

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590638

研究課題名（和文）

オリゴ DNA アレイ CGH 法による 25 種の先天異常症候群の遺伝子内欠失の網羅的解析

研究課題名（英文）

Detection of intragenic deletions by array CGH analysis

研究代表者

小崎 健次郎 (KOSAKI KENJIRO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30234743

研究成果の概要（和文）：遺伝子診断では、翻訳領域内の各エクソン領域を PCR 増幅し、その塩基配列を直接シーケンシング法により決定することが一般的である。本研究では、シーケンシング法では検出できない遺伝子異常である、複数エクソンの欠失を検出する方法の確立を目指した。アレイ CGH 法により標的遺伝子の各エクソンのコピー数の変化の検出を試みた。これまでの方法では検出し得なかった患者の変異を同定することが出来た。

研究成果の概要（英文）：Currently, PCR sequencing is utilized for clinical genetic testing of congenital malformation syndromes. However, PCR sequencing is unable to detect deletion or duplication spanning multiple exons. In the present study, array CGH method was applied successfully to detect deletion spanning multiple exons. The present method will complement widely used genetic testing based on Sanger sequencing or next generation sequencing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：臨床遺伝学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：遺伝子、アレイ、検査の感度、先天異常症候群

1. 研究開始当初の背景

診療での利用を前提とした遺伝子診断では、翻訳領域内の各エクソン領域を PCR 増幅し、その塩基配列を直接シーケンシング法によ

り決定し、各エクソン内の点変異・欠失・挿入を検出することが一般的である。しかし、シーケンシングに基づく方法では、感度が 100%には達せず、偽陰性と考えられる症例が

少なからず存在し、遺伝子検査を臨床応用する上で問題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、シーケンシング法では検出できない遺伝子異常である「複数エクソンを含む遺伝子内欠失」を網羅的かつ高感度に検出しようとするシステムの作成を試みた。

3. 研究の方法

先天異常症候群 10 疾患 (15 遺伝子) の患者のうち、エクソン内の点変異・欠失・挿入が同定されていない患者を対象とし、患者・両親からインフォームドコンセントを得た後、QIAGEN 社の QIAamp DNA Blood Midi Kit を用いて全血からゲノム DNA を抽出し、オリゴ DNA アレイ C G H 法による再解析を行った。10 の古典的な先天異常症候群の原因遺伝子各エクソンに 10~20 個程度のプローブを配置するようにカスタムオリゴ DNA 作成ウェブサイト、eArray (アジレント社) をもちいて設計をした。60 塩基程度の合成 DNA プローブをスライドグラス上に配置した。患者に由来するゲノム DNA および正常対象者由来ゲノム DNA を制限酵素処理により 200~500bp に断片化後、患者に由来するゲノム DNA を Cy5、正常対象者由来のゲノム DNA を Cy3 でラベル化し精製・濃縮を行った。ラベル化した患者由来サンプルと正常対象者由来サンプルを混合し、アレイ上で 65、24 時間のハイブリダイゼーションを行った。その後、マイクロアレイスキャナーにて、スキャンし、これを専用ソフトウェア Feature Extraction (アジレント社) にて数値化した後、各遺伝子のゲノムコピー数を解析した。欠失範囲が小さい場合には病的意義を決めることが婚案である場合ば少なくない。この

場合、患児に認められたコピー数異常を両親のいずれにも認めない場合に異常と判断した。

慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受けて研究を実施した。

4. 研究成果

古典的な先天異常症候群の原因遺伝子およびその周辺領域に約 6 万プローブを密に配置することが出来た。(図 1) また、設計した領域に対して、特異的なハイブリダイゼーションが得られた。ハイブリダイゼーションが得られた領域は十分に稠密であり、当該領域のコピー数を正確に算定することができた。(図 2)

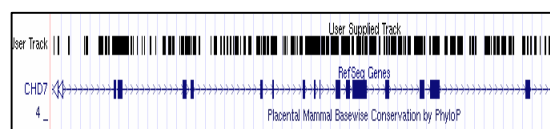


図 1. プローブ密度例
上段が今回作成したプローブ群
下段が CHD7 遺伝子のエクソンの配置

CHARGE 症候群を含む複数の先天異常症候群について、検査感度の向上が得られた。本研究により遺伝性疾患の遺伝子診断の検査感度が 100% に近づくことが期待される。対象とする遺伝子数を増やすことが必要であることから、マイクロアレイの高密度化にあわせ、ハプロ不全 (遺伝子欠失) により発症することがこれまでに知られている約 400 個の遺伝子を含むシステムの構築を進めた。

図 2 に Sotos 症候群の事例を示す。Sotos 症候群の大部分は遺伝子の点変異によって発症し、シーケンシング法によって診断が可能である。一方、一部の Sotos 症候群の患者は染色体欠失によって発症する。典型堤には欠失の大きさはメガベース (100 万塩基)

の単位である。このような場合には、BAC(バクテリア人工染色体)由来のプローブDNAを用いたFISH検査が行われる。BACに含まれるヒトDNA配列の大きさは、120kb~150kbである。したがって、この大きさより小さい欠失が検出できないことがこれまで問題であった。図2に示症例では、欠失範囲は73.5kbであり、FISHでは検出が不可能と考えられる。本研究で開発した方法によって、従来不能であったサイズの遺伝子の異常を検出できるようになったと云える。

理想的には、単一のアッセイ法でDNA配列の変化という定性的な変化と、複数エクソンを含む欠失というコピー数の変化(定量的な変化)を同時に検出できることが望ましい。今後、PCRシーケンシング法に変わって、次世代シーケンサー(第2世代)が利用されるようになると期待される。第2世代の次世代シーケンサーでは、複数エクソンにわたる欠

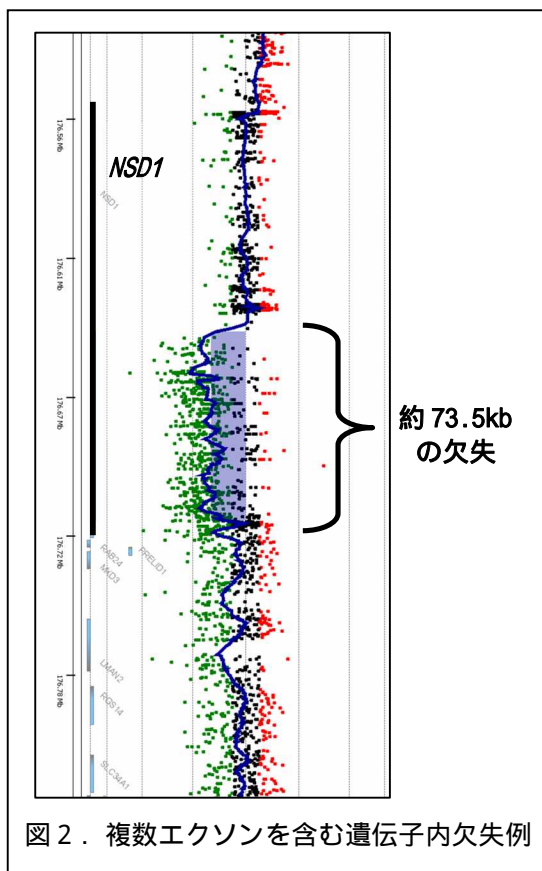


図2. 複数エクソンを含む遺伝子内欠失例

失を検出する事は出来ないが、第3世代次世代シーケンサーは欠失領域内の両端をつなぐ断片(いわゆる junctional fragment)を検出する事ができると期待される。しかしながら、現時点では次世代シーケンサーを用いて、染色体領域のコピー数の異常を検出する事はできない。すなわち次世代シーケンサーで異常を検出出来なかった場合、本研究で開発したごときマイクロアレイを用いた解析法が必要となる。本研究で開発した方法と新規技術の感度の比較が今後の課題と考えられる。

本研究で開発した方法は特に、非家族性(散發性)に発症し、常染色体優性遺伝疾患(つまり本来2コピー存在する遺伝子が1コピーとなることによって発症する疾患)の診断に有効であると期待される。シーケンシング法によって異常を認めない場合には、実施することが望まれる検査法である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Takenouchi T, Nakazawa M, Kanemura Y, Shimozato S, Yamasaki M, Takahashi T, Kosaki K. Hydrocephalus with Hirschsprung disease: Severe end of X-linked hydrocephalus spectrum. American Journal of Medical Genetics、査読有、158巻、2012、812-815

Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K, Kosaki K. Ophthalmic features of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. 査読有、158巻、2012、514-518

〔学会発表〕(計1件)

小崎 健次郎

日本人類遺伝学会 第56回大会「診療利用
の段階を迎えたアレイ CGH：遺伝相談にお
ける活用のポイント」2011年11月12日
幕張メッセ 国際会議場

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小崎 健次郎 (KOSAKI KENJIRO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30234743

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし