

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15690

研究課題名(和文)メンデル遺伝病に対する無侵襲出生前遺伝学的検査の臨床応用

研究課題名(英文)Clinical application of noninvasive prenatal testing for Mendelian disorders

研究代表者

野田 佳照(YOSHITERU, NODA)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：10767338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在NIPTのメンデル遺伝性疾患への応用はほとんど進んでいないが、主な原因として母親と胎児由来ゲノムDNAを高精度に区別することができないためと考えられる。本研究では、母親と胎児由来ゲノムDNAを高精度に区別する手法の開発と、重篤なメンデル遺伝性疾患保因者夫婦に対し臨床応用が可能な非侵襲性出生前診断法の確立を目指し、複数の SNP 領域に対するmultiplex PCRを行った後に次世代シーケンサーによるSNP解析を行う方法を用いて、母体cfDNA中の胎児由来DNAの存在を確認する新規手法を確立した。このシステムの確立により、今後重篤なメンデル遺伝性疾患保因者夫婦に対する臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出生前診断において、無侵襲的出生前遺伝学的検査(NIPT)が注目されている。NIPTとは、母体血漿中に含まれている僅かな胎児由来のcell-free DNA(cfDNA)を使用して遺伝学的検査を行う方法であり、日本国内では、21番染色体トリソミーなどの染色体異常性の診断のみが臨床応用されている。現在NIPTによる出生前診断は急速に全世界に広がっているが、一方でメンデル遺伝性疾患を対象にしたNIPTは未だ研究段階で実用に至っていない。本研究は、これまで基礎研究レベルであったNIPTのさらなる展開が実現し、社会に大きく貢献されることが期待される新しい研究内容といえる。

研究成果の概要(英文)：Currently, the application of NIPT to Mendelian disorders has hardly progressed. It is assumed that the main cause is that it is not possible to distinguish between maternal and fetal genomic DNA with high accuracy. In this study, we aim to develop a method for distinguishing genomic DNA derived from mothers and fetuses with high accuracy, and to establish a noninvasive prenatal diagnostic method that can be clinically applied to couples who carry severe Mendel hereditary diseases. We have established a new method for confirming the presence of fetal-derived DNA in maternal cfDNA by using the method of performing SNP analysis with a next-generation sequencer after performing multiplex PCR on multiple SNP regions. The establishment of this system is expected to be clinically applied to couples who are carriers of serious Mendelian disorders in the future.

研究分野：Obstetrics and gynecology

キーワード：NIPT cell-free DNA(cfDNA)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

出生前診断は、妊娠成立以降分娩までに行われる胎芽、胎児に対する診断を指すが、出生前診断として胎児の遺伝学的検査を行うには、羊水、絨毛、胎児血などの胎児成分を採取する侵襲的な検査が必要であった。しかし、近年は母体血を用いた無侵襲的な出生前遺伝学的検査である NIPT が注目されている。NIPT は母体血漿中に存在する胎児由来 cfDNA を検出・解析する方法であり、その存在が確認されたのは1997年であった（Lo YM et al. Am J Hum Genet 1998）。母体血漿中には、母親由来 cfDNA とともに10%程度の胎児由来 cfDNA が混在し、妊娠7週齢程から検出可能であり、その割合は妊娠週数に伴い増加し、分娩後にすみやかに消失すると報告されている（Lo YM et al. Am J Hum Genet 1999）。その発見以降、PCR 法により母体が持たない遺伝子をターゲットにした胎児の遺伝子診断が行われてきたが、胎児染色体異常の正確な診断は難しいと考えられてきた。しかし、近年の遺伝子解析技術が進歩し、2008年に次世代シーケンサーを用いた胎児染色体異常検査が報告されると、2010年には米国で臨床応用に至り、本邦でも2013年4月より臨床研究として開始されるようになった。

現在 NIPT による出生前診断は、日本国内では21番染色体トリソミーなど染色体異数性の診断のみが臨床応用されている。一方で、メンデル遺伝性疾患を対象にした NIPT は未だ研究段階で実用に至っていない。そこで本研究では、重篤なメンデル遺伝性疾患保因者夫婦に対し、高精度で汎用性が高く、また短時間で結果の得られる NIPT 法の確立を考案するに至った。

## 2. 研究の目的

出生前診断において、無侵襲的出生前遺伝学的検査(NIPT)が注目されている。NIPTとは、母体血漿中に含まれている僅かな胎児由来のcell-free DNA(cfDNA) を使用して遺伝学的検査を行う方法であり、日本国内では、21番染色体トリソミーなどの染色体異数性の診断のみが臨床応用されている。現時点で、メンデル遺伝性疾患への応用はほとんど進んでいないが、その主な原因として、母親と胎児由来ゲノムDNAを高精度に区別することができないためと考えられる。そこで本研究では、母親と胎児由来ゲノムDNAを高精度に区別する手法を開発するとともに、重篤なメンデル遺伝性疾患保因者夫婦に対し臨床応用が可能な非侵襲性出生前診断法の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究はメンデル遺伝性疾患を対象にしたNIPTによる出生前診断法の確立を目的とし、研究期間内に以下のことを明らかにする。

(1)母体血漿中に含まれる胎児由来cfDNAの割合は10%前後であるため、従来のサンガーシーケンスでは検出が困難であることが予想される。そのため本研究では、次世代シーケンサー(NGS)を用いて該当する変異箇所をdeep sequenceし、低頻度のアリル変異の検出方法を確立する。一般的にNGSのエラー率は0.1%程とされており、該当の変異箇所の前後のエラー率と比較することで、変異の有無を明らかにすることができると考えている。胎児由来cfDNAは母体由来cfDNAと比較してサイズの短いことが知られているため、サイズ分画によりcfDNAを濃縮する。

(2)常染色体劣性遺伝やX連鎖性疾患で、母親が同じ原因遺伝子変異を有している場合は、胎児における変異の同定は非常に困難であることが予想される。これまでの報告で母体血漿中に含まれるcfDNAのサイズ分布を調べると、胎児由来cfDNAでは母親由来cfDNAよりもサイズが小さいことが示されているためこの特徴を利用し、母体血漿から抽出したcfDNAから、胎児由来cfDNA

を濃縮し、モザイク率を高めてからdeep sequenceすることにより、胎児の遺伝子変異の有無を明らかにする。一方、cfDNAは断片化が進んでおり、cfDNAやcfDNA由来のPCR産物を断片化し、アダプター配列のライゲーションを行うのは難しい。そのためPCRプライマーの5'末端にシーケンス用のアダプターを付加したtailed PCRを用いて、目的遺伝子領域の増幅を行う。アダプター配列が付加されたPCR産物をNGSでdeep sequenceし、変異箇所を数万回繰り返し読むことで低頻度モザイクの検出を試みる。

(3)検査精度の向上のために、疾患の遺伝子変異のPCRと同時に、複数のcommon SNPを含む領域をmultiplex PCRで増幅後にシーケンスし、全リード数から各SNPのマイナーアレル頻度(minor allele frequency = MAF)の割合を算出するとともに、各SNPの遺伝子型が母親:胎児=AB:ABと母親:胎児=AB:AAとなるMAFの閾値を決定する。その後、原因遺伝子変異のMAFの割合が、母親:胎児=AB:ABと母親:胎児=AB:AAのどちらのグループに属するか決定し、母親の遺伝子変異が胎児に遺伝しているかを決定する。本研究では常染色体劣性遺伝、もしくはX連鎖性疾患の保因者妊婦の血漿を同時に収集し、cfDNAを抽出後に、tailed PCRによりcommon SNP領域と原因遺伝子変異の領域を増幅し、NGSで解析する。また、出産に至った児の表現型、もしくは遺伝子型からNIPTの結果について判定する。

#### 4. 研究成果

(1)母体血漿中に含まれる胎児由来cfDNAの割合は10%前後であるため、従来のサンガーシーケンスでは検出が困難であることが予想される。そのため次世代シーケンサー(NGS)を用いて該当する変異箇所をdeep sequenceし、低頻度のアレル変異の検出方法を確立する。一般的にNGSのエラー率は0.1%程とされており、該当の変異箇所の前後のエラー率と比較することで、変異の有無を明らかにすることができると考えている。胎児由来cfDNAは母体由来cfDNAと比較してサイズの短いことが知られているため、サイズ分画によりcfDNAを濃縮する。申請者が行った予備的実験では、サイズ分画前には15.3%だったcfDNAの割合が、サイズ分画後には36.5%に増加することが確認された(N=3)。

(2)検査精度の向上のために、母体血cfDNAに胎児由来DNAが含まれている事を証明するため、両親の血球由来DNAと母体血漿から抽出したcfDNA(各20組)を用いて、マイナーアレル頻度が約50%の30箇所のSNPを選定し、同領域のmultiplex PCRを行った後に次世代シーケンサーによるSNP解析を行い、選定したSNPの少なくとも1箇所以上で母親と異なる父親由来のアレルタイプを検出することで胎児由来DNAの有無を確認するシステムを考案し、検証実験を行った。検証を行った夫婦20組のすべてにおいて、母親と異なる父親由来のアレルタイプのSNPを同定した。

(3)検査精度の向上のために、母体血cfDNAに胎児由来DNAが含まれている事を証明するため、両親の血球由来DNAと母体血漿から抽出したcfDNA(各20組)を用いて、マイナーアレル頻度が約50%の30箇所のSNPを選定し、同領域のmultiplex PCRを行った後に次世代シーケンサーによるSNP解析を行い、選定したSNPの少なくとも1箇所以上で母親と異なる父親由来のアレルタイプを検出することで胎児由来DNAの有無を確認するシステムを考案し、検証実験を行った。検証を行った夫婦20組のすべてにおいて、母親と異なる父親由来のアレルタイプのSNPを同定した。

今回の検討から、複数のSNP領域に対するmultiplex PCRを行った後に次世代シーケンサーによるSNP解析を行う方法を用いて、母体cfDNA中の胎児由来DNAの存在を確認する新規手法が確立

された。このシステムの確立により、今後重篤なメンデル遺伝性疾患保因者夫婦に対する臨床応用が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Yoshiteru Noda                                                                                                     | 4 . 巻<br>-       |
| 2 . 論文標題<br>Potentially effective method for fetal gender determination by non-invasive prenatal testing for X-linked disease | 5 . 発行年<br>2019年 |
| 3 . 雑誌名<br>Congenital Anomalies                                                                                               | 6 . 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/cga.12302                                                                                  | 査読の有無<br>有       |
| オープンアクセス<br>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<br>-        |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|