

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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591210

研究課題名（和文）羊水染色体検査の限界をMLPA法、DNAアレイ法はどこまで克服できるか。

研究課題名（英文）How far can the MLPA method and the DNA array method do the limit of a water chromosomal test in conquest

研究代表者

尾崎 守 (OZAKI MAMORU)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：50319068

研究成果の概要（和文）：

MLPA法は実際に使用してみると正常コントロールに5テスト分の試薬を必要とし、1件の検査には5テスト分の試薬が必要となった。コスト的にはDNAアレイ法と変わらなかった。DNAアレイ法は、予想していた妊娠後期における症例の検査承諾を期待していたほど得ることはできなかった。妊娠中期の羊水検査でマーカー染色体（由来不明過剰染色体）が認められた症例では承諾が得られ、3症例で起源が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

When the MLPA method really used it, We needed the reagent for 5 tests for normal control, and the reagent for 5 tests was necessary for one inspection. We did not change with the DNA array method for the cost. We were not able to obtain the DNA array method so as to have expected the inspection consent of the case in the late stage of the pregnancy that We expected. Consent was provided in the case that a marker chromosome (origin ignorance accessory chromosome) was recognized by amniotic diagnosis of the second pregnancy trimester, and the origin became clear in 3 cases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：出生前診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体検査では、高精度分染法でも 10 メガベース未満の微細な構造異常は検出できないといわれている。時間的制約の中で実施される羊水染色体検査では、通常は ICSN 2009 (An international system for cytogenetic nomenclature 2009) で示されているハプロイドセット 550 バンドレベルの G 分染法で解析されるのが限界かと考えられている。高精度分染法が 850 バンドレベルの G 分染法であるから、羊水染色体検査の異常検出限界は、10 メガベースに遠く及ばない。

(2) 一方、先天異常分野では多発先天奇形および精神発達遅滞 (multiple congenital abnormalities and mental retardation 以下 MCA/MR) の原因究明に、まず染色体検査が実施されているが、1990 年代になり各種の分子生物学的解析法が登場し、従来染色体分析では検出できなかった 10 メガベース未満の微細な構造異常 (欠失や重複) が次々と検出、報告されるようになってきた。染色体の短腕、長腕末端部の構造異常の検出には全サブテロメア領域の FISH 法が大きく貢献した。その結果 Cryptic reciprocal translocation という通常の染色体分析では検出できなかった均衡型相互転座の存在が明らかとなった。現在は、簡便な全サブテロメア M L P A (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法に移行しつつある。

(3) このような解析法の進歩により MCA/MR 患者の検査では、染色体分析の結果だけで原因不明としてはならない。少なくともサブテロメア領域の異常の有無を検索することが必要とされている。

DNA アレイ法も 1990 年代に登場し、ゲノムのコピー数や遺伝子発現の解析にその威力

を發揮してきた。とりわけ CGH アレイや SNPs 解析用アレイによって、健常人では 2 コピーと考えられてきたゲノムが、多くの領域で染色体コピー数の変化 (CNV、Copy Number Variation) が認められることが判ってきた。CNV の中には、benign なものもあり疾患に直接関与していないと考えられているものも多くあるが、両親には検出されず、児に *de novo* の CNV が認められるものもあり、その領域には疾患と密接に関連する遺伝子が認められるようになってきた。異常なコピー数異常から新しい疾患が認められるようにもなってきた。このような pathogenic な染色体コピー数異常を検出することによって、上記の MCA/MR ではサブテロメア領域以外に 10~20% 程度の患者に、その疾患に密接な関連が示唆される pathogenic な CNV が認められている。

2. 研究の目的

MCA/MR 患者の検査では、染色体分析の結果だけで原因不明としてはならない。少なくともサブテロメア領域の異常の有無を検索することが必要とされている羊水染色体検査においても、超音波検査で異常所見が認められる症例には、検出できないサブテロメア領域の異常をもつ症例が存在すると予想される。

DNA アレイ法も 1990 年代に登場し、ゲノムのコピー数や遺伝子発現の解析にその威力を發揮してきた。とりわけ CGH アレイや SNPs 解析用アレイによって、健常人では 2 コピーと考えられてきたゲノムが、多くの領域で染色体コピー数の変化 (CNV、Copy Number Variation) が認められることが判ってきた。CNV の中には、benign なものもあり疾患に直接関与していないと

考えられているものも多くあるが、両親には検出されず、児に *de novo* の CNV が認められるようになり、その領域には疾患と密接に関連する遺伝子が認められるようになってきた。コピー数異常から新しい疾患が認められるようにもなってきた。このような pathogenic な染色体コピー数異常を検出することによった。上記の MCA/MR では、サブテロメア領域以外に 10～20% 程度の患者に、その疾患に密接な関連が示唆される pathogenic な CNV が認められている。本研究の目的は、出生前診断における羊水染色体検査では異常検出に限界があり、染色体異常を強く疑うような超音波検査の所見がある症例でも、染色体構造異常を検出することができず、正常核型と報告せざるを得ないことが度々ある。一方申請者らは、新しいゲノム解析技術、MLPA 法や DNA アレイ法を用い、染色体分析では検出できなかった微細な異常の検出に成功した。これらを羊水染色体検査に応用してその限界をどの程度克服できるか検討することである。

3. 研究の方法

対象は、羊水染色体検査を依頼された症例から超音波検査で異常所見が指摘されるも、染色体異常が認められなかった症例を対象とする。対象となる症例の培養羊水細胞からゲノム DNA を抽出する。1 次スクリーニングとして全サブテロメア構造異常を解析する MLPA 法を実施する。2 次スクリーニングとして、1 次スクリーニングで異常が認められなかった症例に対して、CNV 検出用 DNA アレイ法を実施して、pathogenic な CNV の有無を検討する。

4. 研究成果

妊娠後期の超音波断層検査によって染色体異常が疑われるも、通常の羊水検査では異常を検出できない症例でこの DNA アレイ法が活躍すると予想していたが、この週数では妊娠を中断することができないため、異常が検出されても出産する選択しか残っていないなどの理由で検査の同意を得ることは困難であった。これは、予想できなかったが胎児が何らかの異常をもっていると聞かされたカップルの心情は複雑でこの時期に、追加検査のむずかしさを知った。出生後に両親が落ち着きを取り戻し、児を受け入れできるようになってからこの DNA アレイ法に同意できる可能性があると考えた。むしろ、妊娠 16 週以降に行われる通常の羊水検査の由来不明の過剰染色体（マーカー染色体）が認められた場合、マーカー染色体の由来を明らかにし、表現型への影響を判断が必要な症例では、検査の同意はスムーズに行われ、16 番由来が 1 件、15 番染色体由来 3 件認められた。しかし、DNA アレイ法の試薬は高額なところが、利用しにくい点である。価格が下がれば、もっと利用しやすくなるを考える。また、MLPA 法と同様の分析能力をもつも、より安価な検査法と考えられるデジタル PCR 法の応用を次の課題とする。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 守 (OZAKI MAMORU)
金沢医科大学・総合医学研究所・助教
研究者番号：50319068

(2) 研究分担者

石垣 靖人 (ISHIGAKI YASUHITO)
金沢医科大学・総合医学研究所・准教授
研究者番号：20232275

(3) 連携研究者

新井田 要 (NIIDA YO)
金沢大学・医学部・准教授
研究者番号：40293344