

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592424

研究課題名(和文)非侵襲性出生前診断法の開発を目指した妊娠初期母体血中の胎児細胞分離技術の確立

研究課題名(英文)The study aiming at non-invasive prenatal diagnosis: establishment of fetal cell separation from peripheral blood of pregnant women during the first trimester.

研究代表者

孫田 信一(Sonta, Shinichi)

愛知医科大学・公立大学の部局等・客員研究員

研究者番号：00100165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠初期の女性の末梢血から密度勾配液を用いた遠心分離を繰り返して胎児細胞を濃縮した。この胎児細胞リッチな細胞液を、胎児細胞膜特異抗体を内壁に塗布したチャンバーに入れて胎児細胞を選択的に付着させて回収を図った。既知の抗体のほかに胎児細胞膜に特異性を有するナノ抗体については、有用な情報は入手できなかった。また、胎児nRBC細胞のFACSによる分離法も検討した。これらの方法で濃縮、分離した細胞のスライド標本で、胎児nRBC細胞を同定した。その細胞を用いて、各染色体を識別するプローブを用いたFISH法で胎児細胞の染色体構成を確認した。本研究の完成は、胎児染色体の「確定診断」を可能にする。

研究成果の概要(英文)：Due to try to sort out fetal cells from maternal blood in the pregnant woman, the density gradient centrifugation was repeated. The fluid with rich fetal cells was put in the culture chamber which applied the fetal cell-specific antibody. The fetal cells were adherent partially by this method. In addition to the known antibody, we couldn't get useful information about nano antibodies in particular in fetal cells. The dissociation procedures of fetal nRBCs by FACS was also considered. The slide preparations were made with cells concentrated by these methods. Fetal nRBCs were identified by the morphological specificity. The chromosome construction of these fetal cells was confirmed by FISH using probes which is able to distinguish each chromosome. Completion of the study may enable "prenatal diagnosis" of fetal chromosomes.

研究分野：臨床細胞遺伝学

キーワード：染色体異常 トリソミー 出生前診断 非侵襲性検査

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の結婚年齢の上昇などに伴う出産年齢の高齢化は、その胎児が染色体異常などの遺伝性疾患に罹患する確率を高める結果になっている。この10数年間において、国内の総出生児数がおよそ半減しさらに減少傾向にあるにもかかわらず、例えば染色体異常症の代表疾患であるダウン症候群(21トリソミー)の出生推定数は、2006年以降はむしろ増加していると推定されている(Kajii, T., 2008)。その理由が高齢妊娠の急激な増加のためである。最近の高齢妊娠の割合は全妊娠のおよそ2割に達している。ご存知のようにダウン症候群の出生率は、女性の出産年齢に大きく関わっている(Hook, E. B. and Porter, I. H., 1977)。

(2) 一方、欧米諸国では高齢妊娠女性などにおける出生前診断の実施率がかなり高く、欧米諸国ではその実施率が8~9割を超えているところもある。これに対して、日本国内では、35歳以上を高齢妊娠とみなした場合の出生前診断の実施率は対象者の2割弱しかなく、この実施率はここ10年ほどほぼ横ばい状態でその増加はほとんどないと見られている(Kajii, T., 2008)。

(3) 国内の出生前診断の低実施率は種々の理由による。出生前診断のための羊水穿刺によって起こる感染や流産等のリスクが0.3~1.0%で、絨毛組織採取ではさらに高く2%ほどと言われており、このリスクが出生前診断の受診を躊躇させるもう一つの大きな理由になっていると思われる。したがって、非侵襲性の出生前染色体・遺伝子診断法の開発はきわめて重要となっている。この非侵襲性の出生前診断法の開発は国際的にも強く望まれており、妊娠初期の母体の末梢血から胎児細胞を分離する技術の開発は極めて意義のある研究と考えられている。

2. 研究の目的

従来の研究によって、妊娠母体血の血清中には胎児細胞由来の free DNA や RNA、また低頻度ではあるが胎児由来の細胞が確実に流れていることが知られている(Zhao X. X. et al., 2004; Raymond F. L. et al., 2010)。したがって、妊娠母体の末梢血を用いてこれら胎児の DNA や細胞を母体のそれと分離して得ることができれば極めて有用であり、それを応用すれば胎児の染色体・遺伝子異常について非侵襲的診断を可能にする。

これまで多くの研究者が出生前診断を目指してきた。特に、最新機器と手法を用いておもに血清中の free DNA や RNA による胎児遺伝情報の抽出が試みられ(Hill M. et al., 2010; Raymond F. L. et al., 2010)。現在も多くの研究機関や企業で取り組まれている。しかしながら、大量の母体組織由来 DNA と比較して胎児 DNA は極めて微量なこと、ま

た共存する母体組織の DNA 情報が胎児自身の情報の半分と共通することなどから、胎児情報のみを分離検出することが困難であり、母体血清中の free DNA や RNA を対象にした胎児遺伝情報解析法が未だに十分に開発されていない。これに対して、妊娠母体血中の胎児細胞の場合も確かに頻度は低いが、その細胞特性を利用すればそれを分離することが可能であり、少ない数の細胞であっても確実な診断が可能になる。

本研究の目的は、妊娠初期の母体血から胎児由来の細胞を分離し、胎児染色体・遺伝子情報を確実に取得する方法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 妊娠母体血中から胎児細胞の濃縮と分離

十分なインフォームドコンセントを得て協力の得られる妊娠初期(妊娠9~12週)の女性から末梢血各10mlの提供を受けて研究に当てる。

母体血中の有核赤血球(nRBC)は比較的頻度が高く、nRBCは母体血球と区別しやすい特性を持っているので、本研究ではまずこの胎児 nRBC を標的細胞にする。

定法により赤血球を遠心分離して除外する。必要があれば弱い低張液処理によって残存する赤血球を破壊することも試みる。

胎児有核赤血球 nRBC の濃縮：胎児 nRBC は成人の白血球などに比べて微妙に細胞比重が異なるので、厳密に調整した密度勾配の分離液を調整、開発し、それを用いて遠心分離を行い、胎児細胞を高密度に有する細胞集団を回収する。

胎児細胞の分離 (a):胎児細胞特異的な抗体を表面に塗布したチャンバーに胎児細胞リッチな液を入れてチャンバー壁に胎児細胞を付着させる。チャンバー内の母体細胞を洗浄して胎児細胞の回収を試みる。既知の抗体の中で胎児細胞特異性を示す抗体を用いる。(b):上記で胎児細胞を高濃度に濃縮した細胞群を用いて、蛍光色素で標識した胎児細胞特異的な抗体を細胞に吸着させ、FACSを用いて胎児 nRBC の分離法を検討する。

(2) 胎児細胞の特定

上記の方法で分離した細胞をスライドグラス上に伸展固定し、胎児 nRBC の形態学的特性を指標にして顕微鏡下で胎児 nRBC を特定する。

同様の細胞のスライドグラス標本を用いて、胎児細胞特異抗体を蛍光色素で標識し、これを probe にして in situ hybridization (FISH)法で解析を行い、胎児細胞を特定する。同じ細胞をスライドグラス上によく伸展させた標本を用いて、蛍光標識した胎児 nRBC に特異的に発現する mRNA を probe にした FISH 法による特定も試みる。

(3) 分離した胎児細胞の染色体解析

上記の方法で特定した胎児細胞について、各染色体の特定部位を標識する DNA などを probe にした FISH 解析を実施し、検出細胞が胎児細胞であること、さらに各細胞の染色体構成が判定できることを確認する。また、特定遺伝子由来の蛍光色素で標識した DNA を probe にして FISH 法を行い、胎児細胞の遺伝子構成について解析を試みる。

4. 研究成果

(1) 妊娠母体血中から胎児細胞の分離

本研究のために、十分なインフォームドコンセントを得て協力の得られる妊娠初期（妊娠 9～12 週）の女性 60 人から末梢血各 10ml の提供を受けて研究に当てることを目指した。しかし、研究を開始してまもなく、日本国内において母体血による出生前染色体検査（NIPT）が開始になったこと、研究の成果として協力者本人の胎児情報を提供できないことなどがあって十分な協力が得にくい状況があった。我々が目指す研究は「確定診断」に繋がる可能性の高い研究であることへの理解を得るように努めた。なお、この検体の不足分は培養細胞等を用いた研究によって補った。

標的にする胎児細胞：母体血中には文献的に幾種類かの胎児由来細胞が低頻度で流れていることが知られているが、有核赤血球（nRBC）は比較的頻度が高いこと、nRBC は健康成人の末梢血にはほとんど含まれないこと、nRBC はヘモグロビン F を多量に含有し形態的特徴を有することなど、母体血球と区別しやすい特性を持っているので、本研究ではこの nRBC を標的細胞にすることにした。

定法により赤血球と単球層を分離した。15mm 径の遠心チューブに抗凝固処理した血液をチューブに入れ、等量の 0.9% NaCl を加えて希釈後、Lymphoprep[™]を入れた別のチューブでこの希釈血液を重層し、遠心した。遠心後、検体と Lymphoprep[™]の境界面の層を回収した。弱い低張液処理によって残存する赤血球を破壊することを試みたが、細胞膜抗原や胎児細胞の特性をできる限り温存するには必ずしも適切ではないと思われた。

胎児 nRBC の濃縮：胎児 nRBC の比重に合わせ厳密に調整した密度勾配の分離液を検討した。市販の溶液（Lymphoprep、Ficoll-Paque Premium、Percoll その他）なども含めて密度勾配遠心に最適な分離液を調整した。これらを混合するなどして分離液を作成し、厳密に限定した比重の細胞を回収することが可能になった。しかし、最終的にこれらの方法だけでは必ずしも胎児有核赤血球 nRBC の密度を十分に上げることができなかった。これらの結果は、胎児有核赤血球 nRBC の比重にはある程度のばらつきがあり、厳密にするほどその密度境界から外れる胎児 nRBC が生じて、回収した細胞集団から漏れると考えられた。すなわち、密度勾配による遠心分離はある程

度の幅をもった細胞集団を回収する方法で行う方が良いと思われる。一方、密度勾配遠心法に用いる分離液も細胞膜抗原などの特性を失うことがないかを検討した。特に溶液の組成との関係で細胞特性が著しく低下すると思われる結果は得られず、この関係は明瞭にはならなかった。

胎児細胞の分離 (a)：胎児細胞により特異的な抗体を壁面に塗布したチャンバーにて得た胎児細胞リッチな液を入れて緩やかに振とうした。チャンバー壁に胎児細胞を付着させ、チャンバー内の母体血球を洗浄後、胎児細胞の回収を試みた。既知の抗体の中で比較的胎児 nRBC 特異性を有すると考えられる抗体（CD36、CD71 のほか）を用いて実施した。しかし、これらの抗体では胎児細胞を吸着するものの、母体由来細胞も依然として相当の割合で吸着した。これとは別に胎児 nRBC に特異性を有すると思われるナノ抗体の情報を ICB International, Inc. (San Diego, USA) 社の協力で提供を受ける予定であったが、胎児細胞特異的な抗体の選別が残念ながら不成功であった。

胎児細胞の分離 (b)：上記で胎児細胞を高濃度に濃縮した細胞群を用いて、蛍光色素で標識した胎児細胞特異的な抗体を細胞に吸着させ、FACS を用いて胎児 nRBC の分離する方法を検討した。FACS を用いる方法において胎児 nRBC の細胞特性をどのように使用するかが問題である。種々の角度から検討したが、実施には相当の経費を必要とするので、今後新たな研究として研究費の獲得を狙いたいと考えている。

(2) 胎児細胞の特定

上記の方法で分離した細胞をスライドガラス上に伸展固定し、胎児 nRBC の形態学的特性（核が良く染色される。核が比較的大きくて丸く、固定標本でも比較的丸い。細胞質も多く含む、など）を指標にして、顕微鏡下で胎児 nRBC の特定（同定）を行った。この特性のみで顕微鏡下で胎児 nRBC を検出するのはかなり労力を要する。最近の自動細胞検出装置（例えば、Carl-Zeiss, Cytogenetic Scan System）等を使用するとより効果的に検出が可能になると考えられる。

同じスライド標本を用い、胎児細胞膜特異抗体を蛍光色素で標識し、これを probe に用いて in situ hybridization (FISH) 法で胎児細胞を特定する試みでは、効率的な検出はできなかった。今後胎児細胞にさらに特異的な抗体の探索が必要である。これまでの研究で何種類かの mRNA プロブを用いて実施した実績によると、この方法による解析は有望である。今後、胎児細胞特異的 mRNA probe の作成を独自に取り組んでいく予定である。

(3) 分離胎児細胞の染色体解析

上記の方法で特定した胎児細胞について、市販されている Abbott 社の染色体 13、18、

21、X、およびYを含む各染色体の特定部位を標識するDNA probe (LSI, DEP) を用いてFISH解析を実施した。その結果、いくつかの胎児細胞でYシグナルを確認することができた。また、胎児細胞ではこれらの染色体構成が判定できることを確認した。

同様に市販の特定遺伝子由来のDNAをprobeにしてFISH解析を行い、胎児細胞の遺伝子構成についても解析を試みた。顕著なシグナルを示すprobeではシグナルは検出できたが、通常弱いシグナルを示すものについては回収した胎児細胞での確認が難しかった。

我が国でも非侵襲的出生前検査(NIPT)が漸く開始されたが、この検査はリスクを確率で示す検査であり、「確定診断」ではない。本研究の完成によって妊婦の母体血中に含まれる胎児由来の細胞を濃縮・分離できれば、胎児染色体の「確定診断」に繋がる。本研究はこの研究期間内に進展したが、さらなる継続が必要である。

<引用文献>

Kajii, T.: Predicted prevalence of Down syndrome live births in Japan, 1970-2006. *Am J Med Genet A*. 146A(11):1387-88, 2008.

Hook, E. B. and Porter, I. H. eds, *Population Cytogenetics: Studies in Humans*. Academic Press, Inc., New York, San Francisco and London, 1977.

Zhao, X. X., Suzumori, N., Ozaki, Y., Sato, T., Suzumori, K.: Examination of fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood for fetal gender determination. *Gynecol Obstet Invest*. 58(1):57-60, 2004.

Raymond, F. L., Whittaker, J., Jenkins, L., Lench, N., Chitty, L. S.: Molecular prenatal diagnosis: the impact of modern technologies. *Prenat Diagn*. 30(7):674-81, 2010.

Hill, M., Finning, K., Martin, P., Hogg, J., Meaney, C., Norbury, G., Daniels, G., Chitty, L. S.: Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet*. 80(1):68-75, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

孫田 信一 (SONTA, Shinichi)

愛知医科大学・公立大学の部局等・その他

研究者番号: 00100165

(2)研究分担者

黒川 景 (KUROKAWA, Kei)

日本赤十字豊田看護大学・看護学部・教授

研究者番号: 90399030

佐賀 信介 (SAGA, Shinsuke)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40144141

若槻 明彦 (WAKATSUKI, Akihiko)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90191717