



Identifying pathogenic variants in rare pediatric neurological diseases using exome sequencing

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2025-05-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小松, 和幸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000402

博士（医学）小松 和幸

論文題目

Identifying pathogenic variants in rare pediatric neurological diseases using exome sequencing

（エクソーム解析による希少小児神経疾患の病的バリエーションの同定）

論文の内容の要旨

[はじめに]

次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析は、希少な小児神経疾患の診断率を飛躍的に向上させた。このうち、エクソーム解析は診断において費用対効果の高い解析方法とされ、エクソン領域のみならずエクソン-イントロン境界近傍のイントロンバリエーションの解析も可能である。

希少疾患の原因となるバリエーションを同定するためには、網羅的ゲノム解析で検出される膨大な数のバリエーションから、一般集団中にアレル頻度の高いバリエーションをまず除外する。これには、全人種のゲノムデータベースである gnomAD や日本人データベースである 54KJPN といった、健常集団におけるアレル頻度情報が用いられる。理論上、これらの集団には小児期に発症する重篤な顕性遺伝性疾患の病的バリエーションは含まれないが、実際には不完全浸透やモザイクバリエーションにより、病的バリエーションが含まれる可能性がある。得られた稀なバリエーションの病的意義を判断するための情報付与（以下、アノテーション）のうち、ClinVar はバリエーションの病的意義や表現型が登録されている世界最大のデータベースである。また、スプライス異常を予測する SpliceAI や遺伝子と患者表現型の関連性を評価する PhenoMatcher も広く用いられているが、小児神経疾患の診断における有用性は明らかになっていない。

今回我々は、4つのアノテーションの有用性（アレル頻度、ClinVar、SpliceAI、PhenoMatcher）について小児神経疾患の患者コホートを用いて後方視的に検討した。

[患者ならびに方法]

本研究は昭和医科大学倫理委員会の承認（承認番号 G219-N, G220-N）および浜松医科大学臨床研究倫理委員会の承認（承認番号 15-282, 17-163, 20-207）を得て施行された。臨床情報および患者末梢血は担当医による書面での同意を得て収集された。

2016年4月から2024年3月までに国内の医療機関から集積された未診断の小児神経疾患患者 463 例を対象にエクソーム解析を行い、同定された病的バリエーションを用いて各アノテーションの有用性について後方視的に検討した。

再解析の方法として、患者毎のFastqファイルを参照配列にマッピングし、Single nucleotide variant (SNV) および Copy number variation (CNV) 解析を行った。SNV

解析では HaplotypeCaller を用いてエクソン領域の他にエクソン-イントロン境界部位から 50bp 離れたイントロン領域までバリエーションコールを行い、アリル頻度 0.01 以下の稀なバリエーションを抽出した。コールされた各バリエーションにアノテーションを付与し、病的バリエーションの再解析を行った。CNV 解析では XHMM および jNord を用いた。病的バリエーションは両親検体を用いて由来を確認した。

[結果]

270 例に 271 個の病的 SNV と、33 個の病的 CNV が同定された。CNV は全体の 10.9% (33/304) で検出された。*de novo* で検出された顕性遺伝形式の疾患原因バリエーションのうち、13 個のバリエーションが 54KJPN および gnomAD に登録されていた。いずれのバリエーションもアレル頻度は 0.001%未満であった。病的バリエーションの 38.4%が、病的意義のあるバリエーションとして ClinVar に登録されていた。SpliceAI によるスプライシング異常の予測では、 Δ スコアが 0.2 以上でスプライス異常が示唆されるイントロンバリエーションは 22 個あり、そのうち 4 個がエクソン-イントロン境界部位から 11 塩基以上離れたバリエーションであった。PhenoMatcher による疾患関連スコアでは、96.7%のバリエーションが 0.6 以上のスコアを有していた。

[考察]

我々のコホートをを用いた再解析では、463 例中 270 例に病的バリエーションが検出された。うち、CNV は 10%を占めていたことから、エクソーム解析における CNV 解析の有用性が再確認された。

本コホートでは、ClinVar の情報を付与することで 38.4%の病的バリエーションが即座に抽出できることが確認され、その具体的な有用性が示された。一般的に、エクソンを中心とした解析におけるイントロン領域の探索はエクソン-イントロン境界部位から 10 塩基以内とすることが多いが、本解析では SpliceAI を用いることでエクソン-イントロン境界部分から 11-50 塩基離れたイントロン領域で 4 個の病的バリエーションの同定に成功した。一方で、10 塩基以内の病的バリエーションが 24 個中 20 個であったことから、境界部位から離れるほど病的バリエーションは少なくなり、50 塩基以上離れて解析を行ってもかえって偽陽性のみが多くなる可能性が示唆された。

また、本解析では 13 個の *de novo* かつ顕性疾患の原因となる病的バリエーションが健常集団においても登録されていた。例えば、FOXG1 の Q86Rfs*106 は、アリル毎のリード数の比からモザイクバリエーションとしてデータベースに登録されている可能性が示唆された。また、TUBB3 などの表現型の重症度に幅がある遺伝子の病的バリエーションのデータベース登録も確認された。よって、顕性遺伝形式の疾患において、一般集団に登録されたバリエーションの全てを疾患原因候補から除外してしまうと、これらの病的バリエーションを見逃す可能性が示された。表現型の評価による絞り込みは病的バリエーションの検出において重要である。これ

まで PhenoMatcher の cutoff 値は 0.3 と報告されていたが、我々の検討では、小児神経疾患においては 0.6 以上に 95%以上の症例が含まれており、新たな cutoff 値の候補となり得ることが示唆された。

[結論]

本研究により、小児神経疾患のエクソーム解析におけるアノテーションの有用性が示された。SpliceAI や ClinVar などのアノテーションを用いることは病的バリエーションの効率的な検出に寄与する。一般集団への登録の有無で絞り込む際には、顕性遺伝形式の病的バリエーションを見逃す可能性に注意が必要である。