

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08981

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを活用した過剰マーカー染色体の発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of generating mechanism of supernumerary marker chromosome using next generation sequencer

研究代表者

大江 瑞恵 (Ohye, Tamae)

藤田医科大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：10247661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小型の過剰染色体である過剰マーカー染色体は、比較的発生頻度が高い染色体異常である。本研究では、次世代シーケンサーやマイクロアレイ染色体検査などを用いて、マーカー染色体の構造解析を行い、マーカー染色体の由来領域や切断点の解析を行った。その結果、マーカー染色体は、単純な切断と結合ばかりではなく、DNA複製や染色体粉碎現象といった様々な発生メカニズムにより、複雑な構造となっていることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過剰マーカー染色体は、病態の原因となる場合があり、その由来を知る事は臨床的に重要であるが、実際には、発生機構はもとより、正確なゲノム領域やその構造もよく解らないままに診断されている。本研究により、発生メカニズムは、単純なセントロメア領域から構成されるものだけではなく、DNA複製のエラーや染色体粉碎現象などの関与が考えられ、染色体構成領域が様々であることから、臨床検査として、由来領域を精査することは、患者の予後予測に有用となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Supernumerary small marker chromosomes (SMC), which are small excess chromosomes, are chromosomal abnormalities that occur relatively frequently. In this study, structural analyses of marker chromosomes were performed using next-generation sequencing and comparative genomic hybridizations, and the origins and breakpoints of marker chromosomes were examined. As a result, it was presumed that the marker chromosome has not only simple cleavage and binding but also a complicated structure due to various developmental mechanisms such as DNA replication and chromothripsis.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：過剰マーカー染色体 次世代シーケンサー 発生メカニズム 染色体粉碎現象 DNA複製

1. 研究開始当初の背景

ヒトの46の染色体に加え、過剰に染色体をもつことがある。その1つに小型過剰マーカー染色体があるが、20番染色体より小さい過剰染色体である。新生児の1/2500人、発達障害患者ではその7倍もの頻度で見られる比較的頻度の高い染色体異常である。マーカー染色体は、症状に影響する場合としない場合があり、両親からの遺伝性の有無、モザイク率、由来染色体やそのゲノム領域、構造の決定は臨床的に重要となる。ところが、一般的に臨床検査として行われている染色体核型解析のG分染法では、マーカー染色体の存在を確認するのみであり、追加でSKY法やFISH法を実施しても大雑把に判断されるだけで、詳細な解析は行われていない。つまり、発生メカニズムはもとより、正確なゲノム領域やその構造もよくわからないままに診断されている。

微細な染色体異常を1コピーレベルで検出できるマイクロアレイ染色体検査の急速な普及に伴い、原因不明であった疾患の微細な染色体構造異常が次々と明らかにされた。加えて、近年の革新的な次世代シーケンサーの技術発展は、メンデル遺伝病の診断だけではなく、新型出生前診断や解析不能だった構造異常の発生機構の解明へ向けての解析を進めている。がんは体細胞で多くの点変異や染色体構造異常に伴って発生するが、これまでは、時間経過の中でこれらが徐々に蓄積されていくと考えられていた(多段階発がんモデル)。近年、がん細胞の染色体構造異常において、一つの染色体内の離れた複数箇所がばらばらに繋ぎ直された「染色体粉碎現象(Chromothripsis)」が報告され注目されている。

2. 研究の目的

マーカー染色体は一般的には、ほとんどがセントロメア周辺から構成されていると考えられている。しかし、私達は、生殖細胞で生じる過剰マーカー染色体は染色体粉碎現象が起点となり、複雑な構造を形成すると仮定し、近年のゲノム解析技術を利用して、その検証を行うことを目的とした。本研究により、マーカー染色体の発生メカニズムの理解が進み、詳細な臨床検査に発展することを目指した。

3. 研究の方法

G分染法で同定された小型過剰マーカー染色体やマーカー染色体の構造解析を行った。初めに、マイクロアレイ染色体検査を行い、コピー数の増加領域からマーカー染色体のゲノム構成領域を推定し、FISH法やマイクロサテライト解析にて確認を行った。複雑なゲノム増加領域のコピー数は、リアルタイムPCRやドロレットデジタルPCRにより確定を行った。さらに、次世代シーケンサーによるメイトペア解析により結合点を絞り、PCRにより塩基レベルの解析を行って発生メカニズムを推定した。

4. 研究成果

小型過剰マーカー染色体は、セントロメア領域から構成されるものが多かったが、複雑な構造を想定されるものも一定数は存在し、それらは多様であった。

(1) 重複領域と欠失領域からなるマーカー染色体

マーカー染色体について、マイクロアレイ染色体検査を行った結果、性染色体にマーカー染

染色体由来と考えられる重複領域が検出されたが、その領域内に欠失領域も検出された。そして、そのゲノムコピー数の変動は、マーカー染色体に起因することをFISH法により確認した。また、欠失領域は両親由来ではなく、発端者のみに発生していた。結合領域のDNA塩基配列の特徴から、この過剰マーカー染色体は、姉妹染色体内で繰り返し配列を介した組み換えもしくは、DNA複製時に何らかの原因により一旦停止し、その再開時に異なる領域にテンプレートスイッチを数回繰り返したことが考えられ、Microhomology-Mediated Break Induced Replication(MMBIR)やFork Stalling and Template Switching(FosTeS)を介して発生した可能性が示唆された。

(2) 段階的コピー数増加を伴う過剰マーカー染色体

シンプルなゲノムコピー数の増加を認められたマーカー染色体ばかりではなかった。マイクロアレイ染色体検査により、短腕領域の約11Mbに渡り段階的に増幅しているものがあった。増幅領域に位置するプローブを用いてFISH解析を行い、段階的な増幅はマーカー染色体で生じていることを確認した。次にリアルタイムPCRやドロレットデジタルPCRを行い、ゲノムコピー数を確定すると、がんのゲノム増幅の様に増大していることはなく、ある程度、制御されたDNA複製機構を介していることが判明した。さらに、次世代シーケンサーとPCRにより結合点の解析を行った。結合点の分布あるいはコピー数のデータ、およびFISH解析の結果から、小型過剰染色体の形成には1回の細胞分裂ではなく、複数回の細胞分裂やDNA複製、修復を介していることが考えられた。また、SNPのパターンから、患者が受け継いだ正常染色体から派生していることから、受精後に発生したことが推測された。

(3) 同一染色体の断片から構成される過剰マーカー染色体

小型過剰マーカー染色体の一部では、マイクロアレイ染色体検査で同一の染色体上の断片的な領域増加が検出されるものや、さらに、マイクロサテライト解析により、短腕末端から長腕末端にかけて断片的な領域を含んでいるものが検出された。次世代シーケンサーによる結合部位の解析では、直近領域との結合ではなく、染色体上の離れた領域との結合も検出された。これらの結果は、1つの染色体が一旦ばらばらになり再結合する染色体粉砕現象を想定させていた。染色体粉砕現象は、がん細胞で特異的ではなく、生殖細胞でも小型過剰マーカー染色体を発生させていることが考えられた。

以上のように、マーカー染色体は、シンプルな切断と結合による発生メカニズムばかりではなく、染色体粉砕現象、DNA複製のエラーなど様々なメカニズムに起因していることが考えられた。よって、マーカー染色体の構成ゲノム領域は複雑であることから、臨床検査として、由来領域を精査することは、患者の予後予測に有用となると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 大江瑞恵	4. 巻 43
2. 論文標題 次世代シーケンサーを用いた染色体構造異常の網羅的解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 122-123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miura H, Ohye T, Kozawa K, Hattori F, Kawamura Y, Ihira M, Kurahashi H, Yoshikawa T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Coinfection With Human Herpesvirus (HHV)-6B in Immunocompetent, Healthy Individuals With Chromosomally Integrated HHV-6A.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pediatric Infect Dis Soc	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jpids/piaa009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miura H, Ohye T, Kozawa K, Hattori F, Kawamura Y, Ihira M, Kurahashi H, Yoshikawa T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Coinfection With Human Herpesvirus (HHV)-6B in Immunocompetent, Healthy Individuals With Chromosomally Integrated HHV-6A.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pediatric Infect Dis Soc	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jpids/piaa009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miura H, Kawamura Y, Hattori F, Kozawa K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, Yoshikawa T.	4. 巻 90
2. 論文標題 Chromosomally integrated human herpesvirus 6 in the Japanese population.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Virol.	6. 最初と最後の頁 1636-1642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.25244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoi K, Nakajima Y, Ohye T, Inagaki H, Wada Y, Fukuda T, Sugie H, Yuasa I, Ito T, Kurahashi H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Disruption of the Responsible Gene in a Phosphoglucomutase 1 Deficiency Patient by Homozygous Chromosomal Inversion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JIMD Rep.	6. 最初と最後の頁 85-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/8904_2018_108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura Y, Ohye T, Miura H, Ihira M, Kato Y, Kurahashi H, Yoshikawa T.	4. 巻 98(7)
2. 論文標題 Analysis of the origin of inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 in the Japanese population.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Gen Virol.	6. 最初と最後の頁 1823-1830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.000834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Doi H, Matsui T, Ohye T, Saito K, Katsuda I, Akiyama H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Andrographolide from the herb Andrographis paniculata induces apoptosis on cultured human leukemic cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FMJ	6. 最初と最後の頁 48-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20407/fmj.3_3_48	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohye T, Kawamura Y, Inagaki H, Yoshikawa A, Ihira M, Yoshikawa T, Kurahashi H.	4. 巻 12
2. 論文標題 A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated human herpesvirus-6.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Virol Methods	6. 最初と最後の頁 74-78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2016.00125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki H, Kato T, Tsutsumi M, Ouchi Y, Ohye T, Kurahashi H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Palindrome-Mediated Translocations in Humans: A New Mechanistic Model for Gross Chromosomal Rearrangements.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Front Genet	6. 最初と最後の頁 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jviromet.2015.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Y, Osumi T, Imadome KI, Takahashi E, Ohye T, Yoshikawa T, Tomizawa D, Kato M, Matsumoto K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Transmission of chromosomally integrated human herpesvirus 6 via cord blood transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transpl Infect Dis	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tid.12636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takaiso N, Nishizawa H, Nishiyama S, Sawada T, Hosoba E, Ohye T, Sato T, Inagaki H, Kurahashi K.	4. 巻 2
2. 論文標題 Mutation analysis of the JUNO gene in female infertility of unknown etiology.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Fujita Medical Journal	6. 最初と最後の頁 59-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 大江瑞恵、倉橋浩樹
2. 発表標題 ゲノム医療と認定遺伝カウンセラー
3. 学会等名 第58回日本臨技中部圏支部医学検査学会(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大江瑞恵、倉橋浩樹
2. 発表標題 エマヌエル症候群の家族の集いの地域ごとでの開催の意義
3. 学会等名 第42回日本遺伝カウンセリング学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大江瑞恵、倉橋浩樹
2. 発表標題 稀少難病の遺伝カウンセリング
3. 学会等名 第42回日本遺伝カウンセリング学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大江瑞恵、村松友佳子、水野誠司、秋山秀彦、倉橋浩樹
2. 発表標題 マイクロアレイ染色体検査によるマーカー染色体の由来検索
3. 学会等名 第18回日本検査血液学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大江瑞恵
2. 発表標題 遺伝医療をになう認定遺伝カウンセラー
3. 学会等名 中部圏検査技師会 医学検査学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohye Tamae, Mizukami Haruna, Katsuragawa Yohei, Fujita Naoko, Nakajima Yoko, Akiyama Hidehiko, Ito tetsuya, Kurahashi Hiroki.
2. 発表標題 Analysis of inverted chromosome from phosphoglucomutase 1 deficiency patient.
3. 学会等名 The 13th International Congress of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ohye Tamae.
2. 発表標題 The merits and demerits of obtaining genomewide information of the fetus.
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Genetic Counseling (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yukako Muramatsu, Tamae Ohye, Tomohiko Nakata, Takashi Hamajima, Mizuki Ito, Tomoya Takeuchi, Masako Izawa, Hiroki Kurahashi.
2. 発表標題 Ring chromosome 9 with a 9p24.3-p24.1 deletion and 9p24.1-p21.1 duplication in a girl with developmental delay and sex reversal.
3. 学会等名 The 13th International Congress of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Makiko Tsutsumi, Takema Kato, Hidehito Inagaki, Tamae Ohye, Hiroki Kurahashi.
2. 発表標題 Spermatogenic failure by impaired meiotic sex chromosome inactivation in a mouse with reciprocal translocation.
3. 学会等名 The 13th International Congress of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Naoko Ishihara, Hidehito Inagaki, Misa Miyake, Yuya Ouchi, Tamae Ohye, Makiko Tsutsumi, Tetsushi Yoshikawa, Hiroki Kurahashi.
2. 発表標題 A child presenting distinct phenotype in severe alternating hemiplegia with a novel ATP1A3 mutation.
3. 学会等名 The 13th International Congress of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yoshiki Kawamura, Tamae Ohye, Hiroki Miura, Masaru Ihira, Hiroki Kurahashi, Tetsushi Yoshikawa.
2. 発表標題 The Analysis of The Origin of Inherited Chromosomally Integrated HHV-6 in The Japanese Population.
3. 学会等名 41st ANNUAL INTERNATIONAL HERPESVIRUS WORKSHOP (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Miki Kawai, Tsutomu Sato, Tamae Ohye, Hiroki Kurahashi.
2. 発表標題 Genetic counseling on preimplantation/prenatal genetic diagnosis for incontinentia pigmenti.
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Genetic Counseling
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Maki Kato, Haruki Nishizawa, Eiji Nishi, Tamae Ohye, Hiroki Kurahashi, Tsutomu Sato.
2. 発表標題 Gender differences in thinking affect the choice to pursue pregnancy by gamete donation and/or adoption.
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Genetic Counseling
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kazuo Kanyama, Tamae Ohye, Hiroki Kurahashi, Tsutomu Sato.
2. 発表標題 Public attitude survey for the reporting incidental findings of clinical genome sequence.
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Genetic Counseling
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 加藤麻希、中島葉子、稲垣 秀人、堤真紀子、大江瑞恵、佐藤 芳、伊藤哲哉、倉橋浩樹
2. 発表標題 次世代シーケンス解析によってミトコンドリアHMG-CoA合成酵素欠損症が判明した遺伝カウンセリング外来の1例.
3. 学会等名 第58回日本先天代謝異常学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 加藤麻希、加藤武馬、大橋昌尚、藤崎碧、山口昌俊、鮫島浩、 堤真紀子、稲垣秀人、大江瑞恵、佐藤 芳、倉橋浩樹.
2. 発表標題 PCS/MVA 症候群で同定された Alu 配列挿入による BUB1B 変異.
3. 学会等名 第39回日本小児遺伝学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大江瑞恵、倉橋浩樹	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本医師会雑誌	5. 総ページ数 1
3. 書名 指定難病ペディア2019	

〔産業財産権〕

〔その他〕

t(11;22)とエマヌエル症候群
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~genome/11&22>
 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 分子遺伝学研究部門
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~genome/mg/>
 藤田医科大学 総合医科学研究所 分子遺伝学研究部門
http://www.fujita-hu.ac.jp/ICMS/research_category/res05/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	倉橋 浩樹 (Kurahashi Hiroki) (30243215)	藤田医科大学・付置研究所・教授 (33916)	
連携研究者	稲垣 秀人 (Inagaki Hidehito) (70308849)	藤田医科大学・付置研究所・講師 (33916)	