

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本マス・スクリーニング学会誌 (2006) 16(1) :51-54.

CGH-DNAアレイ

蒔田芳男

技術解説

CGH-DNA アレイ

蒔田芳男

旭川医科大学医学部小児科学講座

著者連絡先

蒔田芳男（まきたよしお）

〒078-8510 旭川市緑ヶ丘東2条1丁目1-1

旭川医科大学小児科学講座

電話 0166-68-2481

ファックス 0166-68-2489

e-mail: makita5p@asahikawa-med.ac.jp

【背景】

1950年代のヒト染色体数の確定は、染色体の単染色という方法で行われていた。1960年代の各種分染法の開発は、古典的な染色体構造異常症候群の発見につながった。分子遺伝学進展、特にヒト遺伝子断片の Mb 単位でのクローニングは、FISH(fluorescent in situ hybridization)法という新しい技術とともに 1990年代の分子細胞遺伝学に発展した。この時期に染色体微細欠失症候群が数多く形成された。染色体解析技術の中で 1950年代から一番重要視され変革を担ってきたものはいったい何だったのだろうか？

それは、染色体分析の「解像度」と言える。ヒトゲノムの情報は、通常の 2 倍体細胞で考えると 60 億塩基対である。染色体の単染色では、大きさを 46 本を区別できるに過ぎない。大まかに 46 を 60 と近似すると、解像度は 1 億塩基対(100Mb)ということになる。通常の染色体分析 G バンド法は、おおよそ 600 バンドと考えることができるので、解像度は、1000 万塩基対(10Mb)ということになる。つまり、60 億塩基対を地球の人口に、観察者を月から地球を見ているものに例えると、1950年代の染色体分析は、日本一つ分の情報の有る無しを判定していたことになるし、その後の G 分染法は、北海道 2 つもしくは東京都に相当する情報の有る無しを判定していたことになる。まさに、粗いフィルターでの観察であるが、分子遺伝学のシークエンスレベルの一塩基が 60 億分の一人に相当することを考えると、ゲノム全体を俯瞰できるという特徴には、捨てがたいものがあるのも事実である。

さて、ヒトゲノム情報が解読されポストシークエンス時代になったにも関わらず、私たちは、このキーワードである「解像度」の向上を手に入れることはできないのだろうか？この命題の答えが、今回の CGH-DNA アレイ解析法である。今回は、この CGH アレイ解析法の概略を示し、先天性多発奇形症候群の診断、治療を中心とする臨床遺伝医療の中での実用化技術の解説をしたい。

【CGH-DNA アレイ】

それでは、CGH-DNA アレイとはどのようなものであろうか？CGH(comparative genome hybridization)は、比べるべき DNA とコントロール DNA を競合的なハイブリダイゼーションを用いることでゲノムのコピー数の差を検出する方法である。この方法は、染色体の中期分裂像を得ることができない疾患（特に固形ガン）の分子遺伝学的解析に革命をもたらした。しかしながら、通常の染色体展開法での分裂中期染色体を用いるために解像度には限界があり、せいぜい 500 万塩基対(5Mb)程度である。解像度を上げるためには、どうしたらいいのであろうか？それは、競合的ハイブリダイゼーションを行う場（分裂中期染色体）の解像度を上げることで解決可能である。ヒトゲノム解読により、ヒト遺伝情報は、BAC(bacterial artificial chromosome)の中で途切れなく存在する状況になっている。つまり、これらの BAC を貼りつけたスライド（アレイ）ができれば、CGH アレイは実現可能なのである（図 1 参照）。

ヒトゲノム解読を目の前にして、前述の方法論に取り組む研究室が生まれた。CGH アレイの実現には様々な問題が存在した（大腸菌内では複製効率の悪い BAC の扱い、DNA を貼り付ける方法、測定の安定性などである）。開発の経緯については、東京医科歯科大学稲澤研究室のホームページを参照されたい²⁾。日本では、東京医科歯科大学稲澤研究室、長崎大学新川研究室、広島放射線影響研究所高橋研究室の 3 研究室が CGH-DNA アレイの実用化を成し遂げた。現在、私たちが臨床応用をめざしているアレイは、東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝学稲澤研究室で開発されたものである³⁾。

それでは、この CGH-DNA アレイでの解析は、どのような画像イメージとなるのであろうか？イメージとしては、見慣れた FISH 法が染色体全体に展開されていると考えていただきのがいいかもしれない。このイメージを可視化するために Williams 症候群患児の診断例を提示する。通常の FISH 法では図 2A のように、7 番染色体においてのシグナルが欠失する形となる。しかしながらアレイでの検索では、7 番染色体上をスキャンする形になり図 2B のようなドットシグナルの連続の中で、該当領域のシグナルの低下として観察される³⁾。

【応用】

ゲノムのコピー数の異常を俯瞰的に検出する Whole Genome Array での未知疾患の検討も大切であるが、現在私たちは、既知疾患を包括的に検出するアレイを構築して実証を行っている。1990 年代の染色体微細欠失症候群の提唱とサブテロメアの再構成による疾患の提唱は、精神発達遅滞を伴う多発奇形症候群に新たな診断法を切り開いた。しかしながら、臨床症状の組合せによってプローブを選択して確認する作業が増えただけであり、診断が容易になったわけではない。私たちは、平成 15 年から既知染色体微細欠失症候群での診断精度の検証を行ってきた。この Genomic Disorder Array(MCG GDA ver1.0) (図 3) は、平成 15 年度中にパイロットとして 30 症例の検討を行い十分な精度をもつものであることを確認している。平成 16 年度には、染色体の構造異常を基盤とすると推定される患児の検索も行い均衡型転座症例での微細欠失などを証明してきた⁴⁾。この発展型として、染色体微細欠失症候群とサブテロメア再構成の責任領域の BAC を搭載した新規のアレイ(MCG GDA ver2.0)を構築し、平成 17 年度より検証を行っている。染色体のコピー数の変動によって生じる既知疾患の診断補助ツールが初めて出現することになる。

【問題点】

解像度の向上という大きな変化は、単染色自体に染色体の分染法が持ち込まれた時にも問題点を提起していた。それは、分染法で初めて確認できた正常変異 (variation) の存在である。一番有名なのは、9 番染色体の腕間逆位である inv(9)であろう。この他にもヘテロクロマチン含量の違いと考えられる正常変異も検出されている。この問題は、単染色時代には存在しなかったものである。この inv(9)も、病的な状態との関連が常に問題視されたことは良く知られた事実である。新しい技術の応用のためには、正常変異の情報基盤の整備

が必要である。それでは、今回の CGH-DNA アレイの導入では、どのようなことが起こったのであろうか？

2004年7月の Science 誌⁵⁾そして9月の Nature Genetics 誌⁶⁾に驚くべき論文が掲載された。健常人においても、200 を超える箇所において数百万塩基対（数十 Mb）の単位でコピー数の違いが存在するという報告である。このことは、既知の疾患での変化の同定には、問題はないものの、CGH-DNA アレイのプラットフォーム上で検出された変化が病的変化であるかの判定には正常変異の情報基盤整備が必要であることを示している。この正常変異は、LCV(Largescale Copy number Variations) もしくは CNP(Copy Number Polymorphism)とも呼ばれるコピー数多型である。人種毎に異なるとされる正常変異地図の作成作業が必須であり、現在各国でこの作業が行われている。

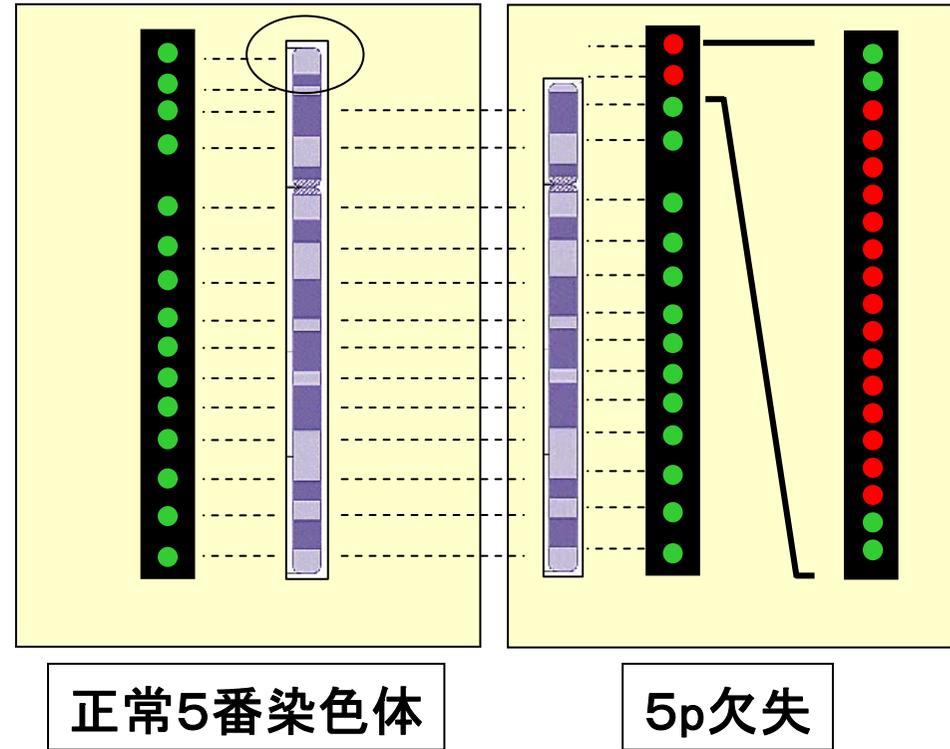
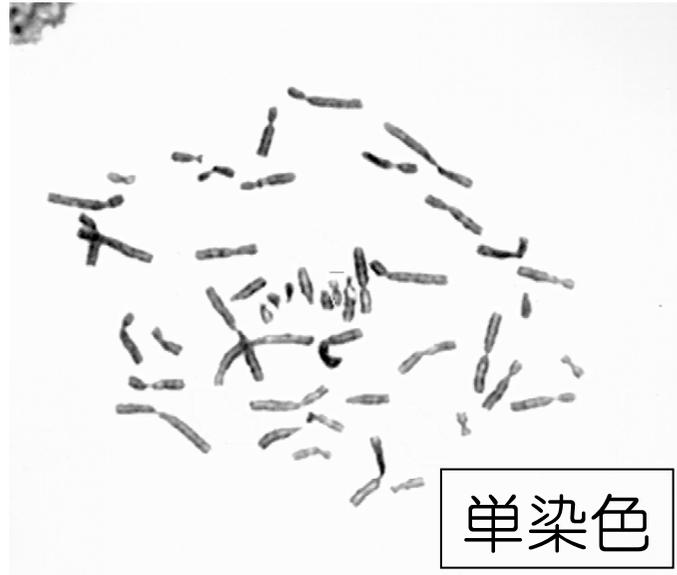
【まとめ】

ヒトゲノム計画が終了し、ポストシーケンス時代に入ったといわれる。連鎖解析の分野では、HapMap project の成果を利用し、そして染色体分野では、今回説明した CGH-DNA アレイを利用した研究が進行し効率的な研究が推進されていくに違いない。

引用文献

- 1) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992; 258: 818–21.
- 2) http://www.cghtmd.jp/CGHDatabase/about/index_j.htm
- 3) Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. Cancer Sci 2004; 95: 559-563.
- 4) Hayashi S, Kurosawa K, Imoto I, et al: Detection of cryptic chromosome aberrations in a patient with a balanced t(1;9)(p34.2;p24) by array-based comparative genomic hybridization. Am J Med Genet. 2005; 139: 32-6.
- 5) Sebat J, Lakshmi B, Troge J et al: Large scale copy number polymorphism in the human genome. Science 2004;305(5683):525–8.
- 6) Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN et al: Detection of large-scale variation in the human genome. Nat Genet 2004;36(9):949–51.

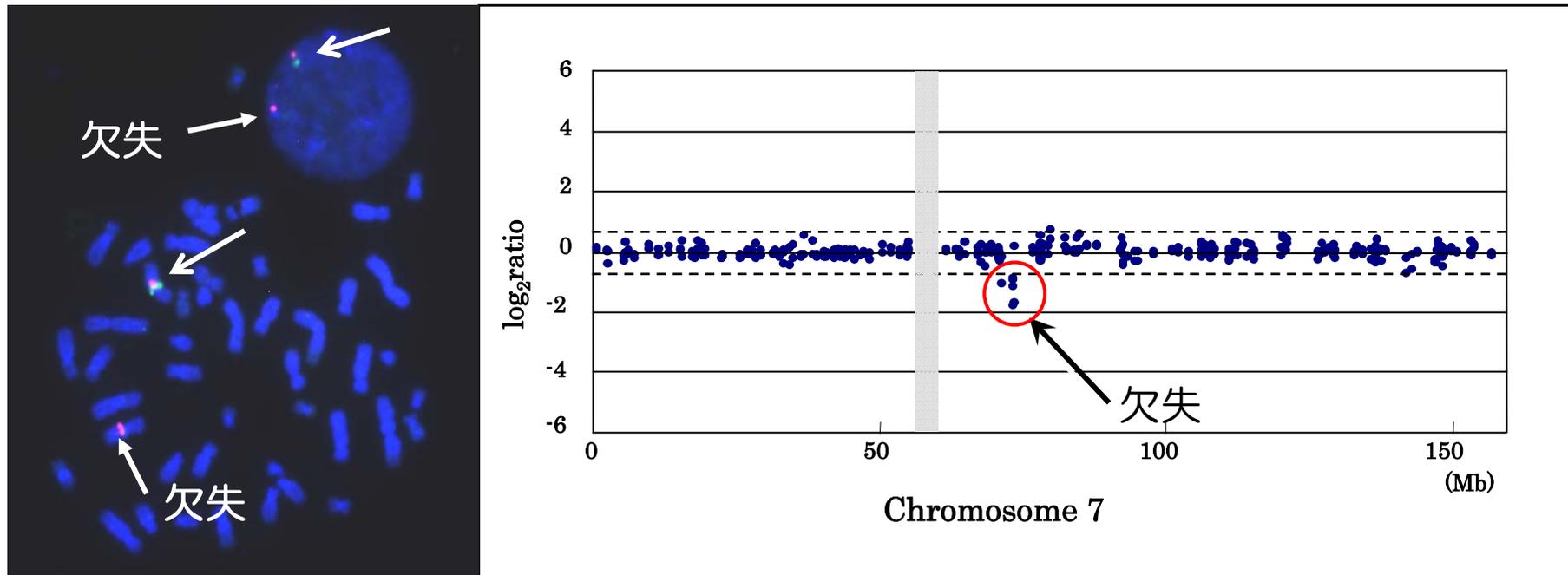
図1. 染色体の解像度の変化



CGH-DNAアレイ

(井本逸勢博士原図を許可を得て転載)

図2. ウィリアムス症候群



A.FISHでのイメージ

B.CGH-DNA アレイでのイメージ

(Inazawa et al., Cancer Science 95, 559, 2004 (Review)より著者の許可を得て改変転載)

図3. MCG GDA ver1.0での
既知疾患の検出

