカルメガバンクに登録あり

図１ .*ECHS1* の遺伝子構造とバリアント
緑色の図は *ECHS1* 遺伝子の構造を示し、青色の図は ECHS1 のタンパク質を示している。バリアントが遺伝子上のどの部位に位置しているか、どのような塩基置換およびアミノ酸置換を生じるのかを図示した。



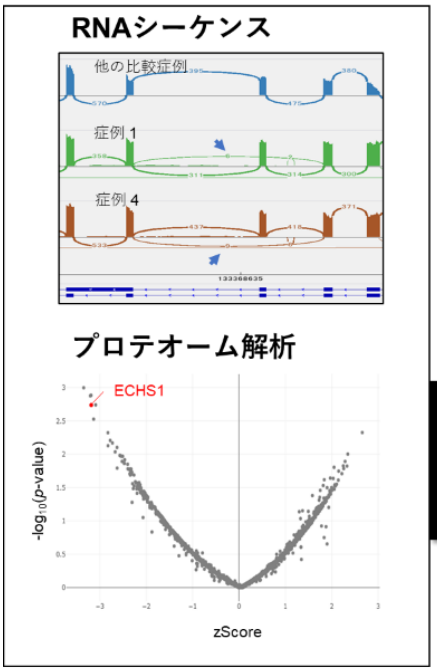

| | 空 | 正常 | M1V | M1T | A2V | L8P | F33S | N59S | D63N | K74E | H119Q | L145P | P163L | T266P | A268T | R272Q | A278T |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| vs 空 | - | 0.0015 | 0.6909 | 0.9888 | 0.9008 | 0.2205 | 0.0089 | 0.9997 | 0.0246 | <0.0001 | 0.6735 | 0.9309 | 0.4297 | 0.0077 | 0.4514 | 0.0583 | 0.9953 |
| vs 正常 | 0.0015 | - | 0.0762 | 0.0158 | 0.0351 | 0.3391 | 0.999 | 0.0027 | 0.956 | 0.4807 | 0.0803 | <0.0001 | 0.1651 | 0.9991 | 0.1547 | 0.7744 | 0.0002 |

有害　　良性

図 2 .ATP 量を指標としたバリアントの簡便かつ網羅的解析
*ECHS1* 遺伝子欠損細胞に、空ベクターまた正常型遺伝子、バリアントを含む遺伝子(アミノ酸位置で表記)を導入し、ATP 量の変化を解析した。統計解析を行ったデータを色付きで、下段の表に示した。赤が濃いほど有害であり、青が濃いほど良性であると考えられる。

上記の方法により VUS 検証を行ってきましたが、それとは並行してマルチオミクス解析による診断にも取り組んできました（過去のプレスリリース[参考 1 ]）。この解析から *ECHS1* 遺伝子の RNA 発現およびタンパク質の発現低下を示す症例を見出しました（図 3、症例 1 と 4）。c.489G>A のバリアントがスプライシング異常を介して、遺伝子発現に影響することを明らかにしました。さらに、これらの症例では c.489G>A の他に、図 2 で検証したバリアントも持っていました。つまり、先に検証を行っていたことで、迅速に病的なバリアントとして判定することができました。

これに関連したバリアントを、過去のゲノム解析データの中から検索したところ、さらなる症例の発見に繋がりました（図 3、症例 2 と 3、4）。




**VUSの検証**

| | 空 | 正常 | M1V | M1T | A2V | L8P | F33S | N59S | D63N | K74E | H119Q | L145P | P163L | T266P | A268T | R272Q | A278T |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| vs 空 | - | 0.0015 | 0.6909 | 0.9888 | 0.9008 | 0.2205 | 0.0089 | 0.9997 | 0.0246 | <0.0001 | 0.6735 | 0.9309 | 0.4297 | 0.0077 | 0.4514 | 0.0583 | 0.9953 |
| vs 正常 | 0.0015 | - | 0.0762 | 0.0158 | 0.0351 | 0.3391 | 0.999 | 0.0027 | 0.956 | 0.4807 | 0.0803 | <0.0001 | 0.1651 | 0.9991 | 0.1547 | 0.7744 | 0.0002 |

有害　　良性

| 症例 | バリアント1 | バリアント2 | オミクス解析 |
|---|---|---|---|
| 1 | c.796A>C (p.Thr266Pro) | c.489G>A (p.Pro163=) | RNAシーケンス プロテオーム |
| 2 | c.802G>A (p.Ala268Thr) | c.489G>A (p.Pro163=) | |
| 3 | c.832G>A (p.Ala278Thr) | c.489G>A (p.Pro163=) | |
| 4 | c.832G>A (p.Ala278Thr) | c.489G>A (p.Pro163=) | RNAシーケンス |
| 5 | c.833C>T (p.Ala278Val) | c.489G>A (p.Pro163=) | |

図 3.VUS 検証とマルチオミクス解析を組合わせた新規症例の診断
マルチオミクス解析から *ECHS1* 遺伝子の発現異常を示す新たな症例を同定した。マルチオミクス解析で同定した *ECHS1* 遺伝子の異常は c.489G>A のバリアントを介したスプライシング異常を生じていた。プロテオーム解析でも ECHS1 タンパク質の発現低下を確認した。表中の赤のボックスで示すバリアントは VUS 検証およびオミクス解析で病的と判定された。

## 今後の展開

本成果において、VUS を検証するための簡便かつ迅速な検証方法を新たに構築することができました。これをもって複数の VUS を病的と判定するに至りました。さらに、マルチオミクス解析との組み合わせで新規の症例を確定診断することができました。先だって VUS 検証を行ったことで、より迅速な診断に至ることができました。*ECHS1* 遺伝子異常による疾患はバリン制限食により症状を緩和することが可能であることが示されています。より早期の介入が重要であり、迅速な診断はその後の予後を左右します。

つまり、本研究で確立した VUS の意義付けを用いて迅速な診断をつける取り組みは、臨床の現場において非常に大きな意義を持ち、今後の早期診断および早期治療を実現する手助けとなるはずです。また、本研究において構築した検証方法は他の遺伝子異常にも応用可能であり、実際に我々は既に複数の遺伝子で同じ検証方法が利用できることを確認しています。拡張性のある検証方法で、今後の発展が大いに見込まれます。

**用語解説**

*1　バリアント：　バリアント(Variant)とは、その遺伝子の DNA 配列における特定の変化や多様性を指します。これにより、遺伝子の構造、機能、または発現に違いが生じ、個体の特性や特徴、あるいは特定の疾患等に影響を及ぼす可能性があります。バリアントは、いわゆる遺伝的な突然変異も内包する言葉です。バリアントの研究は、疾患の遺伝的基盤を理解するために必要不可欠であり、遺伝子検査や個別化医療に利用されます。バリアントは、良性(benign)、病的(pathogenic)、あるいは臨床的意義不明なバリアント(VUS)などに分類されています。

*2　VUS：　臨床的意義不明なバリアント（Variant of Uncertain Significance:　VUS）とは、ある人の DNA に特定の遺伝子のバリアントが見つかっているが、それが健康や疾患のリスクに与える影響がまだ理解されていない状態を指します。良性(benign)あるいは病的(pathogenic)として分類されず、さらなる研究や検査が必要です。VUS となっていることで診断がつかず、これが確定診断の大きな足枷となっています。

*3　RNA シーケンス：　オミクス解析のひとつであるトランスクリプトミクスは RNA の発現を対象とした解析です。トランスクリプトミクスの解析方法として、RNA シーケンスが最も主流な方法となっています。主にメッセンジャーRNA（mRNA）を対象として、全遺伝子の発現を網羅的に解析するものです。

*4　プロテオーム解析：　オミクス解析のひとつであるプロテオーム解析（プロテオミクス）は、タンパク質の発現を対象とした解析です。プロテオミクスの解析方法として、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC-MS)が最も主流な方法となっています。生体内のタンパク質を対象として、全タンパク質の発現を網羅的に解析するものです。

*5　パネル解析：　パネル解析（Panel sequencing）は、特定の疾患の原因遺伝子を特異的に抽出して、配列解読する解析手法です。特定の遺伝子のみを検索対象とすることで、迅速な診断や低コスト化を実現できますが、対象となる遺伝子以外に異常がある場合は、診断がつきません。例として、がん遺伝子パネル検査はがんゲノム医療の中で実用化され、迅速な遺伝子診断と治療選択につながっています。

*6　全エクソーム解析：　全エクソーム解析（Whole exome sequencing; WES）は、ゲノム中でもタンパク質をコードするエクソン領域を選択的に抽出して、配列解読する解析手法です。エクソンはタンパク質をコードするため極めて重要な領域であり、この領域に疾患原因が集積していると考えられます。しかし、エクソン領域は全ゲノムの約 2%にすぎず、調べられていないゲノム領域が多く存在します。

*7　マルチオミクス解析：　マルチオミクスとは Multi（多数の）と Omics（オミクス）を組み合わせた造語であり、オミクスとは生体分子を網羅的に解析することを意味しています。オミクスは DNA、 RNA、 タンパク質、代謝物などが対象となり、それぞれゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスと呼ばれます。マルチオミクスではそれらの解析を組合わせて、複数の分子種を包括的に調べることを意味します。

*8　Leigh 症候群：　1951 年にイギリスの神経学者 Denis Archibald Leigh によってはじめて報告された神経疾患です。40,000 出生に 1 人の割合で発症するとされています。頭部画像所見で、脳幹や大脳基底核に両側対称性病変を認めることを特徴とし、発達遅滞、筋力・筋緊張低下、呼吸障害、知的退行などを主症状とします。

*9　*ECHS1* 遺伝子：　短鎖エノイル-CoA ヒドラターゼを合成するために必要な遺伝子です。短鎖エノイル-CoA ヒドラターゼは脂質代謝やアミノ酸代謝（バリン、イソロイシン、リジン、トリプトファン）の代謝経路に関与しています。近年の研究では、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の機能にも直接的に関与することが示されています。

*10　東北メディカルメガバンク：　東北メディカルメガバンク機構（ToMMo）は東日本大震災被害による震災復興の一環として立ちあげられ、岩手県・宮城県の被災地を中心とした大規模なゲノムコホート研究を行うための組織です。検体試料を収集し、ゲノム情報を含めた生体データを大規模に解析しています。ToMMo のゲノムデータは jMorp（Japanese Multi Omics Reference Panel）というデータベースにまとめられています。

**原著論文**

本研究は Journal of Medical Genetics 誌（Impact Factor [JCR]: 5.945）のオンライン版で(2023 年 4 月 13 日付）先行公開されました。
タイトル：　Strategic validation of variants of uncertain significance in ECHS1 genetic testing
タイトル(日本語訳)：　ECHS 遺伝子の遺伝学的検査における病的意義不明のバリアントの戦略的評価検証

著者：Yoshihito Kishita[1,2,12], Ayumu Sugiura[2,12], Takanori Onuki[3], Tomohiro Ebihara[4], Tetsuro Matsuhashi[3], Masaru Shimura[3], Takuya Fushimi[3], Noriko Ichino[2], Yoshie Nagatakidani[1], Hitomi Nishihata[1], Kazuhiro R Nitta[2], Yukiko Yatsuka[2], Atsuko Imai-Okazaki[2], Yibo Wu[5,6], Hitoshi Osaka[7], Akira Ohtake[8,9], Kei Murayama[3,10], Yasushi Okazaki[2,11,*]
著者（日本語表記）：木下善仁[1,2,12]、杉浦歩[2,12]、小貫孝則[3]、海老原智博[4]、松橋徹郎[3]、志村優[3]、伏見拓矢[3]、市野紀子[2]、長滝谷芳恵[1]、西畑瞳[1]、新田和広[2]、八塚由紀子[2]、岡﨑（今井）敦子[2]、Wu Yibo[5,6]、小坂仁[7]、大竹明[8,9]、村山圭[3,10]、岡﨑康司[2,11,*]
著者所属：[1]近畿大学理工学部生命科学科、[2]順天堂大学大学院　難治性疾患診断・治療学講座/難病の診断と治療研究センター、[3]千葉県こども病院 代謝科、千葉県こども病院 新生児科、ジュネーブ大学（スイス）、[6]理化学研究所　生命医科学研究センター YCI 研究室、[7]自治医科大学 小児科、[8]埼玉医科大学 小児科学・ゲノム医療学、[9]埼玉医科大学 難病センター、[10]千葉県こども病院　遺伝診療センター、[11]理化学研究所 生命医科学研究センター 応用ゲノム解析技術研究チーム、[12]共同第一著者
DOI: 10.1136/jmg-2022-108905

参考１：マルチオミクス解析によりミトコンドリア病未解決症例の原因を特定
～ 遺伝性疾患の診断におけるマルチオミクス解析の重要性 ～
https://www.juntendo.ac.jp/news/00131.html

本研究は主に国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED) のゲノム創薬基盤推進研究事業 JP22kk0305015 の支援により実施されました。そのほか、AMED の JP21im0210625, JP21ek0109511, JP22ek0109485, JP22ek0109468, JP19ek0109273, JP21bm0804018, および JSPS 科研費 JP19H03624, JP20H03648 を受け、多施設との共同研究の基に実施されました。なお、本研究にご協力いただいた皆様には深謝いたします。

＜研究内容に関するお問い合せ先＞
埼玉医科大学ゲノム医療科・小児科
特任教授　大竹　明　（おおたけ　あきら）
TEL：　049-276-1220　E-MAIL：akira_oh@saitama-med.ac.jp

順天堂大学大学院医学研究科 難治性疾患診断・治療学
教授　岡﨑　康司　（おかざき　やすし）
TEL：　03-5802-1794　E-mail: ya-okazaki@juntendo.ac.jp
URL：https://www.juntendo.ac.jp/graduate/nanchi/

＜取材に関するお問い合せ先＞
埼玉医科大学　広報室（担当：蒔田）
TEL：　049-276-2125　E-mail: koho@saitama-med.ac.jp

順天堂大学　総務局 総務部 文書・広報課（担当：濱田）
TEL：　03-5802-1006　E-mail: pr@juntendo.ac.jp

千葉県こども病院　事務局医事経営課（担当：小山）
TEL：043-292-2111

近畿大学　経営戦略本部広報室（担当：坂本、白木）
TEL：06-4307-3007　FAX：06-6727-5288　E-mail：koho@kindai.ac.jp