

学 位 論 文 要 旨

氏 名

堀 あすか



論 文 題 目

「母体血中 cell-free DNA を用いた胎児 RhD 血液型判定法の実用化に向けた検討」

指 導 教 授 承 認 印

高 田 史 男



母体血中 cell-free DNA を用いた胎児 RhD 血液型判定法の実用化に向けた検討

氏名 堀 あすか

【背景・目的】

母体血中 cell-free DNA を用いた解析が広く普及しつつあるが、両親がヘテロ接合性に点変異を有する保因者であるような場合、胎児の **genotype** を正確に決定するのが困難な場合がある。そこで我々は、次世代シーケンサーの正確な定量性を応用した新たな診断手法の開発を進めている。特に胎児 **RHD genotype** 判定は、臨床的意義も高く、欧州で普及している母体 cell-free DNA の定性 PCR 検査では検出できない多型頻度が東アジア人種では高いことから、本邦で適応可能な胎児 **RHD genotype** 判定法の開発が求められている。

Rh 血液型は多様性に富むが、**RHD** 遺伝子にコードされる D 抗原が特に強い免疫原性を示す。D 抗原陰性女性が D 抗原陽性胎児を妊娠する、いわゆる RhD 血液型不適合妊娠では、母体が児の D 抗原に感作することにより母体内に抗 D 抗体の産生を招来し、次回以降の妊娠で胎児に重度の障害をもたらすリスクとなる。したがって、RhD 陰性女性における D 抗原感作の抑制は非常に重要であり、妊娠中期および分娩後に抗 D 免疫グロブリンを投与することの有用性は国内外で知られている。RhD 陰性女性の妊娠中に胎児 D 抗原の判定を行うことは、RhD 不適合妊娠に限った医療管理を可能とする。そのため欧米では胎児の RhD 血液型判定が広く導入されており、児が RhD 陰性であれば、免疫グロブリン投与や定期的な検査を回避することができる。一方日本では、胎児の RhD 血液型判定は行われておらず、RhD 陰性の妊婦全例に対して予防的に免疫グロブリンを投与している。

妊娠期の胎児 RhD 血液型判定に対する対応の違いには、RhD 陰性アレル頻度が人種間で大きく異なることにより、適用可能な判定方法が異なることが関与する。欧州では RhD 陰性アレルの 99% 以上は **RHD** 遺伝子欠失型であるのに対し、日本人を含む東アジア人種では約 25% 程度が非欠失型であるため、**RHD** 遺伝子を有する RhD 陰性個体が珍しくない。欠失型が中心の国では、妊娠中の母体血中 cell-free DNA を用いて **RHD** 遺伝子を PCR 増幅し、増幅の可否で定性的に胎児の **RHD genotype** を判定することができる。一方、日本人集団における主要な RhD 陰性アレルは、**RHD** 欠失型、点変異型、組換え変異型の 3 つであり、欧米のような定性的な検査ではこれらを区別できないことから、本邦で妊娠中に胎児 **RHD genotype** 判定を行うためには、母親が非欠失型でも適応可能な診断法の実用化が必要であった。これに対し Takahashi らは、母体血中 cell-free DNA を 2 組のプライマーペアで 4 領域同時に増幅、解析することで、日本人の主要 **RHD** アレルを判定するアンプリコンシーケンス法を開発した (Clin Chem 2019)。この方法では、次世代シーケンサーによる大量配列情報を利用することで、妊娠母体血中の cell-free DNA に低頻度に含まれる胎児由来 cell-free DNA と高頻度に含まれる母体由来 DNA 各々の **RHD genotype** 推定が可能であり、定性的 PCR やサンガー法では困難なタイプの変異もまとめて解析することができる。

この手法を実用化し、全ての胎児 **RHD genotype** に対して確実な胎児 RhD 血液型判定を行う遺伝学的検査システムの確立を目指すためには、いくつかの課題が考えられる。Takahashi らの手法は、工程を簡略化することによって解析の効率化と解析操作によるエラーリスクの低減および、コストの削減を図ることができる可能性がある。そのうえで、RhD 陰性妊婦の末梢血から抽出した cell-free DNA を用い、感度および特異度など検査精度の検討を行う必要がある。そのため本研究では、Takahashi らの手法の工程の最適化を図るとともに、多施設共同研究に同意した RhD 陰性妊婦の末

梢血から抽出した cell-free DNA の解析を行うことで、本手法での検査精度を評価した。加えて、本手法を、より定量性に優れ、DNA や試薬の混入リスク（いわゆるコンタミネーション）に対してより頑強な方法へと改良するために、分子バーコード配列の導入と混入モニタリング方法の開発についても検討した。胎児 *RHD* genotype 判定における偽陰性判定は母体から必要な医療介入の機会を奪うため、特に児の RhD 陰性判定には確実性が求められる。そこで、母児の *RHD* genotype が同一であっても cell-free DNA 中の 胎児由来 DNA 比率が評価できるよう、複数個所の高頻度多型を用いた胎児由来 DNA 比率算出法の導入についても検討した。

【用語の定義】

- ・ 分子バーコード配列：
アンプリコンシーケンス法では、特定のゲノム領域を PCR 増幅し、増幅産物に含まれる個々の DNA 分子の塩基配列情報を取得する。取得した塩基配列情報が二つの DNA 分子間で同一な場合、①PCR 増幅前に独立に存在した二分子に由来するものなのか、②同一分子に由来する PCR 増幅産物なのか、を区別することができない。本研究では、12 塩基長のランダム合成配列 (4^{12} = およそ 1700 万通り) を分子バーコード配列プールとして使用し、PCR 増幅前の標的 DNA 分子 (約 5000 分子) に 1700 万通りのうちのいずれか一つの分子バーコード配列が無作為に付加される実験原理を導入している。その後の PCR 増幅産物に含まれる個々の DNA 分子について取得する配列情報には標的ゲノム部位の配列に加えて分子バーコード配列も含まれるため、分子バーコード配列が異なるか同じか、を指標に上述の①と②を区別することが可能となる。
- ・ ライブラリ識別インデックス配列：
次世代シーケンシングにおいては、複数のライブラリを混合した上でまとめてシーケンス情報を取得し、データ解析時に個々のライブラリごとにシーケンスデータを振り分ける手法が広く用いられており、この振り分けのために必要なのがライブラリ識別インデックス配列である。本手法では、PCR 増幅プライマーペアの一方に 8 塩基インデックス配列を付与し、他方のプライマーにも異なる 8 塩基インデックス配列を付与する方式を採用した。

【方法】

1. *RHD*, *RHCE* 遺伝子の 4 領域を 2 組のプライマーペアで増幅し、MiSeq を用いてアンプリコンシーケンスを行い、*RHD* genotype を判定した。
2. ライブラリ作製時のアダプター付加方法を、複数段階の酵素反応と精製を含むライゲーション法から、1 回の PCR 増幅のみとする手法に変更した。
3. 使用する検体は、検討実験においては、cell-free DNA を模したゲノム DNA を用いた。実検体での検討については、妊婦の末梢血より抽出した cell-free DNA を用い、結果の確認では、妊婦の末梢血より抽出したゲノム DNA、児の出生後に臍帯血より抽出したゲノム DNA を用いた。RhD 陰性妊婦の末梢血は、多施設共同研究に参加する、成育医療研究センター、昭和大学、慈恵医科大学から提供を受けた。
4. 分子バーコードの検討実験として、増幅領域の 5' 側に分子バーコードとなる 12 塩基の無作為配列を単鎖増幅で付加した後に PCR 増幅し、配列情報を取得した。得られた結果から分子バーコード情報に基づき PCR 重複リードを除去したデータを作成し、リード数の結果との比較を行った。

5. 高頻度 Indel 多型 35 領域と性別判定用 2 領域を標的としたプライマーを作製し、*RHD* genotype 判定用の 4 領域を合わせた 41 領域を同時に PCR 増幅した後、MiSeq で配列情報を取得した。37 の標的領域の結果のうち、母がホモ接合体、児がヘテロ接合体と考えられる多型を参照することで、母体由来 DNA と胎児由来 DNA の比率を算出した。
6. 他の検体等の混入リスクを検討するため、使用するインデックス配列に限らず、シーケンスデータに含まれる全インデックス配列をモニタリングするデータ解析モデルを作成した。

【結果・考察】

1. ライブラリ作製を PCR 方式に変更することで、工程の簡略化を図りつつ、従来法と同様の判定結果を得られることが確認された。PCR 方式への変更は、解析時間の短縮、試薬の節約、解析操作の削減によるエラーリスクの低減につながるとともに、PCR 増幅と同時に各ライブラリに固有のインデックス配列を付加することから、他のライブラリに持ち込まれて結果に影響するリスクの低減にもつながることが期待できる。
2. 多施設共同研究として募集した RhD 陰性妊婦の末梢血より抽出した cell-free DNA を用いた検討では、母児それぞれの *RHD* genotype 判定を行うことができた一方、偽陽性判定が 2 例確認された。そのうち、再解析が可能であった 1 例は、再解析では母児ともに RhD 陰性と判定され、偽陽性判定の原因としては、*RHD* 野生型 DNA の混入が考えられた。微量の胎児由来 DNA を解析対象とする本手法では他検体や試薬等の混入は誤判定に直結することから、対策の必要性が改めて示された。
3. 他検体や試薬の混入対策として試行した、インデックス配列を使用したモニタリングでは、想定されないインデックス配列を有するリードの存在が可視化され、継続して実施することで混入リスクの監視に一定の役割を果たす可能性が考えられた。
4. 分子バーコードを導入することにより、PCR 重複リードを除去した結果を得ることが可能であった。リード数に加え、PCR 重複リードを除去した結果を同時に解析することで、偏った PCR 増幅の影響を補正できる可能性が示唆された。一方、検体によって単鎖増幅の効率が著しく低下するなど、実用化に向けて解析条件を最適化する必要があると考えられた。
5. Indel 多型を用いた胎児由来 DNA 比率算出法の導入に向け、cell-free DNA でのデータ取得は可能であった。これが導入可能となることで、母と児が同じ *RHD* genotype の場合に胎児由来 DNA 比率が推定できないという、本手法の課題が解消できる。

【結論】

本研究では、東アジア人種にも適用可能な胎児 RhD 血液型判定法におけるアンプリコンライブラリ作製工程の簡略化に成功した。今後、臨床検体での検査精度の検討を継続するとともに、他検体等の混入リスクへの対策および、胎児由来 DNA 比率算出法や分子バーコードなどの補助的手法を本手法に付帯することで、確実な胎児 RhD 血液型判定法が確立できると考えられる。

本手法の実用化は、本邦における RhD 陰性妊婦の適切な医療管理につながるだけでなく、東アジア以外の地域で確認される他の RhD 陰性アレルの検出や、*RHD* 遺伝子に限らず母親がヘテロ接合体の際の胎児 genotype 判定にも応用できる可能性がある。