

先天異常症候群診断用DNAアレイ (GD-700) の開発

岩木 義英*, 石井 靖幸*, 氏原 大*, 吉田 淳哉*, 三好 隼人*,
守 智子*, 金原 秀行**, 倉光 昌之***, 寺島 薫*

Development and application of DNA array (GD-700) for congenital anomaly syndromes

Yoshihide IWAKI*, Yasuyuki ISHII*, Dai UJIHARA*, Junya YOSHIDA*,
Hayato MIYOSHI*, Tomoko MORI*, Hideyuki KANEHARA**,
Masayuki KURAMITSU***, and Kaoru TERASHIMA*

Abstract

The recent development of the Comparative Genomic Hybridization (CGH) method enables the comprehensive analysis of the fine structure of human chromosomal abnormalities. The causes of many congenital anomaly syndromes in newborns and children are difficult to be determined. Therefore, it is significantly important to clarify the syndromes and to apply the CGH method for a practical diagnosis.

Professor Inasawa of Tokyo Medical and Dental University established a well reproducible CGH method that enables quantitative analysis of the change in the copy number of the genome. Furthermore, he and his team prepared the Genome Disorder Array (GD-700) with BAC DNA for congenital anomaly syndromes. From 2005, FUJIFILM has collaborated with Prof. Inazawa, has proven this GD-700 to be practical, and developed an original analysis method "Dual Hybridization method" this year. In this paper, we introduce the design of this array and its original method.

1. はじめに

これまで先天異常症候群のゲノム異常の解析は染色体検査を中心に行われてきたが、近年、Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法が開発され、ヒト染色体の微細構造異常の解析が可能になった¹⁾。新生児および小児を対象とした先天異常症候群では原因不明の疾患が多数あり、その原因を解明し、CGH法を用いて診断を行なうことはこの分野の医療に極めて重要である。

東京医科歯科大学稲澤教授はCGH法を用いて再現性よ

く1コピーの増減を定量的に解析する手法を確立し²⁾、さらに、先天異常症候群診断用のGenome Disorder Array (GD-700) を作製した。富士フイルムは、2005年より稲澤研究室と共同研究を開始し、500症例以上を対象とした実用性試験を進めた稲澤教授、(株)ビー・エム・エルを中心としたアレイCGH診断法実用化コンソーシアムに協力するとともに、臨床検査に適した独自の解析法であるDual Hybridization法の開発を行なった。その結果、GD-700とDual Hybridization法による臨床現場で活用できる新しい検査システムを確立した。

本誌投稿論文 (受理2009年11月24日)

*富士フイルム (株) R&D統括本部
ライフサイエンス研究所
〒258-8577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577

*Life Science Research Laboratories
Research & Development Management Headquarters
FUJIFILM Corporation
Ushijima Kaisei-machi Ashigarakami-gun, Kanagawa
258-8577, Japan

**富士フイルム (株) R&D統括本部
先端コア技術研究所
〒258-8577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577

**Frontier Core-Technology Laboratories
Research & Development Management Headquarters
FUJIFILM Corporation
Ushijima Kaisei-machi Ashigarakami-gun, Kanagawa
258-8577, Japan

***富士フイルム (株) 富士宮工場
フィルム材料製造部
〒418-8666 静岡県富士宮市大中里200

***Film Materials Production Division
Fujinomiya Factory
FUJIFILM Corporation
Ohnakazato, Fujinomiya, Shizuoka 418-8666, Japan

本報告では、GD-700の商品設計と性能、および新しい解析法であるDual Hybridization法について述べる (Fig. 1)。

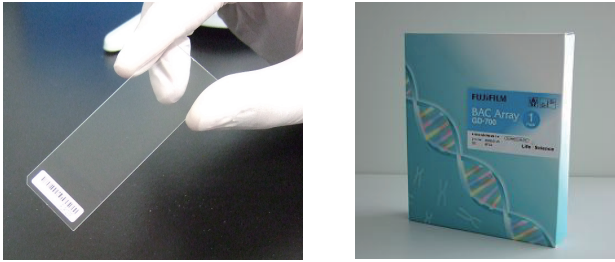


Fig. 1 The appearance of "GD-700".

2. GD-700の商品化

2.1 GD-700の設計指針

現在広く用いられている染色体検査法は、細胞培養、標本作製、G染色による顕微鏡観察という手間のかかる行程が必要であり、さらに染色体異常の有無を正確に同定するには検査技師の高度な技能が要求されるため、簡便化がむずかしいとされていた。われわれが開発したDual Hybridization法とGD-700とをあわせて用いることにより、微細な染色体ゲノムコピー数異常を高精度かつ簡便に検出できる。

GD-700は、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリーとしてヒトゲノムプロジェクトで国際的に広く利用され信頼性の高いRP-11³⁾を用い、この中から、ヒトゲノムデータベースに登録済の先天異常疾患に関連する領域を有する712種類のBACクローンを採用している。それらを用いると、微細欠失症候群・微細重複症候群の30種類、サブテロメア領域の41ヶ所 (13, 14, 15, 21, 22, Y染色体の短腕は除く)、ペリセントロメア領域の42ヶ所の領域についてゲノムコピー数異常を

一度に解析することができる。特に、従来の染色体検査では解析困難であったサブテロメア領域は、近年、精神発達遅滞をきたす疾患の原因領域である可能性として注目されていることから、GD-700でサブテロメア領域を解析できる意義は大きい (Table 1)。

Table 1 The list of congenital anomaly syndromes tested by "GD-700".

症候群	遺伝子	欠失/重複	備考
van der Woude 症候群	DNFB	1q32-q41 欠失(欠失)	
Mowat-Wilson 症候群	ZFXH18	2q22.3 欠失(欠失)	
BPE3 症候群	FOX2	3q23.3 欠失	
4p- 症候群	Multiple	4p16.3 欠失	
5p- 症候群	Multiple	5p15.3・p15.2 欠失	
Sotos 症候群	NSD1	5q35 欠失	5q35 重複症候群
Saethre-Chotzen 症候群	TWIST1	7p21.1 欠失	
Williams 症候群	ELN	7q11.23 欠失	7q11.2 重複症候群
Langer-Giedion 症候群	EXT1, TRPS1	8q24.11-q24.13 欠失	
Beckwith-Wiedeman 症候群	IGF2	11p15.5 欠失/重複	
WAGR 症候群	WT1, PAX6	11p13 欠失	
Potocki-Shaffer 症候群	ALX4, EXT2	11p11.2 欠失	
Paister-Killian 症候群	Multiple	11(2p) 重複	
Prader-Willi 症候群	SNRPN	15q11-q13 欠失	15q11-q13 重複症候群
Angelman 症候群	UBE3A	15q11-q13 欠失	
Rubinstein-Taybi 症候群	CREBBP	16p13.3 欠失	
Miller-Dieker 症候群	LIS1	17p13.3 欠失	
Charcot-Marie-Tooth 1A	PMP22	17p12 重複	HNPP
Smith-Magenis 症候群	RAI1	17p11.2 欠失	Potocki-Lupski 症候群
Neurofibromatosis 1	NF1	17q11.2 欠失	
Diamond-Blackfan 症候群	RPS19	19q13.2 欠失(欠失)	
Alagille 症候群	JAG1	20p12.2 欠失	
Down 症候群	Multiple	21q22 重複	
Cat eye 症候群	Multiple	22q11.2 重複	
22q11.2 欠失症候群	TBX1	22q11.2 欠失	22q11.2 重複症候群
X連鎖性急鋒癇	STS	3p22.31 欠失	
Kalman syndrome type 1	KAL1	Xp22.31 欠失	
Duchenne Muscular Dystrophy	DMD	Xp21.2 欠失/重複	
Pelizaeus-Merzbacher 病	PLP1	Xq22.2 欠失/重複	
MECP2 重複症候群	MECP2	Xq28 重複	

2.2 製造方法

GD-700を構成する712種類のBACクローンは、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法により、安定したシグナルが得られること、他の染色体へのミスハイブリダイゼーションがないことを確認した。選択されたBACクローンからプラスミド精製用カラムを用いて高純度BAC DNAを単離し、アダプターライゲーションPCR法でBAC DNAを増幅することによりプローブDNAを作製して、さらに、712種類のプローブDNAは、非接触式のインクジェットスポッター GENE SHOT (日本ガイシ(株))により、DNAアレイ用スライドガラス(松浪硝子工業(株))上に、濃度・径・形状・位置が均一になるようにスポットをした。これらの工程を経ることで、安定的にゲノムコピー数異常を検出できるBACアレイを作製することに成功した⁴⁾ (Fig. 2)。

ヒトゲノムデータベースに基づき、**先天性疾患遺伝子領域712種類**をヒトBACライブラリー(約40万クローン)から選別。

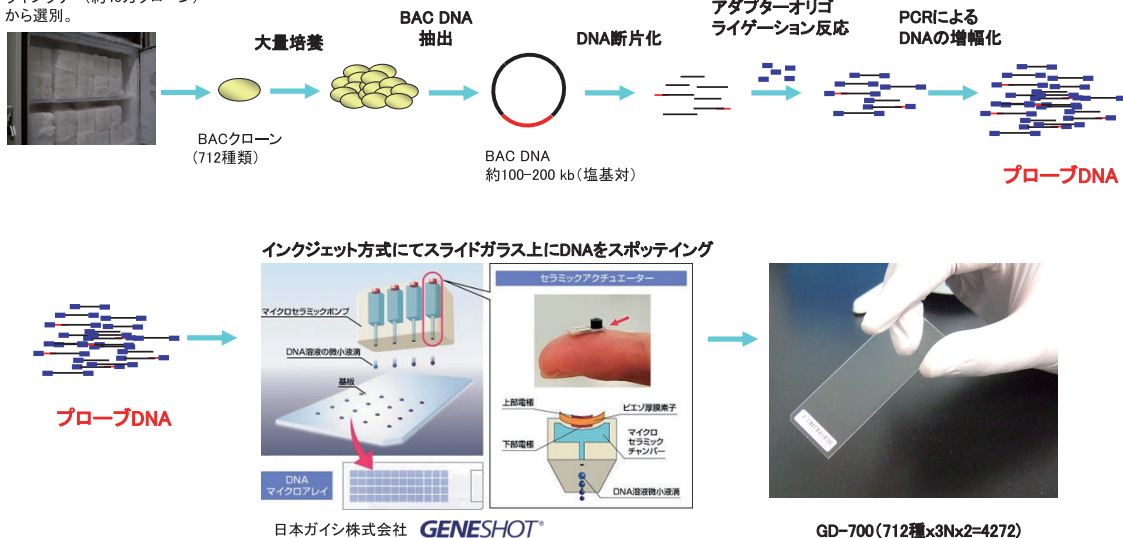


Fig. 2 The flow of "GD-700" production.

3. 解析方法の開発

3.1 概要

一般的なアレイCGH法（単色法）の原理をFig. 3に示す。蛍光分子で標識したテストサンプルおよびリファレンスサンプル（遺伝子異常がないことを確認しているサンプル）をそれぞれBACアレイ上のプローブにハイブリダイゼーションする。その後、アレイにハイブリダイゼーションしたDNAの蛍光値を測定し、テストとリファレンスのサンプルの蛍光値比（テスト/リファレンス）を算出することによってサンプル中のゲノムの欠失、増幅を検出することができる（Fig. 3）。

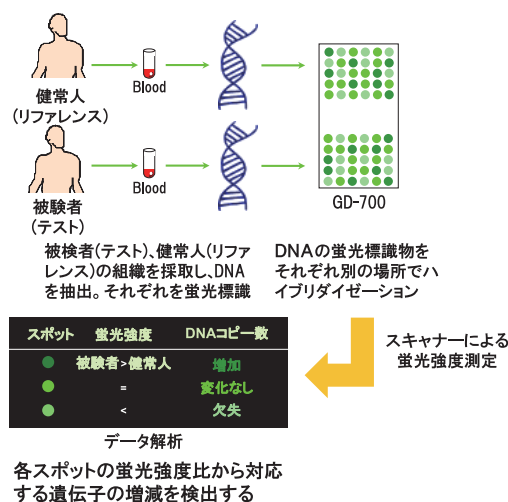


Fig. 3 The principle of CGH array method.

従来の単色法では、テストとリファレンスのサンプルをそれぞれ別々のアレイ上でハイブリダイゼーションさせるため、それぞれのサンプルのさまざまなハイブリダイゼーション条件の影響（例えば、ハイブリダイゼーションの液組成、温度、攪拌条件、プローブDNAの固定化量など）を受けやすく、結果にばらつきが生じやすい問題があることが一般的に知られている。今回われわれは、このようなハイブリダイゼーション条件の影響を減らすことができる新しいアレイCGH法、Dual Hybridization法を開発した。

3.2 Dual Hybridization法の原理

Dual Hybridization法は、テストおよびリファレンスのサンプルと共に、蛍光標識した内部標準DNAをそれぞれのサンプルに混合して、CGHアレイにハイブリダイゼーションする新しいアレイCGH法である。内部標準DNAとして、CGHアレイ上のすべてのプローブDNAに対して、それぞれ一定量ハイブリダイゼーションすることができるDNAを用いた。

それぞれのプローブDNAに対してハイブリダイゼーションしたテストとリファレンスのサンプル、および内部標準DNAの蛍光値を測定する。テストとリファレンスの蛍光値をそれぞれ共にハイブリダイズした内部標準

DNAの蛍光値で割った値を補正した蛍光値とし、補正後のテストとリファレンスの蛍光値の比をとる。このような補正を行なうことで、テストとリファレンスを別々の場所でハイブリダイゼーションするためデータがばらつくという、従来の単色法の問題点を解決することに成功した（Fig. 4）。

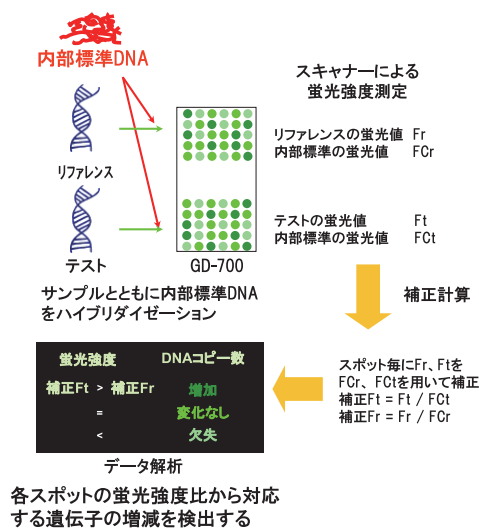


Fig. 4 The principle of Dual Hybridization.

4. GD-700の評価

今回商品化したGD-700について、市販されている標準ゲノム（male/female（プロメガ（株））を用いた性染色体の比較検討（基礎検討）および染色体異常のゲノム（陽性検体）を用いた検討をDual Hybridization法で実施した。

4.1 標準ゲノムの評価

標準ゲノムを用いた検討では、規格として、①常染色体の蛍光値の比が0.75～1.25の範囲に入っていること。（前記の範囲から外れるデータが存在しても、連続していないこと）②maleをリファレンスとしてサンプルfemaleをテストサンプルとした際に、性染色体であるX染色体が常染色体に比べ差があること（すなわちX染色体の平均値が常染色体の平均値に比べ少なくとも0.5以上の差があること）の2点を設け、評価を行なった。n=4での評価の結果、すべてのサンプルで2つの規格を満たしていることを確認した。

4.2 染色体異常のゲノムの評価

染色体異常のゲノムを用いた検討では、先天異常疾患（6検体）および流死産物由来（3検体）のDNAを用いた。先天異常疾患においては、予め染色体異常領域がわかっている検体を用いてアレイCGH解析をDual Hybridization法を用いて解析を実施し、正確に検出できるかを基準として検討を実施した。検討の結果、検体番号No.1（2p25.3 Gain/5p15 Loss）、No.2（15q26.3 Gain）、No.3（22q13.31 Loss）、No.4（16p13.3 Gain）、No.5（22q11.21

Gain), No.6 (2p25.3 Gain/10p15.3 Loss) のすべての検体について問題なく検出することができた。

流死産物からの結果においては、予めトリソミーの染色体異常がわかっているDNAサンプルで解析を実施した。この結果、13番トリソミー、16番トリソミー、21番トリソミーすべてにおいて検出されることがわかった (Fig. 5, Fig. 6)。

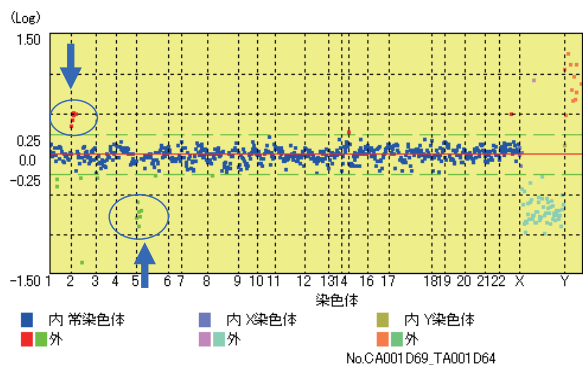


Fig. 5 The result of sample No.1 (2p25.3 Gain/5p15 Loss).

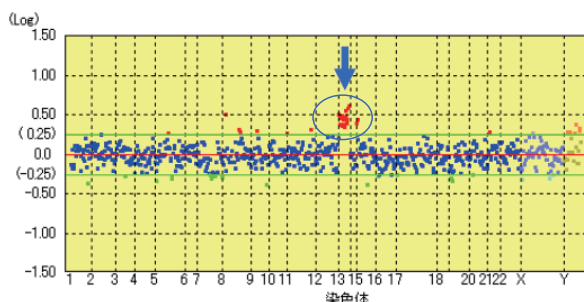


Fig. 6 The result of sample No.7 (13q Gain (trisomy)).

いずれの場合においても明瞭に染色体異常を検出することができたことから、本GD-700とDual Hybridization法の組み合わせは、染色体検査として機能することがわかった (Table 2)。

Table 2 The results of positive samples.

先天性異常疾患検出結果		
検体番号	染色体異常位置	検出結果
No.1	2p25.3 Gain/5p15 Loss	○ 成功
No.2	15q26.3 Gain	○ 成功
No.3	22q13.31 Loss	○ 成功
No.4	16p13.3 Loss	○ 成功
No.5	22q11.21 Gain	○ 成功
No.6	2p25.3 Gain/10p15.3 Loss	○ 成功
流死産物検出結果		
検体番号	染色体異常位置	検出結果
No.7	13q Gain (13番トリソミー)	○ 成功
No.8	16q Gain (16番トリソミー)	○ 成功
No.9	21q22 Gain (21番トリソミー)	○ 成功

※染色体異常位置を示す記号について: 例 2p25.3 Gain(Loss)
染色体番号 p:長短の97% q:短腕 染色体内 Gain:増幅 Loss:欠失

5. まとめ

われわれは、先天異常症候群検出用のGD-700の商品化と共に、本アレイの解析法としてDual Hybridization法の開発に成功した。さらに、これらを用いて、予め染色体異常領域がわかっている検体を正しく検出できることを実証した。今後、この方法は、従来法である染色体検査技術を代替・補完する技術として広く普及し、潜在的な染色体・ゲノム異常がその疾患の背景にあると考えられている原因不明の先天異常症、精神発達障害、自閉症、さらに癌などのゲノム解析ならびに診断ツールとして応用できると考えている。

6. 謝辞

本GD-700の商品化およびDual Hybridization法の開発にあたり、多大な協力をいただいた東京医科歯科大学稲澤教授ならびに(株)ビー・エム・エルの方々に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Pinkel, D. et al. Nat. Genet., **20** (2), 207-211 (1998).
- 2) 井本逸勢, 稲澤譲治. 蛋白質 核酸 酵素, **50** (16) 2134-2139 (2005).
- 3) Osoegawa K. et al. Genome Res., **11** (3), 483-96 (2001).
- 4) 稲澤譲治ほか. アレイCGH診断活用ガイドブック. 大阪, 医薬ジャーナル社(2008).

(本報告中にある“GENESHOT”は日本碍子(株)の登録商標です。)