

ウィキペディア

フリー百科事典

比較ゲノムハイブリダイゼーション

出典: フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』

比較ゲノムハイブリダイゼーション（英: Comparative genomic hybridization, CGH）または**染色体マイクロアレイ解析**（英: Chromosomal Microarray Analysis, CMA）は分子細胞の遺伝学的手法の1つであり、試料のDNAのコピー数変化（過剰／減少）を解析する。

腫瘍細胞を解析することが多い。

CGHは染色体での不均衡型変化のみを検出する。均衡型の相互染色体転座または染色体逆位のような構造的な染色体異常ではコピー数に変化がないため、検出できない。

1990年代にトーマス・クレーマーはペーター・リヒターとともに^[1]分裂中期の染色体への、および特定のゲノム領域を示すDNAスポットをもつマトリックスへの比較ゲノムハイブリダイゼーションを実現した。

方法

調べたい組織と対照とする組織から抽出したDNAを後の解析のためにそれぞれ異なった蛍光色素で標識する。検体と対照のDNAを混ぜ、繰り返し配列をブロックするために不均衡なヒトcot-1 DNA（Alu配列とKpn familyのような繰り返し配列を多く含む胎盤のDNA^[2]）を加えたのち、その混合液は正常な体細胞分裂中期染色体とハイブリダイズされるか、数百、数千の決められたDNAプローブを含むスライドとのアレイCGHが行われる。落射蛍光顕微鏡法と定量的画像解析を用いて、対照DNAと比べた時の局所的な蛍光強度の増加／減少率の違いが検出され、ゲノム上の異常な領域を検出するのに使われる。

現在、スライド上のオリゴヌクレオチドの解像度は概ね20–80塩基対であり、かつて用いられたBACアレイの解像度は10万塩基対であった。

利用

がん

その方法は、蛍光標識した腫瘍のDNA（フルオレセイン（FITC）が多い）と正常なDNA（ローダミンまたはテキサスレッドが多い）を正常なヒトの細胞分裂中期染色体にハイブリダイズすることに基づく。

その他

がん細胞以外では、その試験は子供に異形症、発達遅滞、精神遅滞、および自閉症を引き起こす未知の変異を調べる際に有用である。

CGHによる着床前遺伝子診断は胚の着床率を高め、多胎妊娠と流産を減少させることで人工授精の効率を高める。^[3]

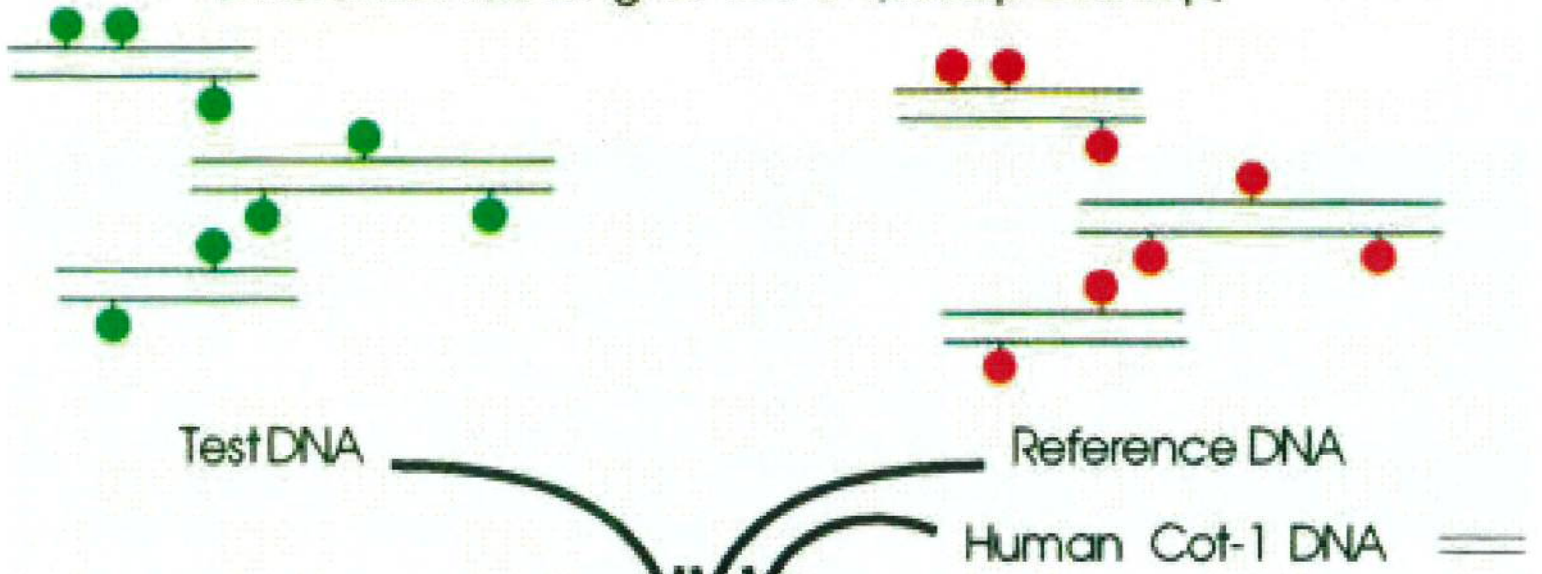
限界

染色体CGHでは、染色体レベルのコピー数の減少、過剰、および増幅を検出することができる。しかし、1つのコピー数の減少を検出するためには、その領域が少なくとも5–10 Mbの長さがなくてはならないと考えられている。増幅の検出は1 Mbより小さくても感度が高いことが知られている。そのため、CGHはある種のコピー数過剰は感度良く検出できるが、部分的な欠失の解像度は限られることを知っている必要がある。

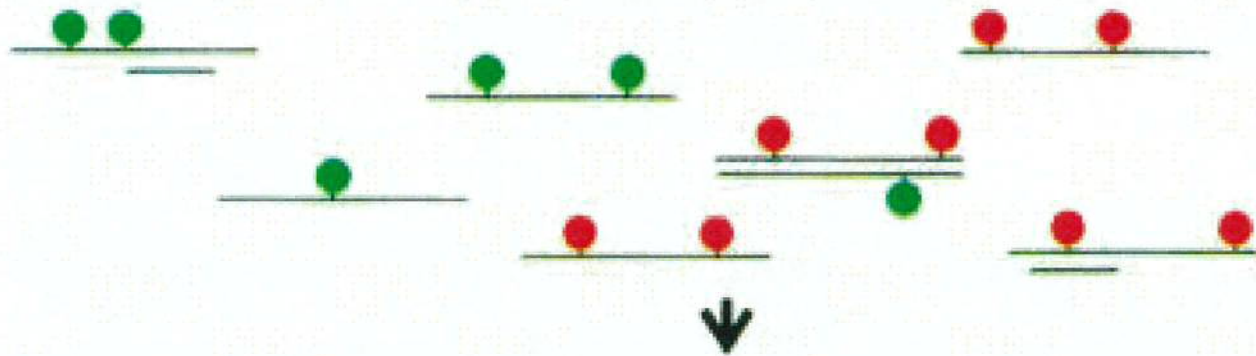
アレイCGHは、これらの限界の多くを克服している。解像度およびダイナミックレンジは改善され、さらにゲノム配列に異常をマッピングでき、スループットも改善している。

Comparative Genomic Hybridization

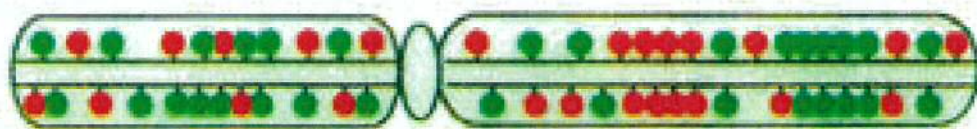
Differential labeling of DNAs (500bp-2000bp)



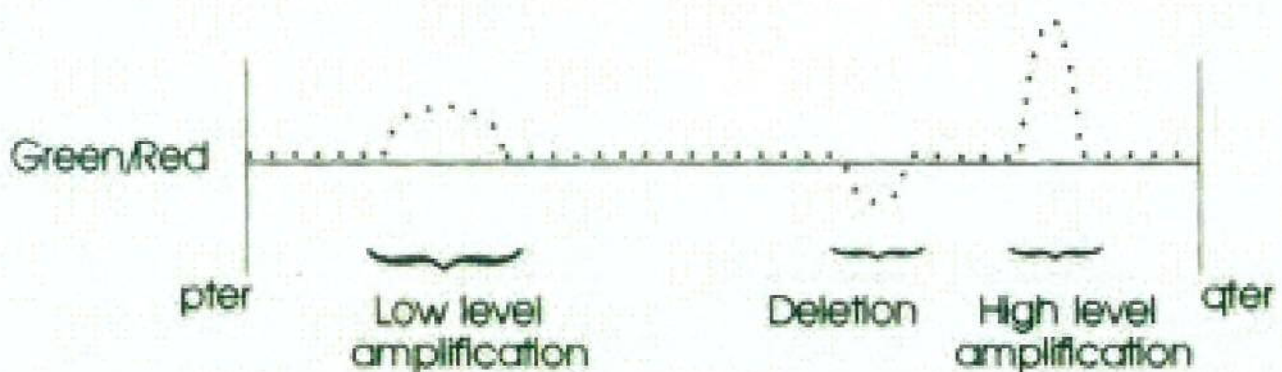
Denature and preanneal

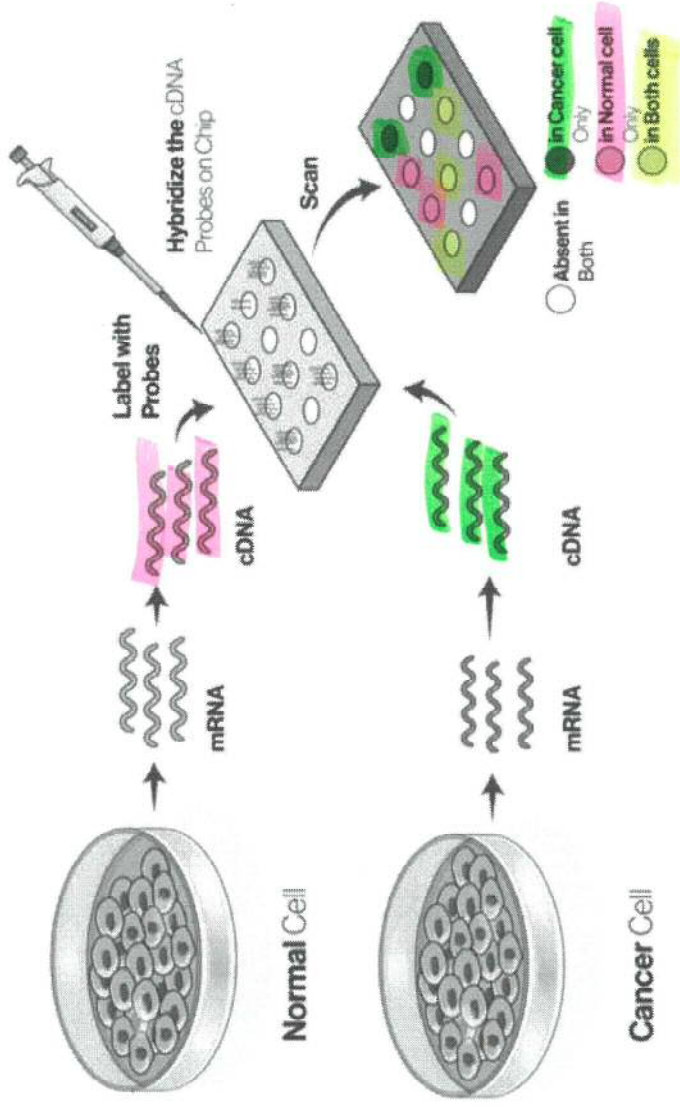


In-situ hybridization to normal chromosomes



Fluorescence microscopy and image analysis





DNAマイクロアレイは「DNA」を「マイクロアレイチップのウェルは65μm）」に「アレイ（配列、整列）」させるという意味で、DNAを基盤（チップ）上に整列させることを指す。

ページの先頭へ

DNAマイクロアレイは、ゲノム全体の遺伝子の発現

ZZZに入カして検索

お問い合わせ マイページ HIPTI(新型コロナウイルス対策) スーパーNIPT

Samples
(Test, Reference)

DNA

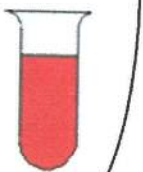
数値化



ラベル化

Ref
DNA-Cy3

Sample
DNA-Cy5



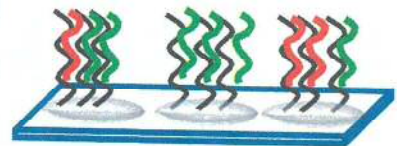
ハイブリダイ
ゼーション

CGH, CGH+SNP Microarray

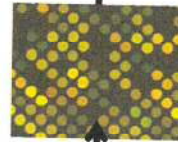
洗浄



スキャン



Feature
Extraction
(Cy5/Cy3)



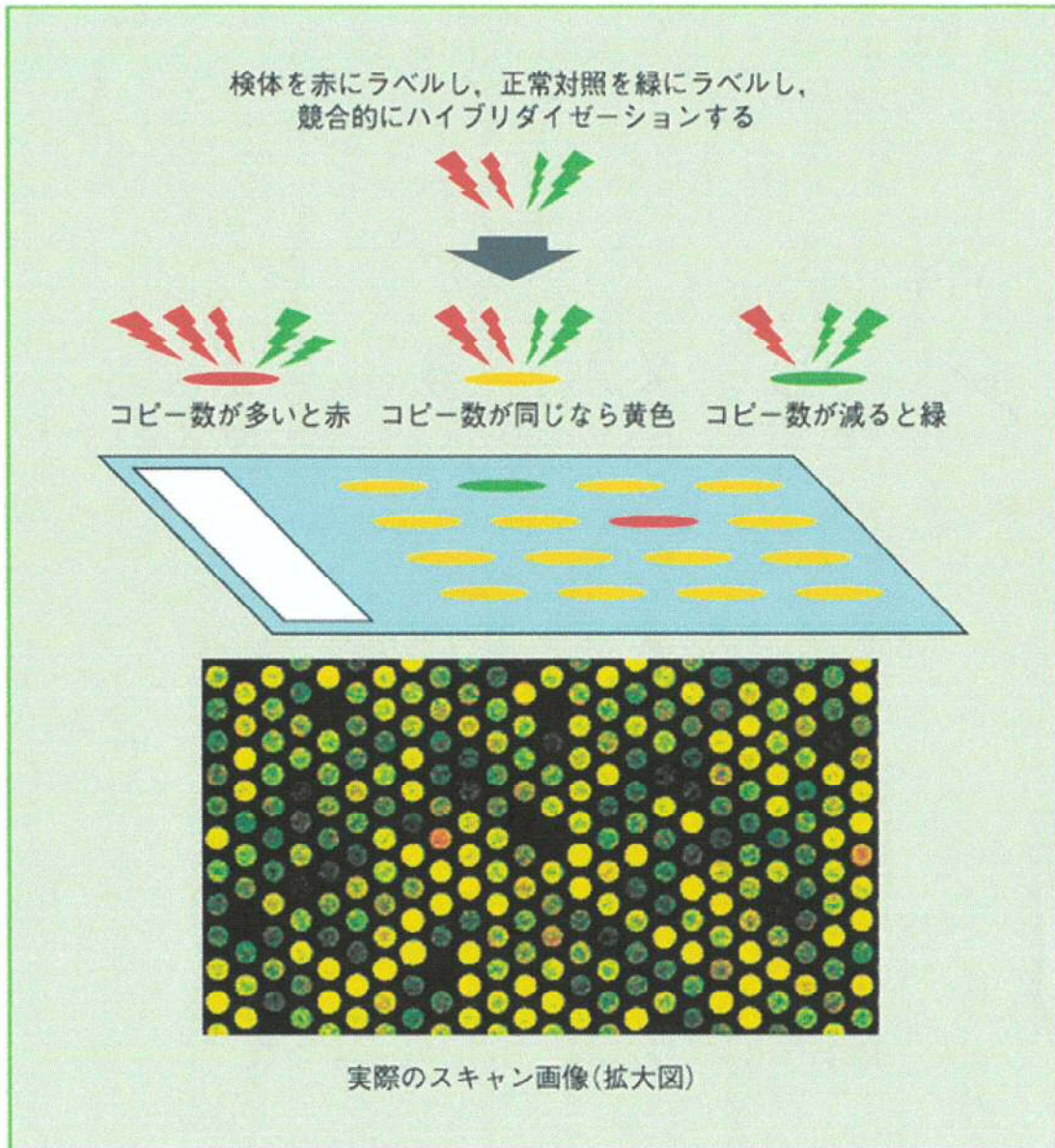
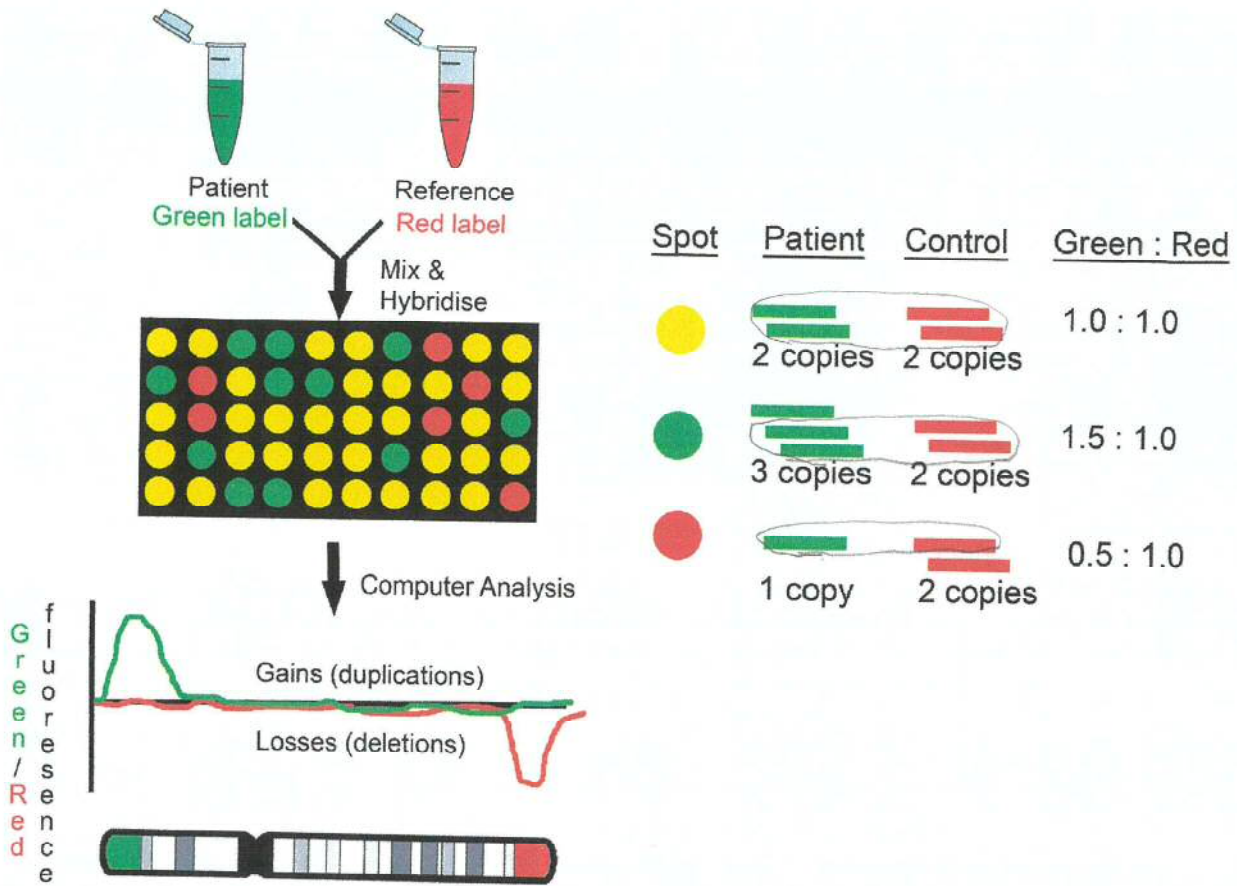
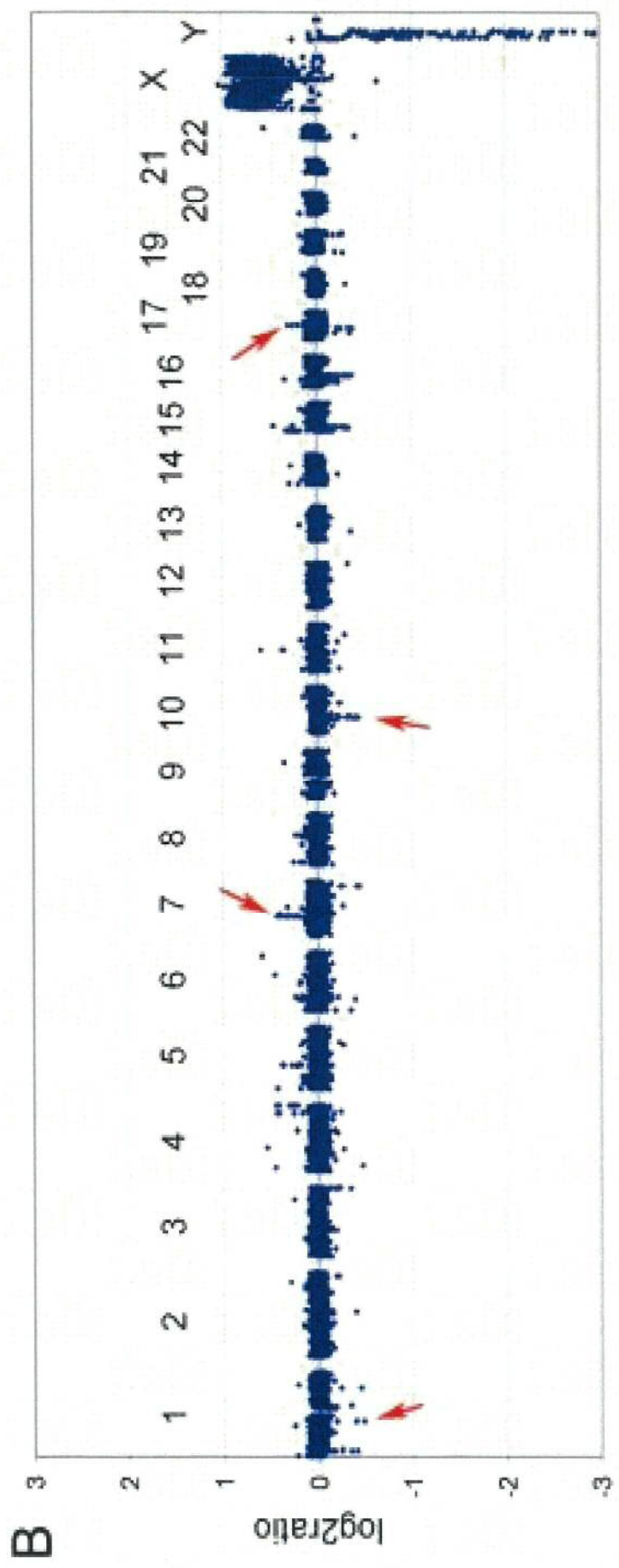
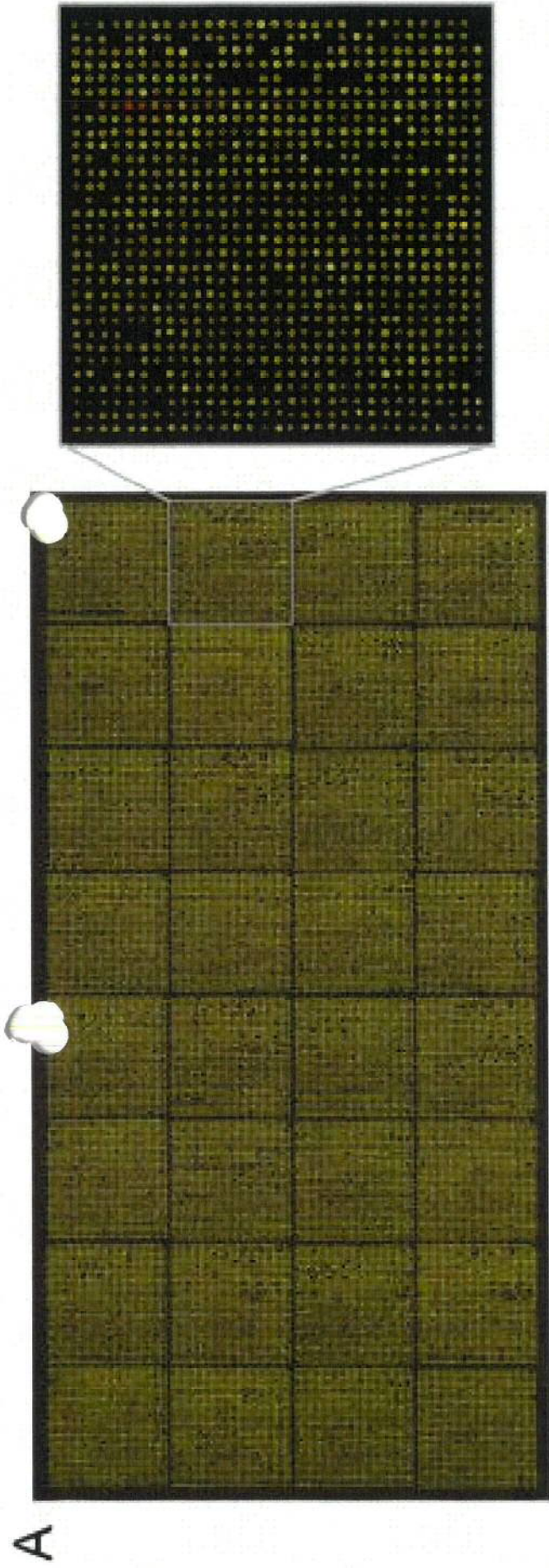


図1 アレイ CGH 法の原理

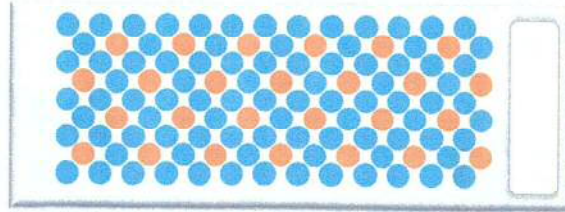
Figure 1. Comparative Genomic Hybridisation (CGH) arrays.





genome mapping

CGHプローブ
(コピー数変化検出用)



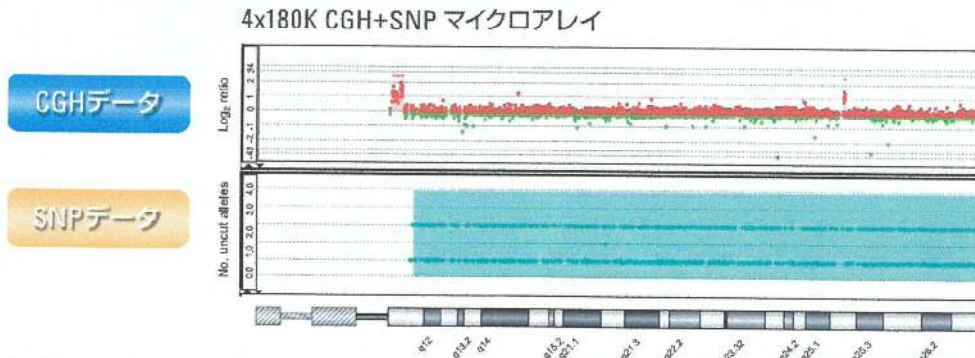
SNP領域プローブ
(UPD、LOH検出用)

- : CGHプローブ
- : SNP領域 プローブ

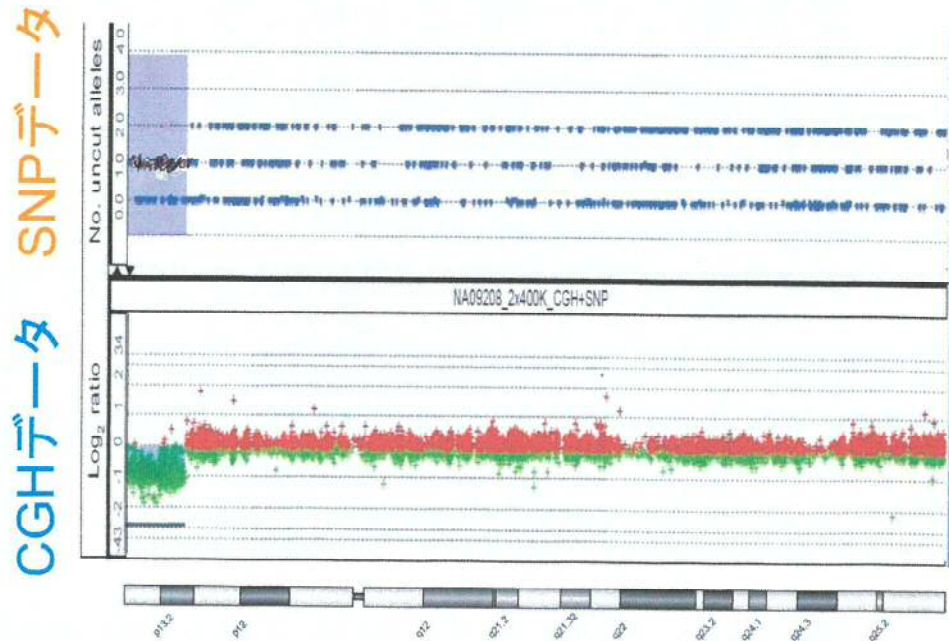
イメージ図

従来のAgilent CGHマイクロアレイの、高精度なゲノムコピー数変化(増幅・欠失) 検出力をそのままにSNP領域プローブをさらに追加し、allele特異的なコピー数を検出することによりUPD (Uniparental disomy、片親性ダイソミー)、LOH (loss of heterozygosity) の検出を可能にしました。

▶ 15番染色体全体のUPD領域 (■) 検出例



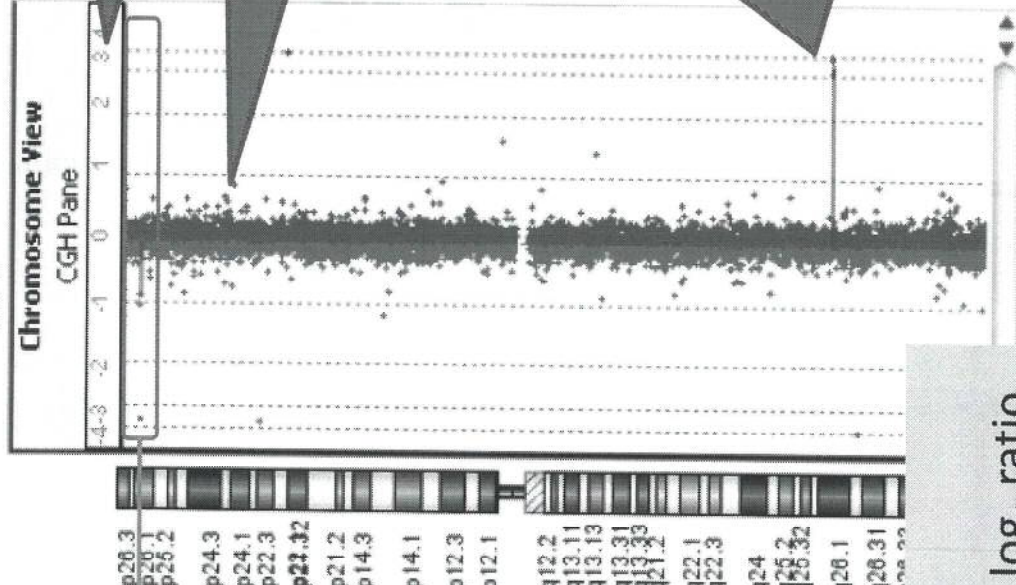
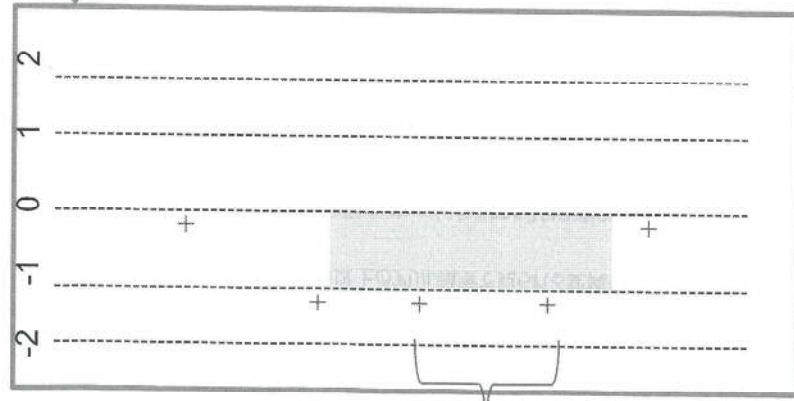
▶ 17番染色体のHemizygous deletion領域 (■) 検出例



CGP → CNA

【拡大模式図】

Ratio: 1/4 1/2 1 2 4

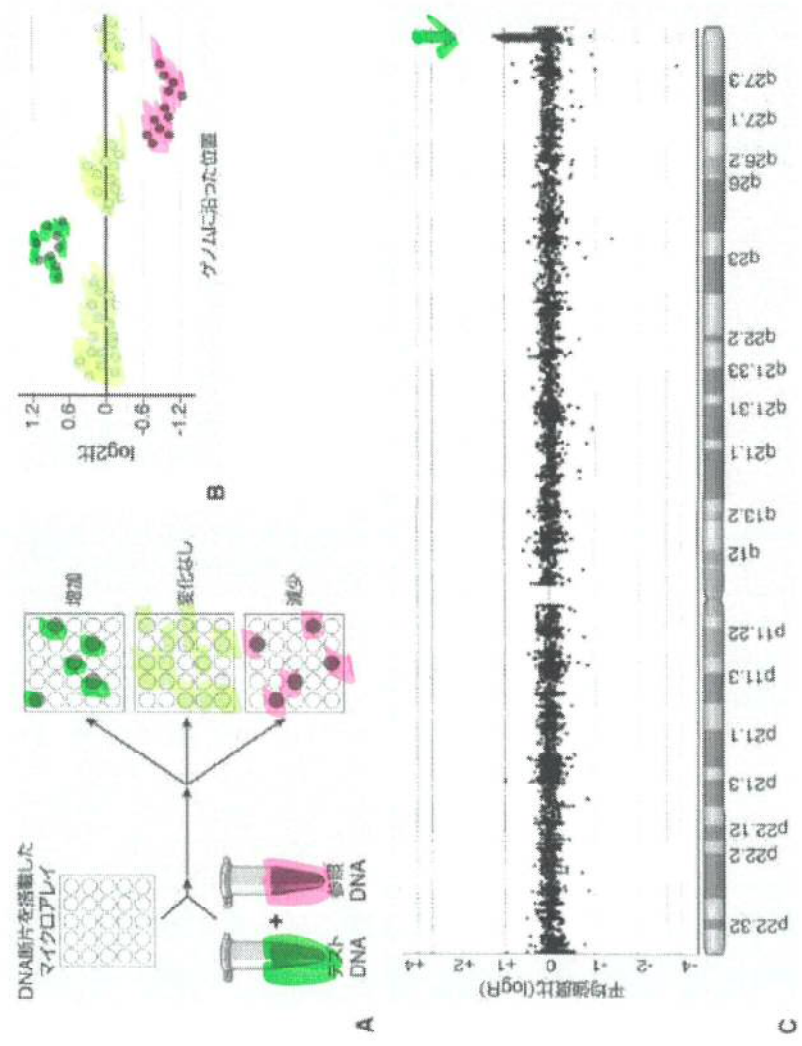


$\text{Log}_2(\text{Test/Reference})$

各プローブデータの $\text{Log}_2(\text{Test/Reference})$ 比を配置・表示

アルゴリズムにより コピー数変化領域を検出・表示。
 Log_2 比 > 0 は gain、
 Log_2 比 < 0 は loss

- 検出条件
- minimum of 3 probes、 $\geq 0.25 \log_2$ ratio
 - minimum of 5 probes、 $\geq 0.15 \log_2$ ratio



ページの先頭へ

マイクロアレイ染色体検査の模式図です。

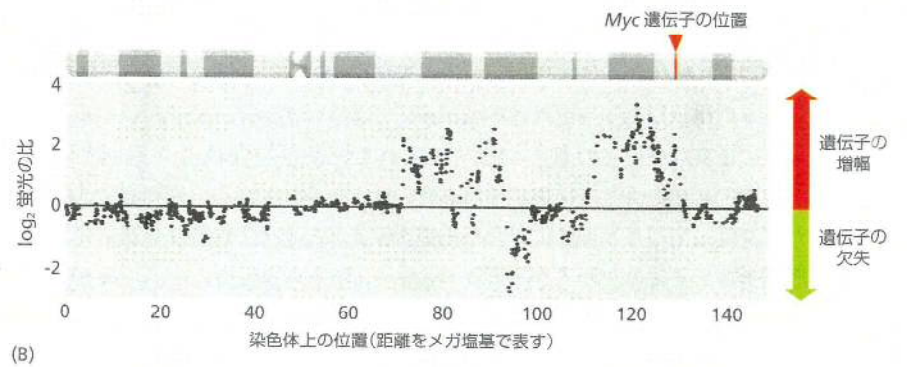
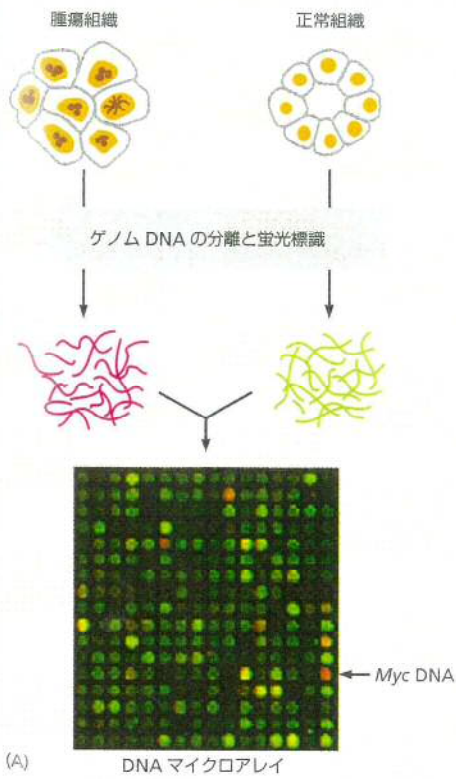
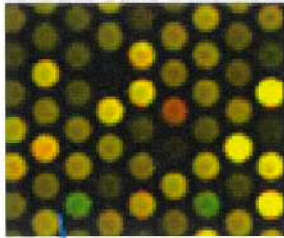
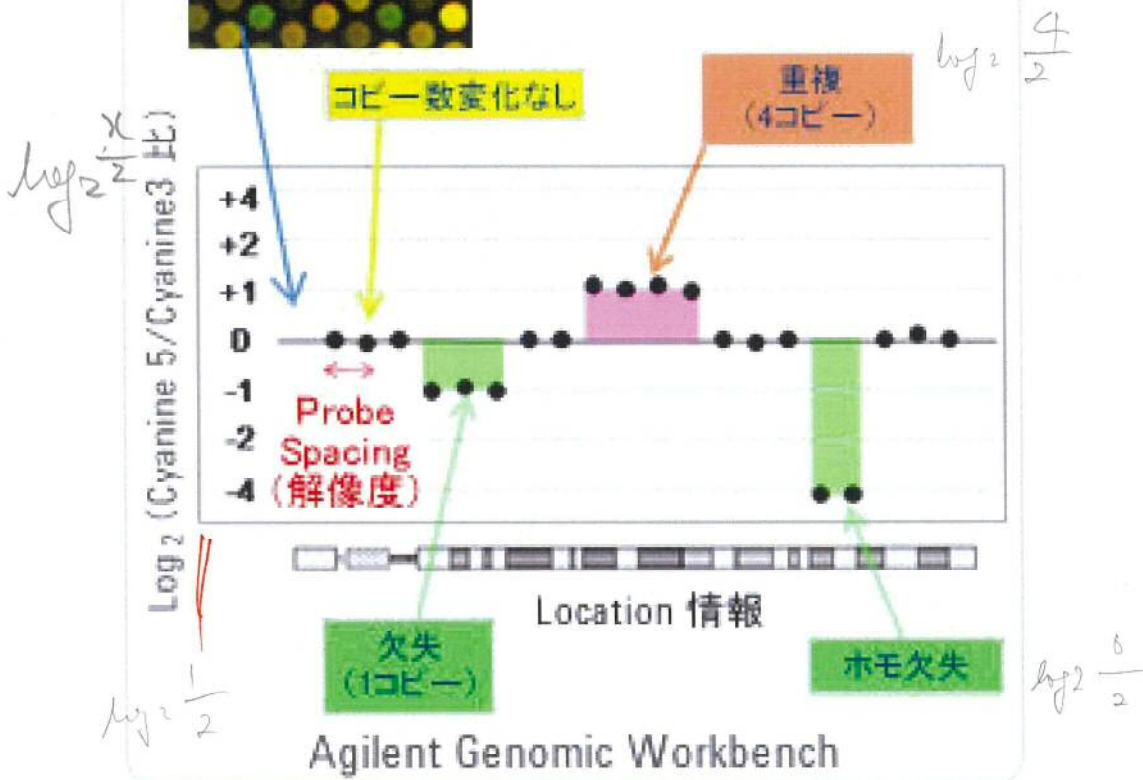


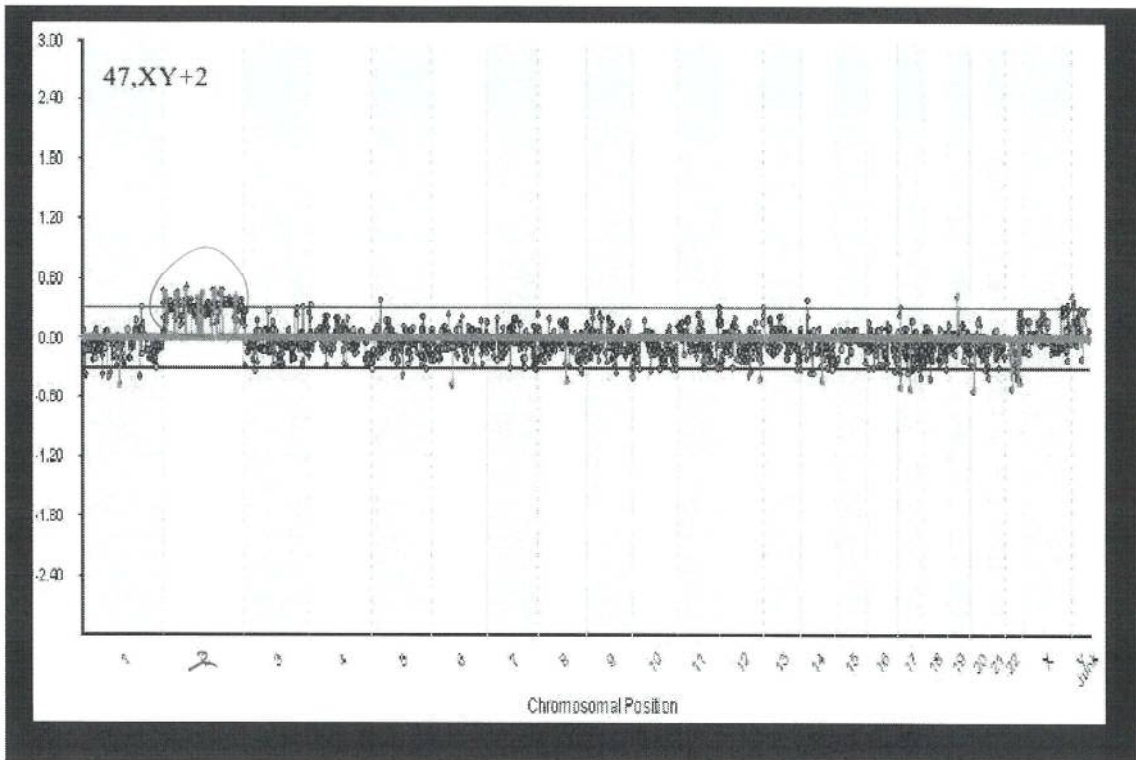
Fig. 20-35 腫瘍細胞の DNA の変化を検出するゲノムハイブリッド形成の比較。(A) 腫瘍細胞と正常細胞から抽出した DNA 断片を 2 種類の蛍光分子 (腫瘍は赤色, 正常な対照は緑色) で標識し, 正常ゲノムでの位置のわかった DNA を配置した DNA マイクロアレイとハイブリッド形成させる。(B) それぞれのスポット (DNA マイクロアレイ上に並ぶ点) の赤色と緑色の蛍光の比を下図のようにグラフにすることにより腫瘍細胞で増幅または欠失している領域がわかる。赤い矢印は増幅を示し, 緑色の矢印は欠失を表す。

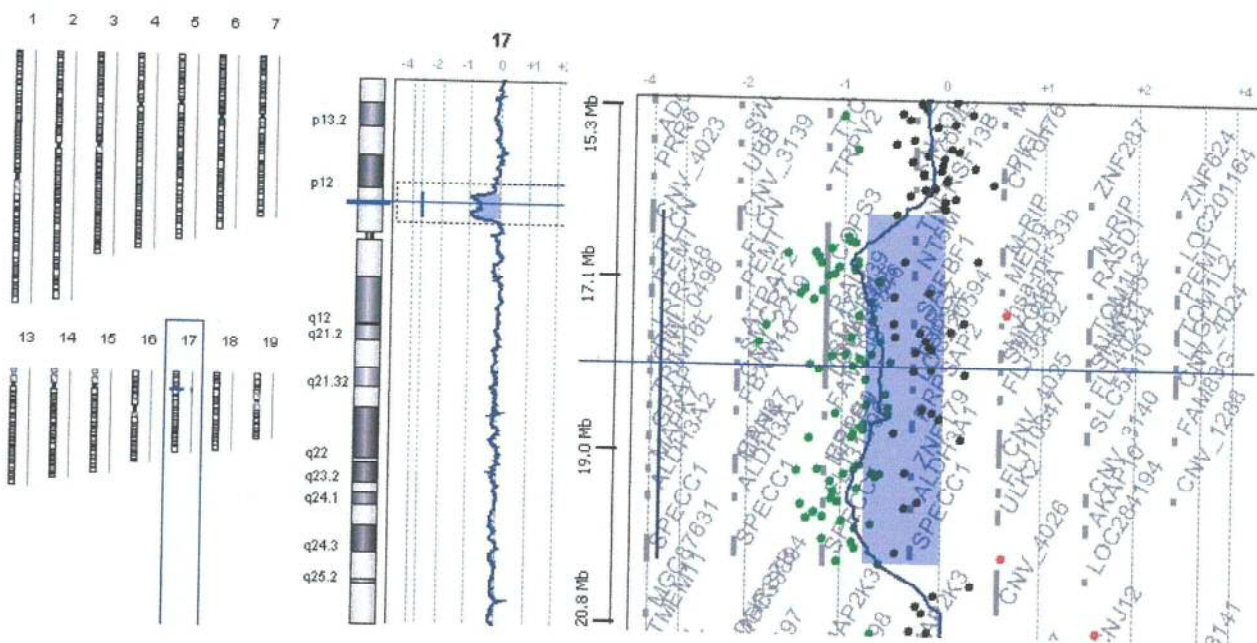
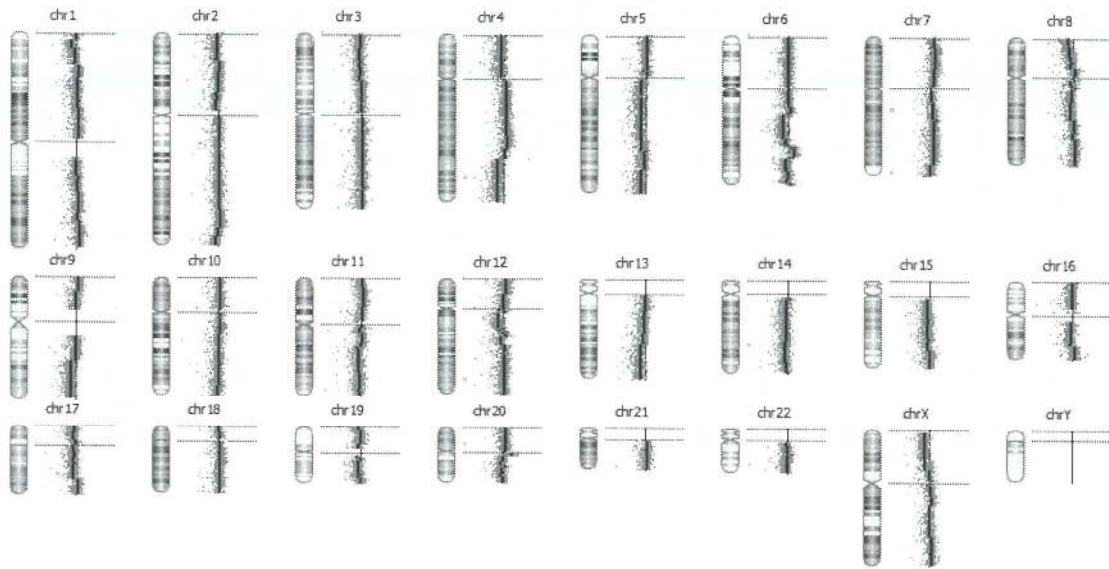
CGH データ解析



マイクロアレイ画像



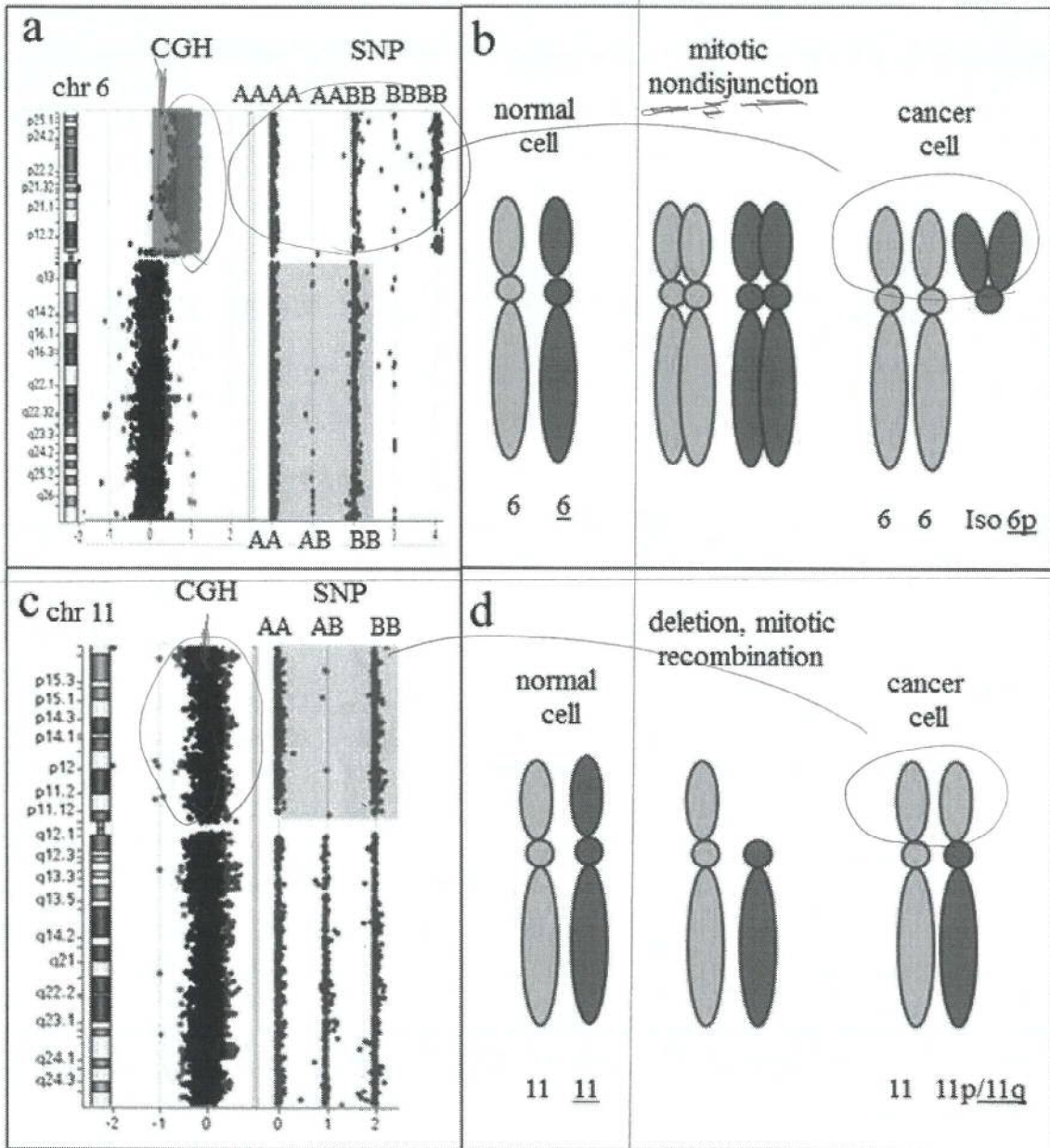




Agilent Genomic Workbenchによる解析画面の例(Smith-Magenis症候群) 左からGenome View、Chromosome View、Gene View。

■ マイクロアレイ染色体検査の解析の対象

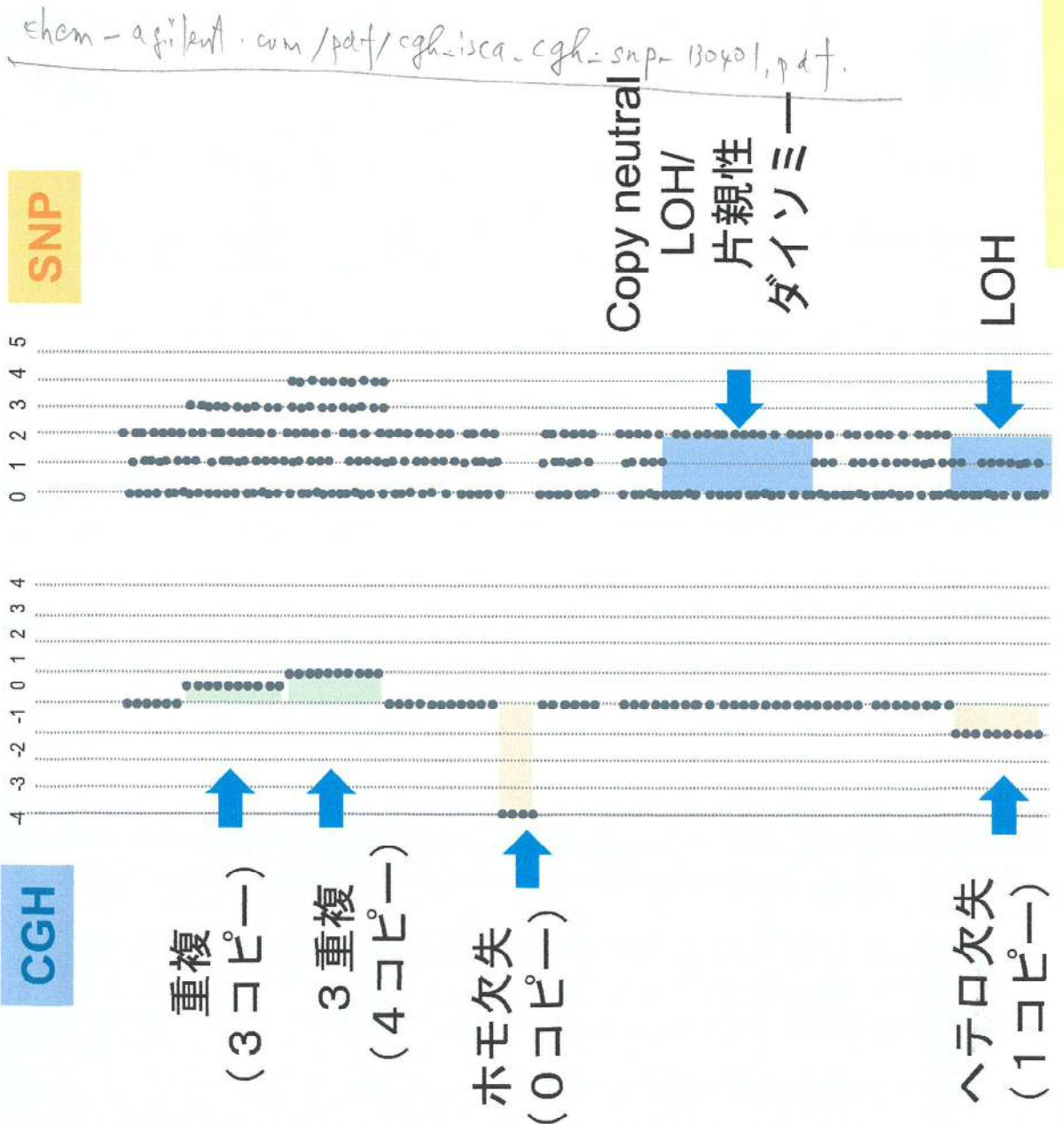
1. 何らかの染色体異常が疑われるが、通常の染色体検査では異常が認められない場合。
2. G-bandで異常が認められたが、切断端を決定したい場合。
3. 付加染色体やマーカー染色体の由来を決定したい場合。
4. その他。

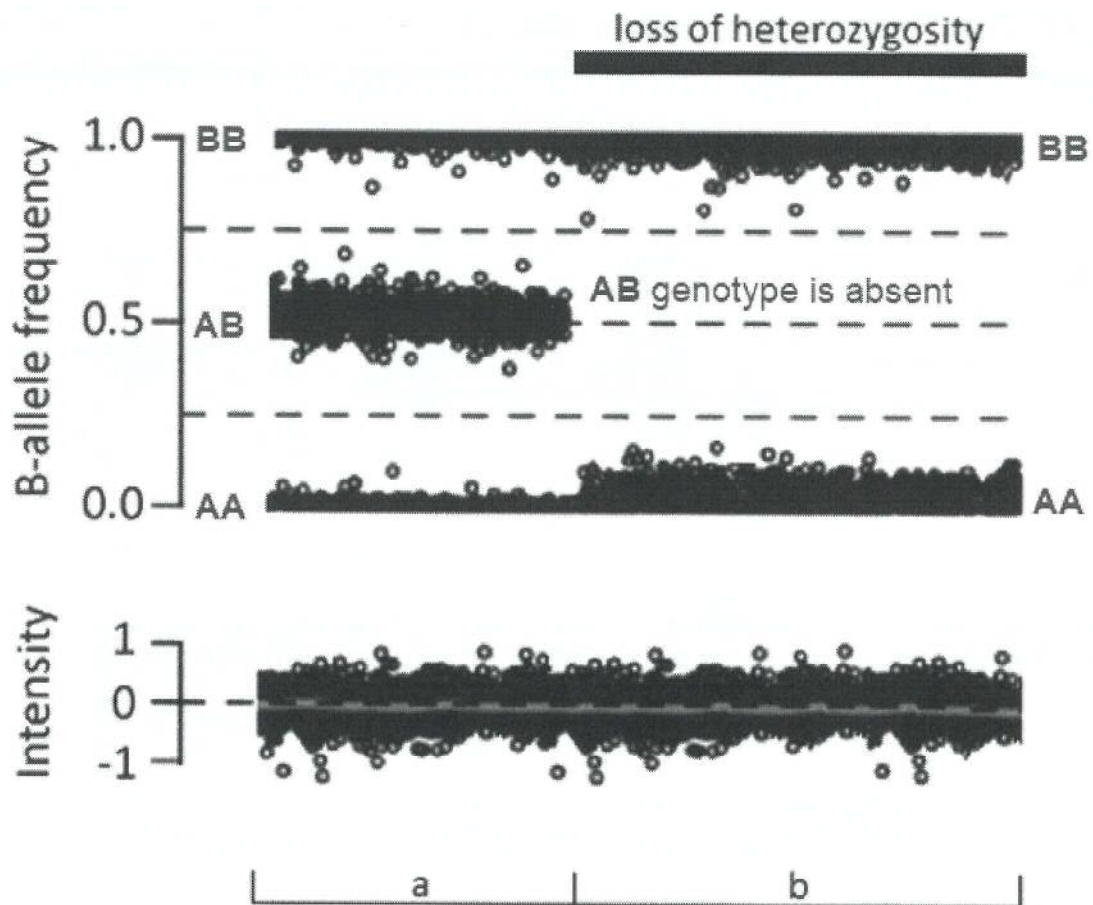


SNP → LOH
UPD

• 染色体全体から選ばれた約60,000 SNP 領域に SNPプローブを設計。

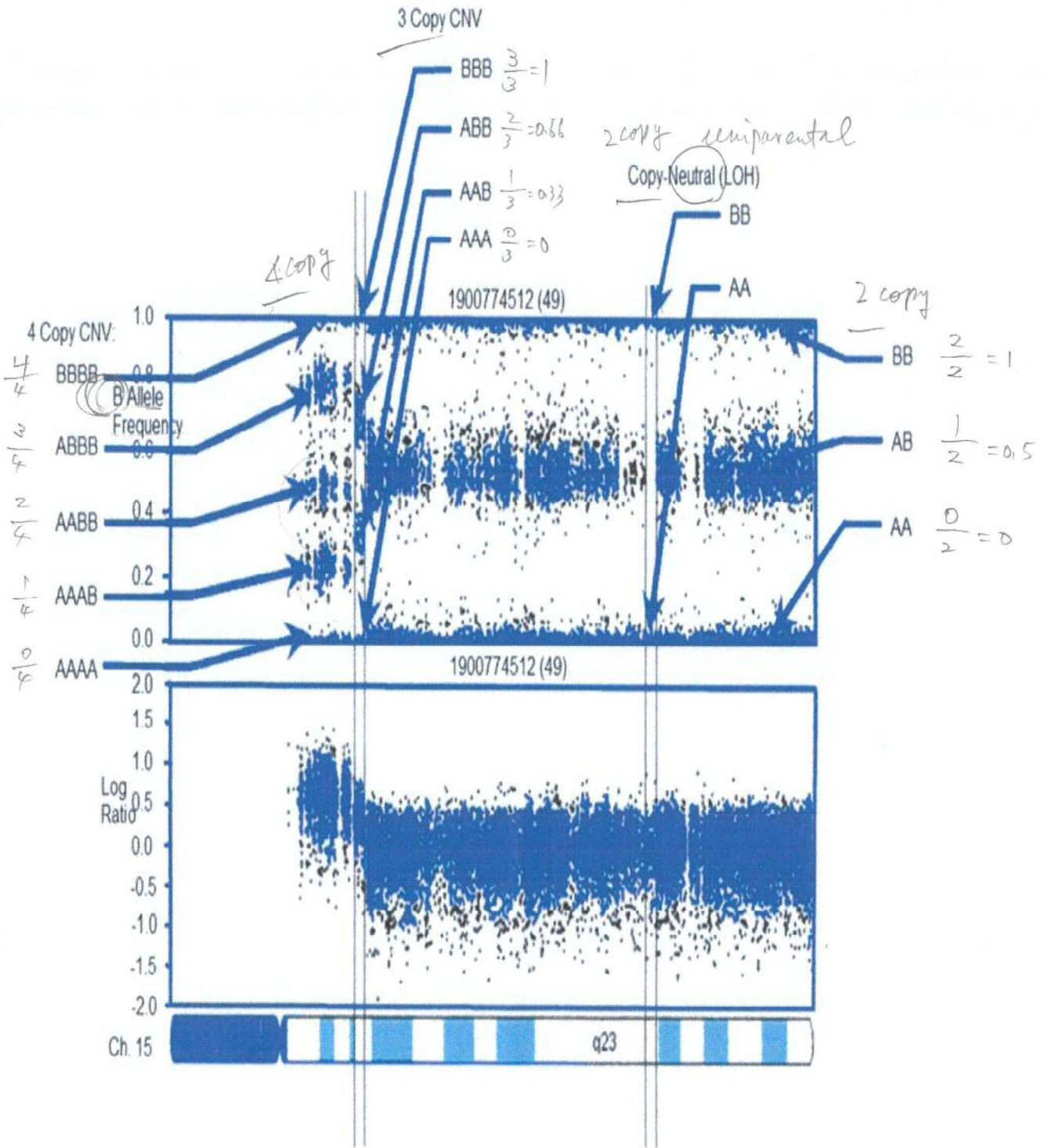
• 各SNPの片方のアレルのコピー数の情報を取得し、(copy neutral) LOHや片親性ダイソミーの領域を検出します。

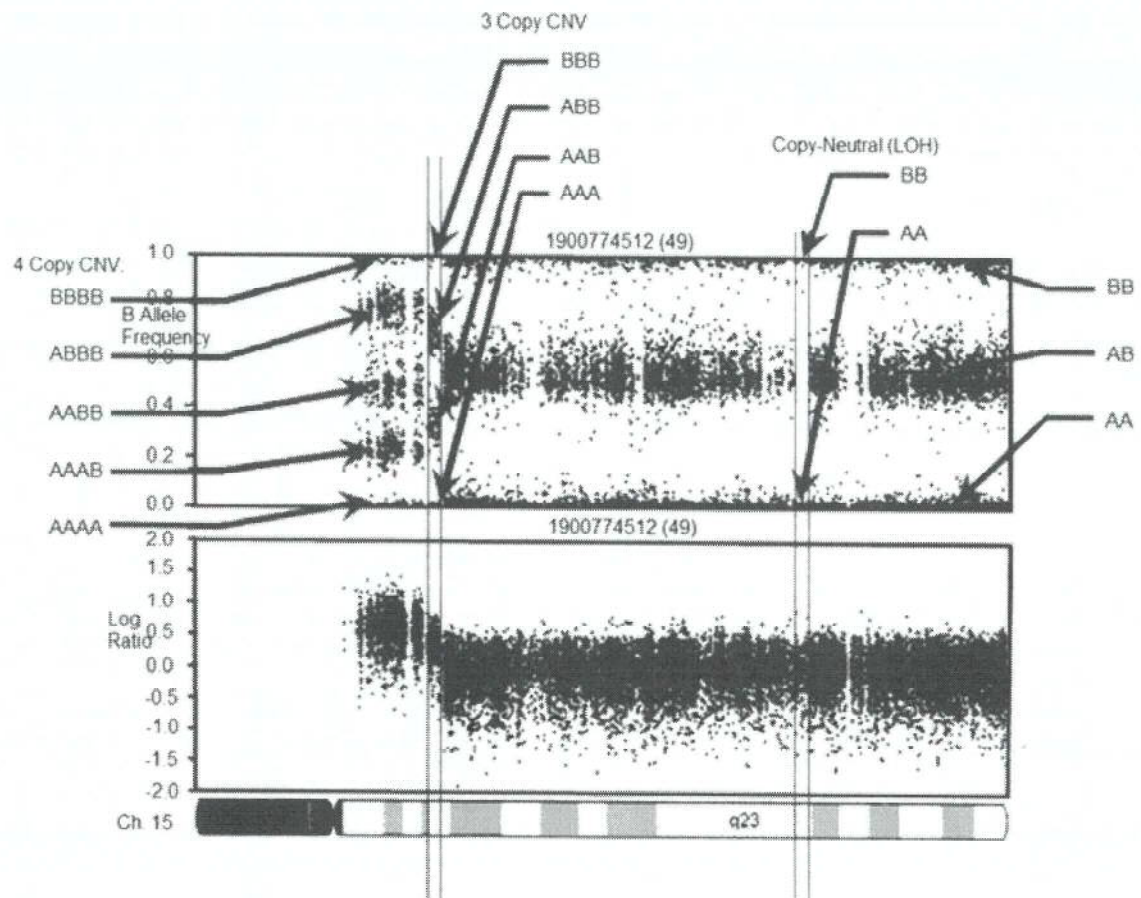




SNP array example of copy-neutral homozygosity

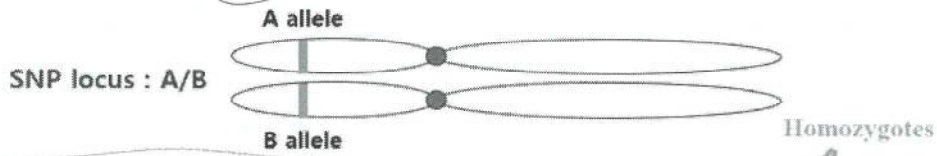
Each dot represents the B-allele frequency and total fluorescence intensity for a single SNP. Predicted genotypes of SNPs as measured by B-allele frequency are shown in red font. The lower case letters (a, b) below the diagram identify segments of an SNP array that demonstrate the B-allele frequency, and intensity signals that are typical for (a) a normal diploid region with identified genotypes for each SNP of AA, AB, or BB; and (b) a region of copy-neutral homozygosity that is diploid and, therefore, every SNP is homozygous (AA or BB) and intensity is unchanged.





CNV detection in SNP-array data using PennCNV: example log R ratio (LRR) and B Allele Freq (BAF) values for the chromosome 15 q-arm of an individual. Three normal chromosomal BAF genotype clusters (AA, AB, and BB genotypes) have LRR values around zero. The copy-neutral loss-of-heterozygosity (LOH) region has normal LRR values, but no AB cluster. Increased copy number can be observed in the increased number of peaks in the BAF distribution and increased LRR values. LRR and BAF patterns are different for different CNV regions, and can be used to generate CNV calls. Adapted from Wang et al. (2007).

Calculation of B Allele Frequency (BAF)



A=0 B=1 *273k*

2 copy

Normal:

$$AA = 0+0 / 2 = 0$$

$$AB = 0+1 / 2 = 0.5$$

$$BB = 1+1 / 2 = 1$$

3 copy

Duplication:

$$AAA = 0+0+0 / 3 = 0$$

$$BBB = 1+1+1 / 3 = 1$$

$$AAB = 0+0+1 / 3 = 0.33$$

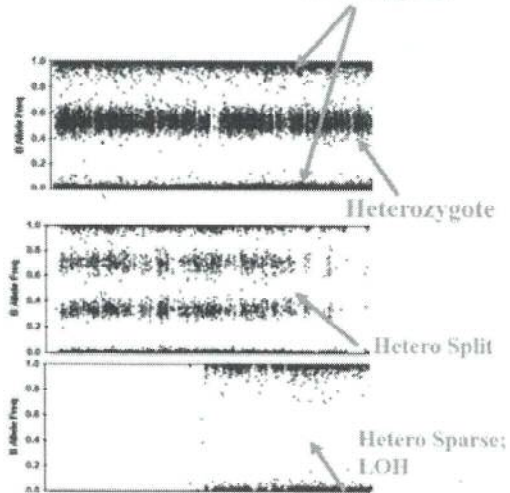
$$ABB = 0+1+1 / 3 = 0.67$$

1 copy

Deletion:

$$A = 0 / 1 = 0$$

$$B = 1 / 1 = 1$$



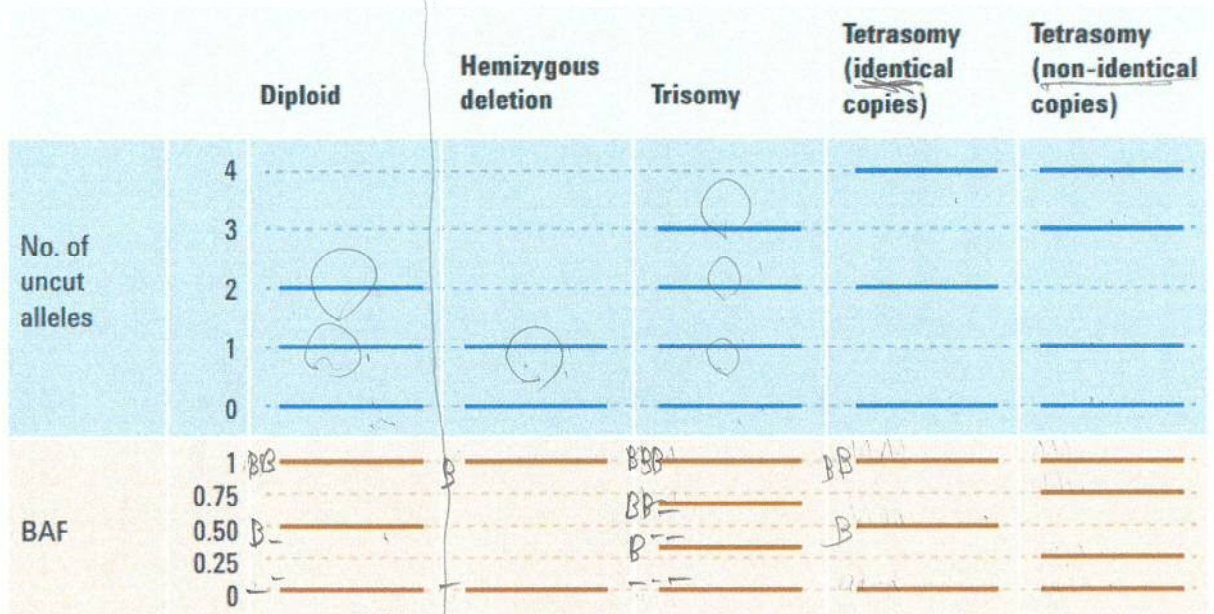
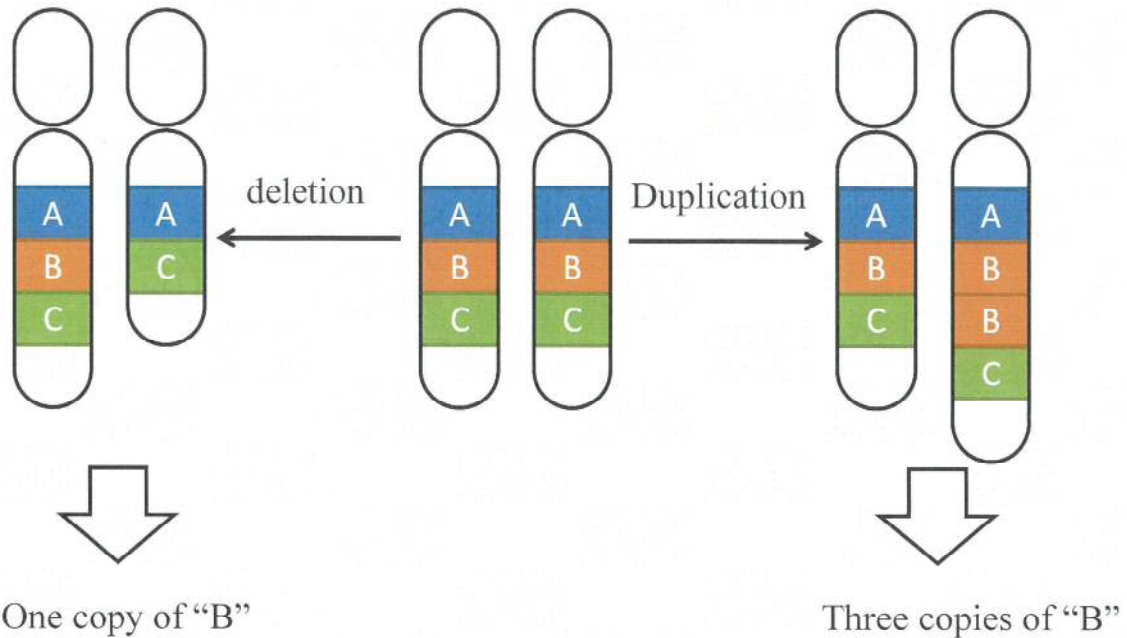


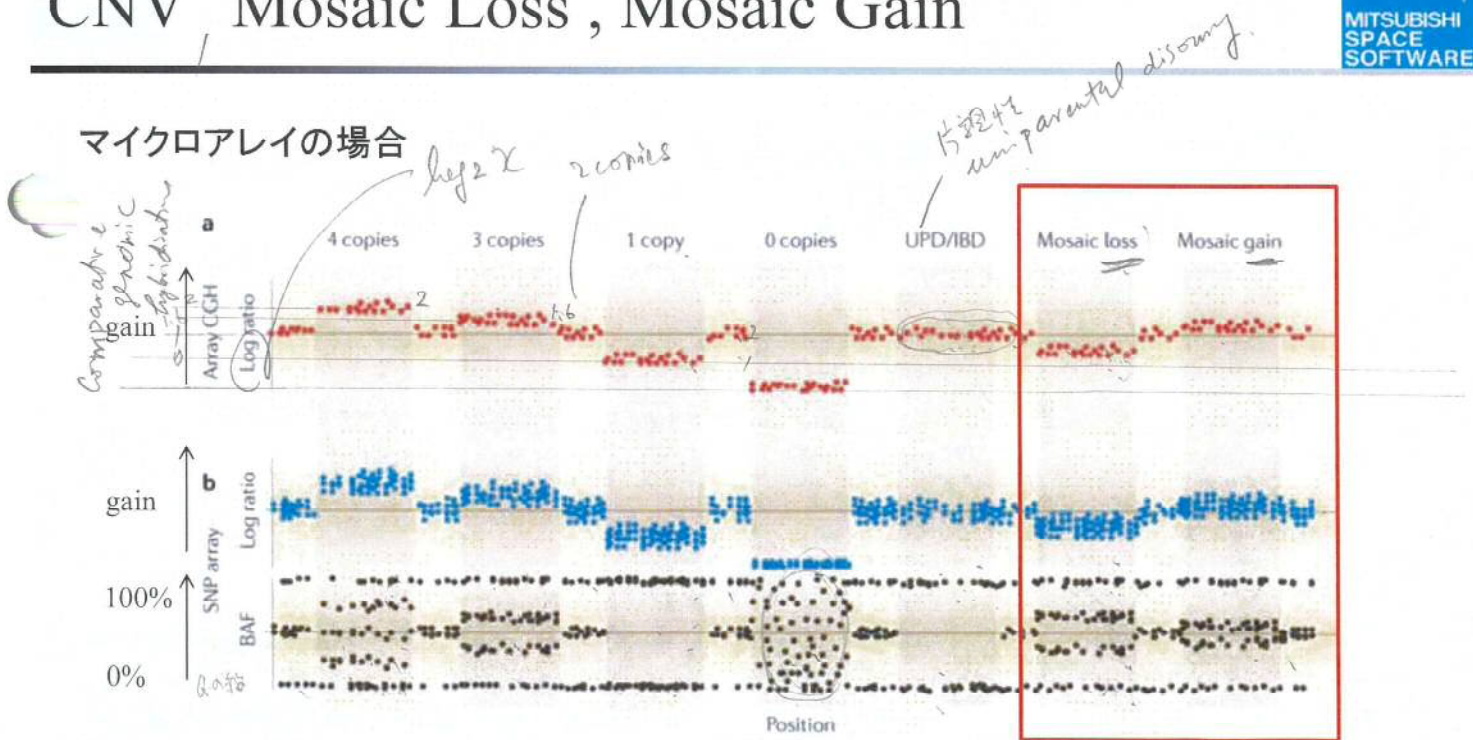
図 1. uncut allele 数と B アレル頻度 (BAF) の比較

$$\begin{array}{l}
 \begin{array}{l}
 0.9 \quad 0.1 \\
 \swarrow \quad \searrow \\
 \text{BBB} \\
 \text{ABB} \\
 \text{AAB} \\
 \text{AAA}
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{l}
 \frac{3}{3} = 1 \\
 \frac{2}{3} = 0.666 \\
 \frac{1}{3} = 0.33 \\
 \frac{0}{3}
 \end{array}
 \end{array}$$

リードマッピングの局所的な増減を検知して”B”のコピー数を検出する

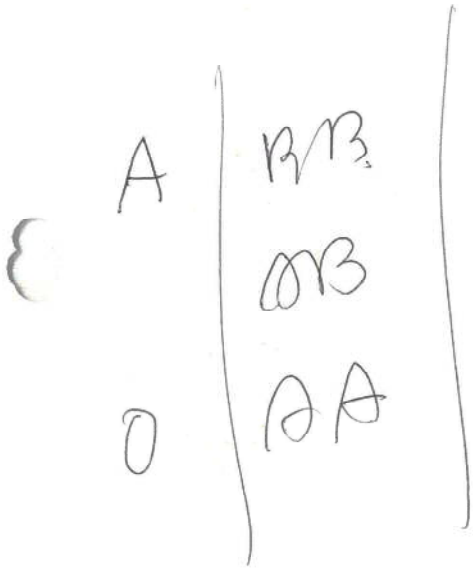


CNV, Mosaic Loss, Mosaic Gain

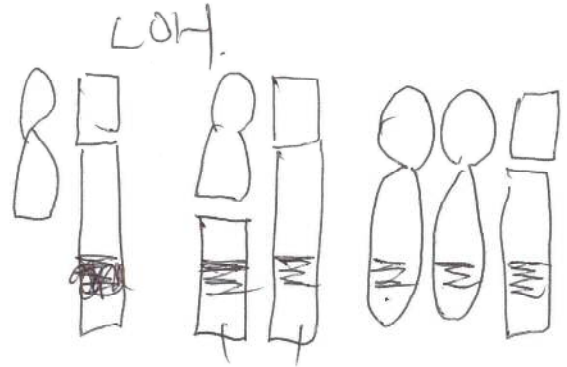
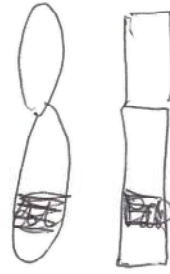


Can A. et al. *Nat Rev Gen* 12, 363-376 (May 2011)

2470 3L1



BBB
ABB
AAB
AAA



loss of
copy

copy
normal

gain of
copy

upD

コピー数変化の検出

NGSによるコピー数解析の原理を理解する

- NGSを利用したコピー数変化の検出
 - ✓ NGSでは、シーケンス深度を利用してコピー数の変化を検出する
 - ✓ コピー数の変化部位には構造異常を伴う事が多い
- アレル不均衡とその検出
 - ✓ 常染色体と女性のX染色体は父親由来のアレルと母親由来のアレルが1本ずつ存在するため、正常な状態ではその構成比は1:1である
 - ✓ コピー数の変化に伴い、アレルの構成比が1:1からずれることをアレル不均衡という
 - ✓ 特に片方のアレルが欠失することをヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity: **LOH**) とよび、特に片親由来のアレルが2本に増幅し他方のアレルが欠失することを片親性ダイミー (uniparental disomy: **UPD**) とよぶ。UPDは必然的にLOHを伴う
 - ✓ LOHIは、癌抑制遺伝子の正常アレルの欠失を通じてがん化過程によくみられる現象である
 - ✓ NGSにおけるアレル不均衡の検出には、SNPsを利用することが一般的である
- 全ゲノム解析におけるコピー数変化の検出特有の問題点
 - ✓ 特に非コード領域や繰り返り配列には、個人差が大きいに留意し、個人差が大きな場所を解析から除外するか、同一患者の正常対照検体と比較することが望ましい

1/2, 0/1, 0/2, 1/3, 2/4

第III章 遺伝学的検査とNGSのメリット

アレル不均衡

父親由来アレル
母親由来アレル

BAF 0.5 0 0 0.33 0.5

①: 正常、②: 欠失、③: UPD、④: コピー数3の増幅、⑤: コピー数4の増幅 (アレル不均衡なし)

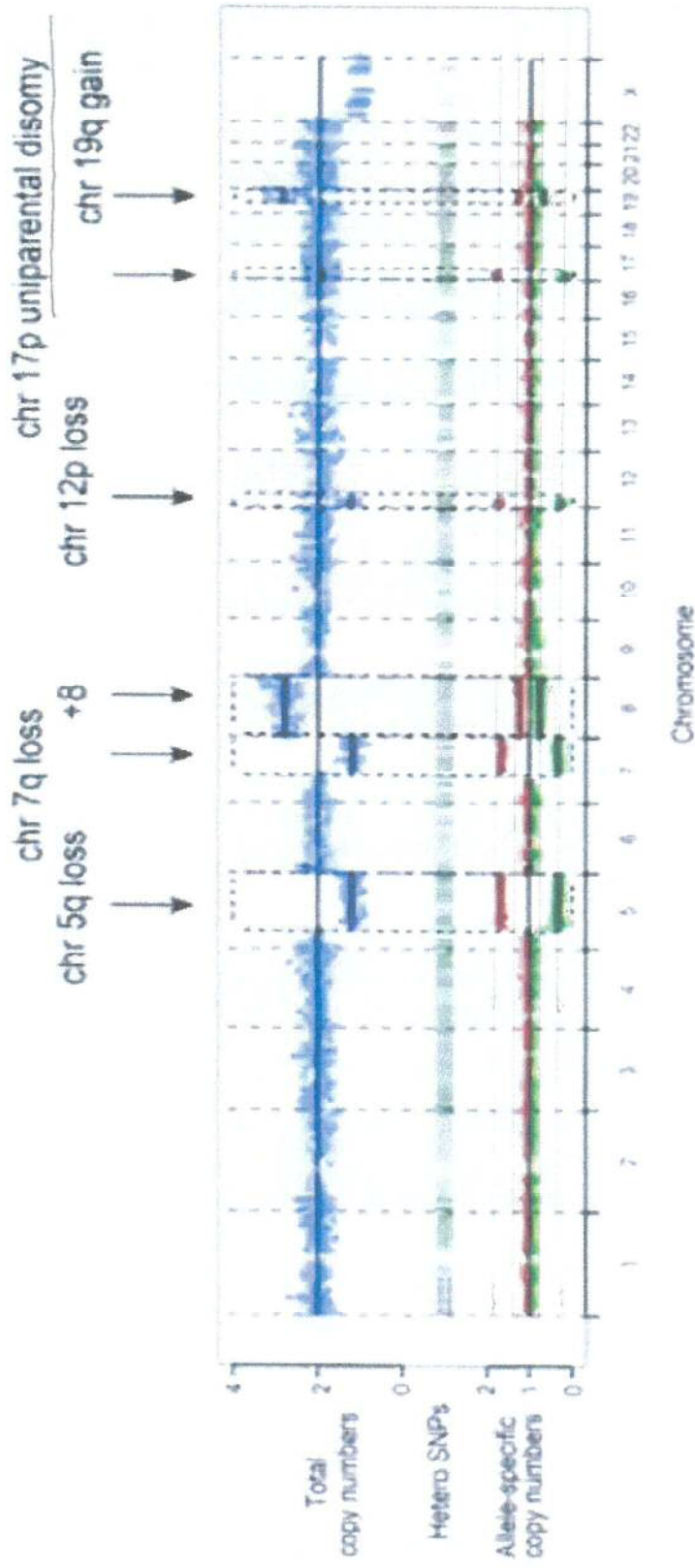
アレル不均衡はB-allele-frequency (BAF) という指標で示される。少ない方のアレル比で、0~0.5の値を取る

NGSによるコピー数解析の例

chr 5q loss, chr 7q loss, chr 12p loss, chr 17p uniparental disomy, chr 19q gain

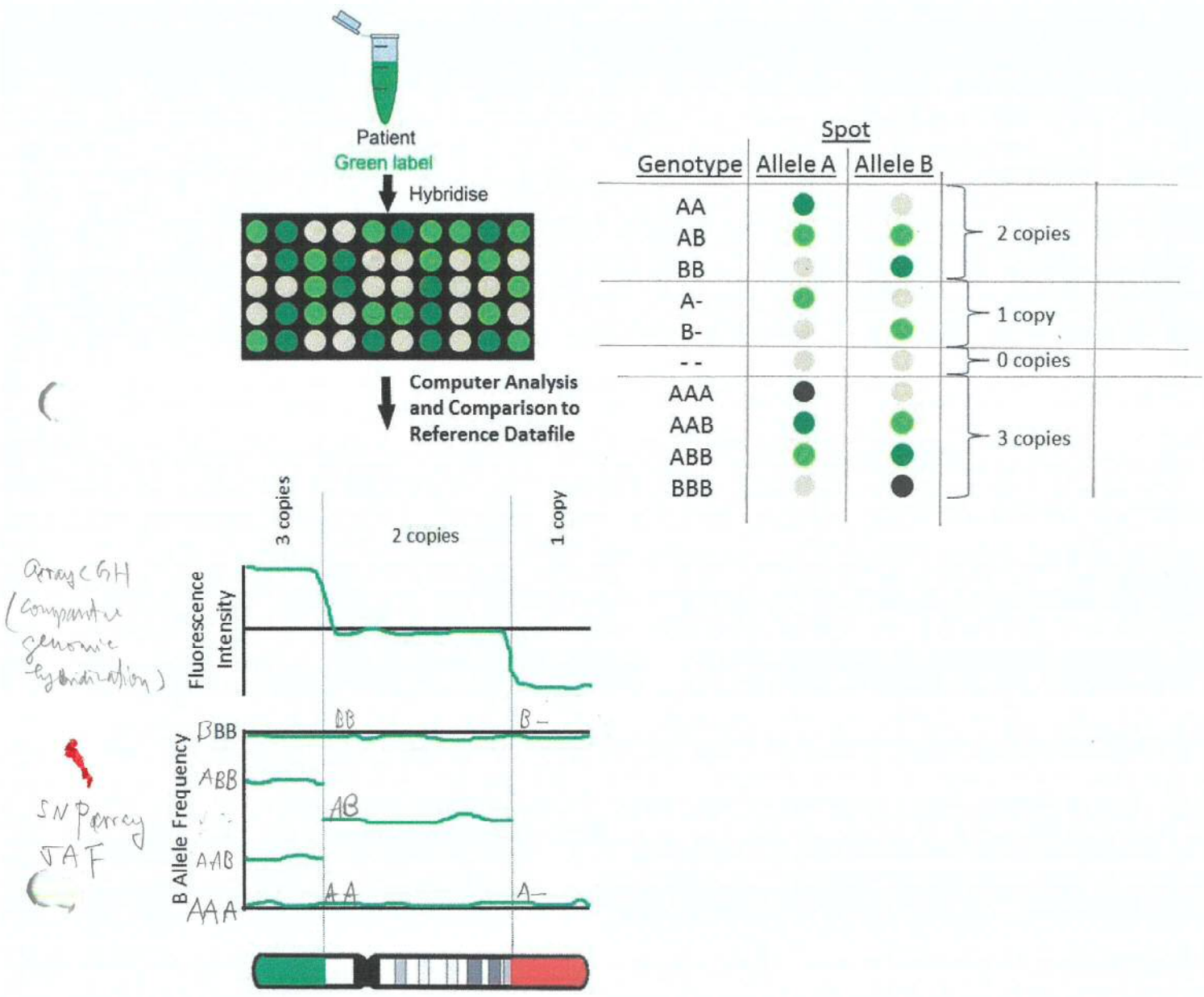
上段の青い線が、コピー数の変化を示す。下段の赤と緑の線が、アレル不均衡を示す (基線からの逸脱が不均衡の大きさを示す)。欠失はアレル不均衡を伴う。Chr17はコピー数が変化していないが、アレル不均衡を示し、UPDを生じていると考えられる。

NGSによるコピー数解析の例



上段の青い線が、コピー数の変化を示す。下段の赤と緑の線が、アレル不均衡を示す（基線からの逸脱が不均衡の大きさを示す）。欠失はアレル不均衡を伴う。Chr17はコピー数が変化していないが、アレル不均衡を示し、UPDを生じていると考えられる。

Figure 2. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) arrays.



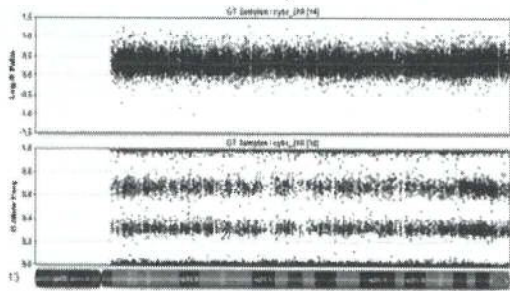
Here, we compare the performance of different array platforms and designs with regards to appropriateness for use for prenatal testing (Table 1). We will also discuss the factors to consider when implementing a microarray testing service for the diagnosis of fetal chromosomal aberrations.

2. Types of Array Platforms

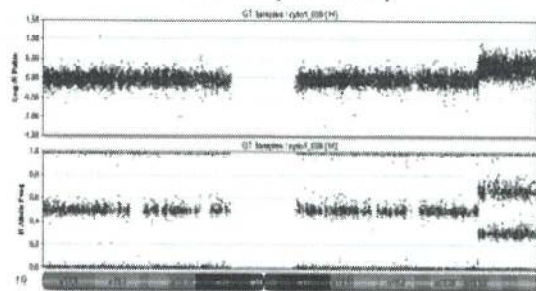
2.1. BAC Arrays

The first microarray platforms utilised BAC clones derived from the Human Genome Project. In more recent years they have been largely replaced by oligo-based platforms, either CGH or SNP, due to the higher resolution that these platforms can offer. However, certain features of BAC microarrays make them potentially appealing in a prenatal setting.

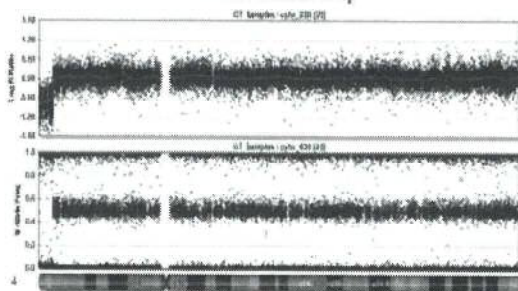
Trisomy 13



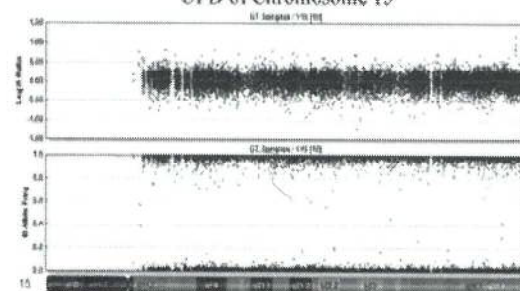
Partial Duplication 19q

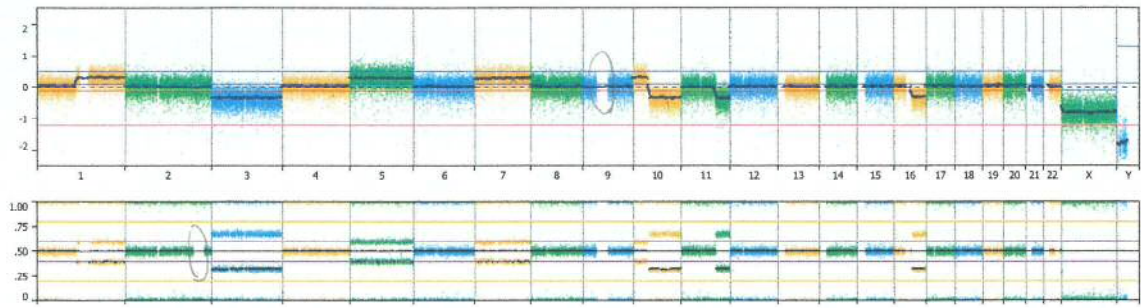


Partial Deletion 4p

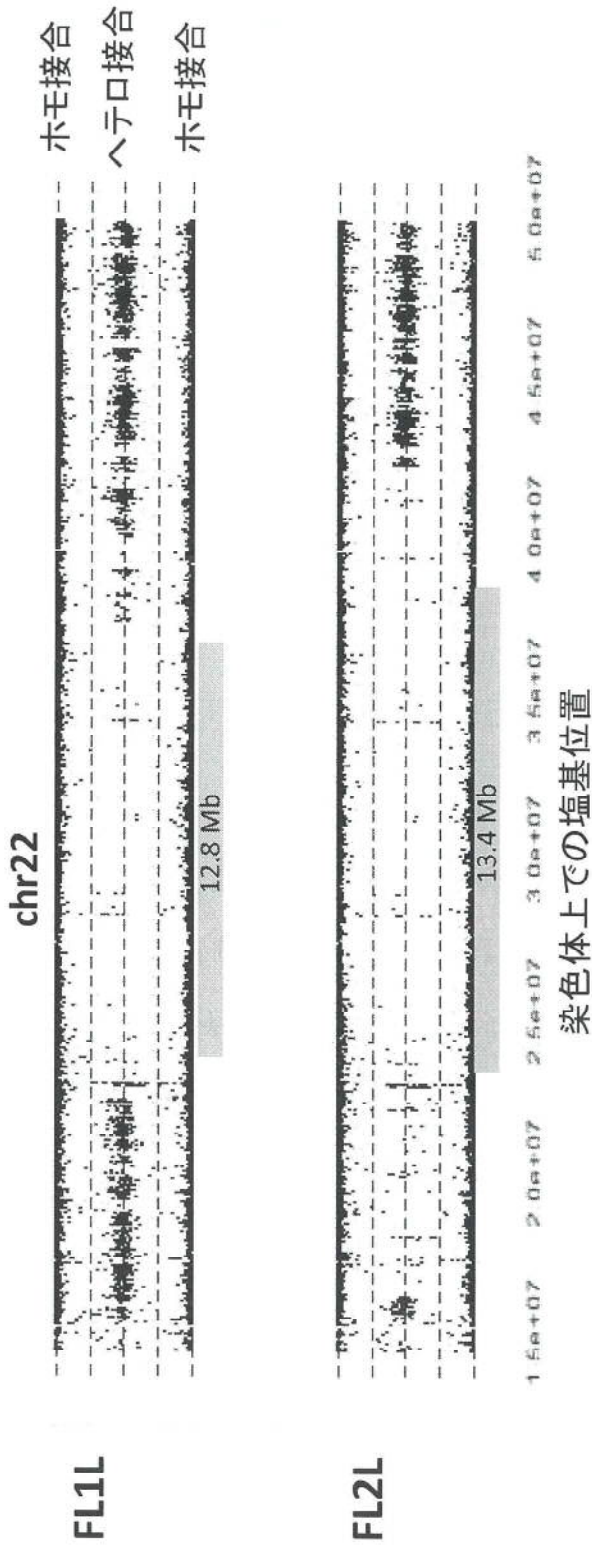


UPD of Chromosome 15





患者には広いホモ接合領域が検出された



Assayed using Omni1 BeadChip (Illumina).

BAF: B allele frequency = intensity of B allele / (intensity of A allele + intensity of B allele)

Total length of homozygous regions (detected by plink software, Purcell *et al.*, 2007)

- FL1L (male): 278 Mb (chr1-22) } 親以上の世代で近親婚が行われている
- FL2L (female): 210 Mb (chr1-22, X) } (いとこ婚?)

- shared homozygous regions: 72 Mb (chr1-22, X, 612 genes) -> 原因変異の存在が疑われる領域

- 4 homozygous variants/ 4 genes in shared homozygous regions between patients