

AMCoR

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

周産期医学 (2014.2) 44(2):167-171.

【遺伝子検査による早期診断】DNA microarray CGHアレイ、SNPアレイ
(胎児・新生児への応用)

蒔田 芳男

DNA microarray : CGH アレイ, SNP アレイ (胎児・新生児への応用)

蒔田 芳男

はじめに

染色体異常症の発見は、染色体解析技術の向上とリンクしている。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数的異常症記載された。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を産み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」である。我々は、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DNA microarrayである。

DNA microarrayの解像度

それでは、解像度について考えてみよう。ヒトゲノム情報は、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、大きさで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(100 Mb)ということになる。通常の染色体分析G分染法は、おおよそハプロイドあたり600バンドと考えることができるので、解像度は、500万塩基対(5 Mb)ということになる。つまり、**図1**に示すように60億塩基対を地球の人口に、観察者を月から地球を見て

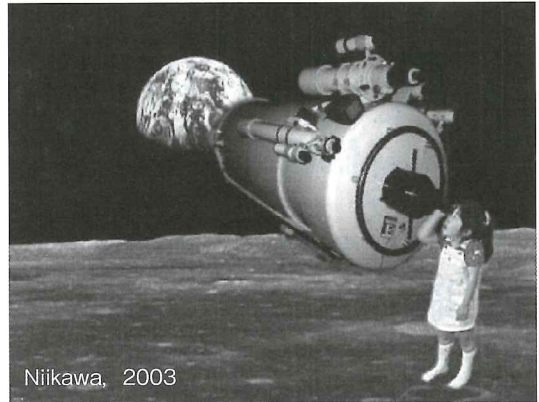


図1 染色体検査の解像度のイメージ (蒔田芳男:アレイCGH診断法の進歩, 日本小児科学会教育委員会編:ここまできた注目の小児科臨床ガイド(小児科専門医のための生涯教育ナビゲータ), 中山書店, 東京, pp189-193, 2009より引用改変)

いるものに例えると、1950年代の染色体分析は、日本の人口分の情報のあるなしを判定していたことになるし、その後のG分染法は、北海道の人口に相当する情報のあるなしを判定していたことになる。一方、我々は分子遺伝学の進歩に伴うシーケンズレベルの診断法も手に入れているが、その情報量は数千塩基分に過ぎない。情報量として1万塩基から100万塩基のギャップを埋める技術がDNA microarrayである。この技術は、通常の染色体分析G分染法のもつ優れた特徴であるゲノム全体を俯瞰できるという特徴をも併せ持つ。つまり、ゲノム全体を俯瞰でき解像度の向上した技術であるということができる。

機能1: 遺伝子コピー数の検出

それでは、DNA microarray技術の発達を振り

まきた よしお 旭川医科大学教育センター
〒078-8510 北海道旭川市緑ヶ丘東2条1丁目1-1
E-mail address : makita5p@asahikawa-med.ac.jp

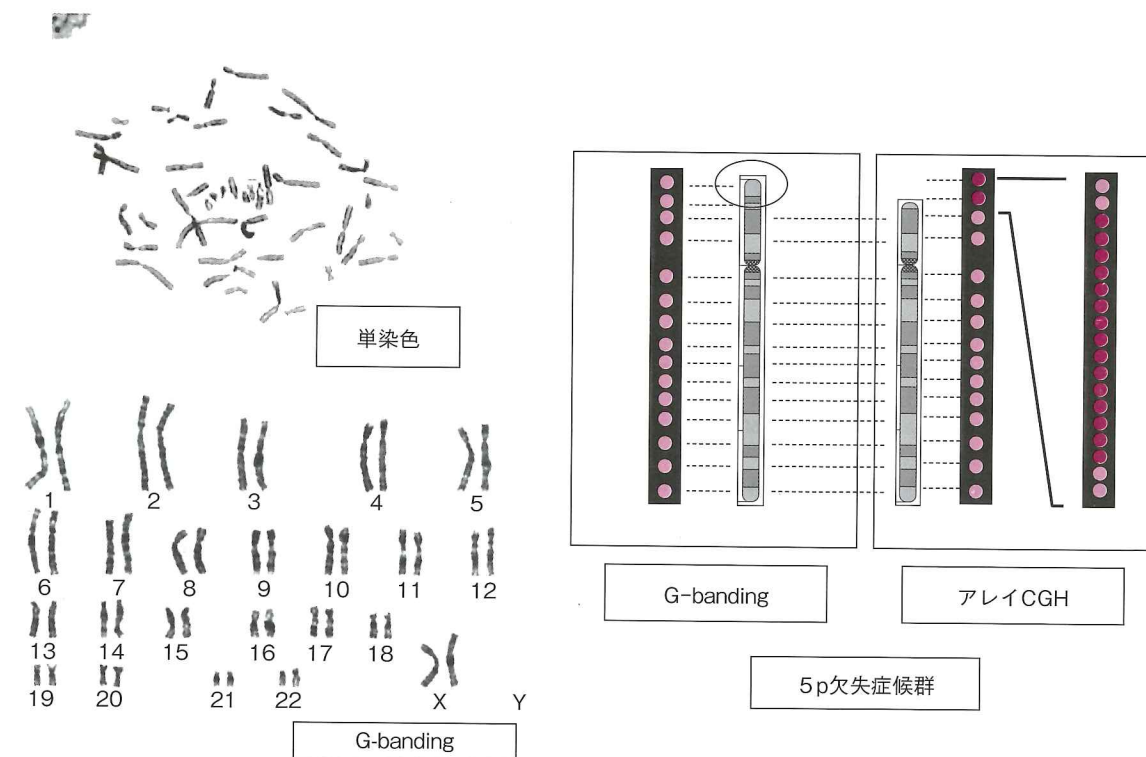


図2 染色体の解像度の変化 (井本逸勢博士原図を許可を得て転載；蒔田芳男：アレイ CGH 診断法の進歩，日本小児科学会教育委員会編：ここまで来た注目の小児科臨床ガイド（小児科専門医のための生涯教育ナビゲータ），中山書店，東京，pp189-193，2009より引用改変）

返ってみることにする。流れは，CGH (comparative genome hybridization)¹⁾，CGHアレイ，SNPアレイの順になる。CGH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。しかしながら，競合的ハイブリダイゼーションを行う場が分裂中期染色体にあるために解像度には限界があり，せいぜい2万～300万塩基対(2～3Mb)程度であった。解像度を上げるためにとられた方策が，競合的ハイブリダイゼーションを行う場の解像度を上げることである。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そのものや一定の間隔でのオリゴヌクレオチドを貼りつけたスライド(アレイ)ができれば，CGHアレイの完成である²⁾(図2参照)。このオリゴヌクレオチドの配列にSNP (single nucleotide

polymorphism) 情報を取り入れたのがSNPアレイである。そのため，CGHアレイ，SNPアレイでは得られる情報に若干の違いが生じる。

それでは，DNA microarray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？ 図2右に5p欠失症候群を例にイメージを示す。G分染では白黒バンド名の欠失と表記されるが，DNA microarrayでは欠失区間の位置情報とともに提供されることになる。

機能2：片親性ダイソミーの検出

CGHアレイ，SNPアレイでは得られる情報に違いがある。SNPアレイでは，遺伝子コピー数の検出以外に片親性ダイソミー (UPD: uniparental disomy) の検出が可能である。図3Aをご覧ください。ある染色体部位に重複があった場合のイメージである。SNPアレイでは，多くのSNPが搭載されている。そのため，ある座位はAAのホモ，あ

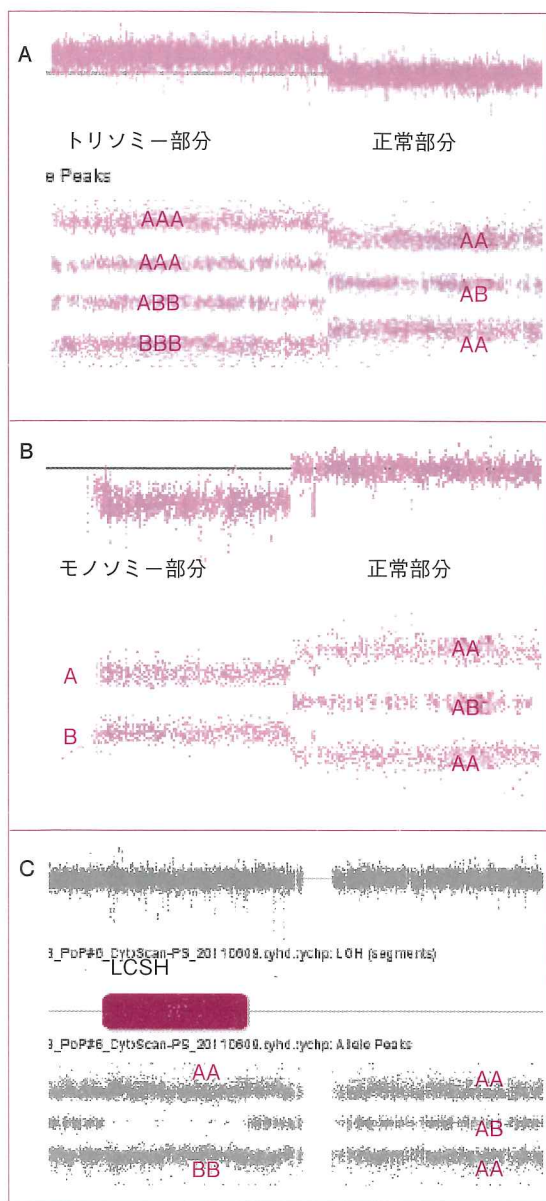


図3 SNPアレイの検出力

る座位はABヘテロ、ある座位はBBのホモというように均等に分布するはずである。そのためトリソミー部分では、上段の遺伝子コピー数の上昇とAAA, AAB, ABB, BBBの4本のラインとして検出されることになる。ある染色体部位の欠失の場合、上段の遺伝子コピー数は低下しモノソミーとなるためSNPの検出はAもしくはBのみとなる。つまりヘテロは検出されなくなる(図3B参

照)。ある染色体にUPDがある場合には、上段の遺伝子コピー数には変化がなくSNPの検出は、AAもしくはBBとなる。ここでもヘテロは検出されなくなる(図3C参照)。このような領域をLCSH (long contiguous stretches of homozygosity) と記載する。

供給されているDNA microarrayの特徴

現在供給されているDNA microarrayは、ほとんどがオリゴプローブを使用したものでBACを基本とした初期型のもの姿を消している。病的変化を検出するための標準化はISCA (International Standard of Cytogenomics Microarray Consortium)³⁾を通じて行われておりACMG (American College of Medical Genetics)からの勧告⁴⁾に沿うものが供給されている。これらのDNA microarrayは、Whole-genome plus target array designと呼ばれるデザインで設計されており、既知の微細欠失が知られている部位の解像度を上げ(20~50 kb)に、そのほかの部位の解像度を下げる(100~250 kb)デザインになっている。

問題点1: コピー数多型の問題

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。健康人においても、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。この正常変異は、CNV (Copy Number Variation)とも呼ばれるコピー数多型である。これは、「お父さんから1コピー、お母さんから1コピーもらって、通常2コピー」ということが成立しない部位があることを示している。つまり、コピー数が異なったからといって病的な状態とはいえない部位が存在するのである。このCNVの存在は、検査結果の解釈の難しさを示していたが、最初の報告から10年が経過し、CNV情報がかなり集積されるようになった^{3,7,8)}。このように正常多型の情報基盤の整備が進化したこともありDNA microarrayは研究室から飛び出し、臨床検査会社が研究検査として受け入れを行うレベルになってきた。

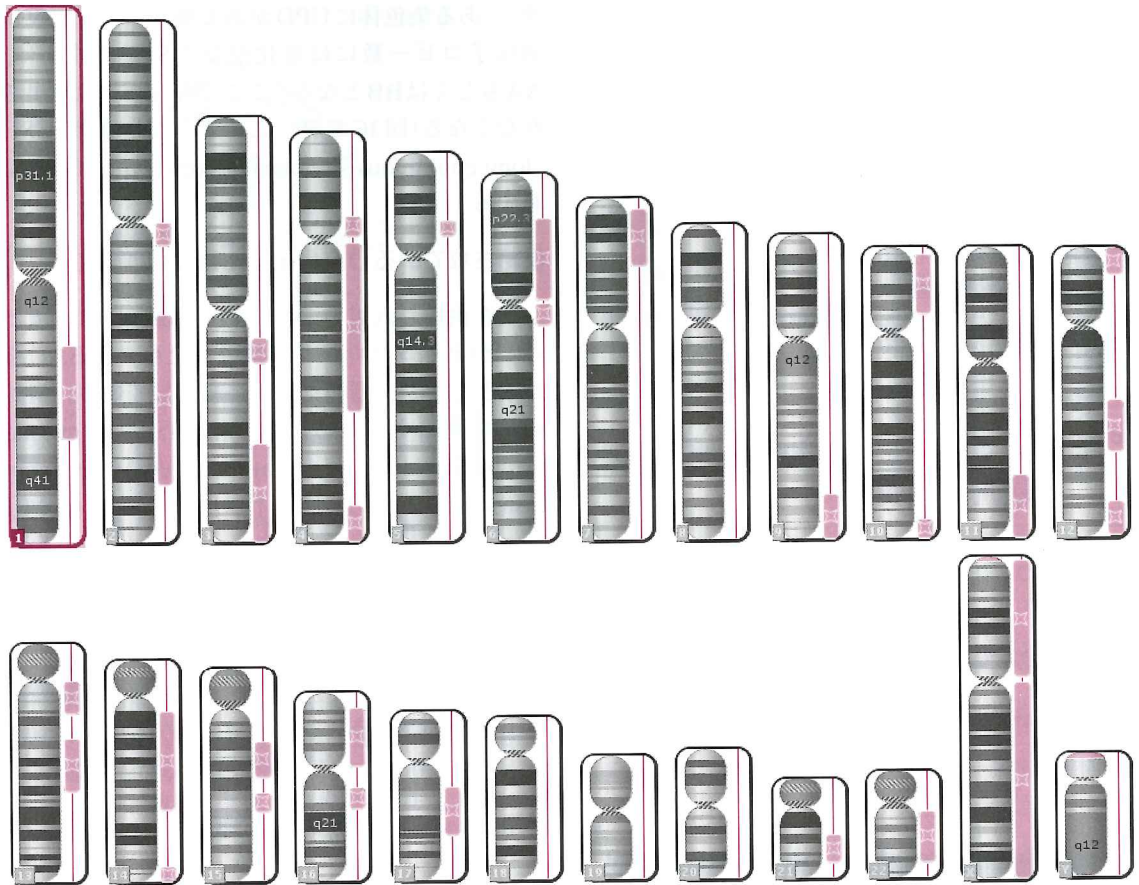


図4 近親婚におけるLCSH

問題点2：血族婚の問題

SNPアレイが提供できる機能として片親性ダイソミーの検出を取り上げたが、これは病的な意義の検出を強調した言い方である。基本的には、遺伝子がホモ接合になっている部分を検出できるということである。いとこ婚では遺伝子の1/16が共有されているが、この事実が可視化されるということをも示している。つまり30億塩基対の1/16、おおよそ1.9億塩基対(187Mb)をLCSHとして検出することが可能である⁹⁾。自験例を図4に示す。患児では728MbがLCSHの状態である。30億塩基対の1/4が共有されているのがおわかりいただけると思う。

応用

本稿では、総論としてのDNA microarray:CGHアレイ、SNPアレイの特徴を記載してきた。最後に「胎児・新生児への応用」について述べたいと思う。アメリカでは、がん細胞の解析にDNA microarrayが用いられるようになるまで、商用DNA microarrayの8割が出生前診断用に出荷されていた。このように出生前診断においては強力なツールであることは間違いない。しかしながら2013年の論文においてもLCSHや病源性のはっきりしないCNVへの対応が問題¹⁰⁾となっている。CNVの意義の確定のためには、ご両親の解析が必要になることもある。そのため、応用にあたっては適切な事前、事後の遺伝カウンセリングの準備が必要である。胎児と異なり新生児の場合、病的所見の

存在のもとでの検査になりDNA microarray応用へのハードルは低くなったと考えられる。また、病的所見をもつ新生児での検査データの蓄積は、病源性CNVの発見にもつながり検査精度を向上させるものと期待させる。新生児への応用においてのハードルは低くなったとはいえDNA microarrayが内在する問題点を避けることはできない。十分な予備知識の上で実施することが望ましいのはいうまでもない。

今我々は、単染色法時代に染色体の分染法が持ち込まれた時と同じ問題点やジレンマを抱えている。分染法の発達により9番染色体の腕間逆位inv(9)のような正常多型やヘテロクロマチンが発見され病的意義が検討された。DNA microarray時代の問題点とジレンマは、一つはCNVの存在であり、もう一つはLCSHにおける血族婚検出である。新しい技術の応用のためには、直面する問題点を解決していく作業も必要である。本稿が、理解のための一助となれば幸いである。

文献

- 1) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258** : 818-821, 1992
- 2) Inazawa J, Inoue J, Imoto I : Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* **95** : 559-563, 2004
- 3) <https://www.iscaconsortium.org/>
- 4) Kearney HM, South ST, Wolff DJ, et al : American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormality. *Genet Med* **13** : 676-679, 2011
- 5) Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al : Large scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* **305** (5683) : 525-528, 2004
- 6) Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al : Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* **36** (9) : 949-951, 2004
- 7) <http://decipher.sanger.ac.uk/>
- 8) <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>
- 9) Schwartz S: Clinical utility of single nucleotide polymorphism arrays. *Clin Lab Med* **31** : 581-594, 2011
- 10) Ganesamoorthy D, Bruno DL, McGillivray G, et al : Meeting the challenge of interpreting high-resolution single nucleotide polymorphism array data in prenatal diagnosis : does increased diagnostic power outweigh the dilemma of rare variants? *Int J Obstet Gynaecol* **120** : 594-606, 2013

* * *