

氏名	寺澤 すみれ
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第 1173 号
学位授与の日付	平成30年 9 月25日
学位論文題名	Multiplex PCR in noninvasive prenatal diagnosis for <i>FGFR3</i> -related disorders 「 <i>FGFR3</i> 遺伝子異常症に対するMultiplex PCRを用いた出生前遺伝子診断」 Congenital Anomalies (in press)
指導教授	倉橋 浩樹
論文審査委員	主査 教授 吉川 哲史 副査 教授 藤井 多久磨 教授 前田 明

論文内容の要旨

【緒言】

胎児骨系統疾患の中でタナトフォリック骨異形成症(tanatophoric dysplasia:以下TD)と軟骨無形成症(acondroplasia:以下ACH)はfibroblast growth factor receptor 3(*FGFR3*)遺伝子変異が原因で*FGFR3*発現が異常となる疾患として知られている。TDは予後不良な疾患であるが、ACHは予後に関しては良好である。従って、妊娠中に胎児超音波検査で四肢短縮を認めた場合に、周産期管理の方針を決めるにあたり、生命予後の異なるこれらの疾患を鑑別する事が重要である。また、無侵襲的出生前遺伝学的検査(Noninvasive prenatal testing: 以下NIPT)とは、母体血を利用して胎児の遺伝学的検査を行う方法である。妊娠中の母体血漿中には母親由来の細胞から遊離したDNA(cell free DNA、以下cfDNA)を含み、その中に胎児由来の断片化されたcfDNAが含まれている。よって、この胎児cfDNAを利用することによって母体に対して無侵襲的に胎児の出生前遺伝子診断が可能となる。そこで我々はこれらの診断に際し、より低侵襲的な方法として、妊娠中の母体血から抽出したcfDNAを用いてmultiplex PCRで増幅後に次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer: 以下NGS)による解析を行い、結果を検討した。

【方法】

妊娠17-35週に超音波検査で胎児四肢短縮を認め当院に紹介受診となり、胎児3D-CTで臨床診断された妊婦7例を研究対象とした。倫理委員会の承認を得た上で同意を得て、妊娠18-37週に母体血を採取するとともに分娩時に臍帯血を採取した。7例のうち3例はTD、2例はACH、1例は骨形成不全症、1例は胎児発育不全であった。*FGFR3*異常疾患の原因遺伝子である*FGFR3*遺伝子は4番染色体長腕に位置し、その遺伝子上にTD 1・2型、ACH、軟骨低形成症(hypochondroplasia、以下HCH)に対する遺伝子変異が検出さ

れた5つのエクソンが存在する。そこで、PCR反応系に複数のプライマー対を同時に使用することで、複数の遺伝子領域を同時に増幅するmultiplex PCR法が有用と考えた。そこで、*FGFR3*異常症の診断に際し、妊娠中の母体血cfDNAを用いてmultiplex PCRで5つの遺伝子変異を含むエクソンを同時に増幅させNGSで解析を行う方法を考案し検討を行った。1回目のPCRとして*FGFR3*遺伝子変異を含む5つの領域の配列を増幅するように、5'末端にアダプター配列の付いたプライマーを用いてmultiplex PCRを行い、次に2回目のPCRの際にNGSのフローセル結合配列を5'末端に付加した。得られたPCR産物をNGSを用い配列を解析した。

【結果】

6症例の母体血cfDNAを用いて*FGFR3*遺伝子変異を含む5つの遺伝子領域を解析した。2症例でTD 1型に認める変異であるc.742C> Tとc.1118A> GがそれぞれPCR 1とPCR 2領域で同定された。また、他の2症例ではACHに認める変異であるc.1138G> Aとc.1138G> CがそれぞれPCR 2領域で同定された。対照として用いた胎児発育不全と骨形成不全症の母体血cfDNAにはNGSのエラー率と同定度の変異しかなく、明らかな変異を認めなかった。

【考察】

母体血cfDNAを用いて*FGFR3*遺伝子変異を含む5つの遺伝子領域を解析したところ、TDとACHの変異の検出が可能であった。一般的な*de novo*突然変異の場合、次子の再発リスクは低い再発例の報告もある。出生前診断として従来施行される羊水検査や絨毛検査は侵襲性があるため、*FGFR3*異常症罹患児の妊娠歴のある妊婦に対し、本研究で検討したNIPTは合併症を回避できる有効な選択肢となるだろう。

【結語】

妊娠中の母体血から抽出したcfDNAより、multiplex PCRで5つの遺伝子変異を同時に増幅させ次世代シーケンサーで解析を行う方法を考案し、結果を検討した。今後、*FGFR3*異常症に対する出生前の無侵襲的な診断への応用が可能と考えられる。

論文審査結果の要旨

胎児骨系統疾患の中でタナトフォリック骨異形成症(tanatophoric dysplasia: TD)と軟骨無形成症(acondroplasia: ACH)はfibroblast growth factor receptor 3(*FGFR3*)遺伝子変異が原因の疾患で、TDが予後不良な疾患であるのに対しACHの予後は良好で、胎児超音波検査で四肢短縮を認めた場合に、生命予後の異なるこれらの疾患の鑑別が重要となる。申請者らは、複数の標的遺伝子を対象としたmultiplex PCRと次世代シーケンサーを組み合わせることで、母体血中の胎児由来cell free DNA中の5つの標的遺伝子領域変異を効率よく、かつ正確に検出する画期的なシステムを構築した。本検査方法は、出生前診断として従来施行されてきた羊水検査や絨毛検査と比較し侵襲性が低く安全な、妊婦血液を用いた無侵襲的出生前遺伝学的検査(Noninvasive prenatal testing: NIPT)を可能にし、臨床的に極めて有用性が高いと考えられる。審査委員会での質疑応答も的確になされ、本研究内容は既に国際専門誌Congenital Anomalies誌にも掲載されていることから、本研究論文は博士論文として十分に値すると判断した。