

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 7 月 3 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659742

研究課題名(和文) 診断困難な異常妊娠検体に対する画期的な染色体診断アルゴリズムの開発

研究課題名(英文) Development of the epoch-making chromosome diagnosis algorithm for the abnormal pregnancies

研究代表者

秦 健一郎 (Hata, Kenichiro)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60360335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：流産や死産などのヒト発生異常試料には、母体由来組織の混入を高率に伴うため、通常の遺伝マーカーを用いた手法(マイクロサテライト解析やMLPA法等)では「診断不能」となる。そこで、事前に取得した両親の多型情報を基に解析対象試料中の児ゲノムと母ゲノムの混在比率を推定し、実測値から児ゲノムの解析結果を予測するモデル式の作成を試みた。これらの解析手法を用い、すでに網羅的一塩基多型解析まで行い、母体組織混入のために診断不能であったと考えられる過去症例の再検証を行ったところ、児の核型を推定診断し、異数性の診断に成功した。

研究成果の概要(英文)：When the karyotyping of products of conception (POC) is conducted by using conventional cytogenetic methods, problems often occur because of erroneous diagnosis due to maternal cell contamination or failure of cell culture. However, those problems can be solved if the analysis uses single nucleotide polymorphism data. In this study, we developed a method which applies the advantageous features of karyotyping using the aforementioned information from single nucleotide polymorphisms in which data correction is performed by using the linear interpolation method on the basis of the results of single nucleotide polymorphism analyses. For the POCs whose karyotyping could not be achieved accurately due to maternal cell contamination, the same method was used for the estimation of the rate of contamination by maternal DNA and for the extraction of only data from the single nucleotide polymorphism of the POCs; and this allowed for successful determination of the latter's karyotype diagnosis.

研究分野：産婦人科学

キーワード：一塩基多型 核型診断 染色体診断 流産

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム計画の完了に伴い、およそ 1,000 万か所程度存在すると推定される一塩基多型情報のデータベース化が進められ、これらの多型情報を駆使した関連解析により、様々な疾患の関連遺伝子が次々に同定されている。

この一塩基多型情報を、アレイ技術を用いて網羅的(全ゲノム領域の数十万から数百万ヶ所)かつ定量的に取得すれば、あるゲノム領域の DNA 量(欠失あるいは増幅)を、高い解像度で検出することができる。これまでも、遺伝マーカー検査やアレイ CGH など、DNA 配列情報を利用した染色体診断が行われてはいたが、これらの従来手法と比較して、一塩基多型情報による解析は、ゲノムの由来を全領域で網羅的に識別できるという利点がある。

このようなアレイ解析技術の劇的な進歩を受けて、米国人類遺伝学会は、「発達障害や先天奇形の染色体診断には、G バンド法などの分染法に代わり、マイクロアレイを用いた染色体解析を第一選択とすべきである」との公式見解を提示した(Am J Hum Genet 86, 749-764, 2010)。

今後、このようなデジタルカリオタイピング(アレイ技術等を用いて高密度に DNA を定量し、染色体構造解析を行う手法)が、染色体診断の標準手技となるのは論を待たない。

2. 研究の目的

研究初年度前半で、理論上の診断アルゴリズムを完成させる。初年度は並行し、実際に核型診断済みの胞状奇胎や正常末梢血由来のゲノム DNA を様々な比率で混合し、解析プラットフォーム上での実測値と理論値の関連を確認し、実用性のある診断アルゴリズムを作り上げる。これらの知見を応用し、すでに収集した流産および死産等の症例の中から、G バンド法による染色体診断で異常を見

出せなかった症例、従来の遺伝マーカー検査で診断不可能だった症例、染色体診断を行っていない症例を、本研究で確立したアルゴリズムを利用して確定診断する。

次年度は、初年度の知見を元に、モザイク率やキメラ率から各領域の DNA 量を補正し、多型解析結果(デジタル情報)からノイズを取り除き、患児(絨毛)の多型情報のみを取り出し、染色体構造解析を行う技術を開発する。

現在胎児診断用と称されて商業化されているアレイ CGH 検査は、いくつかの頻度の高い疾患責任領域を対象とした、極めて解像度の低いものである。本研究で開発する解析アルゴリズムは、解像度および解析対象領域が、共に数千倍と飛躍的に改良されることが期待できる。

3. 研究の方法

【モザイクと母体組織混入をモデルとしたデジタルカリオタイピングアルゴリズムの開発】

初年度は、胞状奇胎検体をモデルとしてアルゴリズム開発を行った。胞状奇胎は、図 1 に示すように、典型的には一精子受精を起源として一種類のゲノムを二つ持つ(アイソダイソミーの)完全胞状奇胎、二精子受精等により父由来の二種類のゲノム(ヘテロダイソミー)と母由来ゲノムが混在している部分胞状奇胎が想定され、実際に回収される病変組織には、さらに母体組織が混入している可能性が考えられる。

このような検体は、状態が不良なことも多く、ゲノム DNA を用いた分子遺伝学的な染色体診断が有効である。しかし、従来の遺伝マーカーを用いた手法(マイクロサテライト解析や MLPA (Multiplex Ligation-Dependant Probe Amplification)法等)で解析しても、最大 4 種類の遺伝子型が様々な比率で混在し、しかも、限られた領域の解析しかしないため、

「診断不能」あるいは「誤診」につながる。そこで、図1の模式図から想定されるあらゆる組み合わせとゲノムの混在比率を想定して解析結果を計算予測し、実測値と比較して最も近似する予測値を選定すれば、胞状奇胎の起源および母体組織の混入を確定診断することができる。

サンプル中に2種類以上のゲノムが非等分に混在していると、多型頻度が多岐に分かれるため、通常であれば「解析不能」と結論付けられる。しかし、流産や死産検体の場合は、原則として胚と母組織の混入で構成されており、すべての組み合わせを考慮した予測値と実測値を比較すれば、確定診断が可能である。

初年度は、想定される胎児(絨毛)の核型(正常二倍体、異数体、父アイソダイソミー、父ヘテロダイソミー、母アイソダイソミー、母ヘテロダイソミー)をすべて網羅し、さらにそれらのモザイク及びキメラ(母組織混入を含む)を仮定し、上記の表と同様の予測モデルを作成した。予測モデルと実測値の検証には、胞状奇胎、絨毛癌細胞株と、正常末梢血由来のゲノムDNAを用いる。加えて初年度に、すでに収集した流産および死産等の症例の中から、従来法で診断できなかった症例を、本研究で確立したアルゴリズムを利用して確定診断した。

【モザイク率やキメラ率を補正した多型情報を用いた染色体構造解析】

初年度の研究計画により、モザイク率やキメラ率の推定が可能となれば、各領域のDNA量を補正して、患児(絨毛)の多型情報のみを取り出すことができる。すなわち、臨床検体から患児(絨毛)の細胞のみを分離回収することは困難であるが、多型解析結果(デジタル情報)からノイズを取り除き、患児(絨毛)の多型情報のみを取り出すことができる。図2は、モザイク率やキメラ率を算定するのに有用な測定値のみを選択しているために

解像度が低い、より詳細な染色体構造解析が可能となり、微細な欠失や増幅、あるいは部分ダイソミーの診断が可能となる。これらの技術を用い、すでに収集している50例の解析不能流産検体の染色体診断をた。

4. 研究成果

流産や死産などのヒト発生異常において、原因検索のために染色体検査が行われるが、このような検体は状態が不良で、生細胞を用いた分染法などの染色体解析が不可能なことが稀ではない。このような場合、ゲノムDNAを用いた分子遺伝学的な解析が有効であるが、その一方で、このような検体では母体由来組織の混入を高率に伴うため、従来の遺伝マーカーを用いた手法(マイクロサテライト解析やMLPA(Multiplex Ligation-Dependant Probe Amplification)法等)では、最大3種類の遺伝子型が様々な比率で混在するため、「診断不能」あるいは「誤診」につながる。そこで、事前に両親の多型情報を取得した上で、解析対象試料中の児ゲノムと母ゲノムの混在比率を想定し、実測値から児ゲノムの解析結果を予測すれば、ノイズの中から児由来のシグナルを抽出し、胎児の核型を確定診断することができる。そこで、予測モデルと実測値の検証のために、父、母、児の精製ゲノムDNAを用い、母ゲノムと児ゲノムを様々な比率で混合し、その実測値から最も効果的な予測モデル式の作成を試みた。その結果、別途取得した父母の一塩基多型情報から混合比率を推定したのちに、BAF(B allele frequency)を補正する手法が最も適切と判明した。これらの解析手法を用い、すでに網羅的一塩基多型解析まで行い、母体組織混入のために診断不能であったと考えられる過去症例の再検証を行った。その結果、児の核型を推定診断し、異数性の診断に成功した。

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)

研究者番号:

〔雑誌論文〕(計1件)

Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, Umezawa A, Okamura K, Hata K : Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. J. Hum. Genet. 2014;59:326-331

〔学会発表〕(計1件)

秦健一郎:「胎児・胎盤発生異常のジェネティクスとエピジェネティクス」第10回北関東遺伝診療フォーラム, 大宮, 2014.11.27

〔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〕

該当事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

秦 健一郎 (HATA, Kencihiro)

研究者番号: 60360335

(2)研究分担者

なし()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし()