

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：今泉 太一

専攻分野：小児科学

指導教授：清水 直樹

主論文の題目：

Establishment of a Simple and Rapid Method to Detect *MECP2* Duplications Using Digital Polymerase Chain Reaction

(ドロップレットデジタルPCRを用いた *MECP2* 遺伝子重複の簡便・迅速な検出方法の確立)

共著者：

Keiko Yamamoto-Shimajima, Hitoshi Yamamoto,
Toshiyuki Yamamoto

緒言

ゲノムコピー数変化 (copy number variation: CNV) は、比較的大きな染色体断片が欠失や重複する現象であり、染色体微細欠失/重複症候群などとして、ヒトの表現型に直接関連する場合がある。CNVの検出は比較ゲノムハイブリダイゼーション法 (array comparative genomic hybridization: aCGH) を用いた網羅的なゲノムコピー数解析により可能であるが、検査結果の再検証や家系内検索が必要となる場合があり、そのような場合は蛍光 *in-situ* ハイブリダイゼーション法 (fluorescence *in-situ* hybridization: FISH) が多く用いられてきた。しかし、微細なCNVでは適切なプローブを準備することが困難であり、特に重複の場合はシグナルが重なってしまうため判定できないという欠点がある。そこで、デジタルPCR (digital PCR: dPCR) を応用したCNVの簡便迅速な解析方法が応用可能かについて、Xq28に位置する methyl-CpG-binding protein 2 [*MECP2*] 遺伝子領域が重複する *MECP2* 重複症候群を対象として検証した。

方法・対象

*MECP2*重複症候群はX連鎖劣性遺伝性疾患であり、精神運動発達遅滞、難治てんかん、易感染性を示す先天性疾患である。これまでの研究で本症候群であることがaCGH法を用いてすでに診断されている患者及び保因者であることが明らかとなった母親を対象とした。正常コントロール6名（男性3名、女性3名）、*MECP2*重複男性13名、*MECP2*重複保因者女性4名に由来する検体を用いた。ゲノムDNAは末梢血から抽出した。dPCRはBIO-RAD社のドロップレットデジタルPCR (droplet digital PCR: ddPCR)を採用し、インターカレーション法によって解析を行った。常染色体に位置する2つの遺伝子 (ribonuclease P/MRP 30 kDa subunit gene [*RPP30*]、ribonuclease P RNA component H1 gene [*RPPH1*]) 及びX染色体上に位置する2つの遺伝子 (androgen receptor gene [*AR*]、X inactive specific transcript [*XIST*]) をリファレンスとして、両者の比率から*MECP2*遺伝子と*MECP2*の近傍に位置するinterleukin-1 receptor-associated kinase [*IRAK1*] 遺伝子のCNVの変化を算出した。本研究は、東京女子医科大学遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得たものである（承認番号341B号）。

結果

X染色体に存在する*AR*、*XIST*、*IRAK1*、*MECP2*遺伝子は、正常コントロール男性では1コピー、正常コントロール女性では2コピーであった。一方、正常コントロール群と比較し、患者男性の*MECP2*、*IRAK1*遺伝子は2コピー、保因者女性では3コピーであった。患者症例だけではなく、保因者でもコピー数増加を確実に検出できた。

考察

dPCRは、PCR反応のある（陽性）/なし（陰性）を利用し、鋳型DNA量を知る新しい解析技術である。従来の定量PCRであるリアルタイムPCRと比較し、増幅効率に基づく検量線を必要とせず、高精度な絶対定量が可能である。今回*MECP2*重複症候群患者検体を用いて、dPCRを用いたゲノムコピー数解析法を確立させた。FISHと比較して細胞培養の必要はなく、作業時間や結果を得るまでの時間も短く、結果の解釈も客観的である。絶対定量のため、実験回数も抑えることができ、費用面でも経済的である。dPCRは簡便に正確なゲノムコピー数を診断できるため、aCGH結果の再検証や家系内検索の手段として有用である。

結論

dPCR を用いたゲノムコピー数変化の診断法を確立した。本法により簡便かつ正確なコピー数を診断できるため、日常診療の診断法として有用である。