

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号	2023B-8	
研究開発課題名	妊婦血中遊離核酸を標的とした診断ゲノミクス技術レパトリーの確立	
分類※	<input type="checkbox"/> ① <input checked="" type="checkbox"/> ② <input type="checkbox"/> ③ <input type="checkbox"/> ④ <input type="checkbox"/> ⑤ <input type="checkbox"/> ⑥ <input type="checkbox"/> ⑦	
区分	<input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> B <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> S	
主任研究者	所属	周産期病態研究部
	役職	室長
	氏名	中林 一彦
実施期間	2023年 4月 1日 ~ 2024年 3月 31日	

※分類は下記①～⑦より選択

- ① 日本の成育分野の疾患の研究の基盤となる研究
- ② 診断、治療及び予防法の開発に関する研究
- ③ 発症機序や病態の解明等を行う研究
- ④ 診断や治療のための基準の開発等に関する研究
- ⑤ 患児・者のQOL向上に結びつく研究
- ⑥ 研究的視点や技術をもつ医療従事者を育てるための研究  
(プロトコル作成のフェージビリティ研究)
- ⑦ 政策提言に結びつく研究

### 成果の概要

#### 計画1: RHD 遺伝子型決定・FF 測定アンプリコンシーケンス法確立

RHD/RHCE 遺伝子4領域とゲノム多型部位35領域を標的としたマルチプレックスPCR法を確立し、RhD陰性妊婦10症例を対象としたテストでRHD遺伝子型決定とFF測定が可能なことを確認した(投稿準備中)。慈恵医大病院産科の高橋健先生が推進する臨床研究に参画し、RhD陰性妊婦リクルート機関を60箇所程度に増やすことで、今後、年間100例規模の遺伝子型決定精度検証を実施できる体制を整えた。

#### 計画2: グロビン mRNA 混入を低減した血中遊離 RNA シーケンス法の開発

血中遊離 RNA 抽出キット4種類のうち最も抽出効率が高かった Norgen 社キットを採用した。血中遊離 RNA からのグロビン mRNA 除去の方法として、①グロビン mRNA キャプチャー除去方法、②血中遊離 RNA 由来 cDNA を対象としたエクソンキャプチャー方法、③両者の組合せ法をテストし、グロビン mRNA 除去効率と発現定量性に関して②で最良の結果を得た。Twist 社 RNA exome panel キットを採用し、細胞質由来 total RNA 1ng を出発材料とした technical replicate 間の遺伝子発現定量相関係数 0.98 を達成し、血中遊離 RNA 2ng の場合でも相関係数 0.92 を達成した。このように当初の目的を達成し、周産期・母性診療センター小澤克典診療部長が12月から開始する臨床研究にこのプロトコルを応用することが決まっている。

**計画 3 : 妊婦血中遊離 DNA を標的としたシーケンスによる胎児継承ハプロタイプ決定法の確立**  
二組のトリオ家系 DNA サンプルを用いて、母 DNA と児 DNA を混合した DNA（模擬的な妊婦血中遊離 DNA）を作製し、Twist 社 SNP キャプチャーシーケンス法によりシーケンスデータを取得した（児 DNA 混合比 10%・20%をテスト）。父 DNA および混合前の母 DNA・児 DNA についてもデータを取得した。このように予定通りに模擬データの取得を進めており、今年度終盤からハプロタイプ決定解析を試行できる見込みである。