

氏 名	野 田 佳 照
学 位 の 種 類	博士(医学)
学 位 記 番 号	甲 第 1185 号
学位授与の日付	平成31年3月10日
学 位 論 文 題 名	Potentially effective method for fetal gender determination by noninvasive prenatal testing for X-linked disease 「X連鎖劣性遺伝性疾患に対する無侵襲的出生前遺伝学的検査による胎児性別判定の効果的手法」 Congenital Anomalies doi.org/10.1111/cga.12302
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】

出生前診断として胎児の遺伝学的検査を行うには、羊水や絨毛などの胎児成分を採取する侵襲的検査が必要であったが、近年は母体血を用いた無侵襲的出生前遺伝学的検査(noninvasive prenatal testing：NIPT)が注目されている。これまでNIPTによる出生前診断では、21トリソミーなど染色体異数性の診断が行われているが、重篤なX連鎖劣性遺伝性疾患への臨床応用としてNIPTによる胎児の性別判定が考えられる。X連鎖劣性遺伝性疾患の妊娠において、女兒と診断されれば保因者か健常者であるため、その後の羊水検査は不要であり、理論上は半数例で侵襲的検査が回避できると考えられる。

### 【目的】

NIPTによる性別判定の臨床的有用性は高いと思われるが、妊娠初期のcell free DNA(cfDNA)に含まれる胎児DNAの割合はわずか数%であり、性別判定目的のPCRが陰性の場合、女兒と証明するには鋳型DNAに胎児由来DNAが含まれていない偽陰性の可能性を排除する必要がある。そこで本研究では、次世代シーケンサーによるSNP解析を利用して、母体血中の胎児成分の存在の有無を確認することで、NIPTによる胎児の性別判定の精度向上を目指したシステムを確立することを目的とした。

### 【対象および方法】

院内倫理審査員会の承認を得た後に、研究内容に同意の得られた妊娠9週以降の母体血漿(71検体)からcfDNAを抽出後、Y染色体特異的反復配列のPCRによる性別判定を行った。また、cfDNA中に胎児由来DNAが含まれている事を証明するため、両親の血球由来DNAと母体血漿から抽出したcfDNA(各20組)の双方を用いて、マイナーアリル頻度が約50%の30箇所 のSNPを選定し、同領域のmultiplex PCRを行った後に次世代シーケンサーに

よるSNP解析を行い、選定したSNPの少なくとも1箇所以上で母親と異なる父親由来のアリルタイプを検出することで胎児由来DNAの有無を確認するシステムを考案し、検証実験を行った。

### 【結果】

性別判定を行った71検体中、Y染色体のPCRが陽性であった38例全てで性別が男児と正しく診断できたが、PCRが陰性(女兒)と判断した33例中2例は結果的に男児であり、胎児由来DNA量が少ないことによる偽陰性と考えられた。そこで、両親の血球由来DNAと母体血漿cfDNAの20組に対してSNP解析を行った結果、20組すべてで母親と異なる父親由来のアリルタイプのSNPを同定することができ、母体血漿cfDNA中の胎児由来DNAの有無の判定が可能であった。

### 【考察】

Y染色体のPCRによる性別判定の検討で、男児を女兒と誤診断する偽陰性例が6.0%(33例中2例)と比較的高頻度であったことから、NIPTによる性別判定において、PCR判定のみでの診断は不十分であり、偽陰性の可能性を排除するためcfDNA中の胎児由来DNAを同定するためのシステムの確立が必要と思われた。

また今回の検討から、Y染色体のPCRが陰性の場合に、複数のSNP領域に対するmultiplex PCRを行った後に次世代シーケンサーによるSNP解析を行う方法を用いて、胎児由来DNAの存在を確認する新規手法が確立された。このシステムによってY染色体のPCRが陰性の場合、胎児由来DNAを認めれば女兒と診断し、その後の羊水検査は不要となり、一方で胎児由来DNAを認めなければ判定不能と判断し、従来の羊水検査を行う新たな出生前診断の戦略が考えられた。

### 【結語】

我々が考案したシステムを確立することにより、NIPTによる胎児性別判定の診断精度向上が示唆されるとともに、今後のX連鎖劣性遺伝性疾患保因者妊婦への臨床応用が期待される。

## 論文審査結果の要旨

重篤なX連鎖劣性遺伝性疾患に関わる診療を行う際に、無侵襲的出生前診断(NIPT)による胎児の性別判定が有用と考えられる。しかし、性別判定目的のPCR解析が偽陰性となる可能性があり、それに対する解決策の開発が重要な課題となっていた。そこで本研究では、次世代シーケンサー(NGS)によるマイナーアリルのSNP解析を利用して、母体血中の胎児成分の有無を確認することで、NIPTによる胎児の性別判定の精度向上を目指した。71例の母体血漿を用いてPCR解析によるY染色体検出を試みた。Y染色体陽性38例は全て男児を出生したが、陰性33例中2例が男児を出生した(偽陰性)。そこで、20組の両親血球由来DNAと母体血漿の循環DNA(cfDNA)に対してNGSを用いたSNP解析を行い、全例で母親と異なる父親由来のアリルタイプのSNPが同定できた。以上から、Y染色体のPCRに加え、今回設定した30ヵ所のSNP領域に対するmultiplex PCRを行った後NGSによる解析を行うことで、正確な胎児性別判定が可能なことを証明した。本研究は臨床的に極めて重要性の高い研究であり、審査委委員会での質疑応答も的確になされたことから博士論文として十分に値すると判断した。