

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2020B-9

課題名：無侵襲的胎児 RHD ジェノタイピング技術を遺伝学的検査として確立するための精度評価

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター研究所  
(所属・職名 氏名) 周産期病態研究部周産期ゲノミクス研究室長 中林一彦

妊娠母体血中遊離核酸を用いた胎児 RHD 遺伝子型出生前検査の従来法では東アジア人で比較的高頻度に見られる非欠失タイプ陰性アレルを野生型アレルと区別できなかった。最近我々は、東アジア人種にも適応可能な胎児 RHD 遺伝子型決定法を開発した。本研究は、①我々が開発した胎児 RHD 遺伝子型決定技術を遺伝学的検査として確立するための精度評価、②ジェノタイピング技術改良、③ データ解析工程自動化、を目的とする。今年度は、成育医療研究センター・東京慈恵会医科大学・昭和大学の三施設で RhD 陰性妊婦 15 症例を収集し、成育医療研究センターで胎児 RHD 遺伝子型を決定した。

### 1. 研究目的

妊娠母体血中遊離核酸を用いた胎児 RHD 遺伝子型出生前検査は、複数の欧州国家で全国規模で実施されているのに対し、日本を含む東アジア諸国では実施されていない。欧州で普及している検査は欠失タイプの RhD 陰性アレルのみを考慮した定性的 PCR であり、東アジア人で比較的高頻度に見られる非欠失タイプ陰性アレルを野生型アレルと区別できないことが、その一因である。我々は、その状況を打破する方法として、東アジア人種にも適応可能な胎児 RHD 遺伝子型決定アンプリコンシーケンス法を開発した<sup>1)</sup>。

本研究は、①我々が開発した胎児 RHD 遺伝子型決定技術の精度評価のために三年間で合計 60 例を目標に、RhD 陰性妊婦症例を対象とした胎児 RHD 遺伝子型決定を実施すること、②ジェノタイピング精度向上と低コスト化を目的とした技術改良を推進すること、③ データ解析工程を自動化することで、シーケンスデータからの遺伝子型判定工程を効率化・規格化すること、を目的とする。

本研究では、成育医療研究センター・昭和大学・東京慈恵会医科大学の三施設で検体を収集し、成育医療研究センターにおい

て RHD 遺伝子型決定を実施する。

### 2. 研究組織

研究者	所属施設
中林 一彦	成育医療研究センター
秦 健一郎	成育医療研究センター
左合 治彦	成育医療研究センター
関沢 明彦	昭和大学
岡本 愛光	東京慈恵会医科大学

### 3. 研究成果

#### 検体収集体制の確立

本研究計画の RhD 不適合妊娠症例の収集、母体血・臍帯血を対象とした遺伝子解析の実施に関して、昭和大学、東京慈恵会医科大学において新たに各倫理委員会より研究計画の承認を得た。

妊娠母体血液の採血には NIPT 用採血管である Streck 社採血管を採用した。この採血管には細胞固定剤が含まれ、血中に死細胞から核ゲノム DNA が漏出するのを防止する。採血後一週間程度の常温保存が可能であることが既に示されている。遺伝子型決定実施施設である成育医療研究センターへの昭和大学・慈恵医大からの血液サンプルの輸送は、宅配便による常温輸送を採用した。専用の輸送箱確保・送り状電子化により輸送に伴う負担の軽減を図った。

## DNA 抽出プロトコールの確立

Streck 社採血管の細胞固定剤は血漿からの DNA 抽出効率低下の要因と成り得るため、従来の DNA 抽出プロトコールを ProteaseK 処理を含む Streck 採血管対応プロトコールに変更した。RHD 遺伝子型決定に必要な量の遊離核酸が抽出できることを確認した。

## RHD 遺伝子型決定の実施

成育医療研究センター・昭和大学・慈恵医科大学で収集した合計 15 検体について、アンプリコンシーケンスライブラリ作製、イルミナ社ベンチトップ型次世代シーケンサー MiSeq でのシーケンスデータ取得、データ解析の工程からなる胎児 RHD 型遺伝子型決定を実施し（図 1）、判定結果を担当医師に送付した。

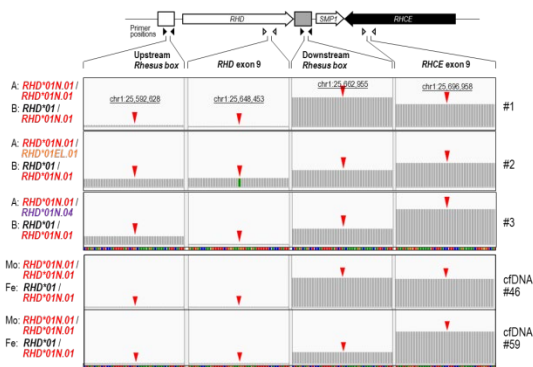


図 1: RHD 遺伝子型決定実施例。遺伝子型推定に必要な 4 か所の領域のリード数・塩基タイプを示している。

## 遺伝子型決定法の改良①: Tailed PCR 法の開発

アンプリコンシーケンスライブラリにイルミナシーケンスアダプターを付加する方法を従来のライゲーション方式から、tailed PCR 方式に変更することで、ライブラリ作製工程の大幅な短縮化・低コスト化に成功した（図 2）（投稿中）。

## 遺伝子型決定法の改良②: 分子バーコード導入によるデータ精度向上

分子バーコード(unique molecular identifier, UMI)を含む片側 tailed PCR プライマーによる短鎖増幅工程、その後の PCR 増幅工程からなるライブラリ増幅条件を決定し、UMI によ

る PCR 重複リード除去が可能なプロトコールを確立した。PCR 重複リード除去によりシーケンスエラーに起因するノイズが低減されることを確認した。

### One-Step multiplex PCR (no UMI)

1. PCR amplification (x30)	90 min
2. AMPure beads purification	40 min
3. Bioanalyzer	70 min
Time total	3.5 h
Hands-on time total	1.5 h

### Linear&PCR amplification (with UMI)

1. Linear amplification	70 min
2. PCR amplification (x35)	90 min
3. AMPure beads purification	40 min
4. AMPure beads purification	40 min
5. Bioanalyzer	70 min
Time total	5.5 h
Hands-on time total	2.5 h

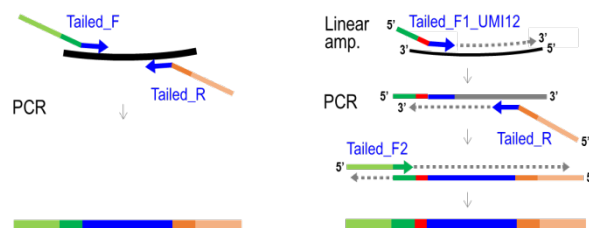


図 2: 改良型アンプリコンライブラリ作製工程概要。

## データ解析スクリプトの作出

AmpUMI ソフトウェア<sup>2)</sup>による PCR 重複除去工程を含むデータ解析パイプラインを構築した（図 3）。

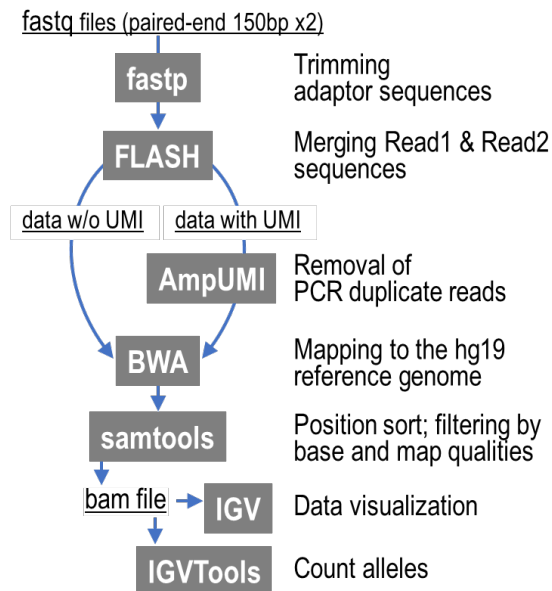


図 3: AmpUMI による PCR 重複リード除去工程を含むアンプリコンシーケンスデータ解析スクリプト概要。

UMI を含まないデータ・含むデータ両方に対応する。

特定のゲノム領域を PCR 増幅し、ベンチトップ型次世代シーケンサーでシーケンスデータを取得するアンプリコンシーケンス法は、血中遊離核酸を標的とした遺伝子診断や疾患検体における体細胞モザイク変異検出などに広く適用されており、この解析パイプラインは *RHD* 遺伝子型決定以外のシーケンス解析にも有用である。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究計画の RhD 不適合妊娠症例の収集、母体血・臍帯血を対象とした遺伝子解析の実施に関して、国立成育医療研究センター、昭和大学、慈恵医科大学の倫理委員会より承認を得ている（成育受付番号 699/1545、昭和大受付番号 233、慈恵医大受付番号 27-059）。