

平成 28 年 3 月 18 日

原発性免疫不全症に対する次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子診断法の確立

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋 雅英）、小児科学の小島 勢二（こじませいじ、責任著者）教授、村松 秀城（むらまつひでき）助教、小島 大英（こじまだいせい、筆頭著者）大学院生、名古屋大学医学部附属病院先端医療・臨床研究支援センターの奥野 友介（おくのゆうすけ）特任講師らの研究グループは、原発性免疫不全症に対する次世代シーケンサーを用いた新規診断方法を確立しました。

原発性免疫不全症は、病原体の排除に必要な免疫系に、先天的な機能異常がある病気の総称です。極めて稀な病気ですが、すみやかに適切な治療を受けないと感染症を繰り返し生命に関わることもあります。したがって、迅速かつ正確な診断が非常に重要です。

原発性免疫不全症の原因となる遺伝子は、300 種類以上が報告されています。これまでは、身体所見や検査結果から異常があると想定される遺伝子を、個別に解析する方法が主流でした。しかしながら原発性免疫不全症の症状は非常に多様であり、正確な遺伝子診断を迅速に確定するのは容易ではありませんでした。

本研究グループは、近年発展の著しい遺伝子解析技術を利用し、原発性免疫不全症に対する迅速で網羅的な遺伝子診断法を開発しました。次世代シーケンサーという強力な遺伝子解析法を駆使して、97 名の患児について、原発性免疫不全症と関連する 349 遺伝子を解析しました。その結果、従来の方法で遺伝子診断が確定していた 38 例の全例について、正確に遺伝子変異を検出できました。一方、遺伝子診断が確定していなかった 59 例のうち、8 例（14%）について遺伝子診断が可能でした。

今回開発された新規診断法は、原発性免疫不全症における迅速な遺伝子診断と適切な治療法の選択に有用と考えられます。さらに、今後、わが国で導入が予定されている重症複合型免疫不全症に対する新生児マス・スクリーニング陽性例の確認検査に用いるなど、幅広い応用も期待されます。

本研究成果は、米国アレルギー・喘息・免疫学会（American Academy of Allergy, Asthma & Immunology）より発行されている科学誌『Journal of Allergy and Clinical Immunology』に掲載されました（英国時間 2016 年 3 月 17 日 15 時付電子版）。

原発性免疫不全症に対する次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子診断法の確立

ポイント

- 原発性免疫不全症の原因である 349 遺伝子を一度に解析する遺伝子診断法の開発に成功しました。
- 従来の方法で遺伝子診断が確定していた 38 例全例、および診断がつかなかった 59 例のうち 8 例で遺伝子診断を確定できました。
- 迅速かつ正確な遺伝子診断法の開発は、適切な治療選択を可能とし、原発性免疫不全症の患児の生存率や生活の質の向上に寄与するものと考えられます。

1. 背景

原発性免疫不全症は、先天的な要因により免疫系構成要素の欠損または機能不全をきたす疾患の総称です。症状が極めて多彩であるうえに、原因となる遺伝子は 300 種類以上報告されています。加えて、遺伝子変異には、それぞれの遺伝子の点突然変異にとどまらず、DiGeorge 症候群のように広範な染色体の欠失も含まれます。最重症型である重症複合型免疫不全症の患児は、出生後早期から感染を繰り返し、治療が奏功しなければ、乳児期に死亡する予後不良な疾患です。

原発性免疫不全症の治療は、抗菌薬の予防的内服やガンマグロブリンの定期補充のほか、根本的に免疫能の再建を図る目的で造血幹細胞移植（骨髄移植、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植）がおこなわれています。重症複合型免疫不全症においては、生後早期に診断され造血幹細胞移植を受けた症例は、治療が遅れた症例と比較して生命予後が大幅に向上することが報告されています。X 連鎖無ガンマグロブリン血症などの無ガンマグロブリン血症の患者においても、早期からのガンマグロブリンの定期補充により、気管支拡張症等の合併症の予防が可能です。すなわち、原発性免疫不全症は、生後早期に正確な診断を行い、速やかに治療介入を開始することで、予後や生活の質の向上が期待される疾患群です。

原発性免疫不全症に対する信頼性の高い遺伝子診断は、適切な管理を行うのに、非常に重要ですが、これまで日常診療において、迅速で正確な遺伝子診断を行うことは困難でした。現状では、臨床症状や検査所見に基づいて想定される遺伝子異常を、一遺伝子ずつ個別にサングー法で解析しています。しかし、非典型的な臨床像をとる症例では、その臨床診断自体が困難であるうえに、原因遺伝子が多数想定される疾患では、迅速な遺伝子診断は不可能でした。

近年、次世代シーケンサーと呼ばれる新しい遺伝子解析技術が実用化され、これまでの方法と比較して、はるかに大量の遺伝子解析を迅速に行うことが可能となりました。研究グループは、この技術を利用して、原発性免疫不全症に関わる 349 遺伝子を全て一度に解析し、さらに染色体の欠失なども検出可能な遺伝子解析システムを開発し、実際の臨床検体でその有用性を評価しました。

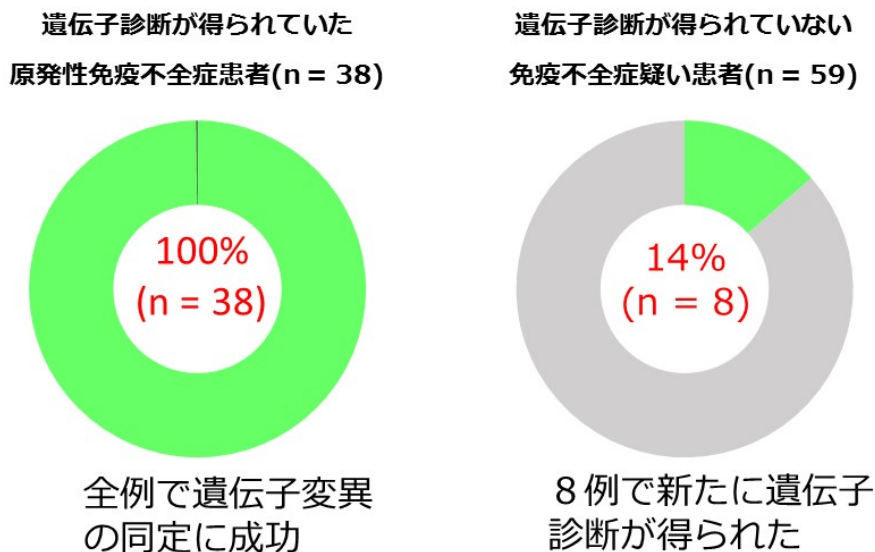
2. 研究成果

次世代シーケンサー、および標的の遺伝子の塩基配列だけを濃縮するサンプル調製システムを用いて、原発性免疫不全症および関連疾患の原因となる 349 遺伝子および染色体コピー数解析が可能な網羅的遺伝子解析パイプライン（免疫不全ターゲットシーケンス）を開発しました。パネルの遺伝子は、国際免疫学会連合、欧州免疫不全症学会、アジア原発性免疫不全症データベースに記載された遺伝子に加え、原発性免疫不全症と類似の症状を示す先天性骨髄不全症の原因遺伝子や DiGeorge 症候群に関連する染色体 22q11.2 領域の遺伝子も含んでいます。タンパク質コーティング領域であるエクソンと隣接するイントロン 10 塩基を解析対象とし、標的とした領域の 99.3% がカバーされた 55877 個（2Mb）のプロンプを設計しました。

このシステムの有用性を評価するため、名古屋大学医学部附属病院を受診した原発性免疫不全症が疑われる患児 97 例の遺伝子解析を行いました。対象とした遺伝子の配列の 99.1% の領域は、十分な検出感度で解析することが可能でした。97 例のうち、従来の方法で遺伝子診断されていた 38 例を解析したところ、すべての症例で従来解析方法と一致する遺伝子変異が検出されました。一方、遺伝子診断が得られていなかった 59 例のうち、8 例(14%)で新たに遺伝子診断が可能でした。

(図 1)

(図 1) 本遺伝子診断システムの性能



原発性免疫不全症患者の効果的な遺伝子診断システムの確立に成功

3. 今後の展開

原発性免疫不全症が疑われた場合、最初に行うスクリーニング検査として免疫不全ターゲットシーケンスを使用することで、より迅速な診断や適切な治療法の選択が可能となり、患児の生命予後や生活の質の向上に寄与すると考えられます。(図 2)

(図 2) 原発性免疫不全症の新たな診断アプローチ



従来の臨床情報に基づく診断に加え、網羅的な遺伝子解析を行うことでより適切な診断と治療方針の決定が可能になります。

4. 発表雑誌

Daiei Kojima, Xinan Wang, Hideki Muramatsu, Yusuke Okuno, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Ikuya Tsuge, Yoshiyuki Takahashi, Seiji Kojima. Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* (英国時間 2016 年 3 月 17 日付けの電子版に掲載)

用語説明

シーケンサー：DNA などの塩基配列を読み取る装置。

次世代シーケンサー：従来の蛍光キャピラリーシーケンサーである「第 1 世代シーケンサー」と対比させて使われている用語です。DNA 断片を並列して解析し、既存のゲノム配置と比較して再構築する手法を用いており、従来のシーケンサーに比べ、大量の塩基配列を低コストで迅速に解析可能です。

ターゲットキャプチャー：標的とする遺伝子領域を選択的に濃縮する手法です。本手法を用いることで、時間とコストの両方で効率的なシーケンスを可能となります。

プローブ：遺伝子などを検出するために用いる、何らかの手段で標識した物質です。例えば、DNA をプローブとして DNA や RNA を検出したり、標識した抗体をプローブとしてタンパク質を検出します。

English ver.

http://www.med.nagoya-u.ac.jp/english01/dbps_data/material/nu_medical_en/res/ResearchTopics/2015/PID_20160318en.pdf