

## いまさら聞けない遺伝学的検査の原理と読み方

1. 染色体 : G-banding
2. 染色体 : FISH
3. PCR-direct Sequencing
4. Array CGH
5. Exome Sequencing by NGS



# Chapter 1

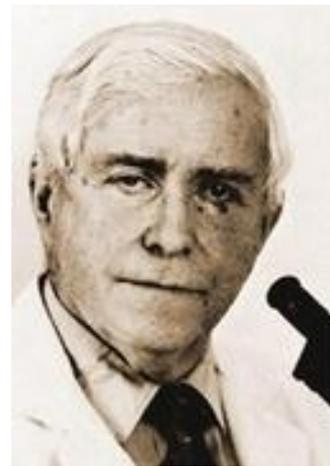
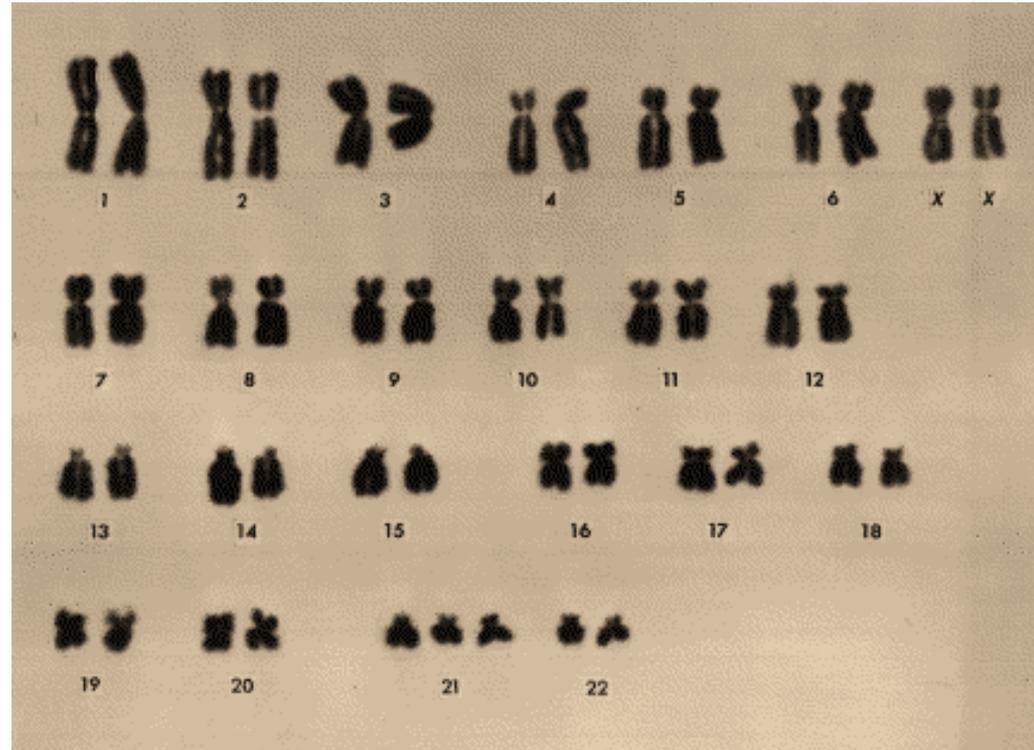
## 1970年代: 染色体 G-banding

1882年 Flemming: 角膜 22-28本

1923年 Painter: 48で男性はXY, 女性  
はXX固定切片法による顕微鏡観  
察

1956年 Tjio and Levan: ヒトの染色  
体数は46培養技術, コルヒチン処理,  
低張液処理, air dry 法

1959年 Lejeune: ダウン症が常染色  
体トリソミーであることを発見



Albert Levan

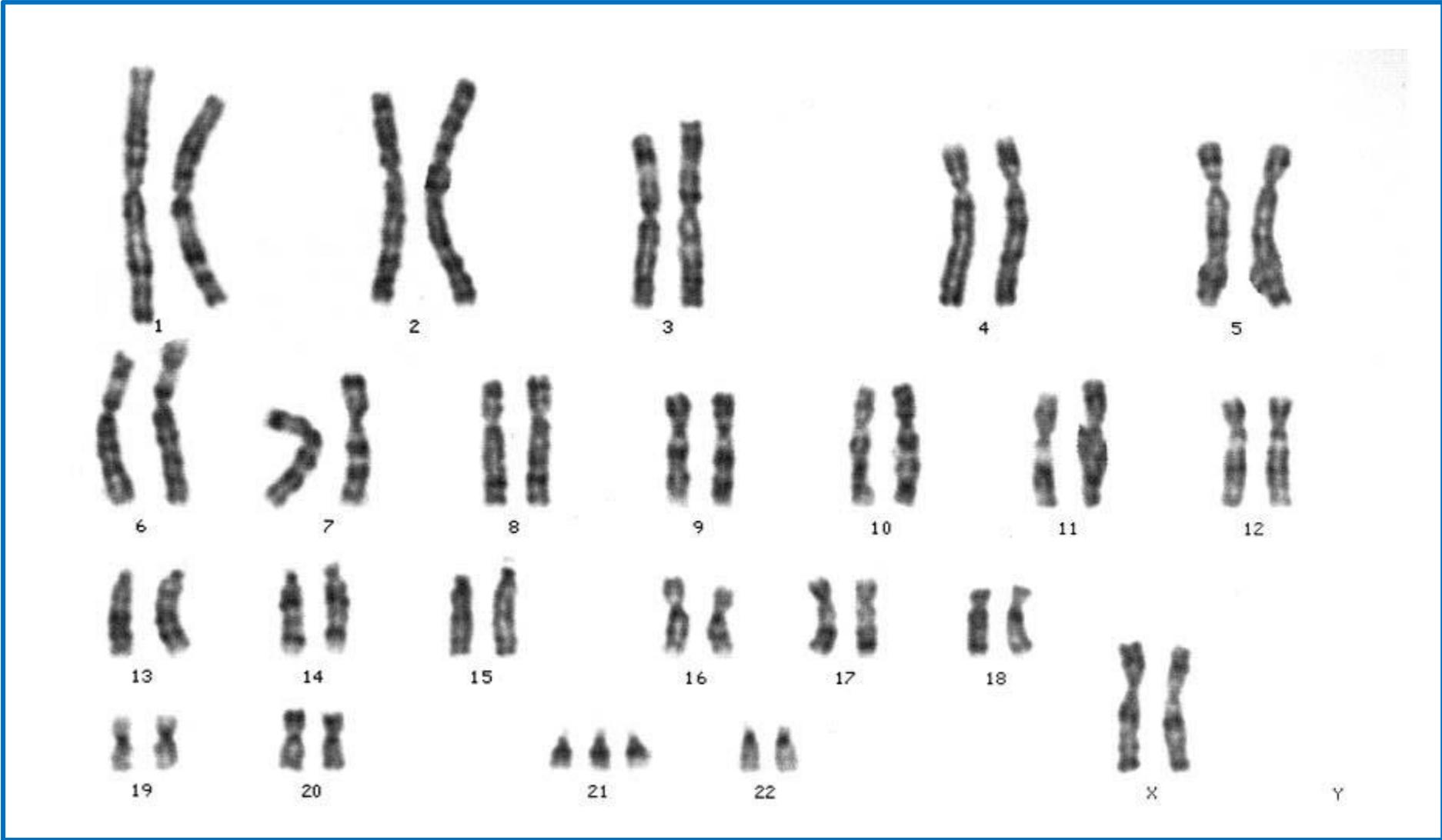


Joe Tjio



Jerome Lejeune

# 染色体検査のスタンダード : G-banding



# 染色体検査のサンプル

急速に分裂する細胞（染色体は分裂中期に観察される）。

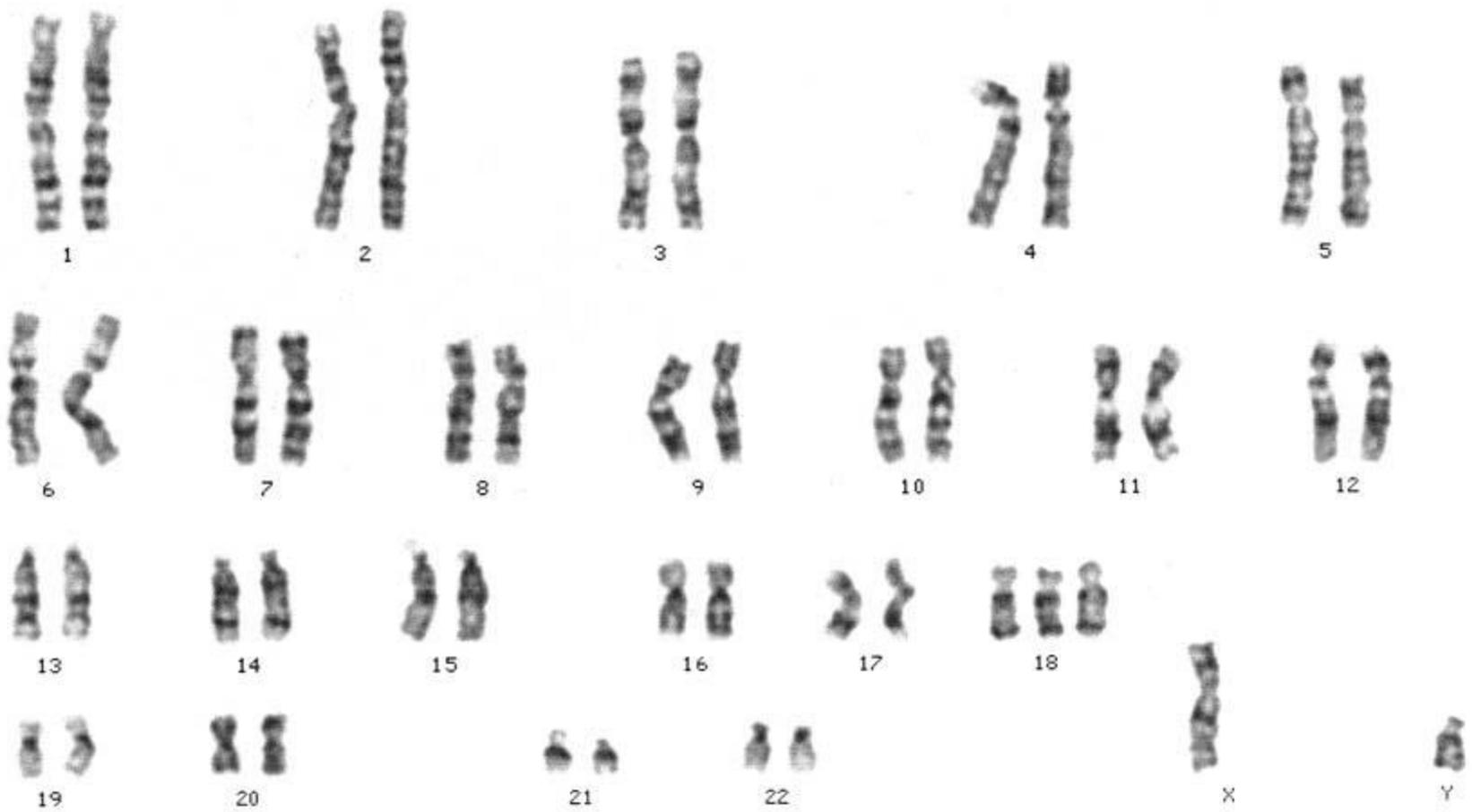
1. 白血球とくにTリンパ球。通常は末梢血をヘパリンを加え採取（末梢血10 mlに対しヘパリン0.5ml程度）。
2. 不死化リンパ芽球（末梢血から得たリンパ球をEBVによる形質転換し株化）
3. 線維芽細胞：皮膚生検や小手術で採取
4. 骨髄細胞：悪性疾患の診断に。培養が不要。標本は解像度が低い。
5. 羊水穿刺あるいは絨毛採取によって得られる胎児細胞

凝固禁，凍結禁，常温あるいは4℃

# 染色体検査の方法：標本の作製と染色

1. 採血：ヘパリンを加え無菌的に静脈血を採取する。
2. 細胞の増殖：採取後48時間以内に, phyto-hemagglutinin (P H A)を加えて, 培養液中で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>下で72時間培養する。
3. 細胞周期の同調：コルセミドを加え分裂中期で分裂を止める。
4. 細胞を低張液で膨化させカルノア液で固定。
5. スライドグラス上に展開する。
6. トリプシン処理しギムザ染色：G-banding  
蛍光標識したDNA断片（プローブ）を結合, FISH

# エドワード症候群男児の全核型

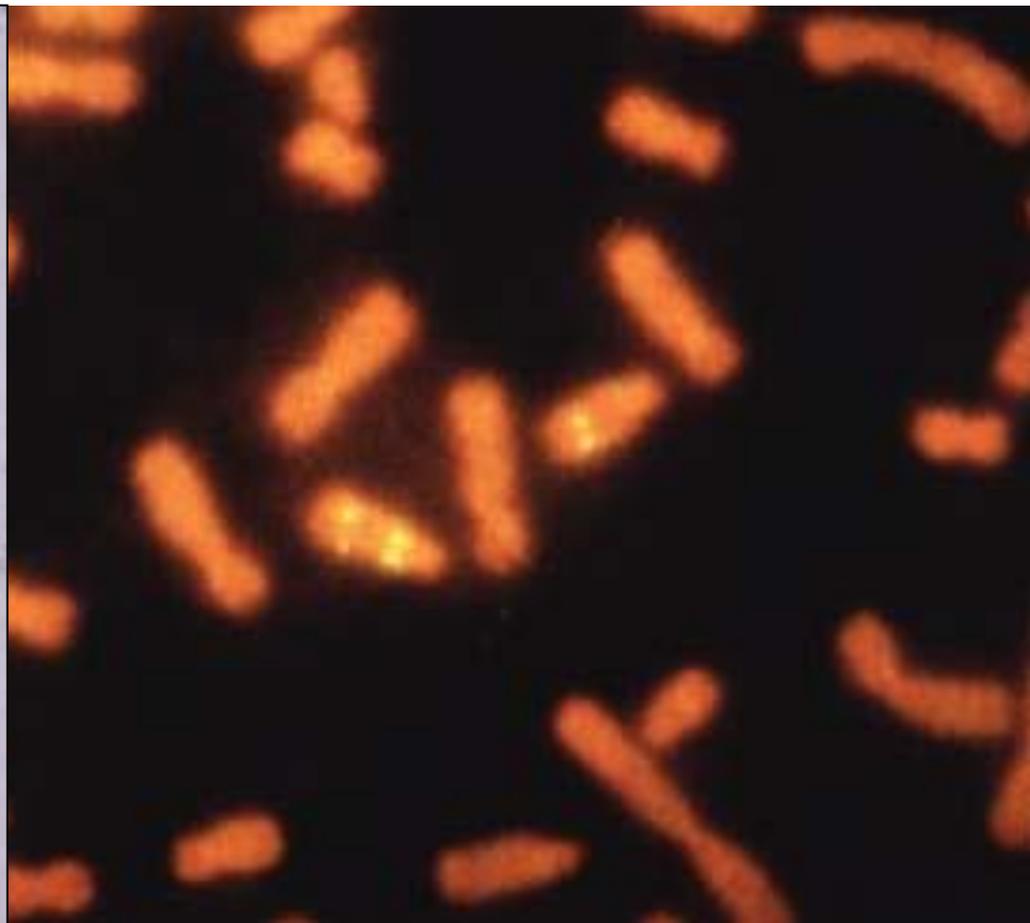
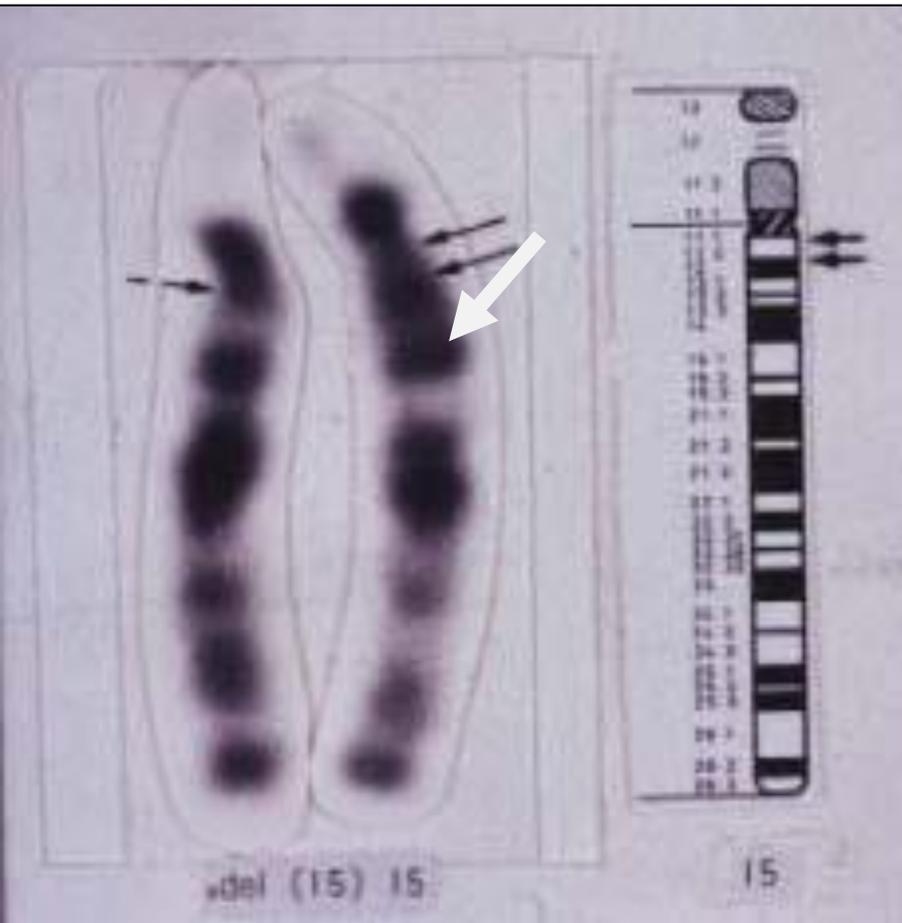


# エドワード症候群

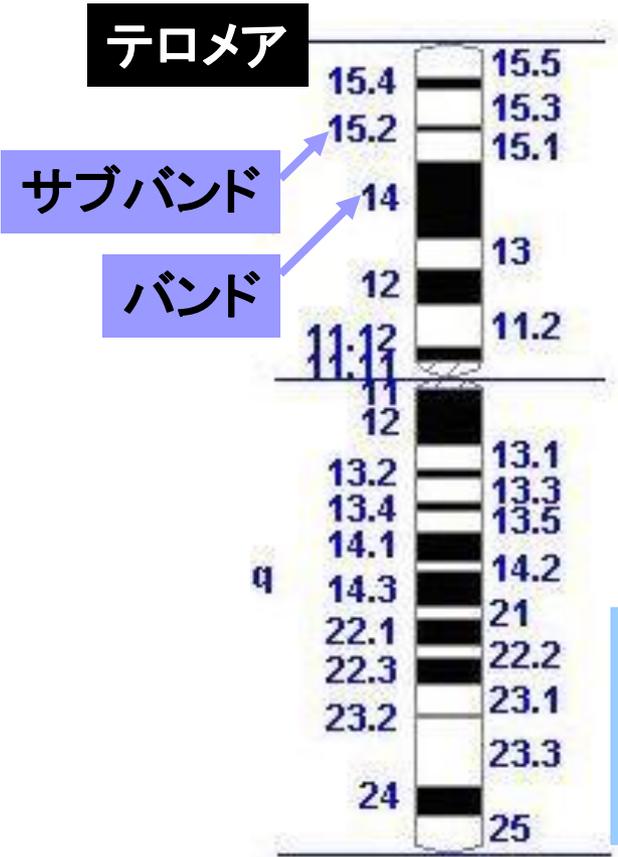


# Prader-Willi syndromeの染色体異常

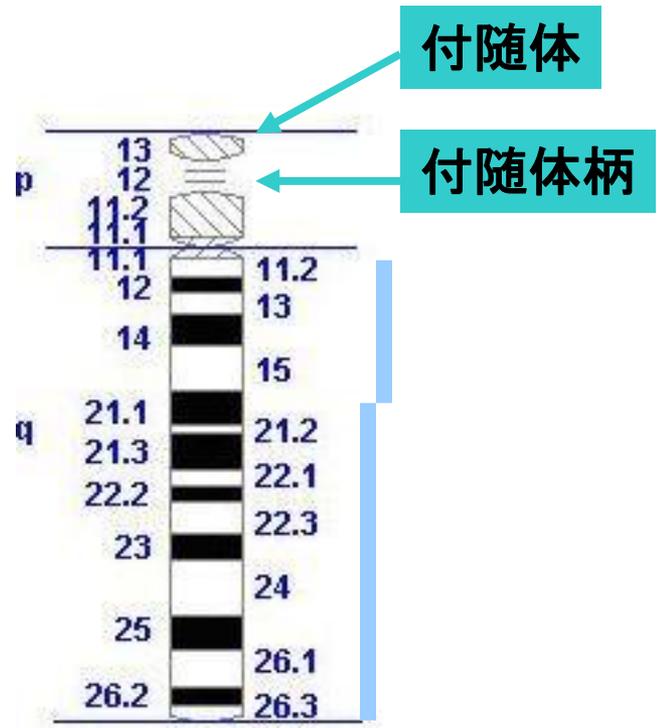
del(15)(q11-q12) G分染法 (左), FISH法 (右)



# 染色体のG分染パターンとバンド



11



15





## *Chapter 2* 1990年代:FISH法

---

- クローン化したDNA断片を蛍光標識し, 染色体標本上で in situ hybridization を行わせる.
- 微細欠失の検出
- 間期細胞核を用いた診断

Paul Berg

1972年 組み換えDNA技術を開発  
遺伝子工学の先駆けとなる

# DNAの5つの物理化学的特徴

**DNAは非常に安定している**

**相補的な塩基配列を持つDNA同士は特異的に水素結合する**

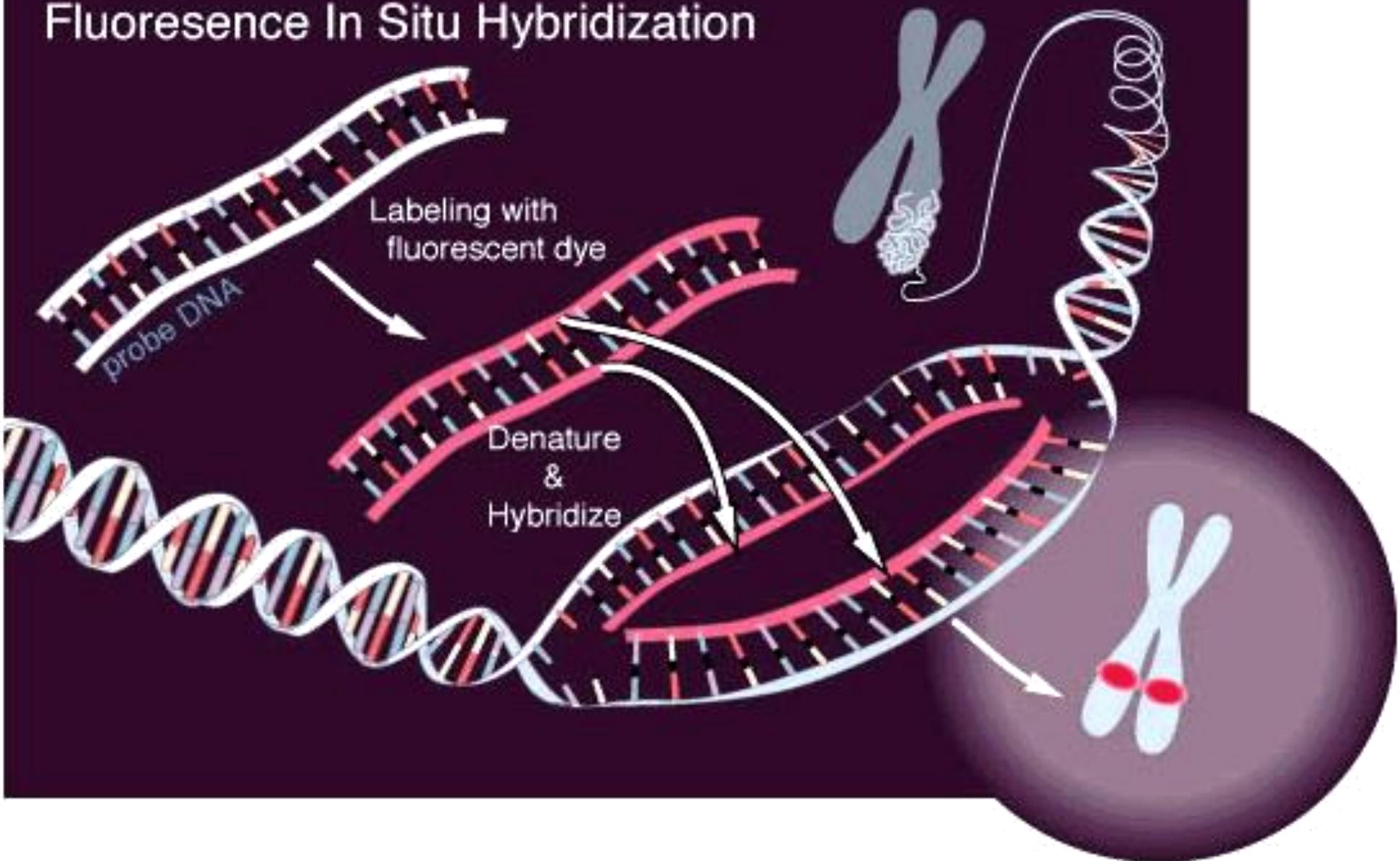
**DNA断片は増幅できる**

**DNAは特定の配列で切断される**

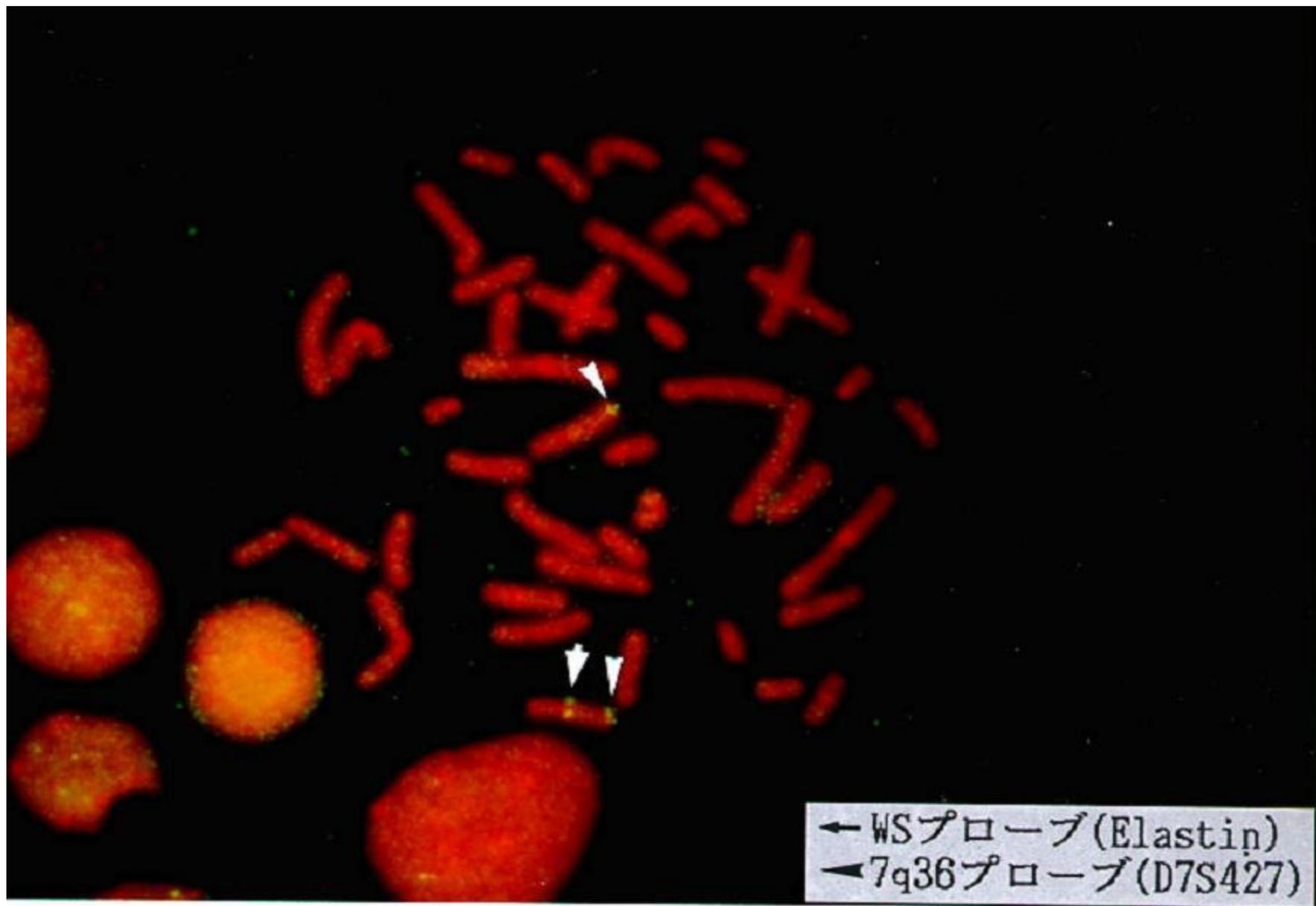
**DNA断片は電気泳動により分子量に従って分離できる。**

# 染色体FISHの原理

Fluorescence In Situ Hybridization



# FISH 法によるWilliams症候群患者の7番染色体elastin領域の欠失の証明



# 不均衡型転座の証明にFISH法は威力を発揮する

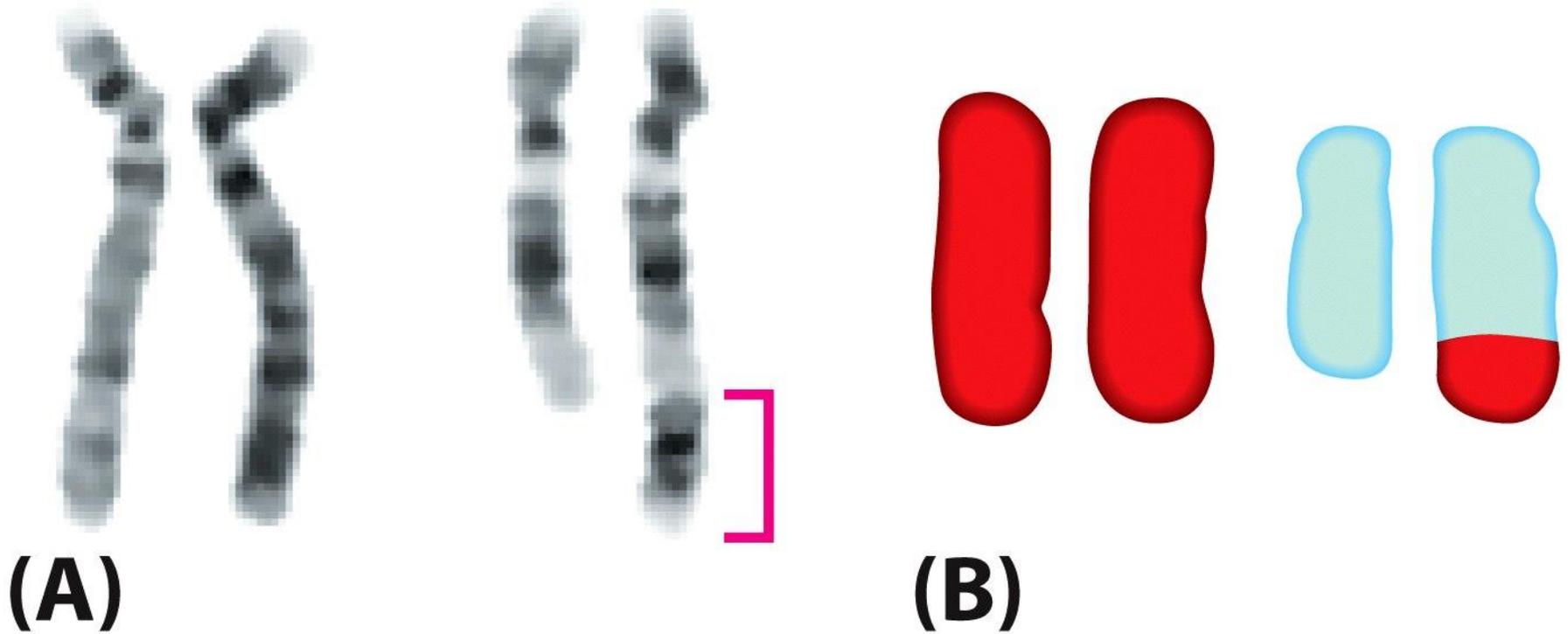
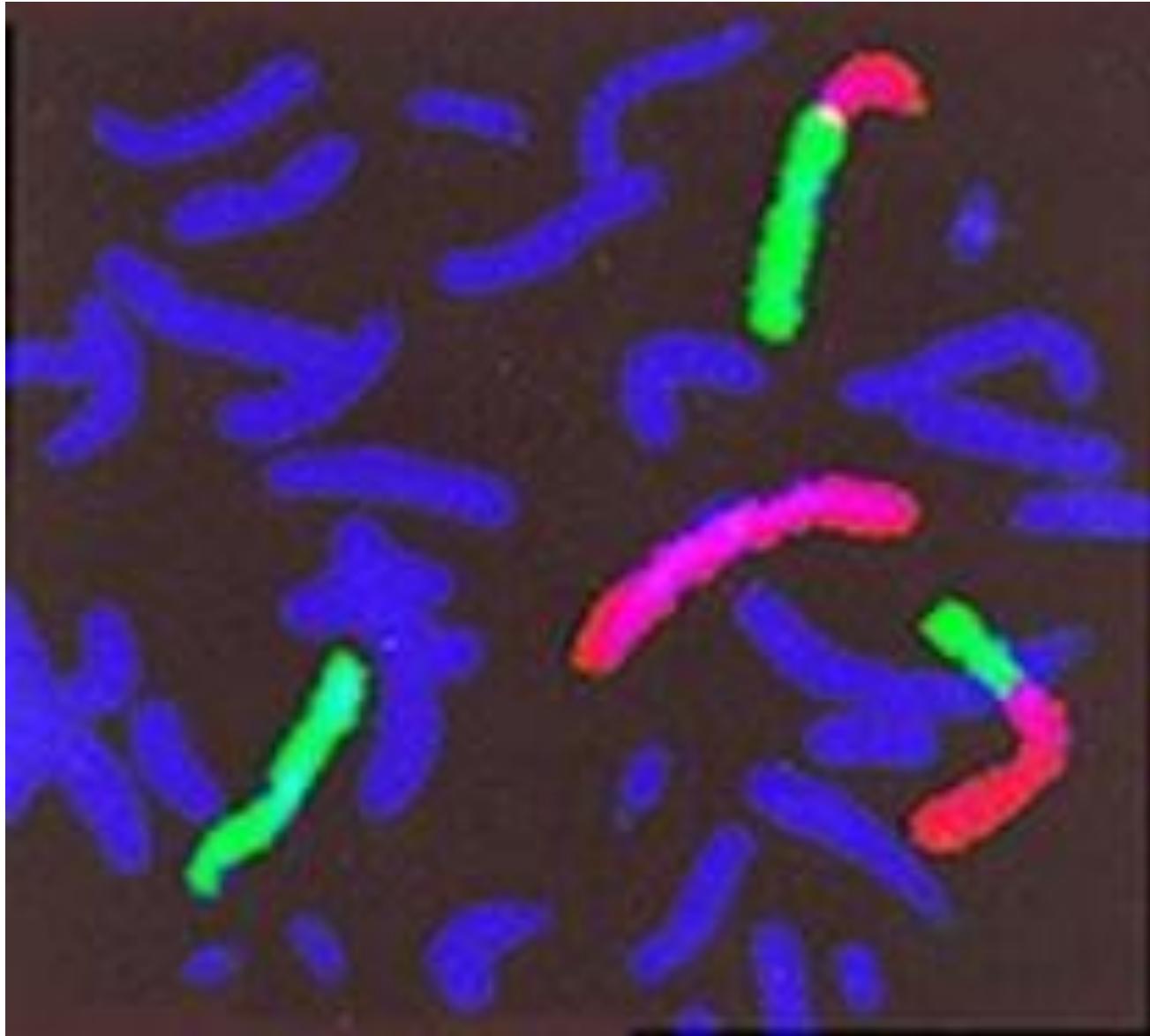


Figure 4-12 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# Chromosome paintingによる相互転座例の解析



# FISH法によるmulticolor whole chromosome painting

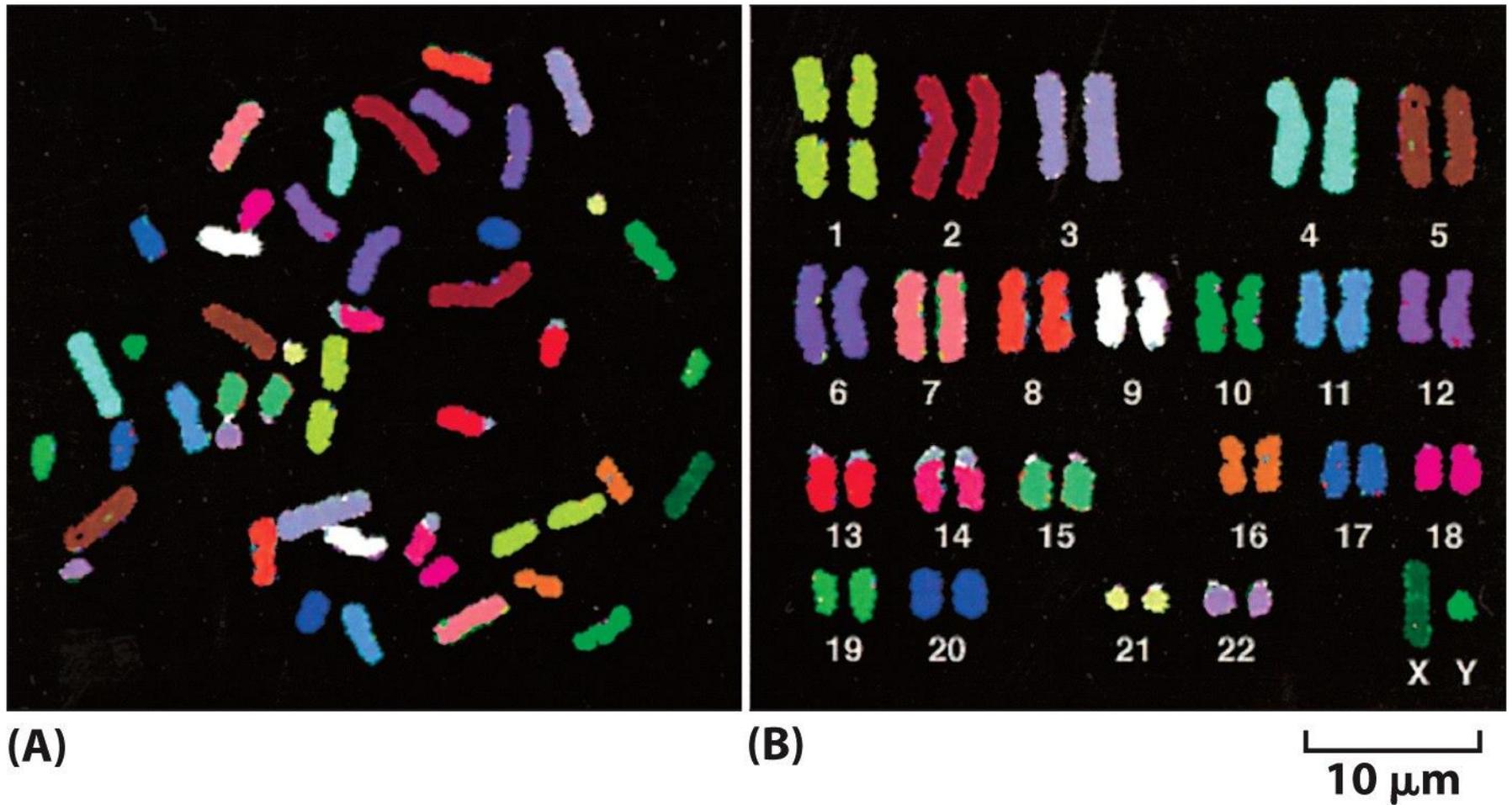
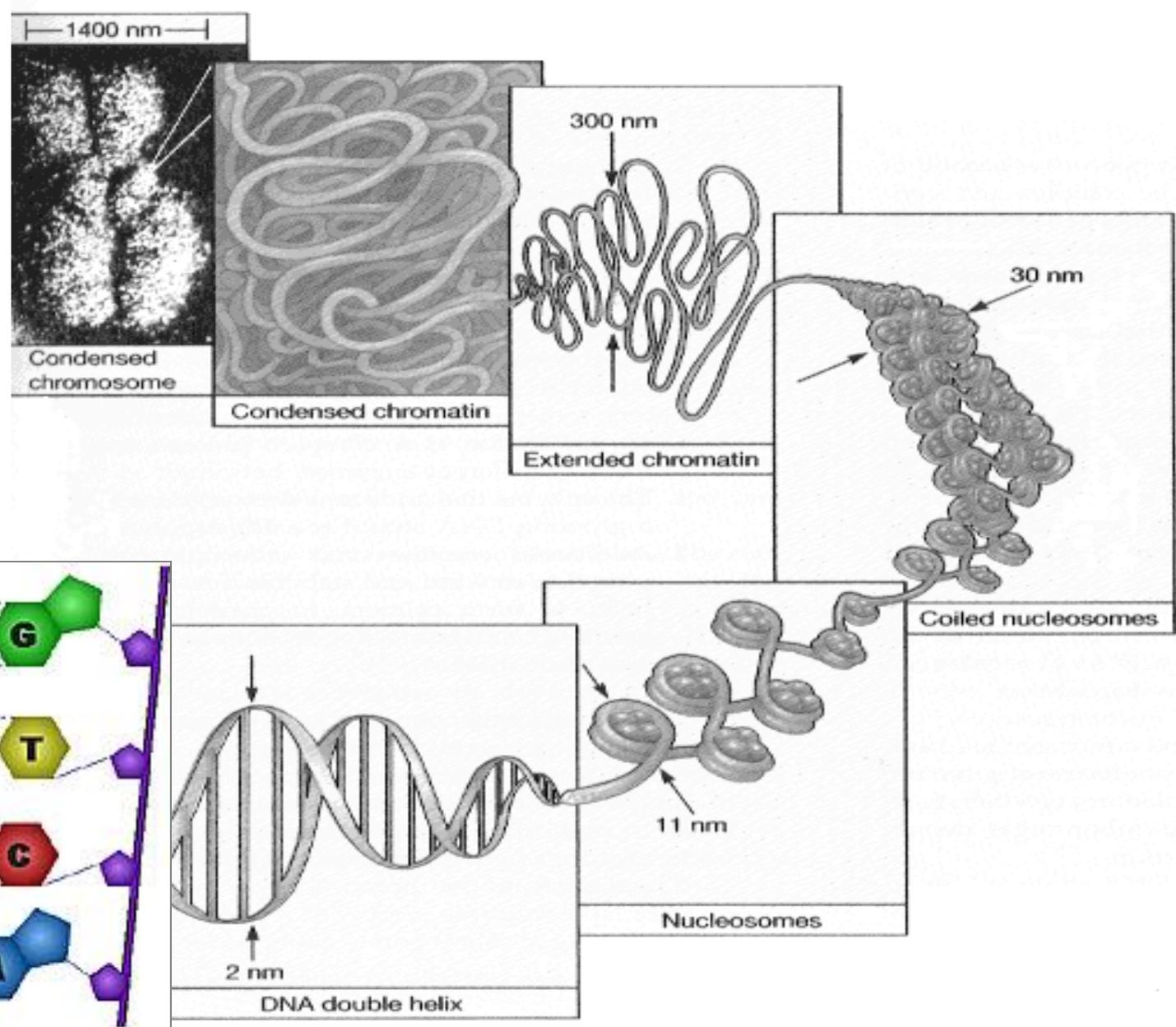


Figure 4-10 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# 染色体部分欠失症と診断用FISHプローブ

欠失領域	疾患名	代表的責任遺伝子	プローブ用クローン
1p36	1p36 欠失症候群		D1Z2, 1pTel
4p16.1	4p-症候群		D4S96
5p15.2	5p-症候群		D5S23
5q35	(欠失型)Sotos 症候群	<i>NSD1</i>	NSD1 (66 %)
7q11.23	Williams 症候群	<i>ELN, LIMK1</i>	ELN
8q24.1	Langer-Giedion 症候群	<i>EXT1</i>	EXT1
9q34	9q34 欠失症候群		9qTel
11p13	WAGR 症候群	<i>PAX6, WT1</i>	PAX6, WT1
15q11.2	Prader-Willi 症候群		SNRPN (70 %)
15q11.2	Angelman 症候群	<i>UBE3A</i>	GABRB3 (70 %)
16p13.3	Rubinstein-Taybi 症候群	<i>CREBBP</i>	CREBBP (10 %)
17p11.2	Smith-Magenis 症候群	<i>SMS</i>	SMS
17p13.3	Miller-Dieker 症候群	<i>LIS1</i>	LIS1
20p11.2	Alagille 症候群	<i>JAG1</i>	JAG1 (5-7 %)
22p11.2	22p11.2 症候群	<i>TBX1</i>	TUPLE1
22p13.3	22p13.3欠失症候群	<i>ProSAP2</i>	ARSA, 21qTel

# 染色体の構造



(A) human chromosome 22 in its mitotic conformation, composed of two DNA molecules, each  $48 \times 10^6$  nucleotide pairs long

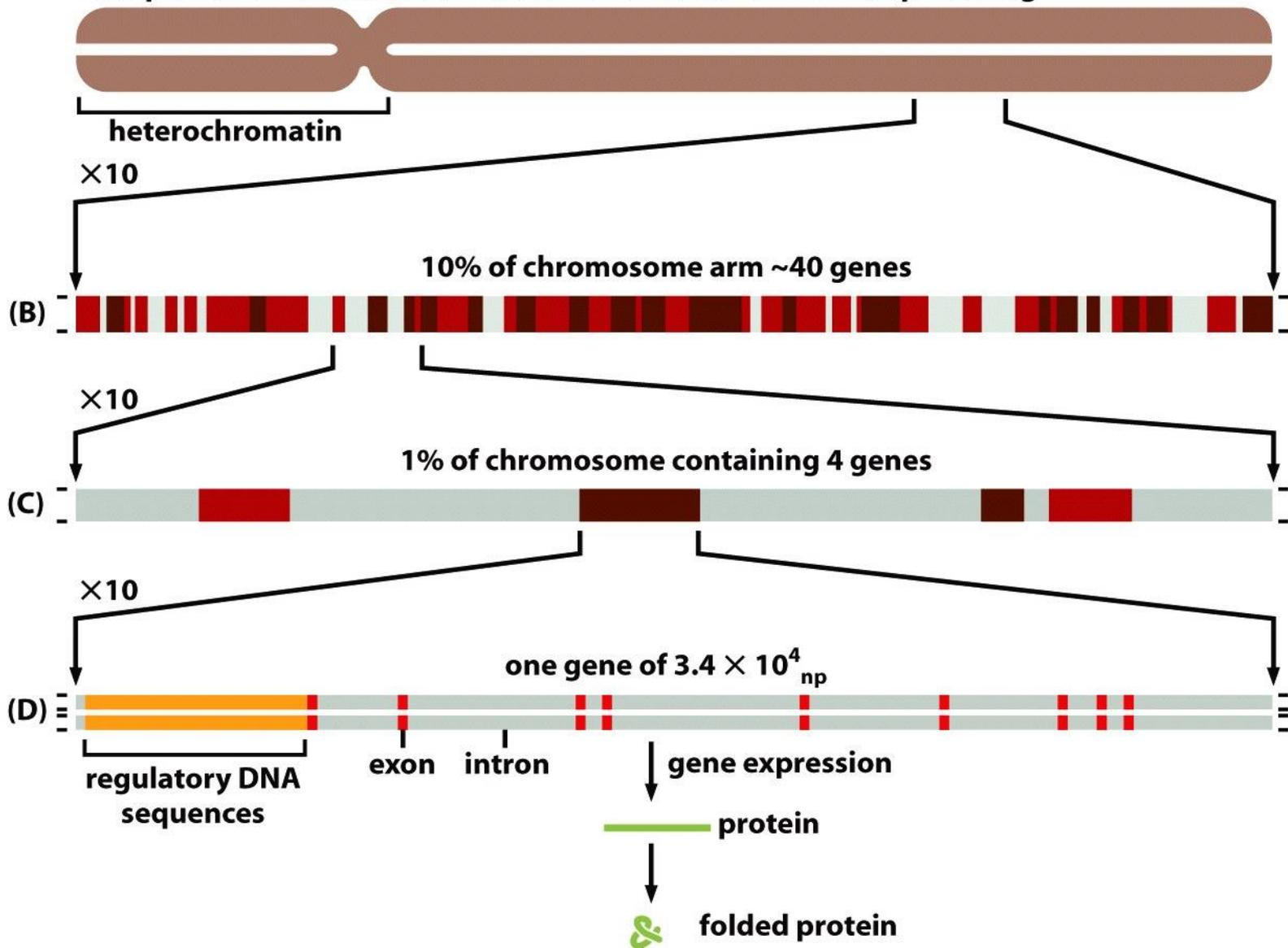
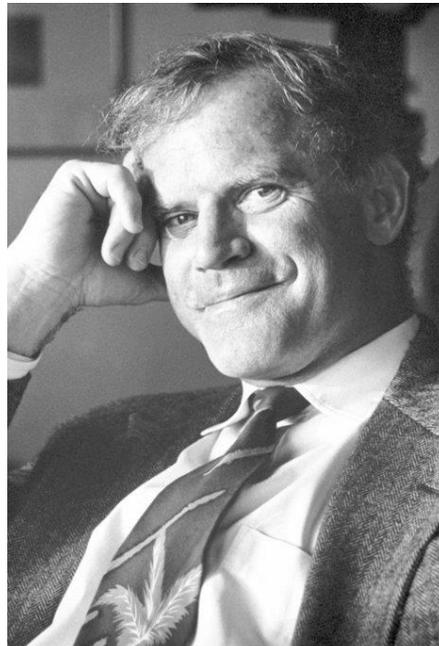


Figure 4-15 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# Chapter 3

---

## 1990年代 PCR-ダイレクト シーケンシング



Frederick Sanger

The Nobel Prize in Chemistry 1958, 1980

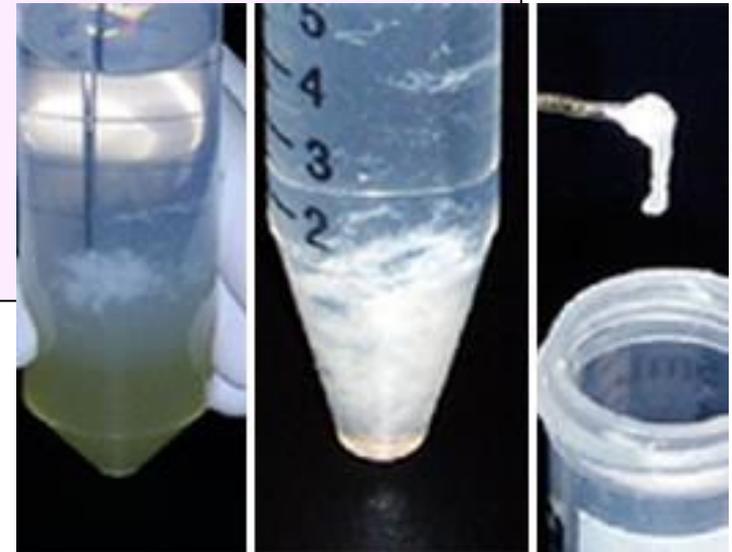
Kary B. Mullis

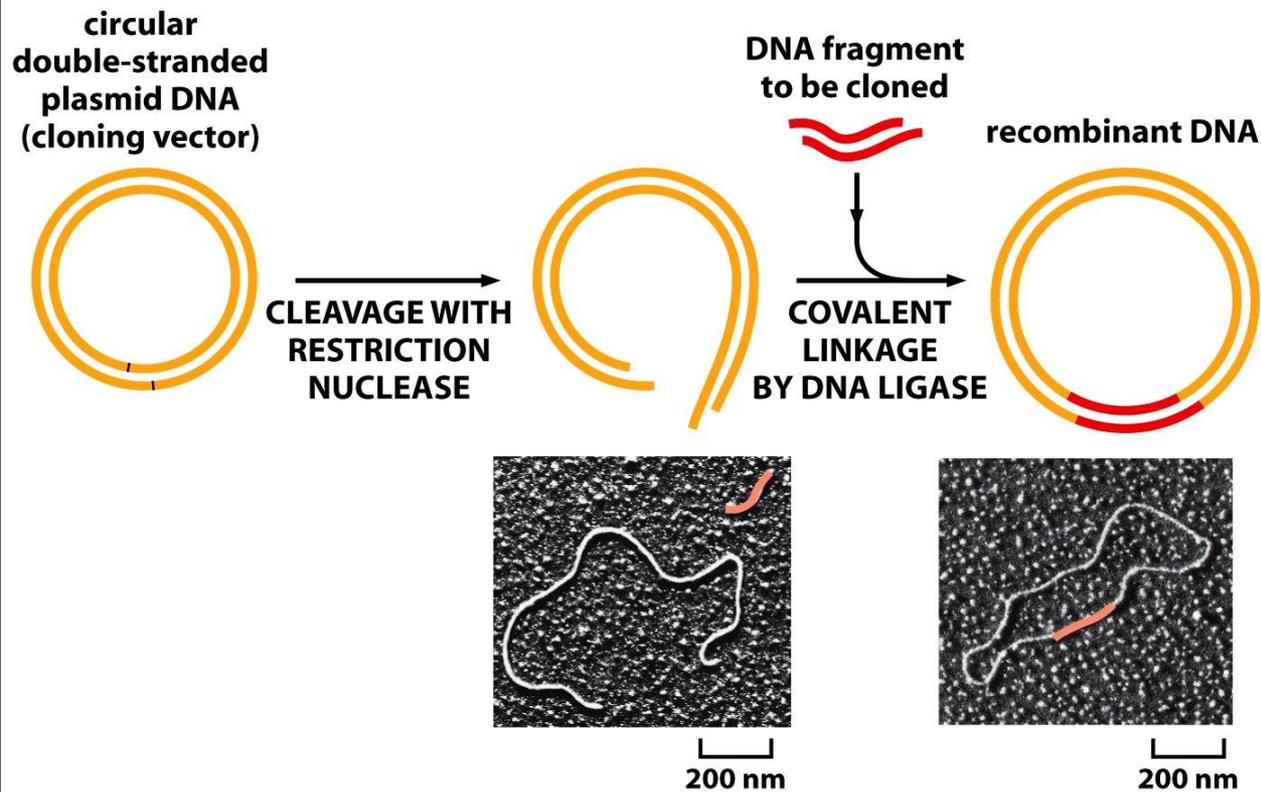
The Nobel Prize in Chemistry 1993

<https://www.nobelprize.org/>

# DNAの抽出

1. 採血: 凝固禁 (EDTA or heparin加), 凍結禁.  
絨毛・爪・毛根・凍結組織や培養細胞からも可
2. 有核細胞 (白血球分画) の採取: 溶血処置後遠心分離
3. 細胞 / 小器官膜の破壊 (界面活性剤), タンパクの破壊 (プロテイナーゼ)
4. タンパクとDNAの分離: フェノール処理 (フェノールと十分混合した後遠心分離)
5. DNAの精製: エタノール沈殿
6. Tris, EDTAを含む緩衝液に溶解.
7. 4°C保存





DNA断片は プラスミドに挿入し、細菌内で大量に増幅できる

Figure 8-39 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

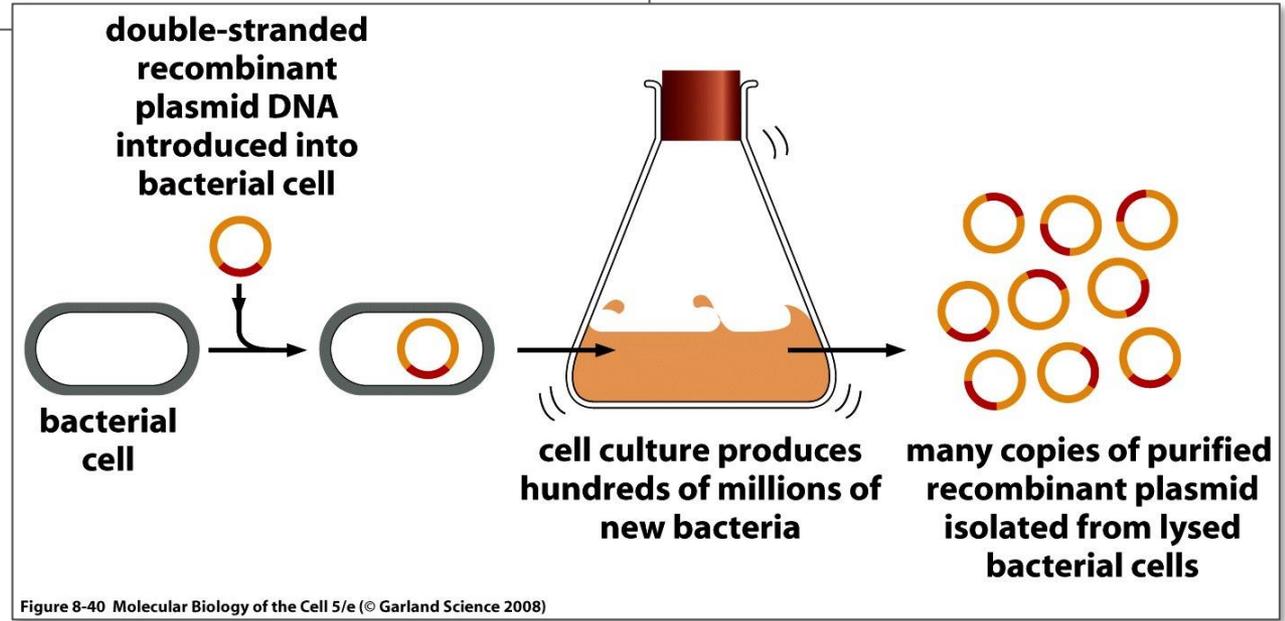


Figure 8-40 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

組織で発現する遺伝子のmRNAから、逆転写酵素により、安定なcDNAを合成できる

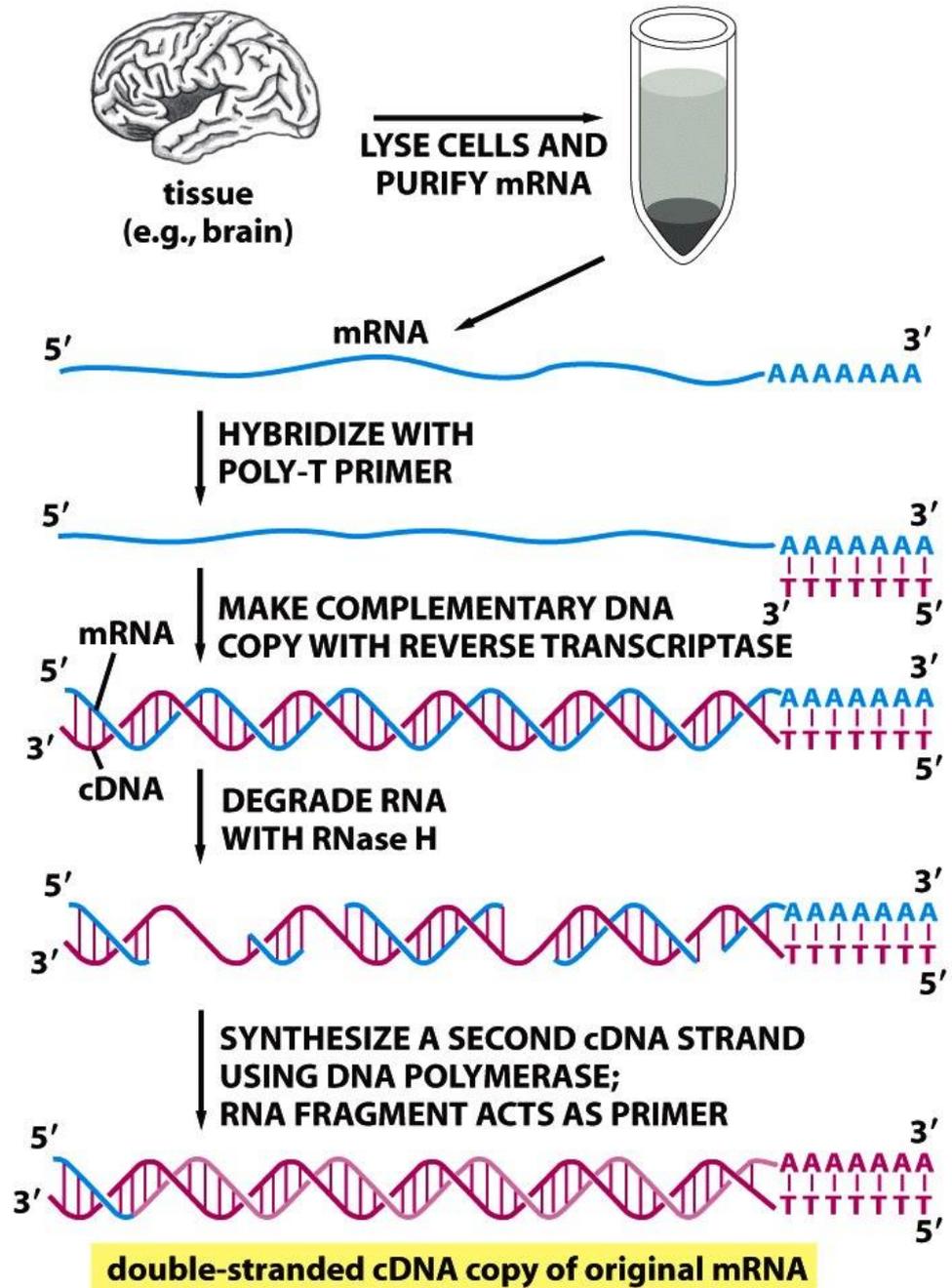


Figure 8-43 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# PCRの原理 step 1

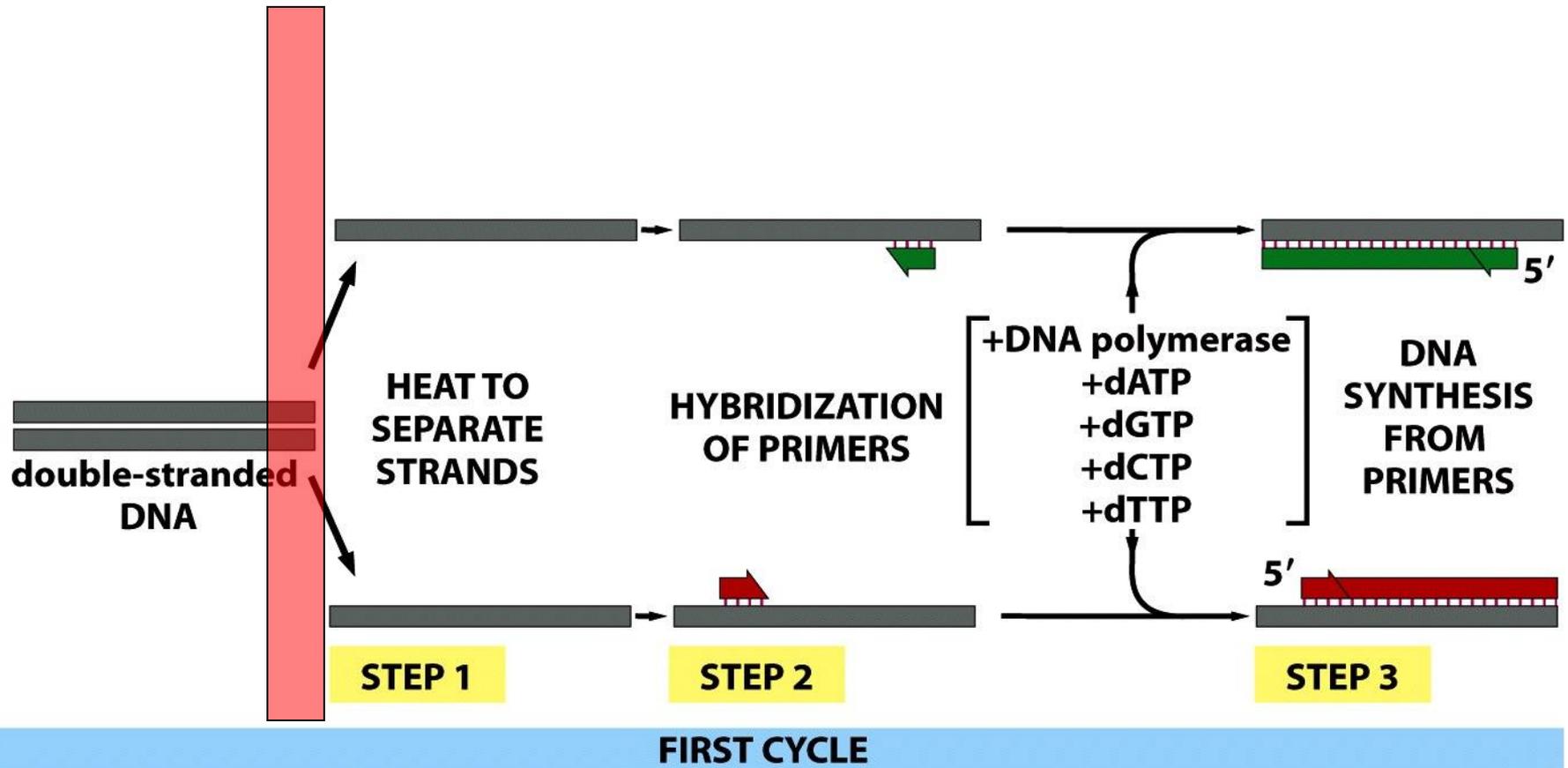


Figure 8-45a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# PCRの原理 step 2

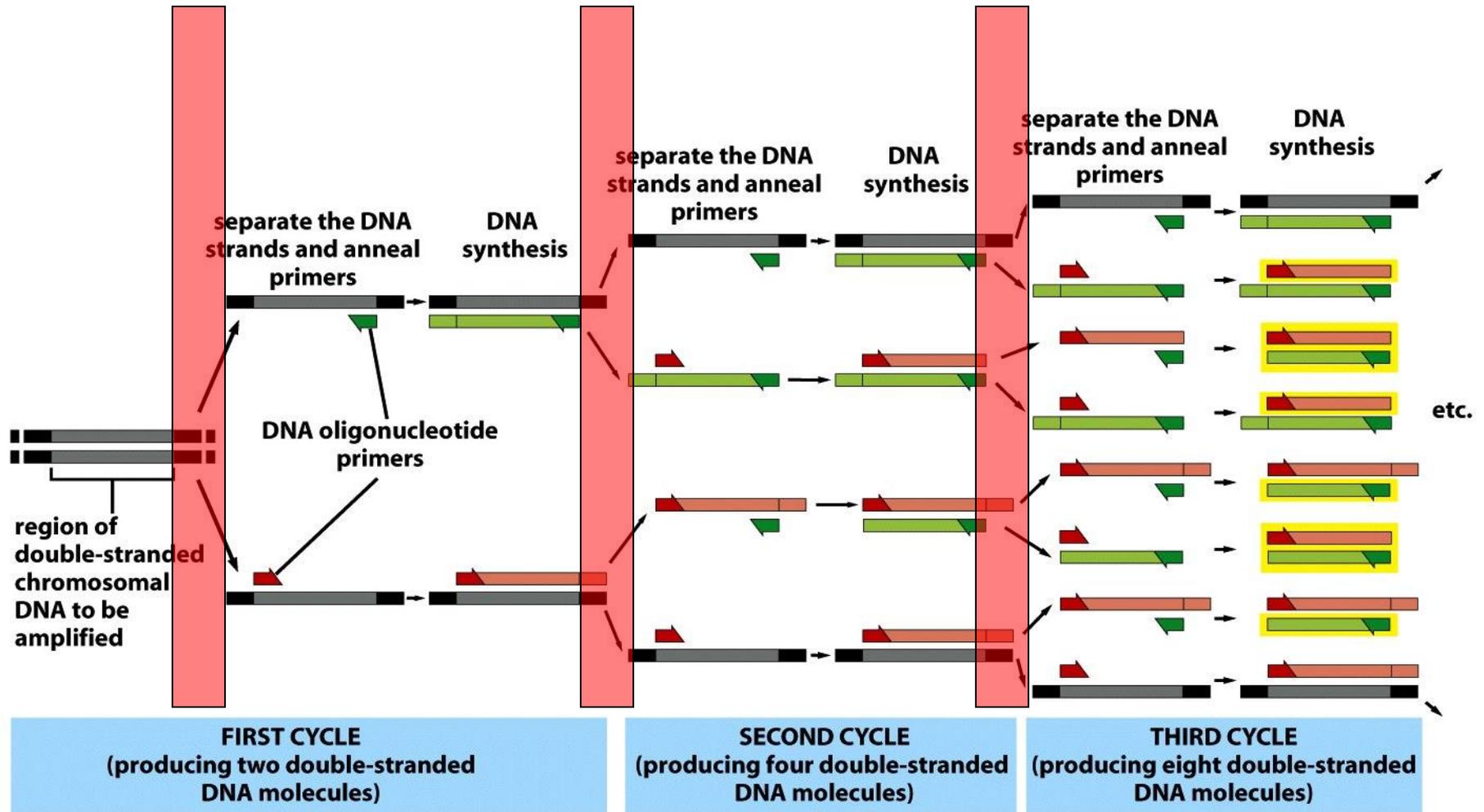


Figure 8-45b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# 細胞から特定の遺伝的領域の増幅法

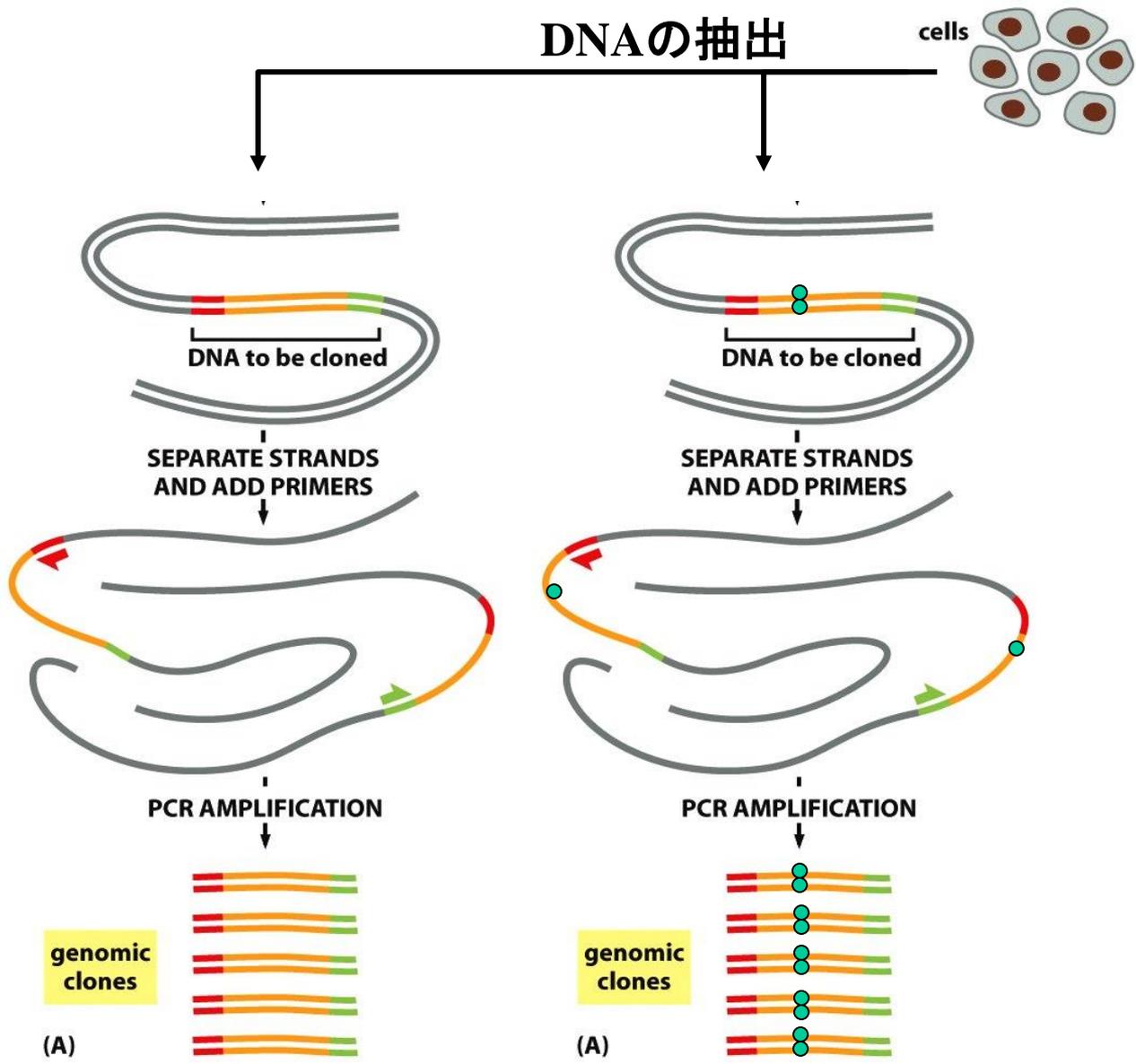


Figure 8-46 Molecular Biology of the Cell 5/e © Garland Science 2008

# 塩基配列の決定方法 Sanger法 / dedeoxy法 の原理1

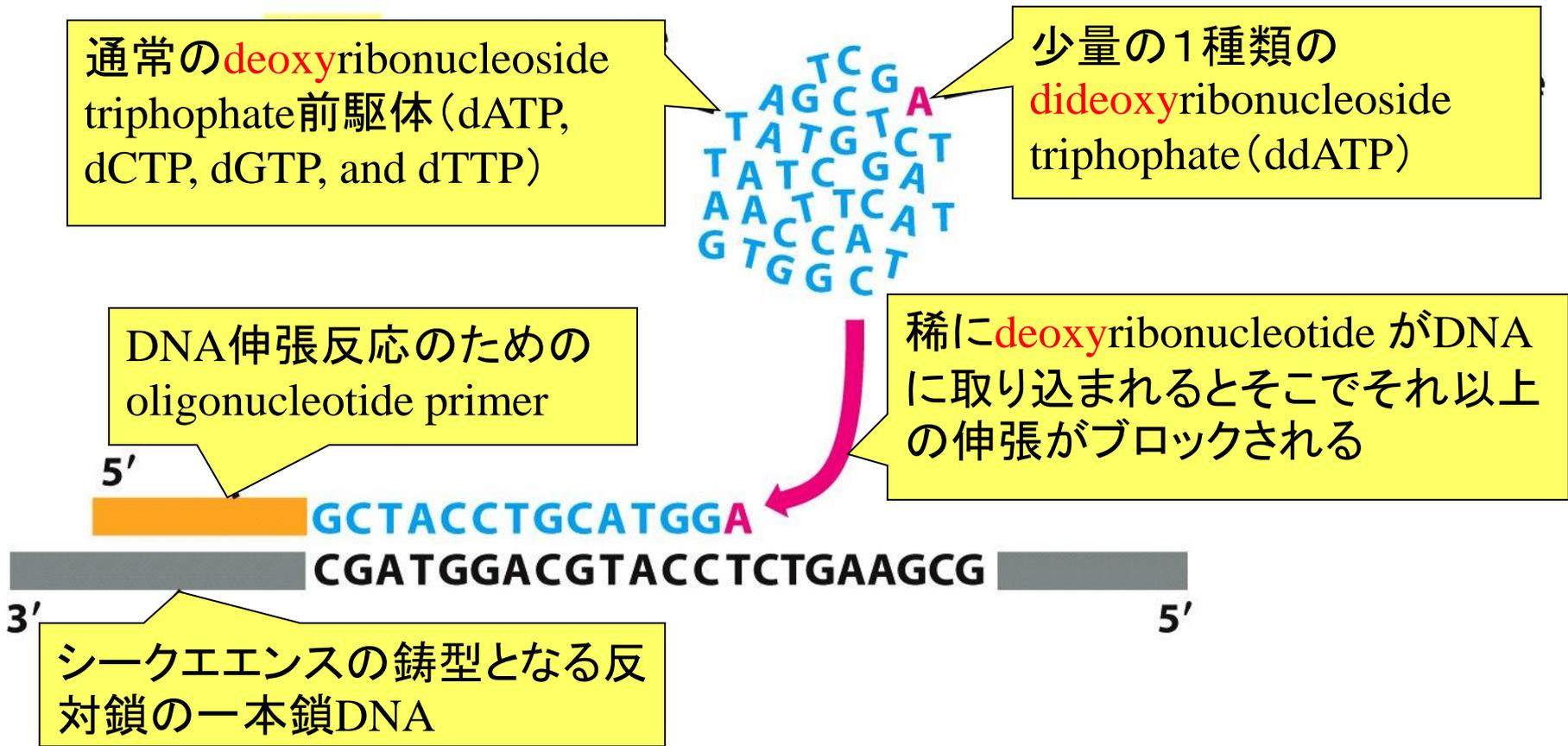


Figure 8-50b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# 塩基配列の決定方法 Sanger法 / dideoxy法 の原理2

**GCTA**  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

**GCTACCTGCA**  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

**GCTACCTGCATGGA**  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

**GCTACCTGCATGGAGA**  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

**GCTACCTGCATGGAGACTTCGCA**  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

**GCTACCTGCATGGAGACTTCGCA**  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

# 塩基配列の決定方法 Sanger法 / dideoxy法 の原理3

          GCT**A**  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

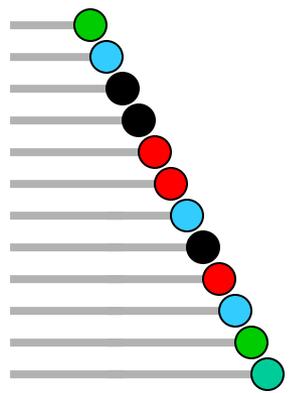
          GCT**A**C  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

          GCT**A**CC  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

          GCT**A**CCT  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

          GCT**A**CCTG  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT

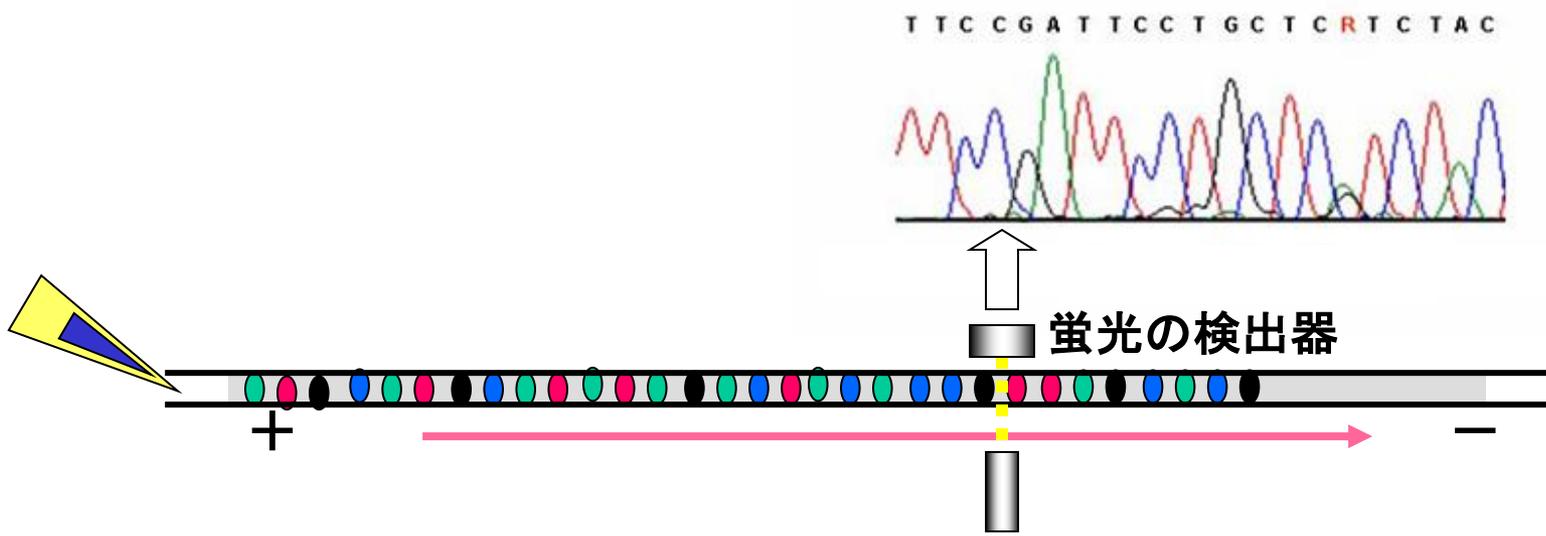
          GCT**A**CCTG**C**  
CGATGGACGTACCTCTGAAGCGT



# 塩基配列の決定方法 Sanger法 / dedeoxy法 の実際2

- 1. DNAを精製し目的の配列をPCRで増幅しておく.
- 2. 標識したプライマーをdNTPとそれぞれのddNTPと共に加え伸張反応を行う.
- 3. できあがった産物を熱し一本鎖にする.
- 4. それぞれをアクリルアミドゲルに電気泳動する.
- 5. バンドパターンから塩基配列を読みとる

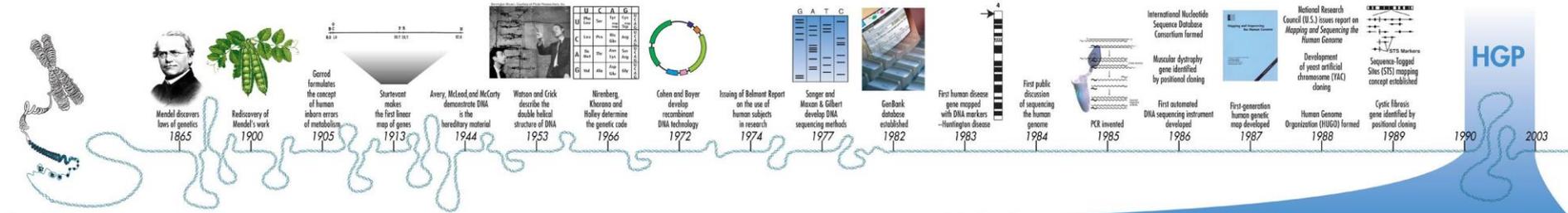
- DNAを精製し目的の配列をPCRで増幅しておく.
- プライマーを過剰のdNTPとそれぞれの蛍光色素で標識したddNTPと共に加え伸張反応を行う.
- できあがった産物を熱し一本鎖にする.
- 反応後のサンプル液をアクリルアミドのカラム内で電気泳動する.
- 蛍光色素の自動検出を行う



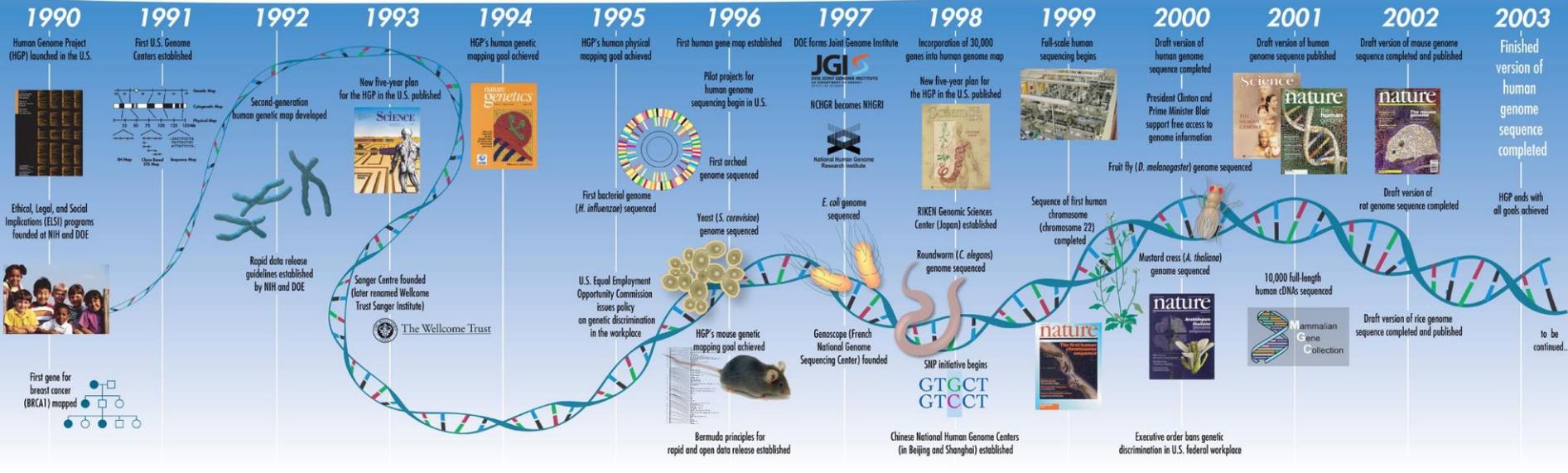


DNA解読機

# Human Genome Project



**HGP**



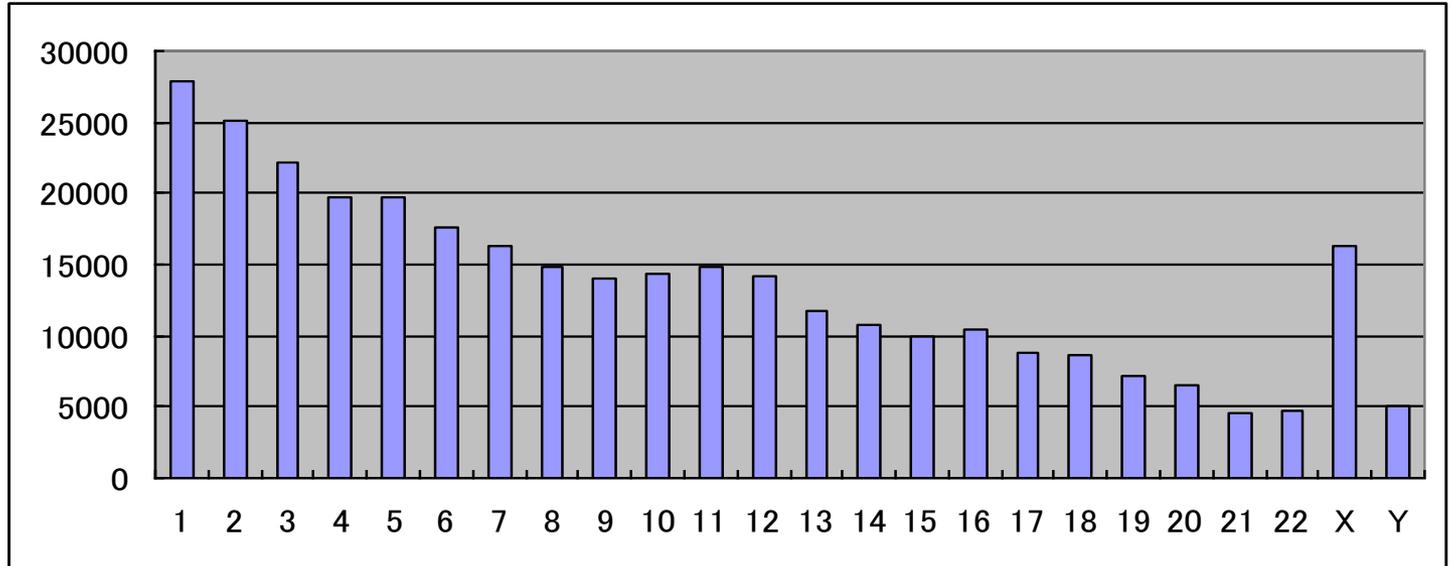
# ヒトゲノムとは

- ゲノム (Genome) とは生物の持つすべての遺伝情報.
- ヒトには約60兆個の細胞:それぞれにゲノム.
- 動物細胞:核ゲノムとミトコンドリアゲノム.
- ヒトの核ゲノムは約32億塩基対 (3,200 Mb)  
24種の2本鎖線状DNAに分かれ染色体を形成.
- ミトコンドリアゲノムは16,569塩基対の環状DNA  
ミトコンドリア中に平均8000コピーある.
- ヒトには約21,000のたんぱく質をコードした遺伝子がある

# ヒトの染色体の統計

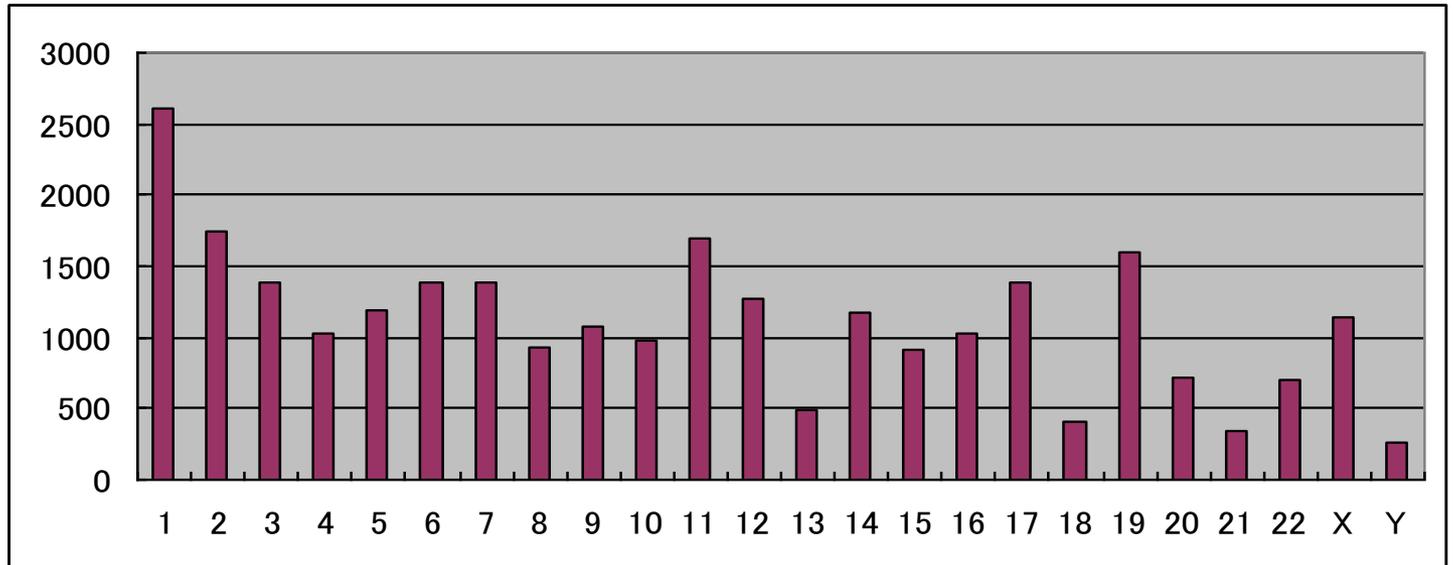
染色体の  
サイズ  
x 10,000 bp

合計  
32億5400 bp



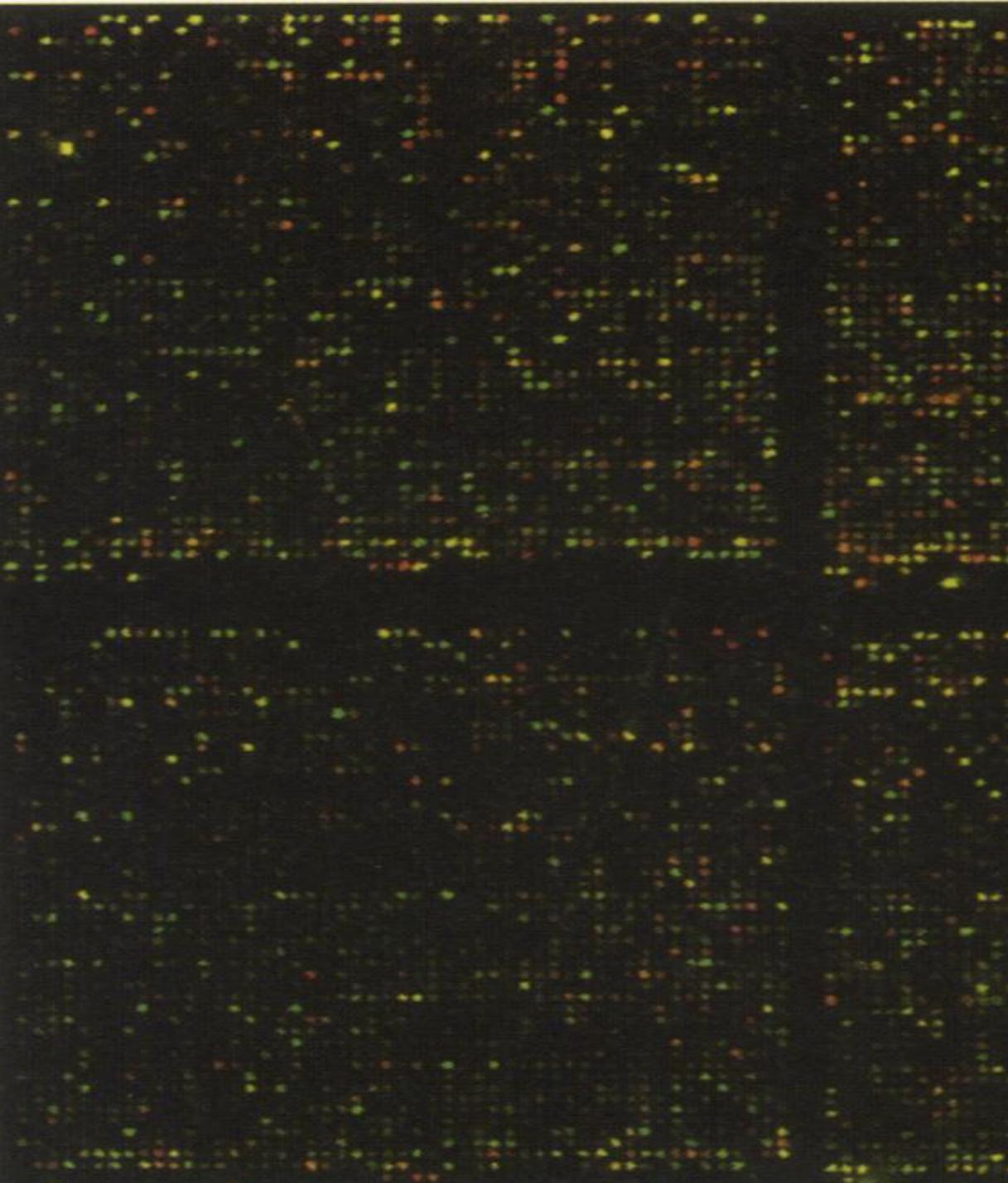
染色体の  
遺伝子数

ハプロイド  
あたり  
合計  
26808 個



# *Chapter 4*

2000年代：  
array CGH



# マイクロアレイ / DNAチップによる遺伝子解析

---

方法	固相化核酸	被検核酸
CGH	70bp-300kb DNA	全ゲノムDNA
SNPs	オリゴヌクレオチド	ほとんどのSNPs 特定の遺伝子
発現解析	全てのcDNA	mRNA

---

# マイクロアレイを用いた比較ゲノム雑種 形成

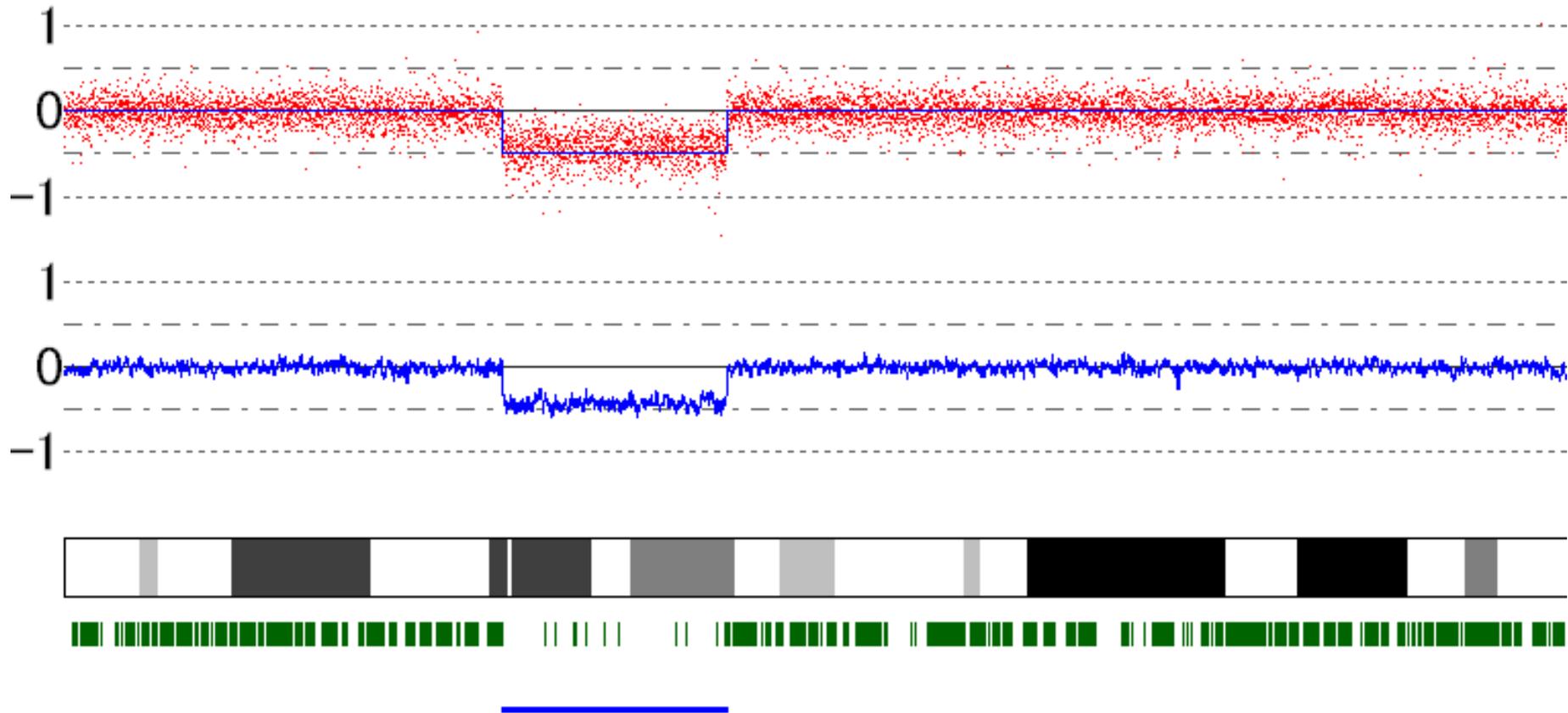


患者 KY (M) MCA/MR

10番染色体の欠失:

46, XY, del (10) (p13.1p12.1) inv (10) (p12.2q22.1)

Ch10



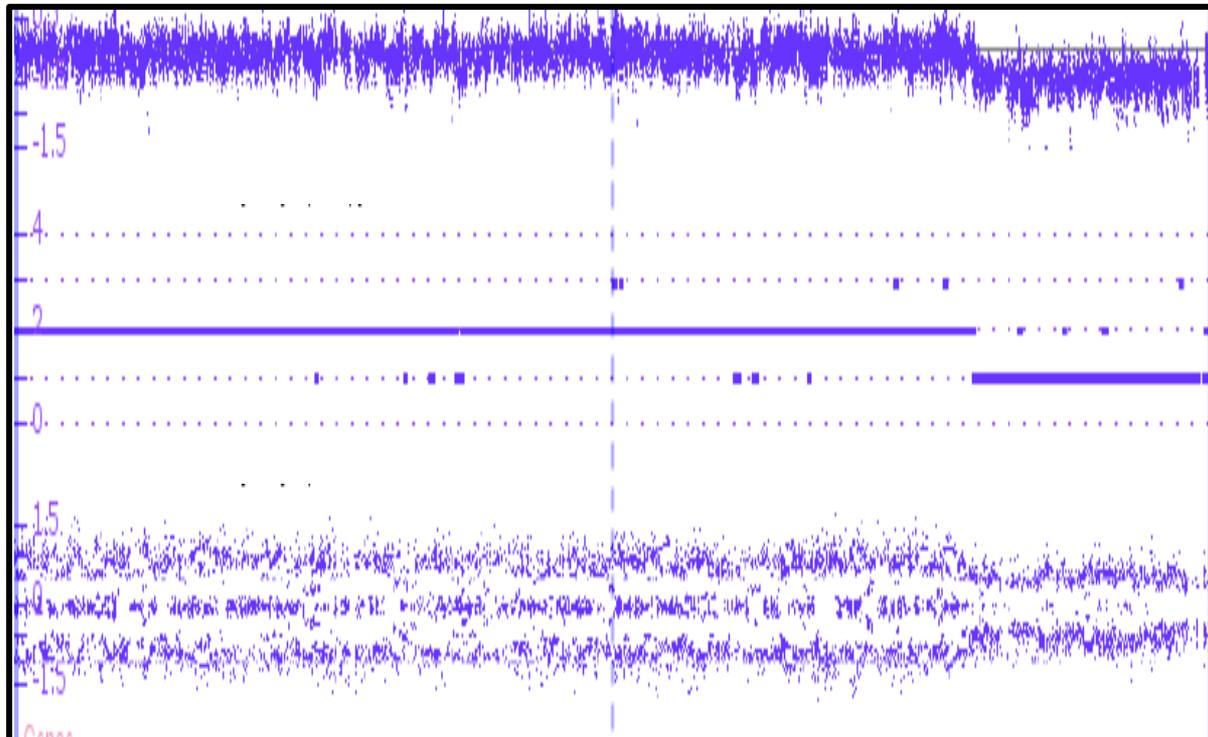
患者 YW (M) MCA/MR

46, XY

arr[hg19]1q43q44(242,457,297-249,224,684)x1

1q44 欠失症候群

aCGHで6.8 Mbの欠失 (G-bandingでは検出不能)



# *Chapter 5* TECHNOLOGY: NEXT GENERATION SEQUENCING

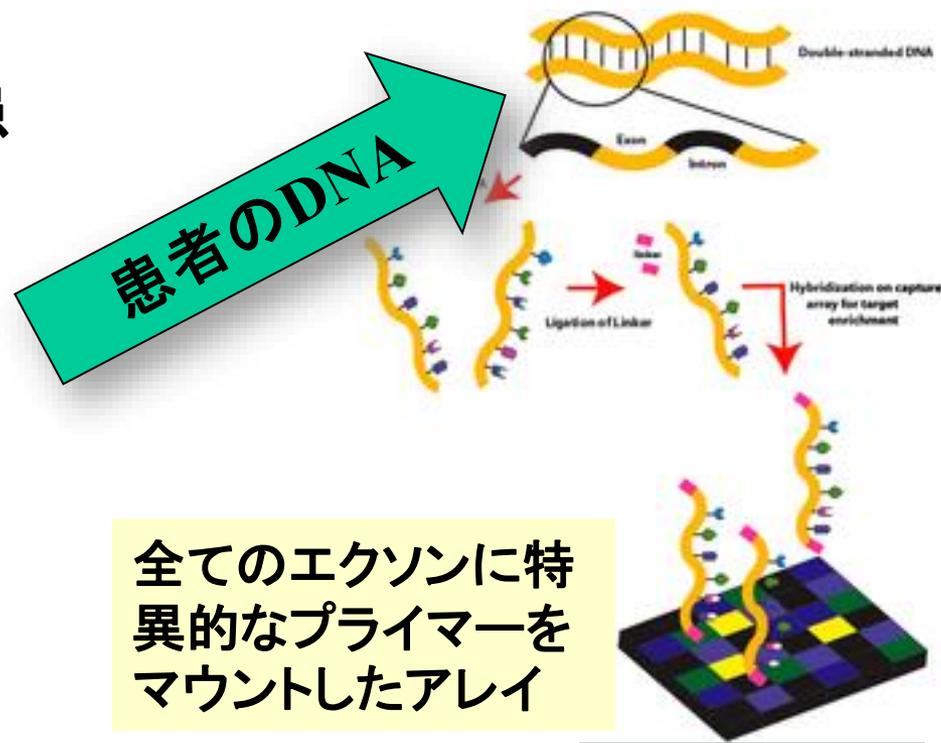
2010年代:  
エキソームシーケンシング  
全ゲノムシーケンシング

A photograph of a rice paddy field with rows of young rice plants in water. The plants are arranged in neat, parallel rows, and the water reflects the sky and the surrounding greenery. The perspective is from a low angle, looking down the rows of plants.

## 診断不明の先天異常症 遺伝子が同定されていない疾患

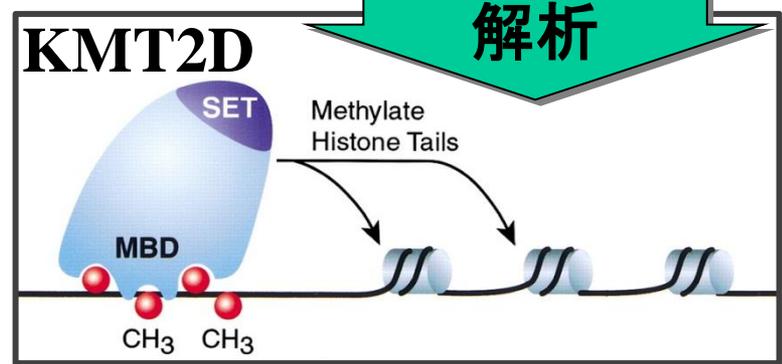


Diseases with mutations in  
**MLL2 (KMT2D) and KDM6A**  
Disorder of genomic activation



全てのエクソンに特異的なプライマーをマウントしたアレイ

塩基変異の検出と解析



# ダウン症の出生前診断：血清マーカー，NTとNIPT

胎児項部浮腫(Nuchal translucency:NT)は胎児後頸部皮下の体液貯留像である。妊娠11週～13週に測定3mm以上でダウン症のリスクとなる

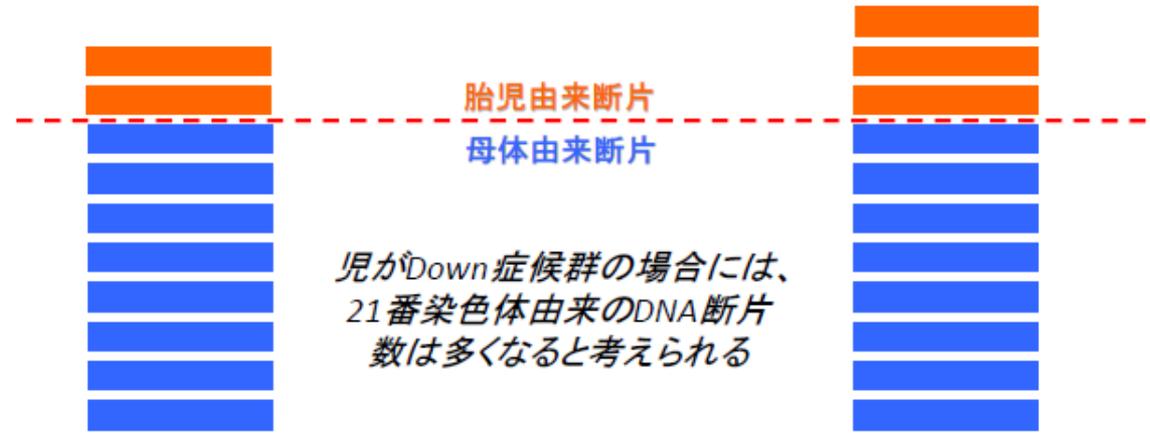
母体血清マーカー  
α-フェト蛋白、hCG、  
エストロール、インヒビン



## 母体血cell-free DNA胎児染色体検査 MPS法検査原理

- DNA断片からその断片が母体由来か、胎児由来かの区別はできない
- DNA断片の比率の変化から診断する(特殊なアルゴリズムを使用)

### 21番染色体由来のDNA断片数



胎児が正常核型

胎児がDown症候群

21番染色体断片濃度：正常核型=1.3%；ダウン症候群=1.42%

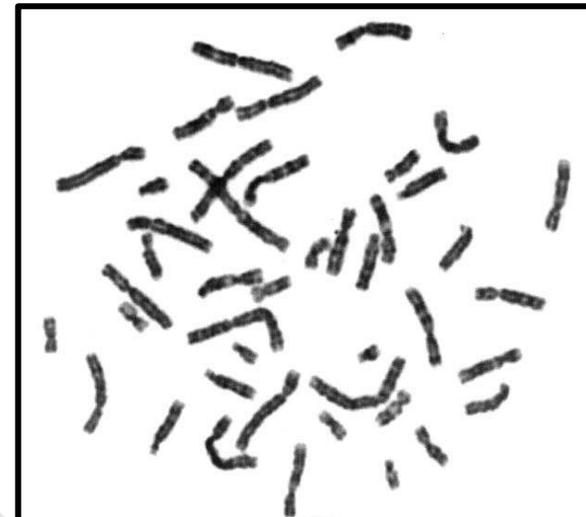
# 主なゲノム検査法

	標的遺伝子の解析	網羅的解析
染色体/ゲノム検査		
染色体検査	FISH法	G-band
DNAアレイ検査		CGH
塩基配列検査		
サンガー法	PCR direct sequencing	
次世代シーケンサー		エクソームシーケンシング 全ゲノムシーケンシング

# 網羅的検査の種類

G-band法

古典的なゲノムスクリーニング  
10 Mb以下の異常を検出できない



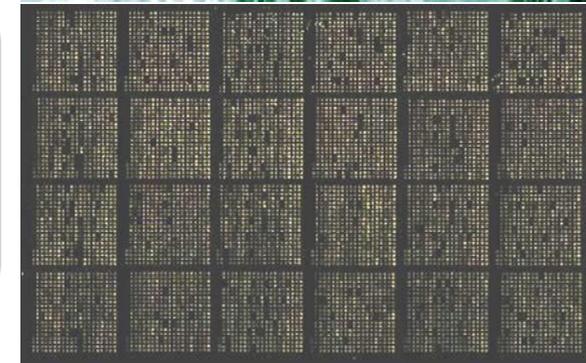
エクソーム  
シーケン  
シング

次世代シーケンサーを利用  
全てのエクソン領域をシーケンス



array  
CGH

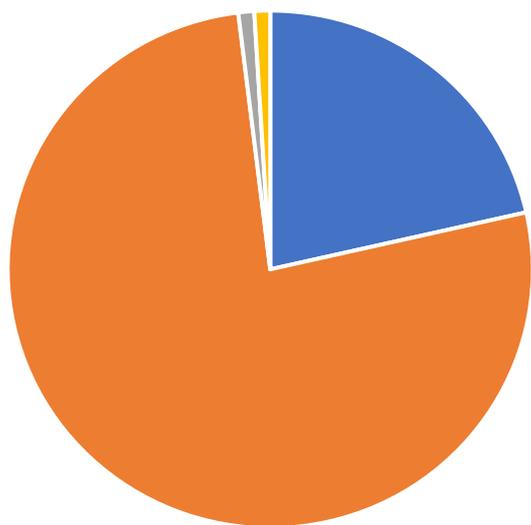
数万のDNA断片をプローブとする  
解像度は数100 kb  
構造異常は検出できない



# ゲノムスクリーニング検査の比較

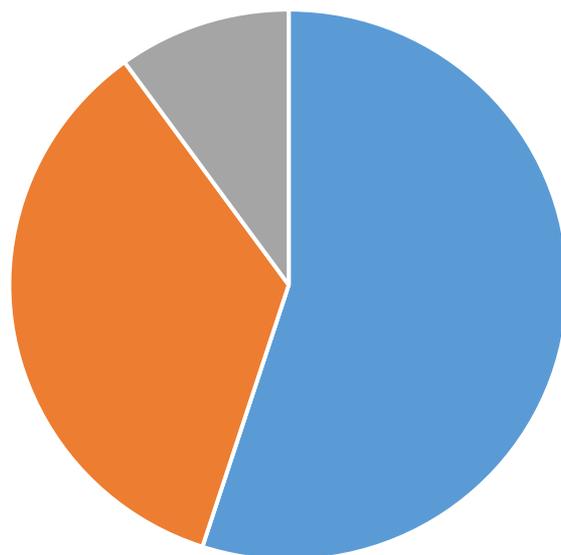
天使病院 小児科 2014-2018

G-banding n=205



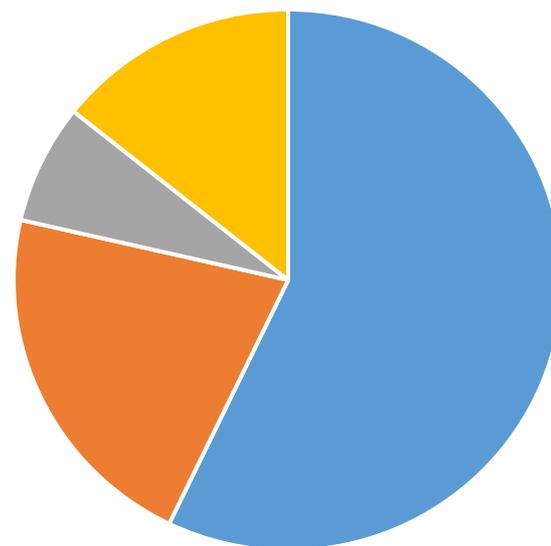
- 異常(44)
- 正常(157)
- 均衡型転座(2)
- その他(2)

array cGH n=20



- 欠失(11)
- 正常(7)
- 重複(2)

IRUD n=14



- 1遺伝子変異(8)
- 同定不能(3)
- 2遺伝子変異(1)
- 微小欠失(2)

# 1. 遺伝子・ゲノム異常の記載法

## 遺伝子

MIMカタログ番号

- \* 190182. TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA RECEPTOR, TYPE II; TGFBR2  
Cytogenetic location: 3p24.1, Genomic coordinates (GRCh38): 3:30,606,471-30,694,141

ヒトゲノムのリファレンス配列

3番染色体の短腕の末端からの塩基番号

## 染色体

染色体数と性染色体構成

- 46,XY
- 47,XX,+21
- 46,XY,t(11;15)(p15.5;q21)

過剰染色体番号

11番染色体短p腕p15.5と15番染色体長腕q21間の相互転座

## アレイCGH

コピー数異常のある染色体領域

- arr[GRCh37]11q13.2q13.4(66,657,415\_71,294,259)x1

1コピー(欠失)の範囲: 11番染色体の短腕の末端から塩基番号で表示

## 遺伝子変異

レファレンス配列

- CHD7 NM\_0017780.3:c.3784G>T

Coding DNAの3784番目のGがTに変異

原因遺伝子名(CHD7)とそのデータベースへのアクセッション番号

Chr8(GRCh37):g.61,748,636G>T  
p.(Glu1262\*)

変異した塩基の8番染色体上の位置

Protein:の1262番目のアミノ酸であるグルタミン酸が終止コドンに変わる

# 遺伝子バリエーションの表記法

- [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsft/17/1/17\\_18/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsft/17/1/17_18/_pdf)
- <https://www.med.kitasato-u.ac.jp/lab/molgen/sub9.html>

いづれも北里大学分子遺伝 宮下先生

# 希少疾患・MCA/MRの遺伝学的診断 フローチャート



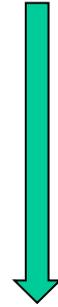
病歴，理学所見，検査所見など表現型の吟味  
家族歴の調査  
臨床診断をする：URDBMSなど支援ソフト使用

G-bandingの実施

疑わしい診断あり

疑わしい診断が想起できない

FISH  
標的遺伝子検査  
(保険・非保険)



aCGH  
ES  
WGS

# 遺伝子検査の結果を受け取ったら

【患者】 硝子体の疾患をもつMCA/MRの患者

- ・ 若干Kabuki 症候群の印象あり， 家族歴なし
- ・ 保険診療で遺伝子検査 KMT2DとKDM6Aの全エクソンと隣接イントロン領域10塩基の配列を決定

【結果】

KMT2D hetero c.16194C>T p.Asn5398=

KMT2D hetero c.8813C>T p.Pro2938Leu

- ・ 後者は私がClinVarで調べたところLikely benign

遺伝子検査の結果の判定には責任あるコメントが必ずしもなされない。  
表現型異常(疾患)の原因となる病的なvariationかどうかの判断が必要

- 1 既報例ではないか文献検索
- 2 de novoかどうか？両親を調べる
- 3 いくつかのプログラムでアレル頻度や遺伝子産物の予測などを調べ専門家と相談

## 2. 遺伝学お役立ちサイト

### PubMed

PubMed comprises more than 20 million citations for biomedical literature from MEDLINE, life science journals, and online books. Citations may include links to full-text content from PubMed Central and publisher web sites.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html>

### UCSC Genome Bioinformatics

<http://genome.ucsc.edu/>

上級者向け: 私には無理なワールド

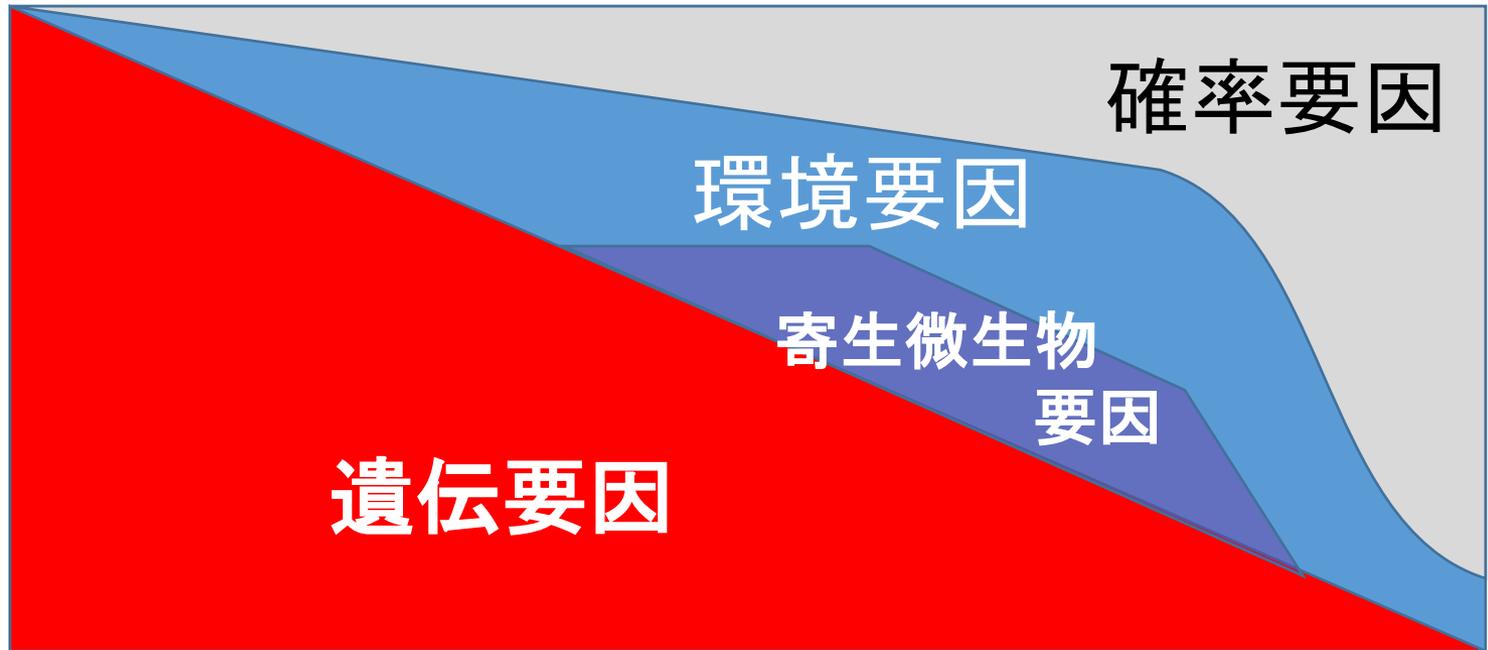
gnomAD\_v3.1

iJGVD\_8.3kjpn

CLINSIG, ClinVar\_20210517

HGMD,\_2021.2

# 疾患の遺伝要因・環境要因・確率要因



単一遺伝子病

染色体異常症

先天奇形

アレルギー

生活習慣病

がん

感染症

事故

多因子疾患