

次世代シーケンサーを用いた PGS について

着床前スクリーニング（PGS; preimplantation genetic screening）の手法は、array-CGH（comparative genomic hybridization）による方法が一般的でしたが、諸外国では次世代シーケンサー（NGS; next generation sequencer）を用いた手法に移行しつつあります。

ヒトゲノム計画の記憶がまだ新しく、NGS を使用した PGS なんて行ったら、知ってはいけない遺伝子情報まで調べることになるのでは？と思っている方も多いのではないのでしょうか。

そこで、今回はその辺の事を詳しい方にご質問してみました。

Question 1 :

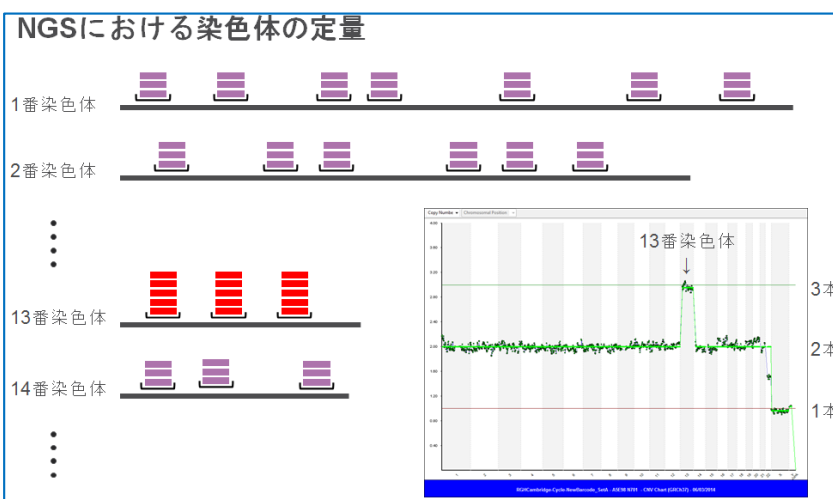
「PGS は array-CGH から NGS も用いた検査に移行していると聞きました。簡単に NGS による PGS の検査原理をお教えいただけませんか？ また、NGS の PGS における現在の位置づけをお教えください。」

Answer 1 :

NGS（次世代シーケンサー）とは、Sanger 法シーケンサーとの対比として使用される用語です。従来の Sanger 法シーケンサーでは、700-1,000 塩基の DNA 配列を 1 断片ずつ配列決定するのに対し、次世代シーケンサーでは、数十塩基から数百塩基の DNA 配列を数千万断片から数百億断片について**多数並行**して塩基配列決定することが最大の特徴です。また、この桁違いに多数の DNA 断片を並行して同時に配列決定するという特徴から、単に塩基配列を決定するだけでなく、**定量するツール**としての側面を持つようになりました。NGS ベースの PGS は、まさにこの特徴を使用したアプリケーションになります。

バイオプシー検体から抽出した DNA を全ゲノム増幅試薬で増幅し、このランダムに断片化された DNA の塩基配列を NGS で決定します。決定した配列を情報として記録されている基準配列と比較し、断片が何番の染色体由来だったかを同定します。つまり、その DNA 断片が何番染色体の大体どの部分のものなのかを調べるわけです。

最終的に、各染色体に各 DNA 断片が何断片ずつ存在したかを集計します。理論上、染色体の長さ按比例して照合される断片数が決まります。たとえば、13 番染色体の長さは約 1 億 1800 万塩基で、全染色体の合計長約 30 億塩基のうちの約 3.9%です。もしも染色体数が正常であれば、解読した全断片のうち約 3.9%が 13 番染色体由来となります。しかし、解読した全断片のうち 13 番染色体由来の断片が約 5.9%であった場合は、通常 2 本であるはずの 13 番染色体と比較して 1.5 倍の量があることになるので、13 番染色体は 3 本であり、13 番トリソミーだったと推定することができます。



NGS ベースの PGS は、array-CGH ベースの PGS と比べて、1) S/N 比（S はシグナル、N はノイズ）が高く、データがはっきりと出て判断がしやすい。2) 手技の成熟を必要とせず、誰でも比較的安定なデータが出せる。3) 現時点（2016 年 3 月）では、以前に比べて格段に 1 検体あたりのコストは低くなっていて、今後もコストダウンが期待される、といった特徴があります。NGS ベースの PGS は、2014 年から実用化され、世界中では array-CGH から NGS への移行が盛んにおこなわれています。そして 2016 年には、NGS ベースの PGS が逆転して主流を占めると予想されています。

Question 2 :

「NGS ベースの PGS では、遺伝病などの塩基配列に関する解析も可能なのでしょうか？」

Answer 2 :

いいえ、できません。

NGS ベースの PGS では、染色体の本数を測定するには十分な量のデータは算出しますが、遺伝病などの塩基配列解析に必要なデータ量の約三千分の一程度の配列データしか産出されないため、そのような解析をすることはできません。

少し解り易いご説明をすると、例えば 23 種類の百科事典が 2 セット (46,XX) あって、人間一人でその冊数の変化をみることはできます (例: 第 21 巻が 3 冊ある、など)。しかし、その本の中身の一文字の違いを詳細にリストアップすることは、人間 1 人ではできません。何年もかけて、何千人も費やせば可能かもしれませんが不可能とは言い切れませんが、普通に考えたらできません。これが NGS ベースの PGS の手法で行っていることですので、全ゲノム解析をすることは上記の状態に近く、理論上は可能ともいえますが、現実には不可能です。

=====
上記のようなご回答を頂きました。

要するに、NGS の原理を使用しているからといって、全塩基配列を読んでいるわけではないということです。PGS に NGS を使用すると塩基配列を調べるから個人の遺伝情報まで知ることになる、とのお考えを耳にすることがありますが、間違った解釈のようです。

また、NGS の利点は、array-CGH よりも染色体本数の変化度合いが正確に解析できることです。例えば、バイオペシーされた 5 個の外胚葉細胞 (TE) がモザイクであり、正常細胞 3 個 + 異常細胞 2 個だったします。このとき、array-CGH では判断が難しかったようなケースでも、NGS であればモザイクであることが判定できる可能性が上昇します。例として、右図は上が array-CGH で、下が NGS の結果です¹⁾。グラフは左から 1 番染色体が並んでいます。図 A では 6 番染色体のラインが他と比較して少し下がっています。array-CGH の結果ではハッキリとは判断できませんが、NGS では明らかに 6 番だけ低いので、この胚は 6 番モノソミーが混ざっているモザイクである可能性が推測できます。

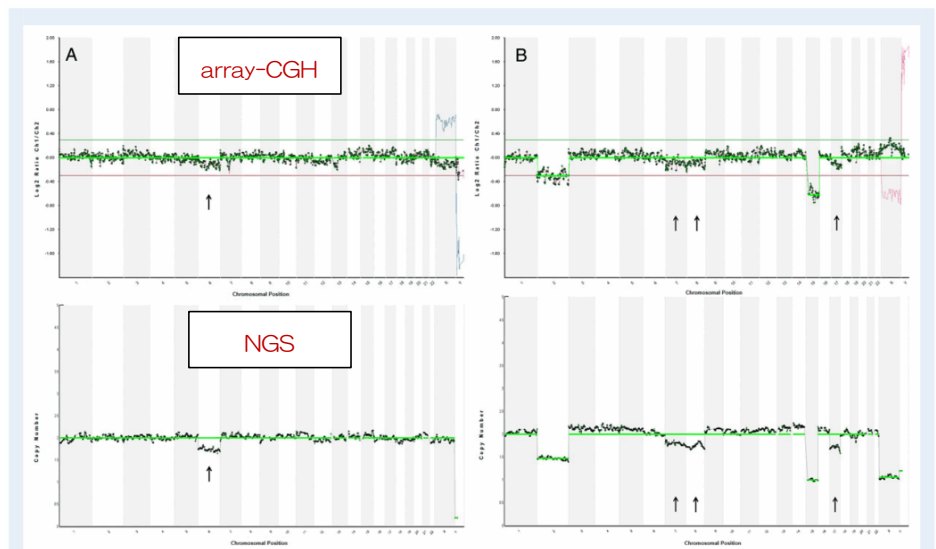


Figure 2 Examples of array comparative genomic hybridization (array-CGH) and next-generation sequencing (NGS) results. Top: results from

- 1) Fiorentino F, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. Hum. Reprod. 2014; 29: 2802–13.