

令和5年4月25日  
千葉県こども病院  
学校法人順天堂 順天堂大学  
学校法人 埼玉医科大学

## 新解析手法を駆使し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 ～3機関共同による研究成果が英論文誌に掲載～

千葉県こども病院遺伝診療センター・代謝科の研究グループは、順天堂大学、埼玉医科大学と共同でミトコンドリア病に関する研究を進めてきました。この度、ミトコンドリア病の遺伝学的検査で見つかることが多い「臨床的意義の不明なバリエント；VUS」に対して、マルチオミクス解析を駆使して病的意義の評価を可能することに成功しました。これらの情報は、ミトコンドリア病を診療する際の正確な診療情報として、小児、成人を問わず臨床現場で活用されていくことが期待されます。なお、本研究成果が論文誌『Journal of Medical Genetics』にオンライン掲載されましたので、併せてお知らせします。

### 1 論文発表日：令和5年4月13日（木）

＊**Journal of Medical Genetics** 誌は臨床遺伝学の論文を扱う英国の医学雑誌です。

### 2 概要：

ミトコンドリア病は、約5,000人に1人の頻度で発症するエネルギー産生異常を来す先天代謝異常症です。その原因遺伝子は400種類にものぼり、遺伝学的検査による診断率は30～40%でした。特に「臨床的意義不明なバリエント(VUS；variant uncertain significance)」の存在は、診断率が低い大きな原因のひとつでした。

本研究グループでは、2020年からミトコンドリア病の遺伝学的検査で見つかったVUSに対して、RNAシーケンスやプロテオーム解析といった手法を組み合わせたマルチオミクス解析を駆使し、正確な評価づけに取り組みました。特に日本人のLeigh脳症を引き起こす核遺伝子の中で最も頻度の高いECHS1遺伝子におけるVUSに対して、マルチオミクス解析によって複数のバリエントを「病的」とであると結論づけました。これにより原因不明とされていたミトコンドリア病に対して正確な診断をつけることに成功しました。

今回の研究によって、VUSの網羅的解析から各バリエ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。今回評価されたVUSは、ミトコンドリア病を診療する際に正確な情報源として臨床現場において活用されることが期待されます。また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。これらの遺伝情報は本邦でも活発になっているミトコンドリア病の治療開発や病態解明など、ミトコンドリア病研究の一層の発展につながることを期待します。

#### 【本件に関するお問い合わせ先】

千葉県こども病院  
事務局医事経営課  
Tel：043-292-2111

※当該研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)「難治性疾患実用化研究事業」の研究費を用いて行われました。



臨床的意義不明なバリエーションを網羅的に解析することで遺伝子診断の迅速化を実現

千葉県こども病院の村山圭 代謝科部長、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、岡崎康司 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）、および埼玉医科大学小児科の大竹明 特任教授らの共同研究により、臨床的意義の不明なバリエーション\*<sup>1</sup>（VUS\*<sup>2</sup>）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\*<sup>3</sup>やプロテオーム解析\*<sup>4</sup>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\*<sup>5</sup>や全エクソーム解析\*<sup>6</sup>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エーション（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エーション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。

村山部長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（岡崎康司教授）、埼玉医科大学小児科（大竹明 特任教授）、近畿大学理工学部（木下善仁 講師）、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意義不明なバリエーション（VUS）は、最終診断まで非常に時間がかかる事態に繋がり、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み合わせたマルチオミクス解析\*<sup>7</sup>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<sup>\*8</sup>等の原因となる *ECHS1*<sup>\*9</sup> 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エントあるいは 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<sup>\*10</sup>に登録されていた健常者由来のレアバリエント（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、既知の病的バリエントあるいは 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エントの機能的意義を決定し、いくつかのバリエ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エ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。

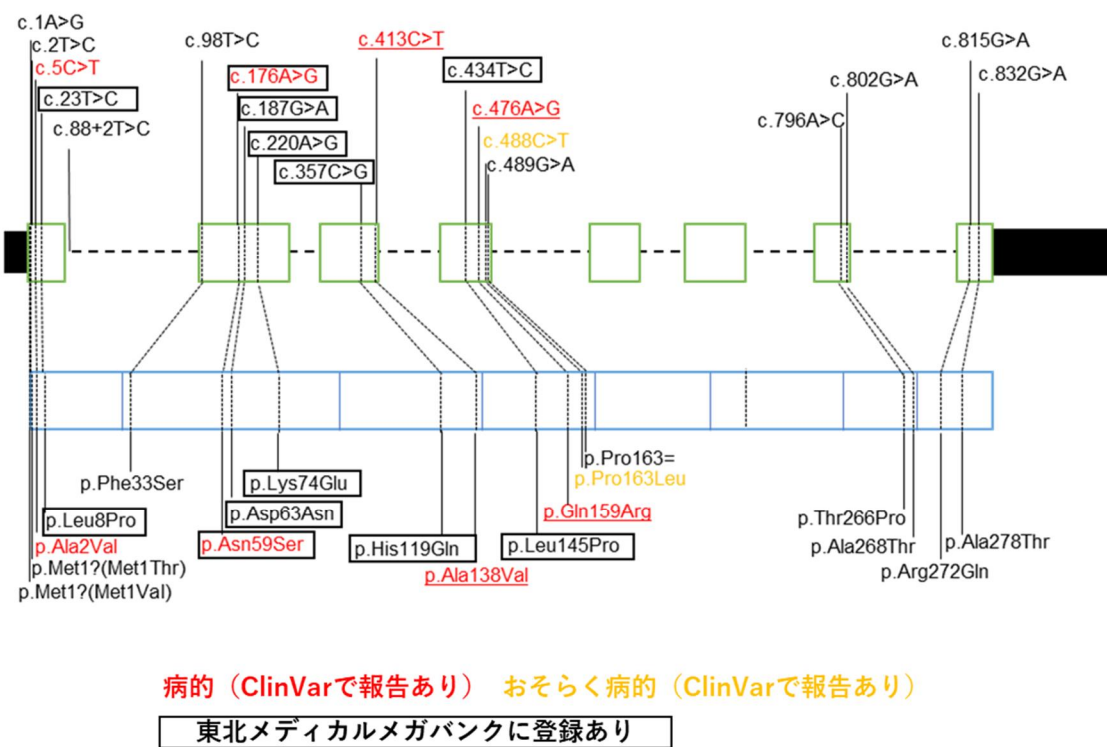


図1. *ECHS1* の遺伝子構造とバリエント

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。バリエ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。

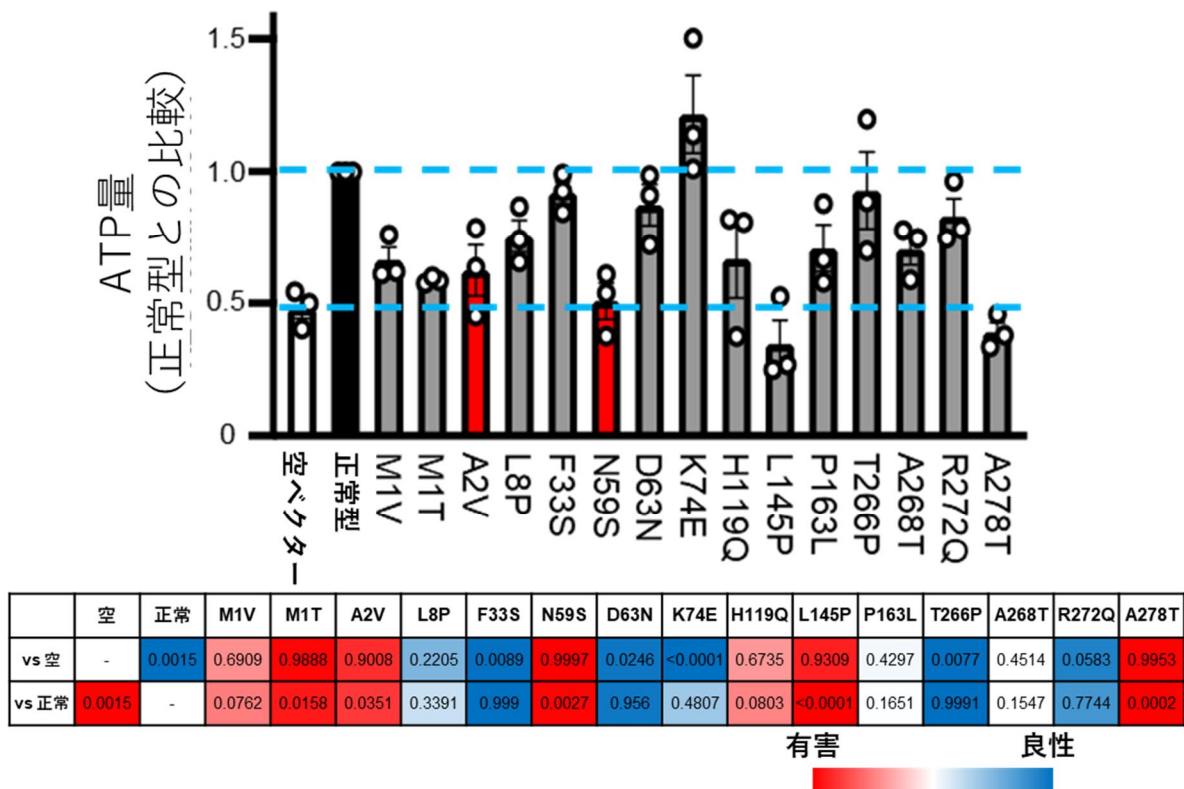


図2.ATP量を指標としたバリエーションの簡便かつ網羅的解析

*ECHS1* 遺伝子欠損細胞に空ベクターまた正常型遺伝子、バリエーションを含む遺伝子(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 のバリエーション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で検証したバリエーションも持っていました。つまり、先に検証を行っていたことで、迅速に病的なバリエーションとして判定することができました。これに関連したバリエーションを、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)。

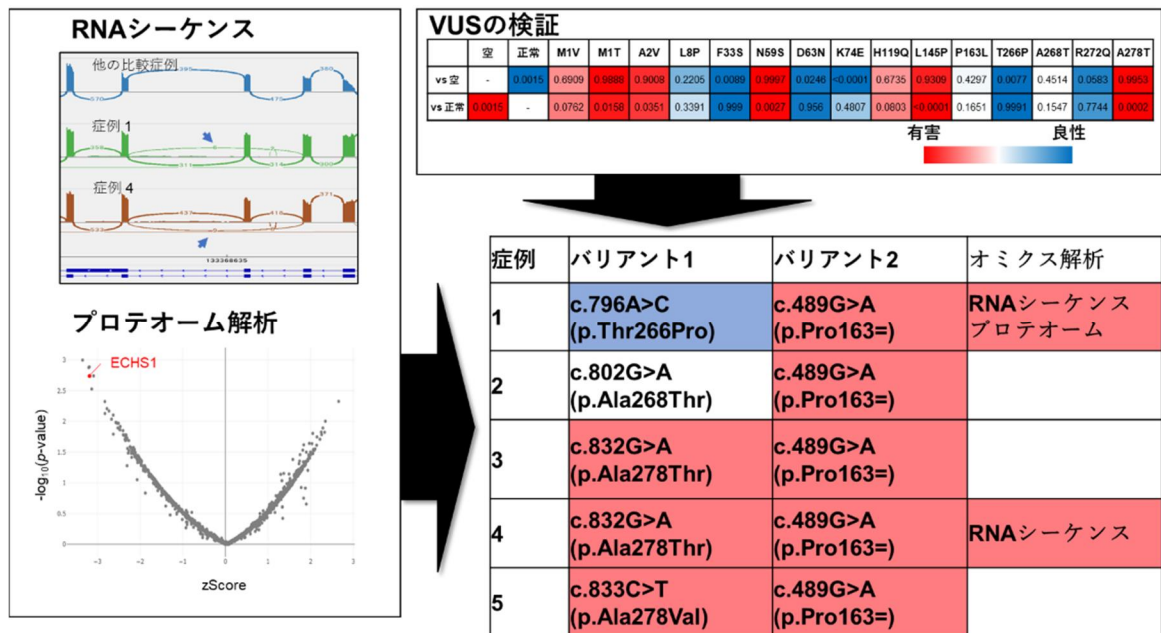


図 3.VUS 検証とマルチオミクス解析を組合わせた新規症例の診断

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 のバリエ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エントは 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。より早期の介入が必要であり、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 の意義づ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 バリエント

バリエント (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。バリエントは、いわゆる遺伝的な突然変異も内包する言葉です。バリエントの研究は、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。バリエントは、良性(benign)、病的(pathogenic)、あるいは臨床的意義不明なバリエント (VUS)などに分類されています。

### \*2 VUS

臨床的意義不明なバリエント (Variant of Uncertain Significance: VUS) とは、ある人の DNA に特定の遺伝子のバリエントが見つかるが、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実験的に抽出して、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、診断が付きません。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 によって初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गा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エーションの戦略的評価検証

**著者:** Yoshihito Kishita<sup>1,2,12</sup>, Ayumu Sugiura<sup>2,12</sup>, Takanori Onuki<sup>3</sup>, Tomohiro Ebihara<sup>4</sup>, Tetsuro Matsushashi<sup>3</sup>, Masaru Shimura<sup>3</sup>, Takuya Fushimi<sup>3</sup>, Noriko Ichino<sup>2</sup>, Yoshie Nagatakidani<sup>1</sup>, Hitomi Nishihata<sup>1</sup>, Kazuhiro R Nitta<sup>2</sup>, Yukiko Yatsuka<sup>2</sup>, Atsuko Imai-Okazaki<sup>2</sup>, Yibo Wu<sup>5,6</sup>, Hitoshi Osaka<sup>7</sup>, Akira Ohtake<sup>8,9</sup>, Kei Murayama<sup>3,10</sup>, Yasushi Okazaki<sup>2,11,\*</sup>

**著者 (日本語表記):** 木下善仁<sup>1,2,12</sup>、杉浦歩<sup>2,12</sup>、小貫孝則<sup>3</sup>、海老原智博<sup>4</sup>、松橋徹郎<sup>3</sup>、志村優<sup>3</sup>、伏見拓矢<sup>3</sup>、市野紀子<sup>2</sup>、長滝谷芳恵<sup>1</sup>、西畑瞳<sup>1</sup>、新田和広<sup>2</sup>、八塚由紀子<sup>2</sup>、岡崎 (今井) 敦子<sup>2</sup>、Wu Yibo<sup>5,6</sup>、小坂仁<sup>7</sup>、大竹明<sup>8,9</sup>、村山圭<sup>3,10</sup>、岡崎康司<sup>2,11,\*</sup>

**著者所属:** <sup>1</sup>近畿大学理工学部生命科学科、<sup>2</sup>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、<sup>3</sup>千葉県こども病院 代謝科、<sup>4</sup>千葉県こども病院 新生児科、<sup>5</sup>ジュネーブ大学 (スイス)、<sup>6</sup>理化学研究所 生命医科学研究センター YCI 研究室、<sup>7</sup>自治医科大学 小児科、<sup>8</sup>埼玉医科大学 小児科学・ゲノム医療学、<sup>9</sup>埼玉医科大学 難病センター、<sup>10</sup>千葉県こども病院 遺伝診療センター、<sup>11</sup>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

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.pref.chiba.lg.jp/kodomo/shinryoka/shinryo/taisha/index.html>