

マイクロアレイ染色体(CMA)検査 超入門

埼玉県立小児医療センター 遺伝科
大場大樹

Webinarの構成

- イントロダクション
 - マイクロアレイ染色体検査 (CMA) 検査 超入門
 - BEDファイル形式データの取扱い
 - マイクロアレイ染色体検査の結果解釈の補助ソフトウェアツール (CAS) の使用方法
 - マイクロアレイ (CMA) 検査の結果解釈に必要なデータベースの使用法
- 実践編
 - 解析例 1 : CASを使用して疾患関連性を調べたLossの例
 - 解析例 2 : CASと各種データベースを使用して疾患関連性を調べたLossの例
 - 解析例 3 : CASと各種データベースを使用して疾患関連性を調べたGainの例
 - 解析例 4 : 疾患関連性領域近傍にあるBenignのLossの例
- Advanced編
 - データベース「UCSC」使用方法
 - 解析例 5 : UCSCを用いて、Uncertain Significance と推定される例
 - インプリンティング疾患の解釈について

この動画ではマイクロアレイ染色体検査（以下、CMA）の「結果を見る」「結果を解釈する」ために必要な最低限の基本事項を述べています。

例外的なことや応用的な内容までは、網羅していませんのでご留意ください。

CMA解釈に必要な基本用語①

- CMA : Chromosomal Microarray (Analysis)
マイクロアレイ染色体検査のこと
- CNV : Copy Number Variation (Variant)
後のスライドで説明
- 欠失、重複
後のスライドで説明
- 切断点
染色体上でCNV領域の両端に位置する部分

CMA解釈に必要な基本用語②

- Kb, Mb (キロbase, メガbase)

塩基 (A, T, G, C) の数。1塩基で1 base、Kbは 10^3 塩基
CNVのサイズ表示 (欠失・重複の塩基数) に用いる

- ゲノムポジション

各染色体短腕の最初の塩基を1塩基目として、何塩基目の
場所かを示す座標

CMA解釈に必要な基本用語③

- GRCh37, GRCh38

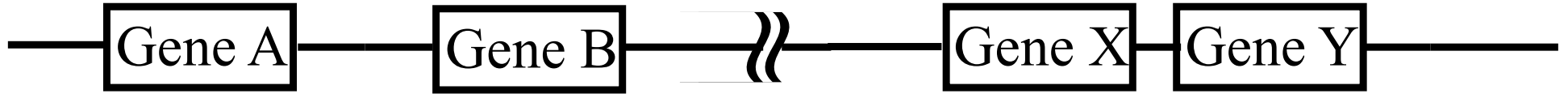
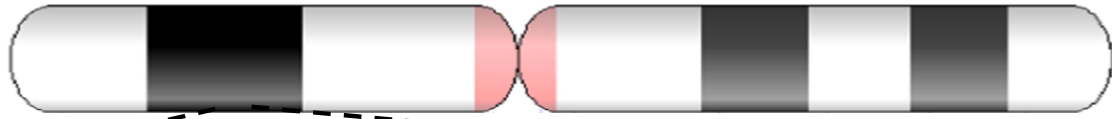
ヒト染色体の標準(基準)塩基配列のversion。各versionで染色体塩基数が異なるため、遺伝子のゲノムポジションも異なる。

CMAではGRCh37に準拠(GRCh38が最新のversion)

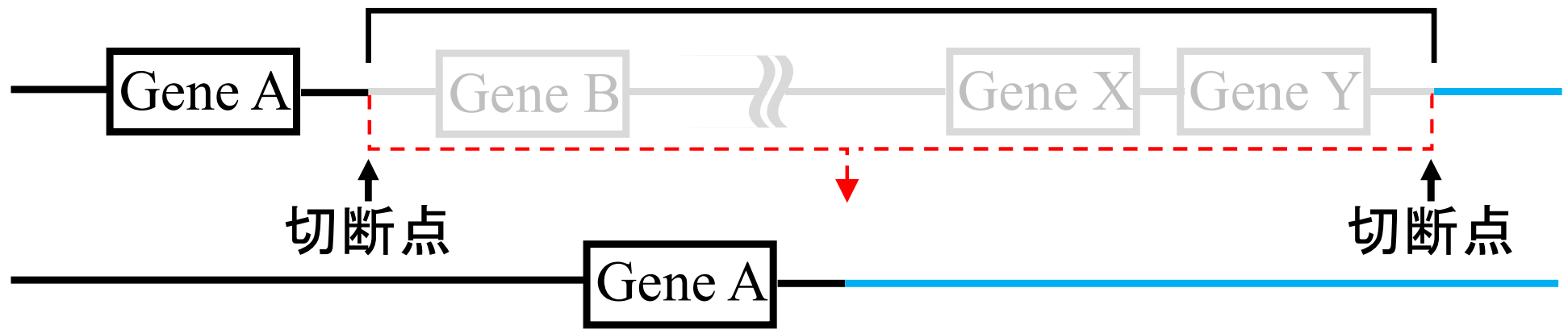
- 病原性CNV (Pathogenic CNV)

CMAで検出されたCNVが被検者の表現型ないしは疾患発症に影響するもの

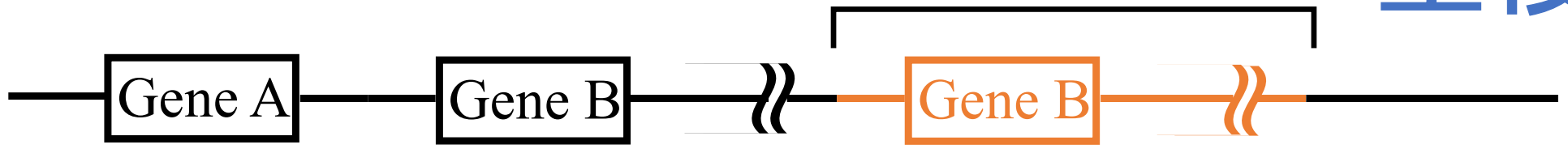
CMAは何をみている？



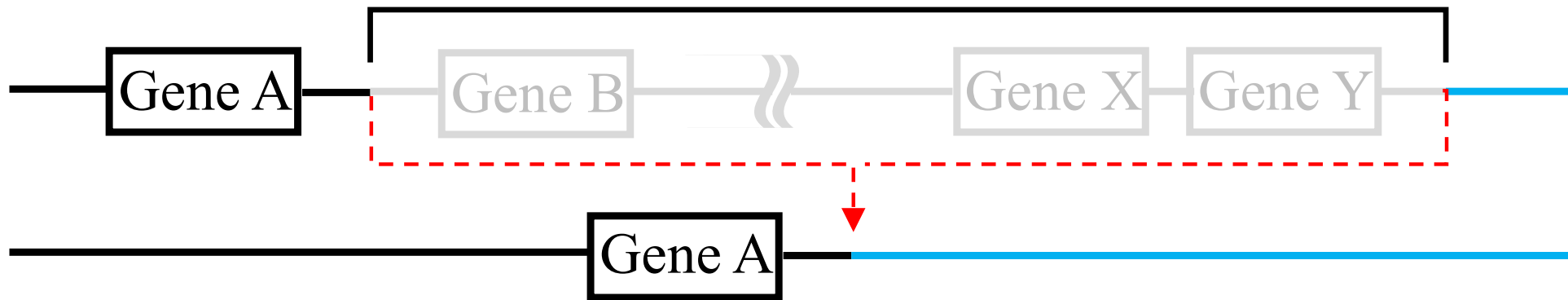
一部分がなくなる ➡ **欠失**



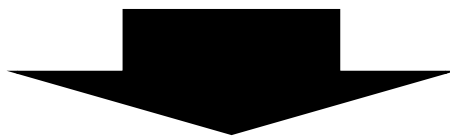
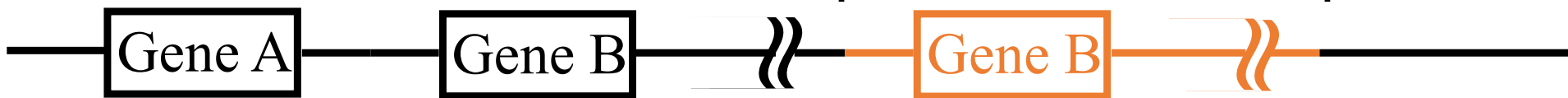
一部分が増える ➡ **重複**



一部分がなくなる ➡ **欠失**



一部分が増える ➡ **重複**



**ゲノムコピー数変化
(CNV)**

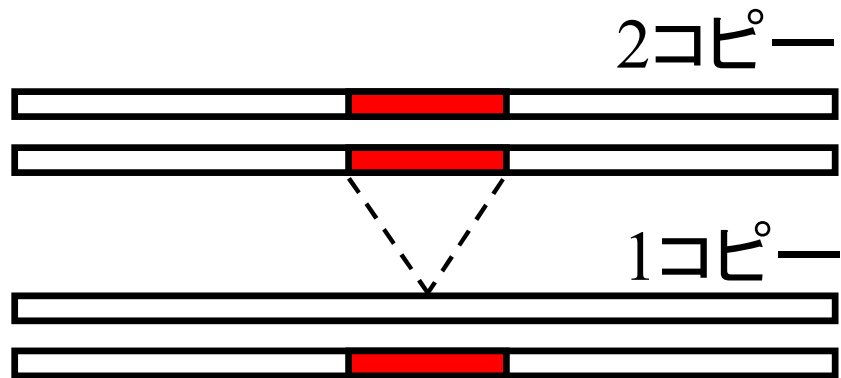
CNVとは

種類	内容
SNV - Single Nucleotide Variation	1塩基置換
Indels	
Insertion	1~数塩基の挿入
Deletion	1~数塩基の欠失
Insertion-Deletion	2塩基以上の挿入および欠失
CNV Copy Number Variation	5 Mb >, \geq 1 Kb 程のゲノムコピー数変化

ゲノムコピー数

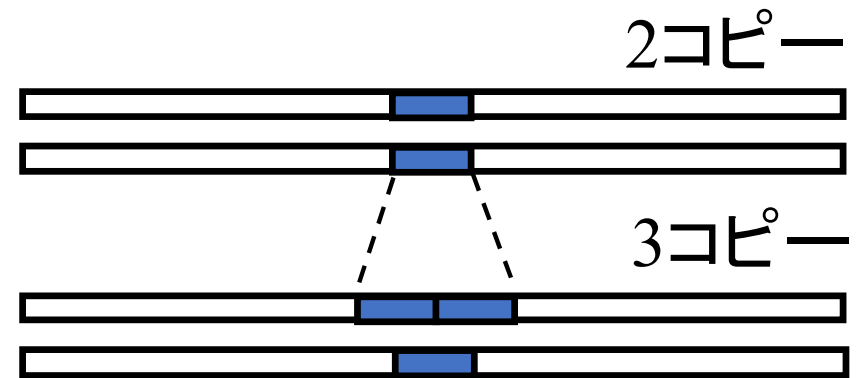
欠失 (Deletion)

常染色体、X染色体(女児)

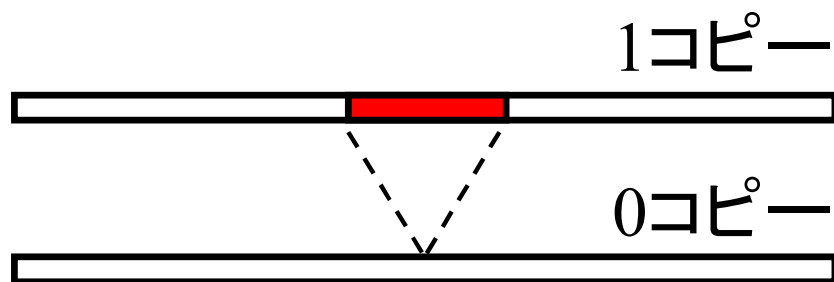


重複 (Duplication)

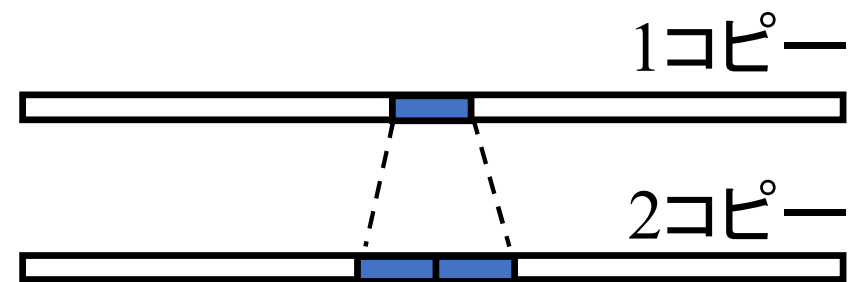
常染色体、X染色体(女児)

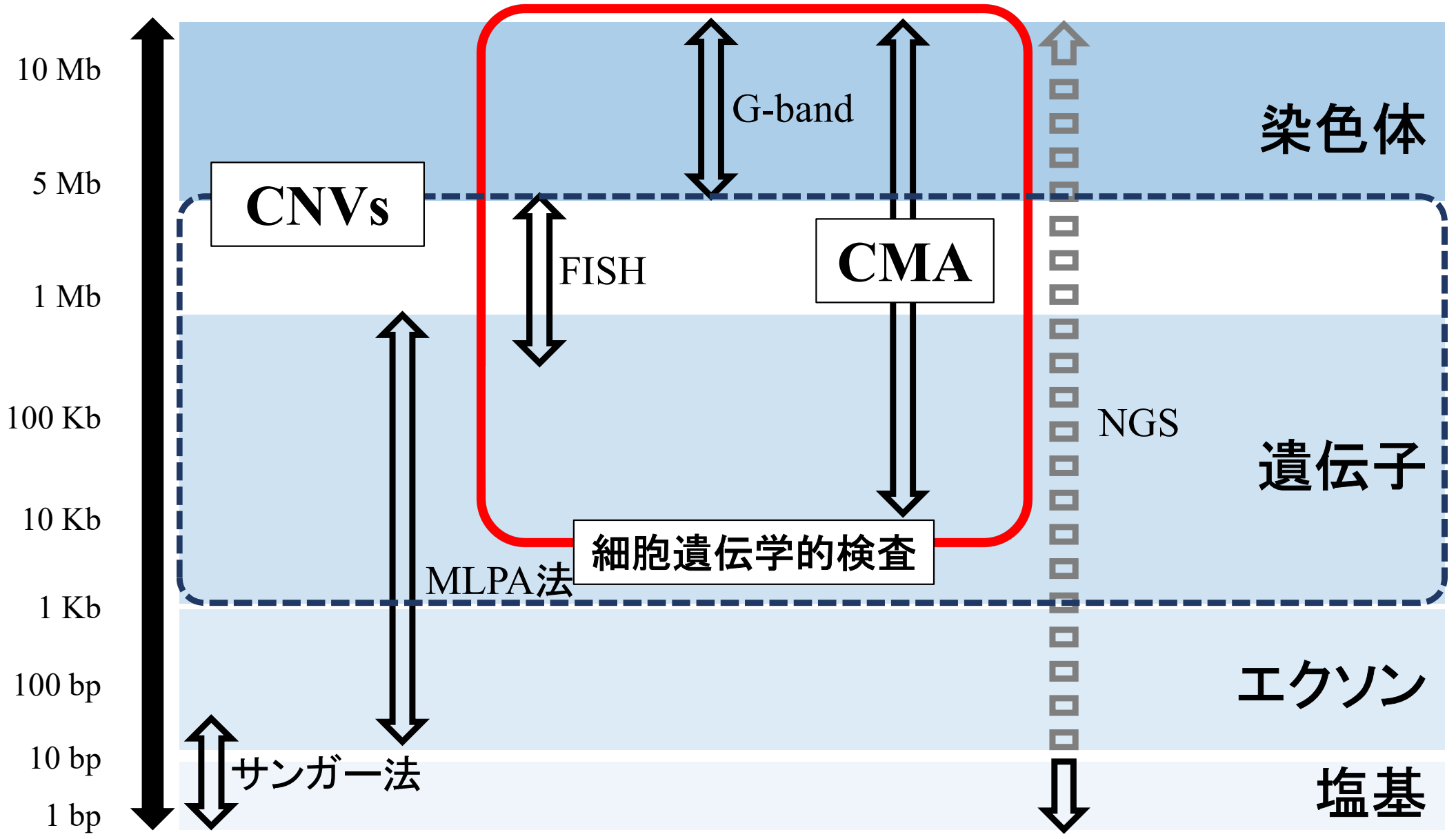


X染色体、Y染色体(男児)



X染色体、Y染色体(男児)





CMAの結果のみかた

CMAの結果とその内容

① どの領域に : 染色体領域、ゲノムポジション

② なにが : コピー数低下、コピー数上昇

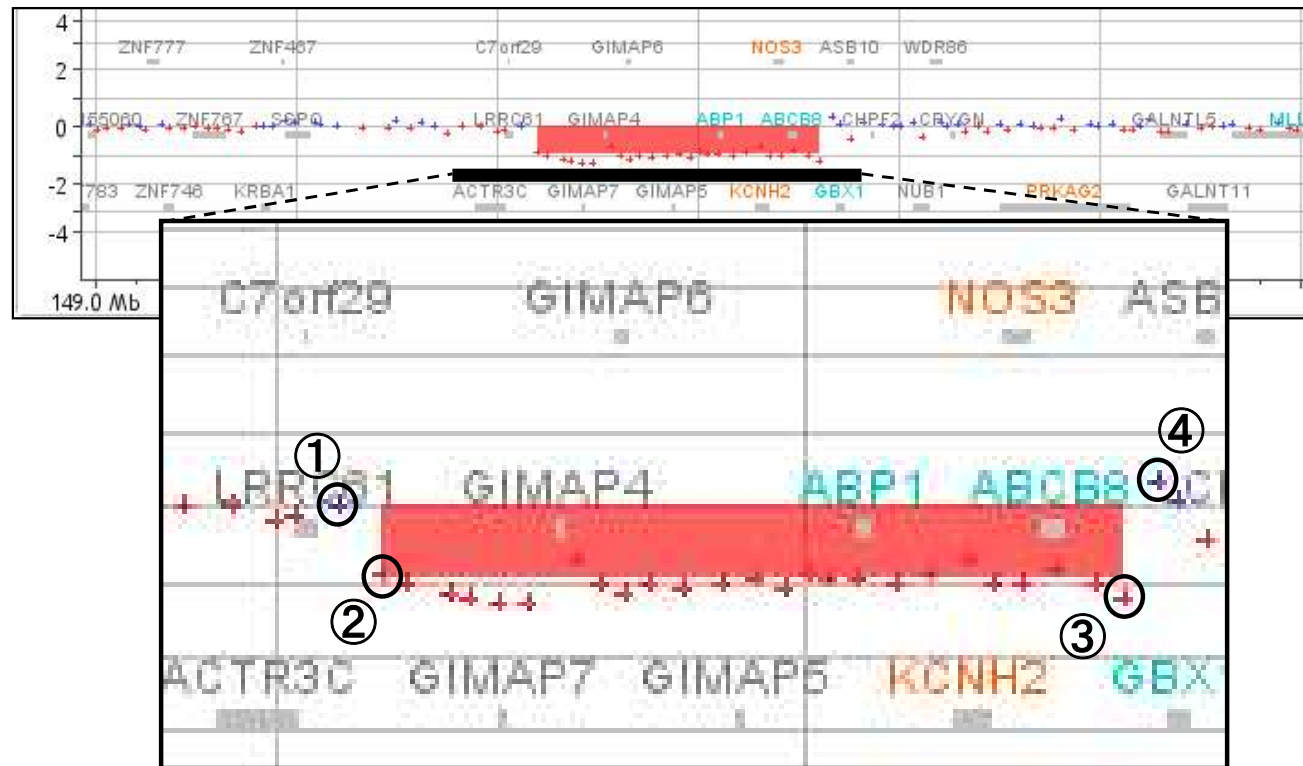
ゲイン/ロス領域表

Gain/Loss Intervals Table

染色体 Chr	最小始点-終点(bp) 最大始点-終点(bp) Min Start-Stop(bp) Max Start-Stop(bp)	最小サイズ(kb) 最大サイズ(kb) Min Size(kb) Max Size(kb)	最小サイトバンド 最大サイトバンド Min Cytoband Max Cytoband	ゲイン/ロス Gain/Loss	アノテーション Annotations
chr1	746608-3375421 647288-3404363	2,628.814 2,757.076	p36.33 - p36.32 p36.33 - p36.32	0.564656	FAM87B, LINC00115, LINC01128, FAM41C, LINC02593, SAMD11, NOC2L, KLHL17, PLEKHN1, PERM1, HES4, ISG15, AGRN, LOC100288175, RNF223, C1orf159, LINC01342, MIR200B, MIR200A, MIR429, TTLL10, TNFRSF18, TNFRSF4, SDF4, B3GALT6, C1QTNF12, UBE2J2, SCNN1D, ACAP3, MIR6726, SNORD167, PUSL1, INTS11, MIR6727, CPTP, TAS1R3, DVL1, MIR6808, MXRA8, AURKAIP1, CCNL2, MRPL20-AS1, MRPL20, ANKRD65, TMEM88B, LINC01770, VWA1, ATAD3C, ATAD3B, ATAD3A, TMEM240, SSU72, FNDC10, LOC105378586, MIB2, MMP23B, MMP23A, CDK11B, SLC35E2B, CDK11A, SLC35E2A, NADK, GNB1, CALML6, TMEM52, CFAP74, GABRD, LOC105378591, PRKCZ, PRKCZ-AS1, FAAP20, SKI, MORN1, LOC100129534, RER1, PEX10, PLCH2, PANK4, HES5, TNFRSF14-AS1, TNFRSF14, LOC100996583, PRXL2B, MMEL1, TTC34, ACTRT2, PRDM16-DT, PRDM16, MIR4251, ARHGEF16

①

②



- ②③間は欠失が確実な領域
- ①②間、③④間は欠失がありうるが確実ではない領域
(CNVの切断点は①②間のどこか③④間のどこかにある)

- 最小サイズ = (③のゲノムポジション) - (②のゲノムポジション)
- 最大サイズ = (④のゲノムポジション) - (①のゲノムポジション)

基本的に最小サイズ(欠失が確実な領域)を評価

Loss/Gain部分の数値

- 被検者とコントロールのゲノムコピー数の比率を Log_2 値換算

$$\text{Log}_2 \left(\frac{\text{被検者のゲノムコピー数}}{\text{コントロールのゲノムコピー数 (基本的に2コピー)}} \right)$$

2コピーの場合

$$\text{Log}_2 \frac{2(\text{被検者})}{2(\text{コントロール})}$$

$$= \text{Log}_2 1 = \mathbf{0}$$

1コピーの場合

$$\text{Log}_2 \frac{1(\text{被検者})}{2(\text{コントロール})}$$

$$= \text{Log}_2 0.5 = \mathbf{-1}$$

3コピーの場合

$$\text{Log}_2 \frac{3(\text{被検者})}{2(\text{コントロール})}$$

$$= \text{Log}_2 1.5 = \mathbf{+0.58}$$

「正の値 ≡ 重複」「負の値 ≡ 欠失」

※ 正しくは上記の式からコピー数を求める必要あり

応用編

コピー数低下(上昇)は欠失(重複)?

一般的なイメージ

- 欠失: 2コピー → 1コピー (常染色体、女性のX染色体)
1コピー → 0コピー (男性のX, Y染色体)
- 重複: 2コピー → 3コピー (常染色体、女性のX染色体)
1コピー → 2コピー (男性のX, Y染色体)

ただし、下記もコピー数低下や上昇に含まれる

- 欠失: 2コピー → 0コピー (常染色体の両アレル欠失)
- 重複: 2コピー → 5コピー

応用編

コピー数低下(上昇)は欠失(重複)?

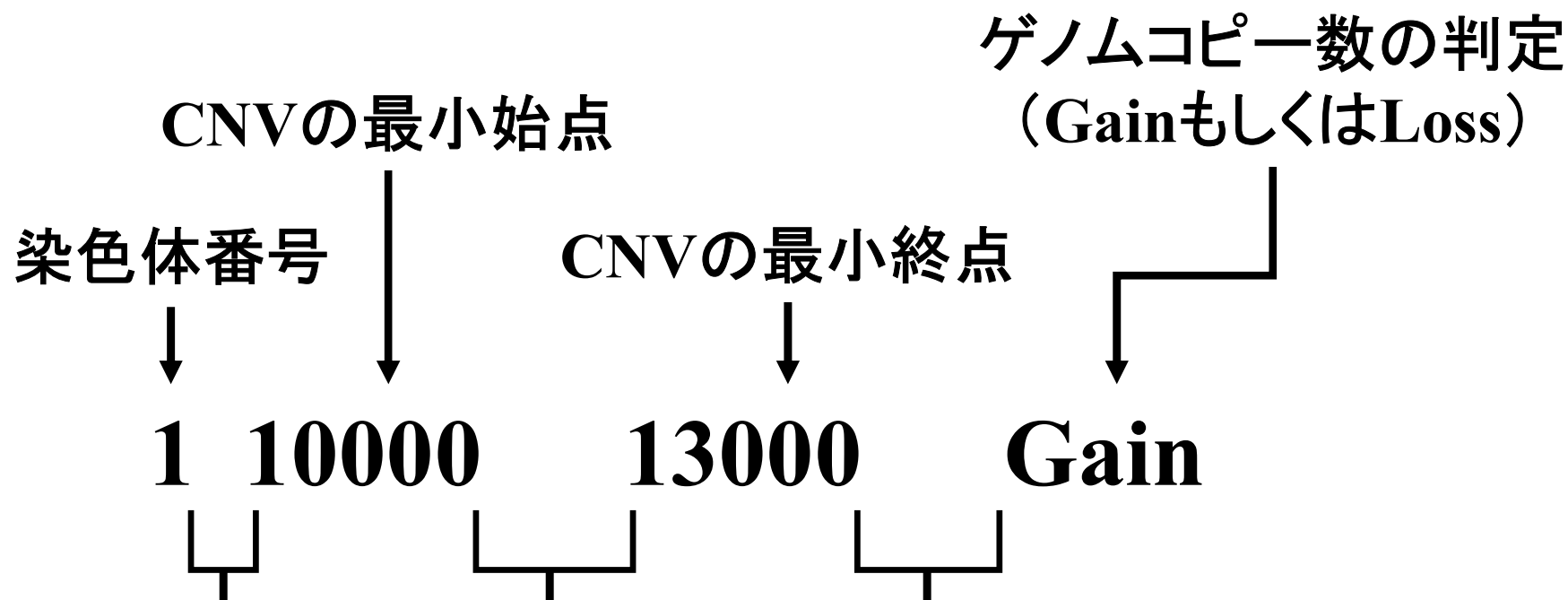
厳密には、

- コピー数低下 (**Loss**) ≠ 欠失 (**Deletion**)
- コピー数上昇 (**Gain**) ≠ 重複 (**Duplication**)

BEDファイルは何してる？

- BEDファイルの中は、**タブ切りされた情報データ**

ファイルの中身



ここはタブ切りの空白

※通常のスペースキーではなく、タブボタンで空白を作る

CMAの結果解釈に必要な知識

Pathogenic, Benignの判断

- Pathogenic (病原性; 表現型へ影響する) CNV



評価対象として認識し、診断につなげる

- Benign (良性; 表現型へ影響しない) CNV



評価対象から除外し、報告対象から外す

病原性判断に必要な情報

- **ハプロ不全 (Haploinsufficiency: HI)**
領域や遺伝子が欠失することによる疾患発症
- **重複感受性 (Triplosensitivity: TS)**
領域や遺伝子が重複することによる疾患発症

TSが確立された遺伝子は稀



CMAの重複は基本的に領域を評価する

病原性CNVの臨床的解釈

- 領域としての病原性及び表現型解釈
 - ✓ 遺伝子1つではなく、欠失(重複)領域としての合併症



染色体異常症、染色体微細欠失/重複症候群

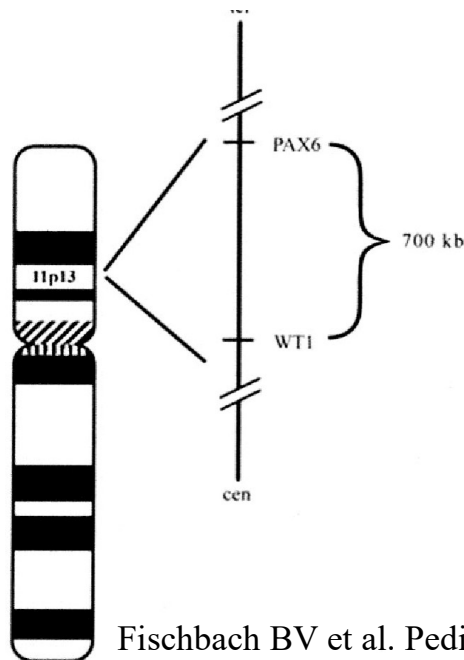
- 遺伝子欠失としての病原性及び表現型解釈
 - ✓ ハプロ不全が確立された遺伝子の欠失による表現型



単一遺伝子疾患

WAGR症候群

(Wilms tumor, Aniridia, Genital anomalies, Retardation)



Fischbach BV et al. Pediatrics, 2005

➤ 11p13領域の微細欠失

- ✓ *PAX6*と約700 Kb下流にある*WT1*の欠失による
隣接遺伝子症候群
- ✓ HIが確立されているのは*PAX6*と*WT1*のみ

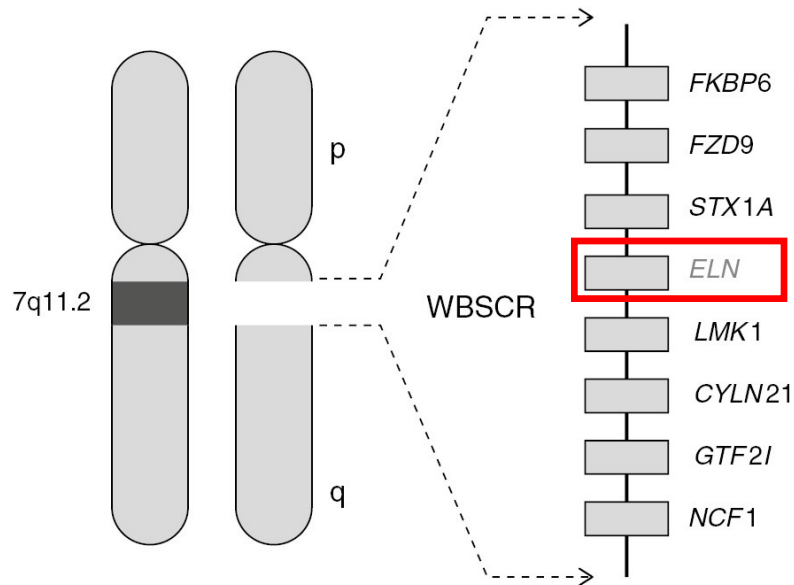
遺伝子欠失としての考え方

- ✓ *PAX6*欠失：無虹彩症
- ✓ *WT1*欠失：Wilms腫瘍
腎泌尿器合併症

染色体微細欠失としての考え方

- ✓ 微細欠失症候群としての発達遅滞
- ※ *PAX6*, *WT1*の各欠失のみでは
発達遅滞をきたさない

Williams症候群



<http://williams-disorder.weebly.com/>より

➤ 7q11.23領域の微細欠失

✓ 一般的な合併症

心疾患(大動脈弁上狭窄;SAVASなど)

Ca代謝異常(高Ca血症/尿症)

発達遅滞、聴覚過敏、斜視、側弯

鼠経ヘルニアや直腸粘膜脱

✓ HIが確立された遺伝子: *ELN*のみ

遺伝子欠失としての考え方

✓ *ELN*欠失: SVAS、鼠経ヘルニア

単一遺伝子疾患では
エラスチン異常症(SVAS、皮膚弛緩症)

染色体微細欠失としての考え方

✓ 発達遅滞

✓ 側弯

✓ Ca代謝異常

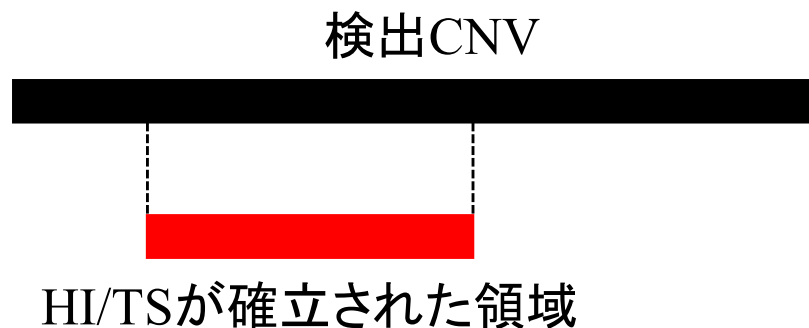
✓ 聴覚過敏

CNVと病原性領域の対比

HI/TSが確立された領域 \equiv そのCNV **全体**を含むことで病原性を持つ

※CNV内に責任遺伝子/領域を有する場合あり

検出CNV \geq HI/TSが確立された領域



確立された
病原性領域を包含する



CNVの病原性は確立

検出CNV \leq HI/TSが確立された領域



検出CNVは病原性領域の
一部を含まない



CNVの病原性は未確立

CMA超入門のまとめ

- CMAが見ているのはゲノムコピー数変化(CNV)
- CNVとは概ね5Mb >, ≥ 1 Kbの欠失や重複
- 評価では、
 - Pathogenic CNVを認識し、報告対象に入れる
 - Benign CNVを評価・報告対象から除外する
 - 評価時にLoss(≡欠失)とGain(≡重複)を間違えない!
 - HIとTSによる病原性の評価を行う
 - CNV領域とHI/TSが確立された領域の位置関係に留意