

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591308

研究課題名(和文)

PCRを用いたゲノムワイドな遺伝子解析法の開発とその出生前診断への応用

研究課題名(英文)

Development of PCR-based whole-genome analysis method and the application for the prenatal diagnosis from maternal blood

研究代表者

松岡 隆 (MATSUOKA RYU)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20349111

研究成果の概要(和文)：

母体血中有核赤血球を用いた出生前診断法を確立するため、有核赤血球分離法の最適化・細胞レベルの遺伝子診断法の改良に取り組み、現状で最適な有核赤血球分離・回収・診断プロトコールが完成した。このプロトコールを用いた出生前診断の Clinical Trial として 97 例の羊水染色体検査を行う妊婦を対象に胎児の性別と 21 番及び 18 番染色体の数的な異常の診断を行った。その結果、平均 18 週の妊婦の血液平均 12mL から中央値 12 個(range:1-98)の有核赤血球が回収され、FISH 解析された。この 97 例の中で男児妊娠例は 39 例あり、合計 356 細胞中 158 細胞が XY シグナルを有し、男児細胞であり胎児由来と確認された。男児の診断精度は疑陽性が 1 例あり、偽陰性が 5 例あった。性別診断の正診率は 93.8%であったが、回収細胞数が 3 細胞以下であった 13 症例中の 4 例は疑陽性、偽陰性であり、回収細胞数を増やす必要性が再認識された。さらに、この 97 例中に 9 例の 18-トリソミー、6 例のダウン症候群があったが、これらの染色体異常の症例は 100%正確に診断できた。この結果から、母体血中に確実に有核赤血球が存在することを再確認し、その上で、母体血中有核赤血球を用いた胎児染色体診断法の臨床応用の可能性を証明した。

研究成果の概要(英文)：

Non-invasive prenatal diagnosis through examination of intact fetal cells circulating within maternal blood can be used to diagnose a full range of genetic disorders. Since only a limited number of fetal cells circulate within maternal blood, procedures to enrich the cells and enable single cell analysis with high sensitivity are required. Recently, we have developed the separation methods, including a lectin-based method and autoimage analyzing, leading to the improved sensitivity of genetic analysis. We recently proved the accuracy of the prenatal diagnosis of trisomy-21 and -18 by the nucleated erythrocytes analysis in maternal blood. Thus, this progress has supported the possibility of non-invasive prenatal diagnosis of genetic disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児

キーワード：母体血・有核赤血球・無侵襲・出生前診断・ダウン症候群

1. 研究開始当初の背景

胎児の染色体異常や遺伝子異常を診断するためには羊水穿刺や絨毛採取などにより胎児細胞を採取する必要がある。しかし、これらの方法には0.5-2%に流産のリスクがあり、より安全な胎児細胞の回収法の開発が期待されている。母体血中に胎児細胞が存在することが最初に報告されたのは19世紀に遡るが(Schmorl, 1893)、母体血中の胎児細胞数が僅かであるため、それを出生前診断に用いる試みはなかった。1980年代後半になり、PCR法やFISH法のような高感度な遺伝子分析法が利用できるようになり、無侵襲的な出生前診断法として、世界中で盛んに研究されるようになった。

1990年、蛍光標識した細胞表面抗原(CD71)を用いたFACS法で妊婦末梢血から有核赤血球の濃縮に成功して以降、欧米を中心にこのFACS法や磁気ビーズを用いたMACS法などで、抗原抗体反応を用いて有核赤血球を濃縮し、胎児診断する方法が研究された。1995年から5年間、その方法の臨床応用を目指し、米国NIHが主導する多施設研究(NIFTY study)が行われた。この研究は母体血中有核赤血球を用いた胎児染色体異常の診断精度を検討することが目的で、染色体異常のリスクが高い2744例の妊婦を対象に、FACS、MACS法で回収した胎児有核赤血球優位の細胞分画にFISH法を行い、胎児の性別及び染色体数の異常の有無について検討した。しかし、

その結果、FACSで13%、MACSで48%の症例でXY細胞が同定できたに過ぎず、XY細胞の偽陽性率も11%に及ぶという散々たる結果であった。また、胎児染色体異常の検出率も44%に留まり、胎児細胞が6倍以上あるはずの染色体異常例においても半数以上の症例で胎児細胞の回収ができなかった(Bianchi et al. Prenat Diagn 2001)。このことは、極めて低頻度の細胞の回収を抗原抗体反応で行っても細胞ロスが避けられず確実な標的細胞の分離は難しいことを示しており、本目的でのFACS、MACS法による細胞濃縮の限界を示した。我々は、有核赤血球 rich な分画を非連続密度比重遠沈法を用いて分離し、それを塗抹染色後、形態的に有核赤血球を識別し、その細胞を顕微鏡観察下にmicromanipulatorを用いて回収、その個々の単一細胞のDNAをPCR法で増幅してDuchenne型筋ジストロフィー(Neurology, 1996)やOrnithine Transcarbamylase欠損症(Hum Genet, 1998)の胎児診断を行ってきた。この方法は、母体末梢血の塗抹標本の中から有核赤血球を探し出すもので、一症例当たりその過程に10時間以上を要するというもので、その臨床応用には限界があった。

そこで、レクチン法を用いて、母体血中の単核球成分から有核赤血球の濃縮を行った。この方法は、ガラクトース特異的なレクチンが赤血球系細胞に選択性を持って結合す

ることを利用したもので、効率的な白血球の除去が可能になった。我々は、55例の妊婦末梢血を用い、このレクチン法で有核赤血球の分離を試みた結果、全例で確実に有核赤血球の回収ができることを確認した。さらに、正常妊婦末梢血 6mL 当たり平均 12.8 細胞の有核赤血球を同定した(Prenat Diagn, 2006)。NIFTY study の主要メンバーでもあった Holzgreve らは、この方法で従来の CD71 を用いた MACS 法に比較し、平均 8 倍以上の有核赤血球が回収できると報告している (Babochkina et al, J Histochem Cytochem, 2005)。

次に、このレクチン法で濃縮し、同定した有核赤血球を個々に micromanipulator で分離し、一枚の別のスライドガラス上に移して FISH 法で染色体診断する方法を確立した。20 例の正常の妊婦末梢血から、有核赤血球を分離し、X,Y の FISH probe を用いて、胎児の性別診断を行った。その結果、男児妊娠例だった 8 例で、XY 細胞を複数同定し胎児が男児と診断できた。また、女児妊娠例では XY 細胞は同定できなかった。有核赤血球を用いて行った性別診断の結果は、全例、胎児の性別に一致し、有核赤血球を用いて正確な出生前診断が可能で、及び、母体血中には胎児由来の有核赤血球が確実に存在していることを証明した。さらに、男児妊娠例で、有核赤血球の 56% は XX、44% は XY であったことから、母体血中有核赤血球の約半数は母体由来で、出生前診断においては、より多くの有核赤血球を回収して診断することで、より高い診断精度が確保できると考えられた(Prenat Diagn, 2007)。この方法を、21 番・18 番・13 番染色体の数的異常の診断に応用することも可能である。我々は、羊水検査を行った妊婦 53 例を対象に母体血中から有核赤血球を分離し、21 番染色体の数的異常の診断を行った。この 53 例中には羊水検査で 4 例の 21-trisomy の症例が存在し、その 4 例全てで有核赤血球を用いて 21-trisomy の診断が可能であった。偽陽性、偽陰性もなく、診断精度は 100% であり、母体血を用いた無侵襲的な出生前診断法としての有用性が確認された。

しかし、母体血から有核赤血球の分離に最短 2 日、有核赤血球の遺伝子診断に約 7 日かかるため、少量の検体処理は可能であっても大量のサンプル処理は不可能である。そこで、回収した細胞を短時間に遺伝子解析する技術の開発で、検査時間の短縮をはかる必要がある。また、FISH 法で可能なことは染色体数の確認であり、羊水検査などで行う karyotyping に比べ、染色体全体の異常の診断や微小欠失や重複など詳細な染色体診断はできない。また、遺伝子異常などの診断に結びつかない。そこで、単一細胞レベルで、確実に染色体や遺伝子の異常を診断する新しい方法の開発に取り組み診断精度の向上をはかる必要がある。

一方、母体血中有核赤血球を用いた遺伝子診断を行うために単一細胞レベルで遺伝子診断を行う手法の開発が不可欠である。全遺伝子増幅法により細胞内の遺伝子全域を均等に増幅することで、ゲノムワイドの定量的 PCR による診断が可能になる。また、増幅産物の一部を使って、SNPs 解析を行うことで、有核赤血球の由来を証明した上で、標的遺伝子を分析することが可能になる。このことは信頼性の高い胎児の遺伝子診断システムには不可欠なステップである。ゲノムワイドの定量的 PCR システムは、全染色体領域を対象にゲノムコピー数の変化を一度に解析するもので、プローブを蛍光標識して行う TaqManPCR 技術を用いる。

①最初のステップとしては、単一細胞から抽出した DNA を全遺伝子増幅した後、21 番、18 番、13 番、X、Y 染色体の 5 種類の染色体で数箇所ずつの特異的遺伝子領域を標的に PCR 増幅し、正常の単一細胞で同様に行った遺伝子産物量と比較することで単一細胞レベルでの遺伝子の増減評価を行う。さらに、SNPs 解析も同時に行うことで、その細胞の由来についても同定できるシステムを構築する。5 種類の染色体と SNPs 解析のトータルで 36 ウェル程度で解析する予定である。

②次のステップにおいては、マイクロチャンネルチップを用い、全染色体の多くの遺伝子領域を標的とし、結果的に一枚のチップ

プで全染色体領域の定量的な解析ができるシステムを作る。マイクロチャンバーチップは40nLの容量で1つのPCRが可能であり、1枚のチップで1細胞の1024箇所の解析が可能である。既にシーケンスやその中に含まれる遺伝子の情報が明らかな遺伝子を用いるため、増幅の検出が増幅領域の量に直結し、小さい領域の異常も検出可能である。また、ごく微量のDNAから分析可能なことも本法で実用化を目指す動機である。

## 2. 研究の目的

母体血中から分離した胎児細胞の新しい分析法の開発を通じ、羊水検査にかわる無侵襲的な胎児染色体・遺伝子異常の診断法の確立を目指す。具体的には、全遺伝子増幅法とゲノムワイドの定量的PCRシステムを基本ツールとした単一細胞レベルの遺伝子解析法の確立を目指す。母体血中から分離した有核赤血球を用いて単一細胞レベルで網羅的な遺伝子解析を行うことで細胞の由来を確認した上で、G-bandingに匹敵する染色体診断を可能にするばかりか、遺伝性疾患の診断を行うことも可能にする。このことにより、母体血中有核赤血球を用いた出生前診断の応用範囲が広がり、羊水検査に完全に置き換わるものとしての位置づけを確立できると考える。

## 3. 研究の方法

①妊娠15週以降の羊水染色体検査を行う妊婦で、同意を得た上で母体血14mLを採取した。96例の母体血から有核赤血球を比重遠沈法、レクチン法で濃縮し、自動有核赤血球識別装置で同定した後、マイクロマニピュレーション法で有核赤血球を単離し、X,Y染色体、及び21番、18番染色体特異的プローブでFISH解析を行って、羊水検査の結果と比較した。

②妊娠10-20週の妊婦を対象に、母体血14mLを採取する。母体血から有核赤血球をパーコール2段階比重遠沈法で濃縮し、自動有核赤血球識別装置で同定した後、Micromanipulation法で有核赤血球を単離し、X,Y染色体特異的プローブ及び21、

18番染色体特異的プローブでFISH解析を行う。この方法での胎児有核赤血球分離の比重液の種類・比重や高密度液の利用など検討する。また、FISH法で安定的に結果を得るための方法など検討し、プロトコルの最適化を図る。

## 4. 研究成果

①平均12.0mLの母体血中から、中央値で11細胞(最大-最小:1-98)の有核赤血球が同定され、10細胞(1-24)でFISH診断が行われた。性別診断の正診率は90/96(93.8%)で、偽陽性1例、偽陰性5例あった。男児診断の精度は、感度87.2%、陽性的中率97.1%であった。羊水検査で21-及び18-トリソミーであった6例、9例で、染色体数的異常の解析結果は、偽陽性、偽陰性はなく、全例正確に診断できた。男児妊娠例(n=39)で、合計356細胞の有核赤血球のFISH解析が行われ、158細胞(44.4%)が、胎児由来であった。これらのことから、母体血中に存在する有核赤血球を用いて高い精度で胎児の染色体数の診断が可能であることを証明した。

②比重液の比重を1.075-1.085から1.075-1.090、1.075-1.095、1.075-1.100と比較した。比重遠沈法での有核赤血球回収数は、高比重液ほど多いが、その背景細胞数は著増し、非効率性が際立った。結果的に、回収細胞数と背景となる細胞数のバランスから1.075-1.095が最適であることがわかった。さらに、妊婦の血液検査で貧血があり、小球性低色素性貧血がある場合には、1.075-1.085の比重が優れていることがわかった。

FISH法の細胞の前処理によって有核赤血球へのFISHシグナルの入り方の違いがある。細胞膨化処理としてLithium Diiodosalicylateを用いない場合のFISH(Y-probe)シグナルの入る率は40%であったが、処理により85%に向上した。さらに、蛋白分解を行うためペプシン処理を行うことでFISH効率は90%に向上するなど、数か所のプロトコルの改変を行った。その上で、最適化プロトコルでこれまでに9例の検体で分析した。14mLの血液から平均10個(最小-最大:1-27)の有核

赤血球が回収され、FISH 分析が行われた。症例の中に 4 例の男児妊娠例が含まれていたが、その 4 例は正確に診断され、診断精度は 100%であった。今後、更に症例数を増やし、検討する必要がある。

以上の検討から、母体血中に確実に有核赤血球が存在することを再確認した。その上で、母体血中有核赤血球を用いた胎児染色体診断法の臨床応用の可能性を証明した。母体血中有核赤血球の約 6 割が母体由来であるとすると、数学的には 100%正確な診断はできないことにはなる。しかし、今後、パーコール法の診断精度を更に症例を積み重ねて明らかにするとともに、より回収数を増やす工夫が必要と考える。

#### 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 1 件)

Detection and quantification of fetal DNA in maternal plasma by using LightCycler technology.

Purwosunu Y, Sekizawa A, Okai T. Methods Mol Biol. 2008;444:231-8.

[学会発表] (計 12 件)

第 60 日本産科婦人科学会学術集会 横浜 20080414

母体血による胎児 DNA 診断(FDD-MB2.0) 第一報

高林晴夫、北川道弘、関沢明彦、Yuditiya Purwosunu、千葉博、伊川和美、末岡宗広 15<sup>th</sup> Congress of Federation of Asia-Oceania Perinatal Societies, Nagoya, 20080520-24

Accuracy of prenatal DNA diagnosis from NRBCs in maternal blood

Sekizawa A, Purwosunu Y, Chiba H, Okai T, Takabayashi H, Kita M, Kitagawa M

14<sup>th</sup> International conference on Prenatal diagnosis and Therapy, June 1-4, 2008, Vancouver

Accuracy of prenatal DNA diagnosis

from NRBCs in maternal blood

Sekizawa A, Purwosunu Y, Chiba H, Okai T, Takabayashi H, Kita M, Kitagawa M

第 12 回 胎児遺伝子診断研究会 20090214 兵庫県

母体血による胎児 DNA 診断のための有核赤血球分離法の基礎的検討

北美紀子、高林晴夫、小木美恵子、関沢明彦、千葉博、北川道弘、伊川和美、松本由佳、末岡宗広

6<sup>th</sup> International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS-VI) Hong Kong Nov 9-11, 2009

FDD-MB (Fetal DNA Diagnosis from Maternal Blood) 2.0 System

Purwosunu Y, Takabayashi H, Kita M, Ikawa K, Sekizawa A, Chiba H, Kitagawa M

第 13 回胎児遺伝子診断研究会 東京 2010.2.13.

母体血中有核赤血球探索の効率化：リンパ球分離用液(Ficoll)を用いた白血球除去法の検討

中村豊美、井出上公太郎、北美紀子、松本由佳、Yuditiya Purwosunu、北川道弘、関沢明彦、高村禪、高林晴夫

第 13 回胎児遺伝子診断研究会 東京 2010.2.13.

母体血における胎児遺伝子診断法：有核赤血球の濃縮と高感度 FISH 法の検討

小木美恵子、新村卓也、眞田由親、原田俊、松本由佳、市川秀隆、中村豊美、北美紀子、Yuditiya Purwosunu、北川道弘、関沢明彦、井出上公太郎、高村禪、高林晴夫

第 13 回胎児遺伝子診断研究会 東京 2010.2.13.

母体血中有核赤血球の標本作製から回収の検討：樹脂プレートの有用性

松本由佳、北美紀子、中村豊美、Yuditiya Purwosunu、北川道弘、関沢明彦、森田敏樹、末岡宗広、高林晴夫

6<sup>th</sup> World Congress of Perinatal Medicine in developing countries. Jakarta, March 9, 2010

Fetal DNA Diagnosis from Maternal Blood 2.0 System

Takabayashi H, Kita M, Purwosunu Y, Ikawa K, Sekizawa A, Chiba H, Kitagawa M

6<sup>th</sup> World Congress of Perinatal Medicine in developing countries. Jakarta, March 8, 2010

Recent Advances in Prenatal diagnosis (Special Invited Lecture)

Sekizawa A

第 14 回胎児遺伝子診断研究会学術集会  
平成 23 年 2 月 26 日 金沢

母体血漿を用いた無侵襲的胎児遺伝子診断  
(1) : 胎児 X 連鎖性疾患への応用

四元淳子、関沢明彦、福田麻美、市塚清健、  
小出馨子、宮上哲、仲村将光、松岡隆、齋藤裕、岡井崇

第 14 回胎児遺伝子診断研究会学術集会  
平成 23 年 2 月 26 日 金沢

母体血漿を用いた無侵襲的胎児遺伝子診断  
(2) : 胎児単一遺伝子病(Achondroplasia)  
への応用

福田麻美、四元淳子、関沢明彦、市塚清健、  
小出馨子、宮上哲、仲村将光、松岡隆、齋藤裕、岡井崇

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松岡 隆 (MATSUOKA RYU)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号 : 20349111

(2)研究分担者

関沢明彦 (SEKIZAWA AKIHIKO)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10245839

研究者番号 :

(3)連携研究者