

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11106

研究課題名(和文) 単一細胞解析のための、全ゲノム増幅技術の最適化の研究

研究課題名(英文) Optimization of whole genome amplification methods for single cell analysis

研究代表者

佐藤 卓 (SATO, Suguru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40383898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：着床前遺伝子診断の実際には、稀少なDNA量の遺伝子増幅の際に、例えば対立アリルの一方のみが増幅されないアレルドロップアウト現象の出現が知られ、誤診断の原因となる。現在までに利用可能な各種全ゲノム増幅技術(WGA)を比較した。その結果、WGAの違いによって、検出されやすい遺伝子変異が異なる事象が観察された。また、WGA毎に増幅されやすい遺伝子領域が異なり、それは、同一の遺伝子領域においてさえも、増幅のバイアスは観察された。いずれのWGAを採用しても、あらゆる遺伝子においてADOは観察される結果を得た。現時点では、MDA法が最も汎用性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単一遺伝子病のための着床前遺伝子診断は、今尚国内における実施数は多くないが、次世代シーケンサをはじめとする遺伝子工学技術やタンデムマススクリーニング事業の導入により、今後今まで原因不明とされた稀少遺伝子疾患や代謝異常症のための着床前診断の要望が増えてくると思われる。全ゲノム増幅法の導入により、より簡便にシングルセルPCRを実施できる効果が期待される。本研究では、家系毎に異なる遺伝子異常の変異に応じた全ゲノム増幅技術の選択の最適化のために、有用な情報を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is known that the allele dropout phenomenon, in which only one of the alleles is not amplified, occurs in the process of genome amplification from scarce amount of DNA and causes a misdiagnosis. We compared various whole genome amplification techniques (WGA) available. We observed that the mutations detected differed depending on the each WGA methods. Amplification bias was observed even in the same gene region. ADO was observed at any locus regardless of which WGA was adopted. At present, the MDA method is the most versatile.

研究分野：生殖医学

キーワード：着床前遺伝子診断 シングルセルPCR 全ゲノム増幅法 アレルドロップアウト現象

1. 研究開始当初の背景

着床前遺伝子診断(preimplantation genetic diagnosis: PGT)は、体外受精の過程で発生した胚の細胞の一部を生検・遺伝子診断し、うち非罹患と診断された胚を用いて妊娠・出産を目指す技術である。これは生殖補助医療(体外受精)および遺伝子工学技術のそれぞれの発展と融合がもたらしたものである。重篤な遺伝病患者を家系内にもち、次世代へ疾患が伝播するリスクをもつカップルに対して実施され、従来の出生前診断によってもたらされる罹患児の中絶を回避する選択肢となる。

欧州生殖医学会の PGT コンソーシアムのデータコレクションによれば、1997 年から 2009 年までに既に 33000 件を越える採卵周期数が報告されている。一方、わが国における PGD は、固有の生命倫理観に基づく実施上の多くの制約や、高度な技術を要する医療サービスであること等を背景に、実施施設は限定的である。特にメンデル病を対象とする PGD は、国内のほぼ全ての事例を一施設が担う現状がある。2004 年の申請者の研究グループによる国内初の PGD の実施以来、社会へ認知・浸透が進んでいる。次世代シーケンサー(NGS)の登場により、従来困難であった稀少疾患や common でない変異の同定が可能となりつつある。また、近年導入が進むタンデムマス・スクリーニングを契機として診断に至った代謝異常症家系で、実際に PGD を希望する事例も経験する。クライアントの増加・多様化の傾向は、今後さらに顕著になると考えられる。社会のニーズに応え、より多施設での PGD 実施を促進するために、簡便かつ高精度な診断システムの構築が望まれる。

PGD の技術開発とは、換言すれば単一細胞解析の挑戦である。メンデル病を対象とする PGD では、従来から 2 段階の PCR 法を基本技術としてきた。DNA 増幅の際に、対立アレルの一方のみが増幅されないアレルドロップアウト (allele drop out: ADO) 現象が出現することがある。ADO は稀少 DNA の増幅に特有の現象であり、PGT 実施上の誤診断の最大の原因となる。これは変異アレル特異的 PCR による直接診断のみでは、検査の安全域と引き替えに移植可能胚数が減少し、PGT アウトカムに影響することを意味する。ADO 克服のため、変異の直接診断に加え、変異遺伝子近傍の複数の遺伝子多型について、DNA 増幅・解析を行い、その情報に基づく間接診断(連鎖解析)を併用することで、胚の遺伝的状態をより正確に把握可能となるが、その際の multiplex PCR の条件設定は難解である。また、単一細胞解析におけるもう一つの問題点として、染色体マイクロアレイ解析(CMA)への対応が長く課題を残してきた。マイクロアレイ法自体は、主に原因不明の精神発達遅滞児、先天奇形児または自閉症スペクトラム等の診断のための成熟した技術であるが、CMA の PGD への応用にはテンプレート DNA の稀少性が問題であった。申請者のグループでは、これまで ADO および CMA への対応等の問題を克服する技術として、全ゲノム増幅法 (whole genome amplification: WGA) の導入を検討してきた。現在は、PGD の目的・使用する解析プラットフォームに応じて、異なる原理をもつ WGA を選択することで、実用のレベルに至っている。

NGS 技術の登場とその更なる高速化により、1 細胞の塩基配列情報を解読しようとする潮流がある。体細胞変異解析に基づくがんの進化の同定や、あるいはヒト配偶子のゲノム解析に基づく減数分裂時の相同組み替えの挙動について、また微生物研究の分野における報告がなされつつある。解析に先立つ WGA は PGT と共有するものであり、理想の WGA の追求は、PGT 分野にとどまらないゲノム医学の発展に大きな役割を果たすと考えられ、さらに新しい増幅法の開発・応用も期待される。本研究は、解析に先立って必須となる遺伝子増幅法のうち、現在利用可能な各種の全ゲノム増幅法を比較検討し、その反応条件の最適化を検討する。すなわち、塩基配列レベルでの忠実な複製能と、染色体コピー数解析のためのバイアスの少ない増幅を兼ね備える理想の WGA の条件を追求し、あらゆる単一細胞研究のための普遍的な first step として実用レベルに到達させる事を目指す。

2. 研究の目的

単一細胞・稀少細胞における遺伝子診断のために、各種の遺伝子増幅法を、検査の目的・解析法に応じて適切に選択することおよびその反応条件の最適化の検討を研究の目的とする。これは、家系内に重篤な遺伝病を有するカップルが、疾患を次世代に引き継ぐ事を予防する目的で実施される着床前遺伝子診断において、簡便・安価な診断系構築の基盤となる。また、例えば体細胞変異解析に基づくがんの進化の同定や、ヒト配偶子のゲノム解析に基づく減数分裂時の相同組み替えの挙動など、目的の異なる様々な単一細胞研究の解析プラットフォームの共有化を可能とし、分野を超えた効果もたらすと考えられる。

3. 研究の方法

1. 各 WGA(MDA・MALBAC・PicoPLEX および DOPLify)の反応時間・ステップ数を調べ、簡便性・迅

- 速性を比較した。
2. 各種 WGA を用いて、ヒト株化リンパ球の 1 細胞由来 DNA を遺伝子増幅し、産物の収量を測定した。チップ型ゲル電気泳動装置を用いて、各 WGA 産物の塩基長を測定した。
 3. 福山型筋ジストロフィー患者由来の株化リンパ球の 1 細胞を検体とし、各種の WGA を用いて DNA 増幅を行い、その産物に対して、以下の 1-3) の遺伝子における部位特異的 PCR 増幅と遺伝子解析を実施し、変異の検出率と ADO の発生率について調べた。
 - 1) 点変異(c.961G>A): Sanger 法
 - 2) SVA 挿入変異: ゲル電気泳動
 - 3) 遺伝子多型(D9S2105 と D9S2107): キャピラリー電気泳動
 4. ヒト株化細胞(MOLT-4)の 5 細胞から抽出された DNA を、各種の WGA 法にて増幅し、産物における増幅のバイアスについて、特に FKTN が存在する 9q31 領域におけるカバーの程度について比較した。NGS には、NovaSeq 6000 システム(Illumina)を採用した。

4. 研究成果

結果

1. いずれの WGA のプロトコル時間も、3 時間前後である事が分かったが、反応のステップ数は、MDA と DOPlify が最も少なく、MDA は開始 30 分でハンズオンの工程が終了するため、サーマルサイクラーにオーバーナイトでかけたまま翌日の作業が可能となるなどのメリットがあった
2. MDA による増幅にて、最も産物の収量が多く、およそ 10 マイクログラム以上の収量が得られた。MALBAC では、原理上は増幅産物に一本鎖 DNA を含むため、Qubit などの二本鎖の吸光度測定よりは、Nanodrop による吸光度測定が望ましいと考えられたが、陰性対照にも収量を認める現象が観察された。産物の塩基長では、MDA 産物が平均で 15kb と比較的長い塩基長を有することが判明した。PicoPLEX®による増幅産物は、平均して 600bp 程度と短い塩基長で分布した。
3. SVA の挿入変異の結果は、MDA で比較的高い検出率を示したものの、その他の WGA の検出率は、5 から 10%程度に留まり、本疾患のための PGT の実施上は実用には至っていない。D9S2105 および D9S2107 等の遺伝子多型における解析では、PicoPLEX の検出率が傑出して高い結果を得た。増幅が確認された WGA 産物に対しては、ADO の発生率について氏食べた結果、いずれの WGA を用いても、あらゆる遺伝子座・診断系において ADO は発生しうる事が分かった。
4. FKTN 遺伝子が存在する 9q31 領域に絞り込み、その増幅の領域について比較すると、MDA の網羅性の高さが判明した。これは、その他の遺伝子領域についても同様であった。

WGA 毎に増幅されやすい領域が異なる可能性があり、その検証には、NGS を用いた増幅領域の解析データの集積が必要と考えた。さらに、調べたい遺伝子における最終 PCR 産物の塩基長や、ダウンストリームの解析系との相性も念頭に WGA を選択する必要がある。PGT-M の実践上で、現時点で最も汎用性が高く、簡便な WGA は MDA の可能性が高いと思われたが、NGS 時代の PGT のための、さらに新たな WGA の登場も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 佐藤 卓, 佐藤 健二, 末岡 浩	4. 巻 2巻2号
2. 論文標題 【染色体検査】 単一遺伝子病に対する着床前遺伝子診断の現況	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本卵子学会誌	6. 最初と最後の頁 45-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 佐藤 卓, 佐藤 健二, 末岡 浩	4. 巻 71巻11号
2. 論文標題 【遺伝子診療の最前線-着床前,胎児から婦人科がんまで】 生殖医療 着床前遺伝子診断(PGD)の世界の現状	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 1044-1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.11477/mf.1409209188	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 眞木 順子, 末岡 浩, 佐藤 卓, 佐藤 健二, 水口 雄貴, 仙波 宏史, 田中 守
2. 発表標題 着床前遺伝子診断技術が示唆する卵子形成過程における変異ミトコンドリアDNAのskewed segregation現象
3. 学会等名 第62回日本生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 MAKI JUNKO, SUEOKA KOU, SATO SUGURU, IINO KOTARO, SENBA HIROSHI, MIZUGUCHI YUKI, SATO KENJI, NAKABAYASHI AKIRA, TANAKA MAMORU, AOKI DAISUKE
2. 発表標題 What is preimplantation genetic diagnosis strategy for germline mosaicism?
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 卓
2. 発表標題 骨形成不全症を対象疾患とする着床前遺伝子診断実施のための要件
3. 学会等名 第61回日本生殖医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 佐藤 卓
2. 発表標題 着床前遺伝子診断のための、シングルセル解析に向けた全ゲノム増幅法
3. 学会等名 第37回日本受精着床学会総会・学術講演会 ART FORUM'19 (招待講演)
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