



次世代シーケンサーが変える 不整脈の遺伝子診断

滋賀医科大学アジア疫学研究センター
大野聖子

I. はじめに

次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer : NGS) が登場してはや 10 年が経過し、すでに次世代、とはいえない時代になってきた。さて、次世代というからには現世代があるわけで、現世代のシーケンスといえば Sanger 法を主体としたダイレクトシーケンス (キャピラリーシーケンス) 法である。ヒトの全ゲノムを解読するというヒトゲノムプロジェクトは、このダイレクトシーケンス法で行われたのだが、実に 13 年の時間と 2,700 億円もの費用を必要とした。その全ゲノム解読が、20 年も経過しないうちに 10 万円を切る時代やってきた (<https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>)。この費用の変化を知るだけで、いかに次世代シーケンサー技術が遺伝子診断を変えてきたかが予想できるだろう。

II. 従来法のシーケンス

さて、NGS と従来型のシーケンサー、いわゆるダイレクトシーケンスとの大きな違いは何だろうか。それは 1 回の解析で得られる遺伝子情報量の違いである。

病気の原因となる遺伝子変異は、主にアミノ酸に翻訳される領域、exon に存在する。そのため、exon の外側の領域にある intron にプライマーを設定して PCR で増幅し、さらにダイレクトシーケンス用の PCR (Sanger 法) を行う (図 1 上段)。こうして調整されたサンプルをキャピラリーシーケンサーで泳動する。ダイレクトシーケンスで解析できる塩基長は 800 bp 程度に限定されるため、一回の解析では exon 1 個、intron の短い領域であっても 2 exon 程度に限定される。先天性 QT 延長症候群 1 型 (LQT1) の原因遺伝子、*KCNQ1* は 16 exon で構成されており、LQT1 の遺伝子検査を行うためには、1 検体につき 16 回の解析が必要である。

III. NGS のしくみ

NGS を使った遺伝子解析は、その標的とする領域の違いから主に 3 つに分類されている。ヒトの全ゲノムを読む全ゲノムシーケンス (Whole genome sequence : WGS)、全エクソン (exon) を読む全エクソンシーケンス (Whole exome sequence : WES)、調べたい遺伝子・領域のみを選択したターゲットシーケンス (パネルシーケンス) の 3 種類である。WGS の場合、すべての領域を probe で増幅させ、WES では exon 領域のみを probe で増幅させる。パネルシーケンスでは対象領域の probe をデザインして増幅させる。複数の対象領域を一度に増幅し、得られたサンプルを NGS 本体で一度に泳動する。

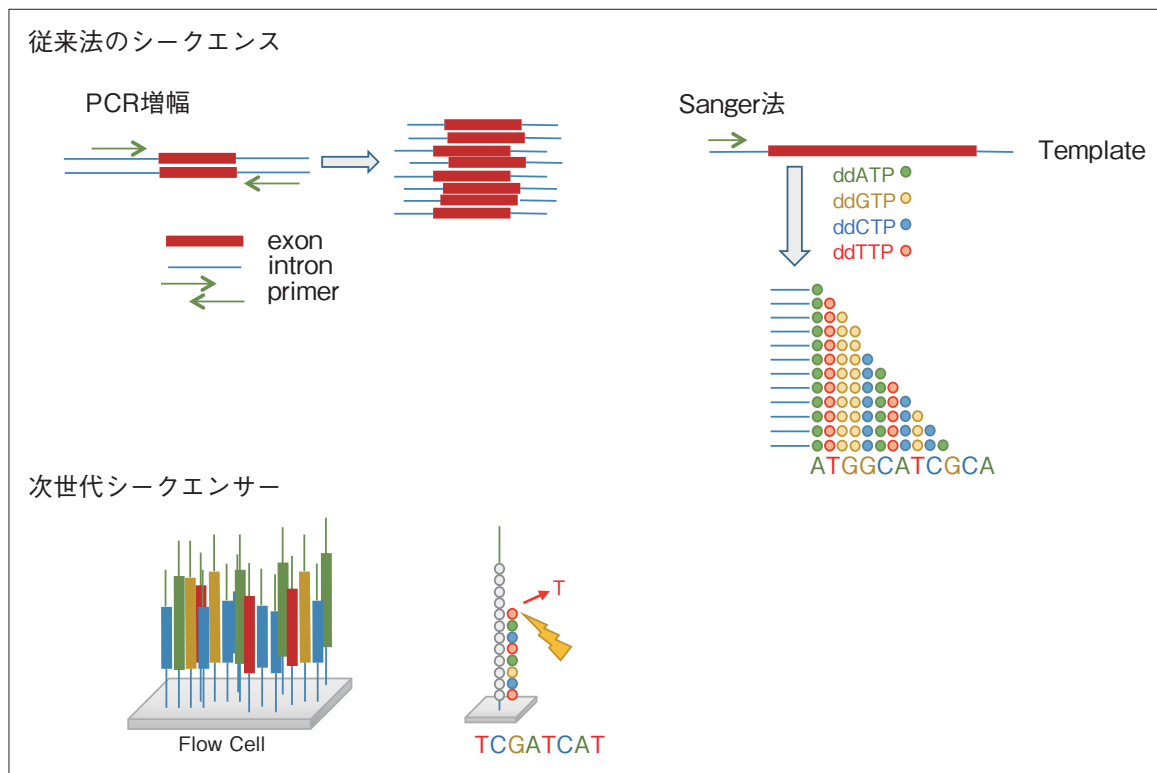


図 1 シーケンス解析法

上：従来法(Sanger法). Intronに設定したPrimerを用いてexonを増幅させる(左). PCRで増幅したexon部分を鋳型(template)としてddNTPを用いて伸長反応を行い、塩基配列を確定する(右).
 下：次世代シーケンサー. Flow cell上に増幅産物を結合させる(左). その増幅産物を鋳型として、一塩基ずつ増幅させ、一反応ごとにカメラで撮影を行い、塩基配列を決定する(右).

私が使用している illumina社のシステムの場合、増幅させた個々のサンプルを Flow cellと呼ばれるガラス板上に結合させ、そのサンプルを鋳型として一塩基ずつ伸長させる反応を行う(図1下段). 一塩基を伸長させるごとにカメラで撮影を行い、どの塩基が増幅されたか記録していく. NGS本体での泳動完了後、カメラで記録された塩基配列のデータが既存のヒトゲノムデータのどの部分に一致するのか、確認して並べていく. そして既存のヒトゲノムデータと異なっている塩基配列を同定、つまり変異を同定する. さらにインターネット経由での情報を活用することで、すでに報告されている変異かどうか、健常人での同定頻度などの情報を付加することができる.

このように、従来法のシーケンスが1 exonごとに解析するのに対し、NGSでは一度の解析で対象領域すべての塩基配列情報を知ることができる. さらにWeb上の情報を利用することで、変異に関する様々な情報も同時に入手することができる. つまり、NGSは情報社会における遺伝子分野での発展により、活用可能になったシステムであるといえる.

Ⅳ. 実際の遺伝子診断

では、実際の遺伝子診断では何が可能になったのでしょうか. LQTSの原因遺伝子はこれまでに15個報告されているが、主要な原因遺伝子は *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A* の3遺伝子であり、この3遺伝子

に対して解析が行われることが多い。この3遺伝子の合計 exon 数は59個であり、従来法でLQTS患者の遺伝子解析を行うためには、最低でも59回に分けたサンプル調整およびシーケンサーでの泳動が必要だった。一方、NGSではこの3つの遺伝子どころか、これまでにLQTSの原因として報告されている15遺伝子の全 exon を一度に解析することができる。さらに、LQTSの類縁疾患であるカテコラミン誘発性多形性心室頻拍(Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia : CPVT)の主要な原因遺伝子である *RYR2* を解析することが可能になった。この *RYR2* は exon が105個もある巨大な遺伝子であり、これまではCPVTが疑われる場合でも、実際に遺伝子診断を行うことは困難であった。それがNGSでは、LQTSとCPVTの鑑別が困難な症例についても、両疾患に対する遺伝子解析を同時に行うことが可能になった。

では、これまで原因遺伝子が明らかにされていなかった疾患についてはどうであろうか。NGSを利用したLQTSの新しい原因遺伝子が2013年に同定された¹⁾。血縁関係のない発端者2人は、乳児期にQT延長からVFをきたした重症例であったが、どちらの発端者においても両親は健康で、心電図上もQT延長を示していなかった。そこで、両親には変異がない新規突然変異が原因であると考えられ、各家族につき両親と子供(発端者)の3人に対してWESが行われた。新規突然変異でアミノ酸置換を伴い、これまでに報告のない変異を探したところ、カルモジュリンをコードする *CALM1* と *CALM2* に変異が同定された。その後、心停止をきたした二人の重症LQTSについても *CALM1* 変異が同定され、*CALM1* と *CALM2* はLQTSの原因遺伝子であることが明らかにされた。このように新しい原因遺伝子を同定するためにも、NGSは有用であることがわかる。

V. NGSの弱点

このように、非常に有用なNGSの解析であるが、NGSにも弱点がある。これまで遺伝子診断を行う場合、対象とする遺伝子のみを調べていた。そのため同定された変異は、ほぼ間違いなく疾患と関連した遺伝子変異であった。ところが、NGSを用いて解析を行うと、原因と考えられる複数の遺伝子変異が同定されることもある。複数の変異が同定された場合、実際にはどの変異が最も病気に影響しているのか、それとも複数の変異が重複することによって病気を発症しているのか、関連を調べて明らかにする必要がある。また、疾患の原因遺伝子であると報告されていても、変異の報告数が少ない原因遺伝子で、その遺伝子でコードされる物質の基礎的研究が少ない場合、変異によって引き起こされる病気の説明が困難なことも多い。さらに、NGSではシーケンサーから取り出した生のデータ(Raw data)から質の悪い部分を除去し、既存のシーケンスデータに合わせて得られたシーケンス配列を並べていく。そのため、間違ったデータを出力してしまう可能性、いわゆるノイズが出てしまう可能性がある。このノイズと実際の変異を見分けるために、変異が疑われる場合には、その部分のダイレクトシーケンスが必要になることも多い。

概念として説明すると、ダイレクトシーケンス法は目標とした魚を釣り上げる一本釣りのようなものである。そのため、一つの変異が見つかり、それを病気の原因である遺伝子変異と考える。一方、NGSは底引き網のようなもので、とりあえずたくさん変異を捕まえて、そこから必要である変異を選んでいく。そのため、一度に多数の変異を同定することはできるが、本当に病気の原因である変異かどうか、一つずつ確認する必要がある。また病気の原因と考えて選んだ変異が、実は病気とはまったく関係ない変異である可能性も残されている。

VI. NGSの今後の展望

これまで遺伝子診断は単一遺伝子疾患，いわゆるメンデルの法則に従う疾患で，頻度の低い遺伝子変異について主に行われてきた．図2左上の遺伝性疾患で同定される非常に頻度の低い変異については，その変異をもっていると必ず疾患を発症すると考えられ，原因遺伝子変異の疾患への影響が非常に強いことが考えられる．一方，頻度の高い変異(多型)については，生活習慣病などの罹患頻度の高い病気との関連がゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study : GWAS)で同定されてきている．ただ，GWASで関連付けられてきた多型は疾患に対する影響が弱く，複数の多型が組み合わせられることで，ようやく疾患リスクが上昇するような多型も多い．

NGSの登場により，ヒトの全ゲノム解析はますます容易になってきている．そうすると，これまで遺伝性ではなく孤発性と考えられていた疾患(図2中央)においても，中等度の作用・頻度の遺伝子変異の組み合わせで発症することが明らかにされていくと考えられる．

VII. 最後 に

NGSの登場で，遺伝性疾患の遺伝子解析は劇的な進歩を遂げた．しかし，患者の全ゲノム情報が得られたとしても，それだけでは疾患の原因解明や治療法確立には不十分である．正確な臨床診断と，遺伝子変異に関連した基礎的な研究が組み合わせられることで，初めて医療の進歩に役立つことを，改めて肝に銘じたい．

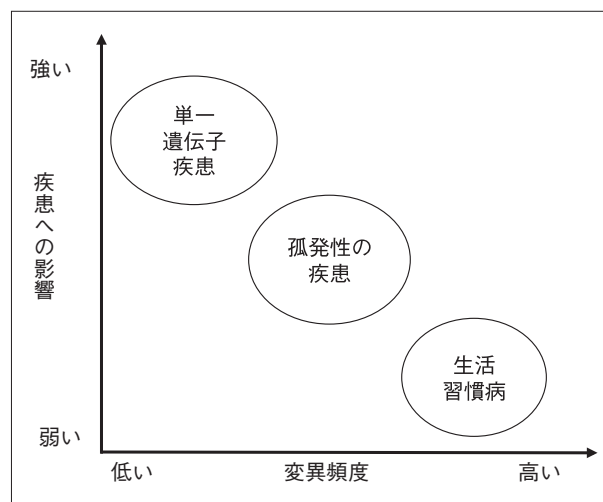


図2 疾患頻度と同定された変異の疾患への影響

【文 献】

- 1) Crotti L, Johnson CN, Graf E, De Ferrari GM, Cuneo BF, Ovadia M, Papagiannis J, Feldkamp MD, Rathi SG, Kunic JD, Pedrazzini M, Wieland T, Lichtner P, Beckmann BM, Clark T, Shaffer C, Benson DW, Käb S, Meitinger T, Strom TM, Chazin WJ, Schwartz PJ, George AL Jr : Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. Circulation, 2013 ; 127 : 1009 ~ 1017