

(様式3号)

学位論文の要旨

氏名 天尾 優希

〔題名〕

ddPCRによる α サラセミア診断法の確立

〔要旨〕

背景 ヘモグロビン異常症の一つであるサラセミアは、グロビン産生低下が原因で起こる先天性小球性低色素性貧血である。 α サラセミアは α -globinの発現量の低下による疾患で、その原因のほとんどは遺伝子欠失によるものである。頻度の高いSEA型欠失などの既知の広範囲欠失はGAP PCRにより診断可能であるが、未知の広範囲欠失による α サラセミアも多数存在し、その診断には遺伝子定量が必要となる。 β -globin遺伝子群の遺伝子定量はReal time PCR法によって比較的容易に行えるが、 α -globin遺伝子に於いては困難を極めている。そこで我々はDroplet Digital PCR(ddPCR)法を用いた α -globin遺伝子定量法(α サラセミアの遺伝子診断法)を確立したので報告する。

方法 ddPCRはQX200™ AutoDG™ Droplet Digital™ PCRシステム(BIORAD)を使用して行った。制限酵素Mse IでgDNAを断片化し、droplet内にPCR primer および加水分解probeとともに封じ込める。各droplet内でPCRを行い、フローサートメトリーの原理で約2万個のdropletの蛍光強度を測定する。結果の評価はCNV(Copy Number Variation)を用いて行った。

正常62検体と既に診断の確定している $-\alpha^{3.7}$ 型欠失(Hetero) α サラセミア35症例、 $-\alpha^{3.7}$ 型欠失(Homo)19症例、SEA型欠失83症例、FIL型欠失19症例、HbH(-3.7/SEA・FIL)症24症例、HbH(α CS/SEA)症4症例、Non SEA・FIL型欠失50症例の合計296検体を用いて検討を行った。

結果と考察 一部のNon SEA・FIL型欠失以外の α サラセミアは、予測値と測定値が一致した。本法は、従来の定量PCR法では測定が困難であった α -globin遺伝子の定量を正確に行うことができ、広範囲遺伝子欠失型欠失 α サラセミアの診断が可能である。

また、Non SEA・FIL型欠失 α サラセミアをReal time PCRを用いて欠失領域の分析を行った。その結果、新しい欠失型が最低でも4種類あることが確認できた。予測値と一致しなかったNon SEA・FIL型欠失 α サラセミア6症例(12%)は α -globin遺伝子に欠失がなく、 α -globin遺伝子発現調節領域であるMCS-R2(HS40)を含む領域の遺伝子欠失による α サラセミアであった。

作成要領

1. 要旨は、800字以内で、1枚でまとめること。
2. 題名が欧文の場合は、和訳を()書きで記載すること。

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 1549 号	氏 名	天尾 優希
論文審査担当者	主査教授	湯尻 俊昭	
	副査教授	山本 健	
	副査教授	西川 潤	
	副査	山城 安啓	
学位論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
ddPCRによる α サラセミア診断法の確立			
学位論文の関連論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。)			
Diagnosis of α -thalassemia Using Droplet Digital PCR (ddPCRによる α サラセミア診断法の確立)			
掲載雑誌名 The Bulletin of the Yamaguchi Medical School 第 66 巻 第 1-2 号 P. 37 ~ 44 (2019 年 月 掲載予定)			
(論文審査の要旨)			
<p>本学位論文は、今まで困難であったαグロビン遺伝子の定量を、ddPCR法を用いることで可能とした。また、欠失範囲が明らかになっていないαサラセミア検体の解析から、数種類の新規の広範囲遺伝子欠失によるαサラセミアが存在すること示唆した。αサラセミアの主な原因は、αグロビン遺伝子の広範囲欠失であるが、未知の広範囲遺伝子欠失が原因と考えられる場合は、遺伝子の定量が診断に必要となる。しかしαグロビン遺伝子の定量は既存のリアルタイムPCR法による分析では困難であった。そこで著者らは、PCR効率に左右されない次世代PCRの1つであるddPCR法を用いたαグロビン遺伝子の定量法を考案した。著者らの研究室に所有する種々のαサラセミア検体と健常人検体を用いて検討を行った結果、本法の有用性が示唆された。また、欠失領域の細かい検索から、日本人に特有と思われる新規の広範囲欠失の存在も示された。臨床症状及び既存の遺伝子検査の結果とddPCRの結果が異なる症例においては、MCS-R2欠失が原因のαサラセミアだと突き止めた。</p> <p>フォーマットについて 図の一部に誤字があり、訂正が必要であったが大きな修正箇所は見当たらなかった。</p> <p>本研究で得られた知見は、当該分野の発展に貢献したと評価し、博士(保健学)の学位を授与するに値する学位論文であると判断した。</p>			

備考 審査の要旨は800字以内とすること。