

# 霜川 修 論文内容の要旨

主論文

## Array Comparative Genomic Hybridization Analysis in First-trimester Spontaneous Abortions with 'Normal' karyotypes

正常核型の妊娠前三半期間妊娠産物におけるマイクロアレイ CGH 解析  
霜川 修、原田直樹、三宅紀子、佐藤可奈子、水口 剛、新川詔夫、松本直通

American Journal of Medical Genetics Part A 140A  
1931-1935, 2006

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻  
(主任指導教員：放射線障害医療学講座：山下俊一教授 ※)  
※人類遺伝学分野の教授不在の為

### 緒 言

臨床的に確認される妊娠のうち約 15%は流産し、そのほとんどが妊娠第 1 三半期に起きている。そのうち約半数は染色体異常が原因とされているが、残り半数の原因は不明である。本研究では正常核型であった原因不明の流産内容物を対象としてマイクロアレイ CGH を行い、通常の染色体検査では検出困難なゲノムコピー数異常を確認し、その頻度を算出したので報告する。

### 対象と方法

解析対象：自然流産した妊娠産物より染色体検査を行い、正常核型であった 20 例 [46, XY:10 例、46, XX:10 例]。

### 方 法

**マイクロアレイ CGH:** ヒト全ゲノム上で 1.5Mb 等間隔に位置する BAC、加えて全染色体のサブテロメア領域、染色体微細欠失・重複症候群や既知の奇形症候群の責任遺伝子座に位置するような全 2,173 個の BAC クローンを選択して DNA を抽出した。これら BAC クローンを用いて FISH を行い、1) 蛍光シグナルが登録されている染色体座位上に一致すること、2) 複数箇所に検出されないことを確認後、BAC-DNA を鋳型に DOP-PCR プライマーを用いて PCR 増幅し、DNA をインクジェット方式でスライドガラス上に配置・結合させマイクロアレイを作製した。また 1 枚のスライドガラス上に、同一の DAN スポットを 2 セット作製した (CGH1 と CGH2)。

**ハイブリダイゼーション:** 解析対象である凍結絨毛組織より DNA 抽出し、*Bam*HI 消化後解析対象および正常コントロール DNA 1 $\mu$ g を 2 種類の蛍光色素 Cy3 と Cy5 でラベルした。CGH1 には解析対象 DNA を Cy3、正常コントロール DNA を Cy5 でそれぞれラベルした組み合わせを、スポット 2 は逆の組み合わせを作製し、熱変性させた後 37°C で 72 時間ハイブリ

ダイゼーションを行う。スライドガラスを洗浄1(43°C 50%ホルムアミド/2×SSC 15分)を2回、洗浄2(室温 0.05% tween 20/1×PBS)を2回行った後に GenePix4000B でスキャンし蛍光シグナルを取り込み、GenePix Pro 4.0 ソフトで解析を行った。

統計学処理と検証：解析対象 DNA と正常コントロール DNA の蛍光強度比を ‘ratio of means’ として計算後、全てのスポットの比の平均値で除して average normalized inter-locus fluorescence ratio (ANILFR) を算出し、この値より標準偏差を計算する。±3SD を超えた座位はコピー数変化を有すると考え、BAC クローン DNA を用いた FISH により検証した。

## 結 果

正常核型 20 例 (46,XY:10 例、46,XX:10 例) を解析した結果、2 例 (10%) について ±3SD を超える CGH 比を検出し、流産絨毛組織において流産の原因と考えられる欠失を確認した。12 例、9 座位において流産とは関連が少ないと思われるコピー数多型 (copy number variation) が検出できた。

[欠失症例 1] 3p26.2 上の 1.4Mb で欠失を同定し、最終報告核型 46,XX,del(3)(p26.2p26.3) であった。欠失領域には *CNTN4*, *IL5RA*, *TRNT1*, *CRBN* という 4 つの遺伝子が存在していた。

[欠失症例 2] 13q32.3 より遠位側にサブテロメアを含んだ約 13.7Mb の欠失を同定し、最終核型 46,XX,del(13)(q32.3q34) であった。この領域には OMIM に登録されている 26 個の遺伝子が存在していた。

## 考 察

欠失症例 1 では欠失領域内に 4 つの遺伝子を確認した。*CNTN4* は過去に 3p 欠失症候群と関係があると報告がある (Fernandez et al., 2004)。

欠失症例 2 の欠失領域は通常の染色体検査で検出可能であるが、これを正常核型としていた理由は、胎児細胞由来の絨毛組織を培養する際に、回避困難な母親由来の脱落膜細胞が混入しており、培養速度が胎児由来細胞よりも母由来細胞の方が早く、染色体検査の際に分析した分裂期細胞全体の中で母由来細胞の個数が優位になったためであると考えられる。FISH による検証を行った結果、母親由来細胞は 18/20 個だった。今回の実験系では DNA 抽出は培養細胞からではなく、絨毛細胞から直接抽出したために母体組織混入の影響を受けず正確な診断が可能であった。

近年、妊娠第 1 三半期の自然流産検体において通常の染色体検査で検出不可能なゲノムコピー数異常を 4/41 例 (Schaeffer et al., 2004)、2/26 例 (Benkhalifa et al., 2005) で検出したことが報告されており、我々の解析結果 (2/20 例) と大差ない。

以上の結果より染色体検査では検出困難な染色体構造異常が妊娠第 1 三半期間自然流産の 10~5%程度で原因となっていることが示唆された。

備考：本研究で用いた解析試料は、平成 12 年以前に収集され、凍結されていた試料 (既に匿名化されていた) を用いた。本研究は長崎大学ヒトゲノム。遺伝子解析に関する倫理委員会の承認 (承認番号 0401130048) を得て行った。