

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11219

研究課題名(和文) MPS法によるNIPTにおけるdiscordantな結果の解明とその臨床的意義

研究課題名(英文) Study on the elucidation of the discordant result of NIPT and its clinical significance by MPS method

研究代表者

四元 淳子 (Yotsumoto, Junko)

国際医療福祉大学・大学院・講師

研究者番号：30553648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：cell-free DNAを用いたMPS法によるNIPTにおけるdiscordantな結果につき解析を行った結果、判定保留の要因として母体の肥満、双胎妊娠、母体腫瘍、ヘパリン使用が示され、特定ゲノム領域の変化を示す場合には、児の染色体微小欠失、母体のCNV、CPM、肥満、母体腫瘍が示唆された。偽陽性にはvanishing Twin、CPM、偽陰性にはCPMが影響していた。以上、NIPTの結果には、さまざまな母体と胎児双方の病態が要因として関与していることが明らかになった。discordantな結果の可能性について予め検査前の遺伝カウンセリングにおいて説明する必要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cell-free DNAを用いたMPS法によるNIPTにおけるdiscordantな結果(判定保留、偽陽性、偽陰性)につき大量のデータを用い解析を行った結果、さまざまな母体と胎児双方の病態がその要因として関与していることが明らかになった。国内のエビデンスに基づいたdiscordantな結果についての情報提供が可能となり、予め検査前の遺伝カウンセリングにおいて説明することの必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the discordant results in NIPT(not reportable, false positive, false negative) by MPS methods, using cell-free DNA. Maternal obesity, twin pregnancy, maternal tumor, and heparin use were shown as factors for not reportable result. The effects of chromosomal microdeletion of fetus, maternal CNV, CPM, obesity, and maternal tumors were shown to differ depending on the type of genomic alteration. Furthermore, the involvement of vanishing Twin and CPM was confirmed as a factor of false positive, and it was found that CPM influences the background of false negative. These results indicate that various maternal and fetal pathologies are involved in the NIPT results, suggesting the need to explain the possibility of discordant results in advance by genetic counseling.

研究分野：周産期遺伝学、遺伝カウンセリング

キーワード：NIPT cell free DNA discordant result genetic counseling

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

母体血漿中の cell-free DNA を用いた NIPT は、日本では 2013 年 4 月より開始され、その実施件数は 2016 年 3 月に 3 万件を超えた。NIPT には様々な原理・技術があるが、その中でも MPS 法 (massive parallel sequencing) は、特定の染色体数的異常症を高精度に検出する方法として世界的に最も普及しているが、低率ながら偽陽性と判定保留となることがある。

我々は NIPT の初年度 7740 例を解析し、実際の観察データに基づく結果を国内で初めて報告した (Sago et al,2015; Suzumori et al,2016; Yotsumoto et al,2016)。MPS 法による NIPT は、開始後 3 年間で 30,615 件の検査が行われた。そのうち偽陽性は 38 人 (38/520,7.3%)、判定保留 94 人 (94/30615,0.31%) であった。陽性的中率は、21 トリソミーで 95.6% であることが示され、統計的理論値での予測よりは高いことが確認されたが、対象疾患によってバラツキがあることも確認し、報告した (Sago, Sekizawa, 2015)。さらに我々は、受検の結果、陽性 (胎児の染色体数的異常) と判定された妊婦で、その後偽陽性と判明した妊婦の心理的負担は大きく増大することを報告した (Yotsumoto et al, 2016)。

NIPT は検査前遺伝カウンセリングで科学的根拠に基づく適切な情報提供を行った上で実施されるが、結果が偽陽性や判定保留となることは妊婦の精神的負担につながり、検査後の意思決定にも大きな影響を及ぼすため、偽陽性や判定保留の成因を解明してその正確な情報を提供することは重要である。また、世界的にも discordant な結果の背景にある胎児や母体の病態の原因究明が待たれる状況にあり、加えて、その病態が周産期異常とも関連する可能性があるため周産期医療にとっても重要な知見となると考えた。

研究代表者が参加する NIPT コンソーシアムは、国内の NIPT の 95% 以上を行っている最大の研究組織であり、その 99% は MPS 法で行われている。母体血漿中の DNA 断片を用いた NIPT (無侵襲的出生前検査) の最大の課題である discordant な結果 (偽陽性, 判定保留, 偽陰性) は、

胎児成分とする cfDNA (cell-free DNA) の大部分が胎盤の絨毛由来であること、また、母体由来の DNA が大量に混在することに起因する。

MPS 法では母体血漿中 cfDNA の中の胎児 DNA 濃度を定量しているが、胎児が 21 トリソミーの場合には、胎児 DNA 濃度は 21 番染色体の DNA 断片濃度と強い正の相関を示すことが確認されていたが、偽陽性、判定保留の場合には、以下のような特徴がみられることがわかっていった。

- A 偽陽性症例の多く、DNA 断片濃度が胎児 DNA 濃度と相関を示さない外れ値にある。
- B 胎盤に限局したモザイク (CPM) の影響で偽陽性となることがある。
- C Vanishing twin の影響で偽陽性となる場合がある。
- D 判定保留例のほとんどは、標的とする染色体濃度が基準値のカットオフ値付近にある。
- E 母体の抗 DNA 抗体の影響で胎児 DNA が破壊され判定保留となることがある。

つまり discordant な検査結果は、胎盤、胎児、あるいは母体の何らかの病態を反映していると考えられ、その解明が世界的にも待たれる状況であったこと、また偽陽性となる症例の検討は単一施設では症例数も限られ、科学的に妥当な結果を得ることは難しいが、NIPT コンソーシアム加盟施設の協力を得て、加盟施設での多数の NIPT 受験者を対象にした研究を行う体制ができており、大きな集団での偽陽性および判定保留事例の検討が可能であった。

### 2. 研究の目的

母体血漿中の DNA 断片を用いた MPS (massive parallel sequencing) 法による NIPT (無侵襲的出生前検査) の最大の課題である discordant (不一致) な結果 (偽陽性, 判定保留, 偽陰性) は、胎児由来 DNA の大部分が胎盤の絨毛細胞由来であること、また、母体由来の DNA が混在することに起因する。例えばダウン症の偽陽性となる症例の多くは 21 番染色体由来の DNA 濃度が胎児 DNA 率と正の相関を示さない症例であり、胎児または母体の染色体疾患や腫瘍性疾患、あるいは胎盤に限局したモザイク等の存在が強く示唆されている。本研究では偽陽性および判定保留症例に対し、出生後に胎盤 (組織)、母体血・新生児 (臍帯血) を分析し、また、過去に偽陽性・判定保留と判定された症例を追跡調査することで、偽陽性・判定保留の成因を解明すること、および胎盤異常に基づく周産期異常の病態やその頻度を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

2013 年 4 月から 2018 年 3 月までの間に各病院で同意書取得後に妊娠女性からの採血が行われ、各サンプルから抽出した cfDNA は、Illumina HiSeq 2000 を使用した MPS 法にて解析された。シークエンスのデータは、トリソミー 21, 18, 13 の z スコアを推定するために使用された。胎児成分率が低い (単胎妊娠: <4% およびツイン妊娠: <8%) ケースは除外した。

最初の採血後に判定保留となった女性は、二次採血または侵襲的手法による再検査を使用して評価された。偽陽性の症例の一部は、出生後に G バンド分析にて胎盤を分析し、CPM の評価を行った。臨床データと妊娠転帰が追跡され、出生後に染色体分析が行われた。羊水穿刺前の子宮内胎児死亡または妊娠の終了、侵襲的検査なしの妊娠の継続を含む NIPT 陽性症例は除外された。出生後の追跡結果不明のケースも除外された。

4. 研究成果

(1) 判定保留については、34626 例の MPS データにて解析し、うち判定保留例は 110 例 (0.32%) であった。うち 22 (20.0%) は胎児成分率が低く (<4%), 18 (16.4%), 母体の悪性腫瘍を含む例はゲノムプロファイルが変化していることがわかった。

ゲノムプロファイルが変化し判定保留となった女性に対し、2 回目の採血での再検査の成功率は低かった (25.0% ~ 33.3%)。NIPT の結果が判定保留となった女性の 13 人 (11.8%) は、妊娠中に抗凝固療法としてヘパリン皮下注射を行っていた。判定保留の 20% は胎児 DNA 率の低値により、肥満、双胎妊娠、母体腫瘍、ヘパリン使用中がその原因と考えられた。

また、20% はゲノムプロファイルの変化であり、その半分は全ゲノム領域に及ぶ変化であった。全ゲノム領域に及ぶ変化の理由としては母体腫瘍、肥満、ヘパリン使用の影響が考えられた。一方、特定ゲノム領域の変化の理由としては児の染色体微小欠失、母体の CNV、CPM、肥満、母体腫瘍が考えられた。他の 50% は標的染色体の Z-score の変化が小さかったもので、その理由としては Vanishing Twin CPM、染色体微小重複、ヘパリン使用、自己免疫疾患、母体腫瘍の関与が推定された (Prenat Diagn. 2019)。このように、3 つの染色体数的異常を標的とする NIPT においても結果にさまざまな母体と胎児双方の病態が要因として関与していることが明らかになった (Suzumori et al, Prenat Diagnosis 2019) (図 1) (Table1)。

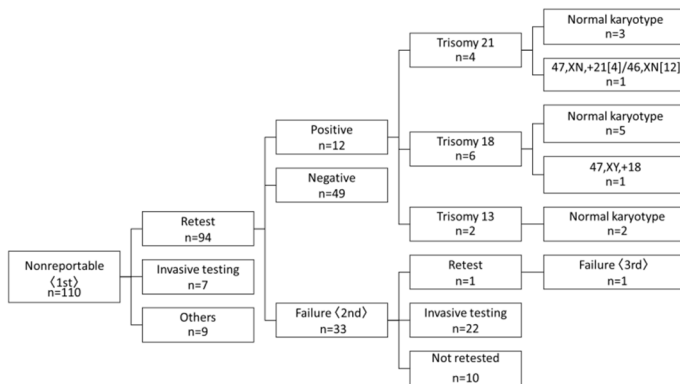


図 1 判定保留

Nonreportable reasons		Number undergoing Retest	Retest results	Success rate of retest (%)
Insufficient cfDNA		22		
	Insufficient cfDNA	2	Negative: n=2	100
	Low fetal fraction	20	Negative: n=14 (BMI <sub>≥</sub> 25: n=3, Twin pregnancies: n=5, Heparin: n=1, Maternal neoplasia: n=1) Failures: n=6 (BMI <sub>≥</sub> 25: n=2, BMI <sub>≥</sub> 25+twin pregnancy: n=1, Maternal neoplasia: n=1)	70.0
Altered genomic profile		10		
	Genome wide change	4	Negative: n=1 (Maternal neoplasia: n=1) Failures: n=3 (Maternal neoplasia: n=3)	25.0
	Specific genome change	6 †	Negative: n=2 (Others: n=1) Failures: n=4 (Maternal neoplasia: n=1 †, Others: n=4)	33.3
Borderline Z score		51		
	Borderline Z13 score	6 †	Negative: n=18 (Heparin: n=3, Vanishing twin: n=1, Others: n=1)	
	Borderline Z18 score	25	21 Positive: n=4 (Vanishing twin: n=1, Others: n=1)	
	Borderline Z21 score	18	18 Positive: n=6 (Vanishing twin: n=1, Others: n=2)	
	Borderline Z13.18.21 score	2	13 Positive: n=2 (Others: n=1) Failures: n=20 † (Heparin: n=6, Vanishing twin: n=1, Maternal neoplasia: n=2 †, Others: n=7)	60.8
Uncertain		12	Negative: n=11 Failures: n=1 (Others)	91.7
Total		94		

Note: † Duplication (one case has two nonreportable reasons)

(2) 引き続き、56,562 例の MPS 例における偽陽性 55 例 (0.097%)、偽陰性は 3 例 (0.006%) を解析したところ、偽陽性 55 例中 7 例は vanishing twin、偽陰性の 1 例は CPM であった。双子の妊娠では、2.22% (10/450) が判定保留であり、その割合は単胎妊娠 (0.29%, 165/56,560) よりも高かった。

トリソミーの偽陽性症例は、21、18、13 トリソミーにおいてそれぞれ 9、18、27 例であったが、いずれも胎児の正常核型が羊水穿刺によって確認された。偽陰性の症例 (n = 3) の胎児成分比 (%) は、他の女性と比較して低かった (表 2)。偽陽性 55 例のうち 18 例のトリソミー-18 症例の 3 例 (16.7%) は、出生後の胎盤の染色体分析により胎盤モザイク (CPM) が確認された。NIPT 結果が偽陰性となった女性は 3 名で、21 トリソミーが 2 例、18 トリソミーが 1 例であった。うち 1 例が産後の胎盤の染色体分析により、CPM (46,XX (70%), 47,XX,+ 21 (30%)) であった。

(3) NIPT の結果がもたらす女性への影響と遺伝カウンセリングのあり方について検討した。検査一年後のアンケートからは、結果によって様々な心理的影響があることがわかった。陰性となっても予期的不安が増大することがわかり、このことは discordant な結果の場合にはさらにその不安が増大することが推測された (Yotsumoto et al. BMC Pregnancy and Childbirth, 2020)。discordant な結果についての検査前の十分な情報提供と結果のもたらす影響をふまえたフォロー体制が必要と考えられた。

- (4) MPS 法による discordant な結果（判定保留，偽陽性，偽陰性）の背景因子について解析を行った結果，様々な母体と胎児の病態が影響していることが明らかとなった．国内のエビデンスに基づいた情報提供が可能となり，また，その情報を検査前に十分に説明することは重要であり，discordant な結果となった女性に対しては慎重なフォローが必要であることが示唆された．しかしながら我々の現在のデータは，偽陽性の結果に CPM，特に 18 トリソミーを有する傾向があるが，CPM により新生児転帰が影響されるかなどについての明らかな結果は得られなかった．国内で NIPT を受検する妊娠中の女性は，判定保留または偽陽性/陰性の結果が低いため，データ数を増やし今後もゲノムワイドな分析を続けていくことが必要と考えられる．

#### 引用文献

1. Sago H, Sekizawa A; Japan NIPT consortium. Nationwide demonstration project of next-generation sequencing of cell-free DNA in maternal plasma in Japan: 1-year experience. *Prenat Diagn.* Apr;35(4):331-6. 2015
2. Yotsumoto J, Sekizawa A, Suzumori N, Yamada T, Sago H, et al: Japan NIPT Consortium. A survey on awareness of genetic counseling for non-invasive prenatal testing: the first year experience in Japan. *J Hum Genet.* 2016 Sep 8. 61(12) 995-1001
3. Suzumori N, Ebara T, Yamada T, Samura O, Yotsumoto J, Sekizawa A, et al; Japan NIPT Consortium. Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma is affected by fetal trisomy. *J Hum Genet.* 2016 Mar 17. doi: 10.1038/jhg.2016.25.
4. Yotsumoto J, Inoue S, Sekizawa A, Sago H, et al: Qualitative investigation of the factors that generate ambivalent feelings in women who give birth after receiving negative results from non-invasive prenatal testing. *BMC Pregnancy and Childbirth.* 2020 Feb 17;20(1):112. doi: 10.1186/s12884-020-2763-z.
5. Suzumori N, Sekizawa A, Yotsumoto J, et al  
Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma for the prediction of hypertensive disorders of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018 May;224:165-169. doi: 10.1016/j.ejogrb.2018.03.048. Epub 2018 Mar 26.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzumori N, Sekizawa A, Samura O, Yotsumoto J, Sago H, et al	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 Classification of factors involved in nonreportable results of noninvasive prenatal testing (NIPT) and prediction of success rate of second NIPT	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prenatal Diagnosis	6. 最初と最後の頁 100-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pd.5408	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 Suzumori N, Sekizawa A, Yotsumoto J, et al	4. 巻 224
2. 論文標題 Fetal cell-free DNA fraction in maternal plasma for the prediction of hypertensive disorders of pregnancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol	6. 最初と最後の頁 165-169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejogrb.2018.03.048	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 Yotsumoto J, Inoue S, Sekizawa A, et al	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Qualitative investigation of the factors that generate ambivalent feelings in women who give birth after receiving negative results from non-invasive prenatal testing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Pregnancy and Childbirth	6. 最初と最後の頁 112-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12884-020-2763-z	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 四元淳子
2. 発表標題 産婦人科領域における遺伝カウンセリング
3. 学会等名 第70回日本産婦人科学会学術講演会（仙台 国際センター）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四元淳子
2. 発表標題 遺伝性乳がん卵巣がんとNIPTの遺伝カウンセリング
3. 学会等名 第59回 母性衛生学会（新潟）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四元淳子
2. 発表標題 出生前検査の遺伝カウンセリングにおける基本的態度と家族歴聴取
3. 学会等名 第4回 日本産科婦人科遺伝子診療学会学術講演会（東京）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関沢 明彦
2. 発表標題 NIPTにおける疑陽性・偽陰性例の病態についての検討
3. 学会等名 第25回日本胎盤学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Junko Yotsumoto
2. 発表標題 A survey on the ambivalence among women who gave birth after receiving a negative result on non-invasive prenatal genetic testing .
3. 学会等名 ISPD 2019 Sep, Singapore (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	関沢 明彦  (Sekizawa Akihiko)  (10245839)	昭和大学・医学部・教授    (32622)	