

三浦生子 論文内容の要旨

主 論 文

Microarray comparative genomic hybridization (CGH)- based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell- free fetal DNA in amniotic fluid

羊水中の cell- free fetal DNA を用いたマイクロアレイ CGH 法による
染色体異常の検出

三浦生子、三浦清徳、増崎英明、三宅紀子、吉浦孝一郎、Sosonkina Nadiya、
原田直樹、霜川修、中山大介、吉村秀一郎、松本直通、新川詔夫、石丸忠之

Journal of Human Genetics vol.51: 412-417 (2006 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
展開医療科学講座 産科婦人科学
(主任指導教員：増崎英明教授)

緒 言

羊水染色体検査には、G バンド法および FISH (fluorescence in situ hybridization) 法が一般的に用いられている。しかし、前者には培養に起因するエラーの問題点があり、後者には目的とする染色体領域が特定されていない時には診断が困難であるという欠点がある。一方、マイクロアレイ comparative genomic hybridization (CGH) 法は、培養が不要であり、かつ全染色体領域を網羅的にスクリーニングすることが可能であるため、G バンド法および FISH 法の欠点を克服しうると期待される。

近年、母体血漿中に流入する cell-free fetal DNA (cff-DNA)と同様に、羊水中にも cff-DNA が存在していることが明らかになった。そこで、私どもは羊水中の cff-DNA を用いたマイクロアレイ CGH 法により、羊水染色体検査が可能であるのか検討し、本法の利点と欠点、および将来の臨床応用への可能性について考察した。

対象と方法

1. 試料と DNA の準備

インフォームドコンセントを得て検体を採取した。羊水穿刺を行なった 13 例 (妊娠 15-17 週 6 例、妊娠 32-34 週 7 例) より採取された羊水のうち、20ml は G バンド法による染色体分析に提出し、残りの 10ml から二重遠心法により細胞成分を除去し、cff-DNA を抽出した。

2. Degenerate oligonucleotide primed (DOP) PCR とマイクロアレイ CGH 法

13 番、18 番、21 番、X および Y 染色体上の座位が確認されている BAC クローン

をそれぞれ 10 個ずつ、計 50 個を target DNA として選択した。3つのプライマーを用いた DOP-PCR で 50 個の target DNA を増幅後、スライドガラス上にスポットしてマイクロアレイチップを作製した。

断片化した subject DNA および control DNA (46,XY) を、それぞれ Cy-3 および Cy-5 でラベルし、マイクロアレイチップ上の target DNA に競合的にハイブリダイゼーションさせ、両者の蛍光強度を比較解析した。

結 果

正常核型女児由来の cffDNA (46,XX)を Cy-3 でラベルし、Cy-5 でラベルした正常核型男性DNA(46,XY)をコントロールとしてマイクロアレイ CGH法 (CGH1)を行なったところ、X 染色体の BAC クローンについて約 2 倍の Cy-3/Cy-5 比を示し、Y 染色体については 0.5 未満の低い値を示した。これは、正常核型男性は X 染色体が 1 本であるのに対し、正常核型女児は X 染色体が 2 本であること、また正常核型男性が Y 染色体を 1 本有するのに対し女児は Y 染色体を持たないことを端的に示していた。蛍光色素を入れ替えてラベルする CGH2 においては、X 染色体の BAC クローンの Cy-3/Cy-5 比はおよそ 0.5、Y 染色体については極端な高値となり、CGH1 の結果を裏付けた。正常核型男児由来の cffDNA においては、CGH1、CGH2 とともにすべての BAC クローンについて Cy-3/Cy-5 比はほぼ 1 となり、コントロール DNA と同じ核型であることが示された。同様に、後に 18 トリソミー、21 トリソミーと診断された症例についても、それぞれ 18 番、21 番染色体において、Cy-3/Cy-5 比が約 1.5 となり、18 番、21 番染色体がトリソミーであることを明確に示す結果であった。均衡型転座 [45,XY,der(14;21)(q10;q10)mat]の症例については、正常核型男性と同じパターンを示した。

また、妊娠 32-34 週で胎児奇形を認め羊水検査を行なった 6 症例は、CGH 法により羊水穿刺から 5 日間で、それぞれ 13 トリソミー、18 トリソミー、21 トリソミー、X モノソミー、正常核型 (2 例) と診断された。これらの結果は、すべて羊水の培養細胞による染色体検査の結果と一致した。

考 察

未培養羊水中の cff-DNA を用いて、マイクロアレイ CGH 法による羊水染色体検査が可能であった。本法は、従来の G バンド法や FISH 法と比較して、1) 培養に伴うエラーを回避できる、2) より迅速に診断することが可能である、3) ゲノムコピー数の変化をきたす染色体異常 (数的異常、欠失や重複) については 1 回の検査で迅速かつ網羅的に診断可能であるというという利点が指摘された。一方、均衡型転座などの構造異常を検出することが不可能であるという欠点も確認された。

したがって、未培養羊水中の cff-DNA を用いたマイクロアレイ CGH 法による染色体検査を臨床応用する際には、培養細胞を用いた従来の染色体検査法と平行して行なうことが必要と考えられた。将来、この技術を母体血漿中 cff-DNA に応用することができれば、母体血を通じて胎児の染色体検査が可能になると期待された。