

ddPCR による

α サラセミア診断法の確立

学位申請者

山口大学大学院医学系研究科

保健学専攻 生体情報検査学領域

天尾 優希

目次

I.要旨	2
II.研究の背景	4
III.目的	14
IV.方法	14
V.結果	22
VI.考察	34
VII.追加実験.....	38
VIII.結語	44
IX.参考文献	45

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Ethical approval:山口大学倫理審査委員会 (管理 number: H25-39)

遺伝子解析研究(174号)

I.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。Real time PCR法による定量PCR法は1サイクルで2倍に増幅される必要があるが、種々の要因により正確に2倍に増幅されない場合が存在する。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。ddPCR法はPCRの増幅効率に左右されないため正確に定量が可能で、直接コピー数を算出できる(copy/ μ g DNA)。

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。CNV値とは、対照遺伝子のコピー数を2とした時の目的遺伝子のコピー数の値である。 α -globin遺伝子が両方欠失していれば0、一方が欠失していれば1、欠失がなければ2となる。

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。

II.研究の背景

1)α サラセミア

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-globin 鎖の生産減少を α サラセミア、β-globin 鎖の生産減少を β サラセミアと命名している[1]。4 量体を形成するサブユニットの減少により赤血球中のヘモグロビン含量は減少し、小球性の赤血球となる。軽症型では相対的に過剰になったグロビン鎖は血球内プロテアーゼにより分解されるが[2]、不均衡が著しい場合は蛋白分解が十分でないため赤血球膜蛋白に結合し、赤血球膜障害を招き髄内溶血(無効造血)、溶血性貧血を引き起こす。日本人においては軽症型サラセミアが多く、見落とされがちな疾患である。しかし、軽症型サラセミアにおいても妊娠や感染症などの増悪因子により一過性に溶血症状をきたす事があるため注意が必要である[3]。日本人におけるサラセミアの頻度は、α サラセミアが約 1/3,500 人、β サラセミアが約 1/1,000 人であるため、日本人においても決して稀な疾患ではない[4,5]。β サラセミアの原因の殆どが点突然変異によるためシーケンシングなどの方法で容易に解析できるが、α サラセミアは遺伝子欠失によるものがほとんどであるため、遺伝子定量が必要となる[1,6]。

α-globin 遺伝子群は 16p13.33 に存在し、5'側から ζ,α₂,α₁,θ の順に存在し、父・母由来のものを合わせて 4 個の α-globin 遺伝子が存在する。そしてその上流には α-globin 遺伝子の発現に強く関与している multispecies conserved sequences (MCS) 領域が存在する (図 1)[1,4,7,8]。

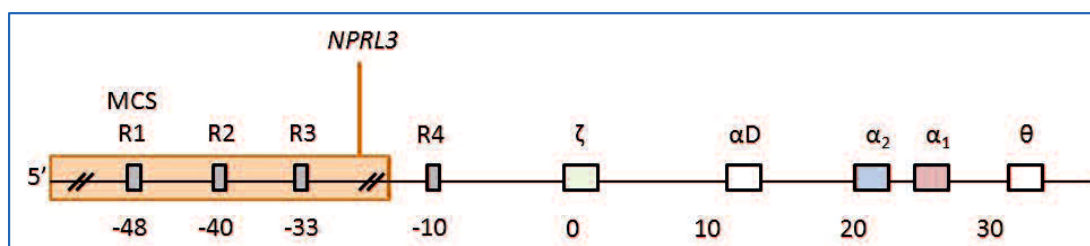


図 1 α -globin 遺伝子群簡易図

α -globin 遺伝子群は 5'末端から α_2 , α_1 の順に並んで存在している。 α -globin 遺伝子は非常に相同性が高いため不均等交差を起し、融合遺伝子を作りやすい。上流には α -globin 遺伝子の発現に強く関与している領域(MCS)が存在し、特に MCS-R2 が遺伝子発現に重要な領域だと考えられている。灰色のボックスは MCS1-4 を示し、オレンジのボックスは遺伝子 *NPRL3*、青色のボックスは α_2 -globin 遺伝子、赤色のボックスは α_1 -globin 伝子を示す [8]。

α サラセミアの原因である広範囲遺伝子欠失は 4 つある α -globin 遺伝子の機能欠失の数が多いほど臨床症状は重くなる。日本人においては、 α_2, α_1 がともに欠失している SEA 型欠失や 1 個の α -globin 遺伝子が欠失した -3.7 型欠失が多く存在する [9]。頻度の高い広範囲欠失型 α サラセミアの欠失範囲の簡易図を図 2 に示す。

1 つの α -globin 遺伝子機能欠失には、遺伝子欠失型 ($-\alpha/\alpha$) と、遺伝子変異型 ($\alpha^T\alpha/\alpha$) が存在する。日本人に最も多く見られる欠失型である -3.7kb 型欠失 ($-\alpha^{3.7}$) は、 α_2 と α_1 -globin 遺伝子の相同性が非常に高いため、減数分裂の際の不均等交差が原因で上流が α_2 、下流が α_1 -globin 遺伝子という融合遺伝子を作り、1 つの α -globin 遺伝子が欠失したものである。共に臨床症状はほとんど見られず、増悪因子と重なった場合に小球性赤血球症として発見されることがある。2 つの α -globin 遺伝子機能欠失には、遺伝子欠失型の ($-\alpha/-\alpha$)、 ($--/\alpha\alpha$) と遺伝子変異型の ($\alpha^T\alpha/-\alpha$)、 ($\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$) が存在する。一つの染色体上の α_2 , α_1 -globin 遺伝子

が共に欠失している(--/ α)は約 30 種類報告されており、日本人においては SEA(Southeast Asia)型が 49%、FIL(Filipino)型が 4%存在する。3 つの α -globin 遺伝子機能欠失には、遺伝子欠失型(--/ α)と、遺伝子変異型(--/ α^T)が存在する。この状態を HbH 症とよぶ。4 つの α -globin 遺伝子機能欠失は、(--/--)で多くは流産に終わる[4,10]。

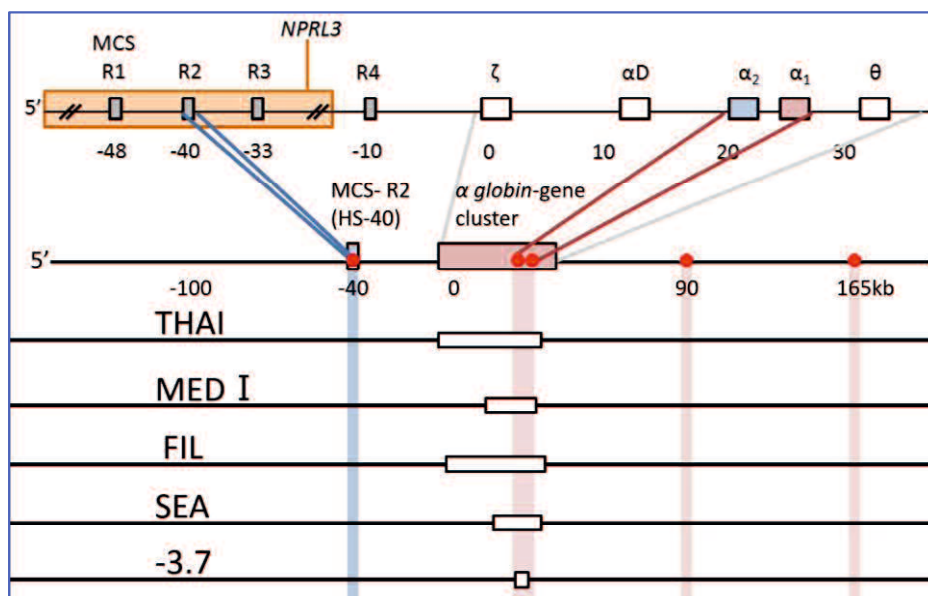


図 2 頻度の高い欠失型 α サラセミア

頻度の高い欠失型の α サラセミア。日本人は-3.7 型欠失，SEA 型欠失が多く，THAI 型欠失，MED 型欠失は少ない。

既知の広範囲欠失による α サラセミアの診断には GAP PCR を使用し，迅速に解析を行っている。GAP PCR とは，欠失領域の少し上流と下流に primer を設計し，PCR を行い，それに特異的な増幅が得られるかどうかで欠失の有無を確認する方法である。

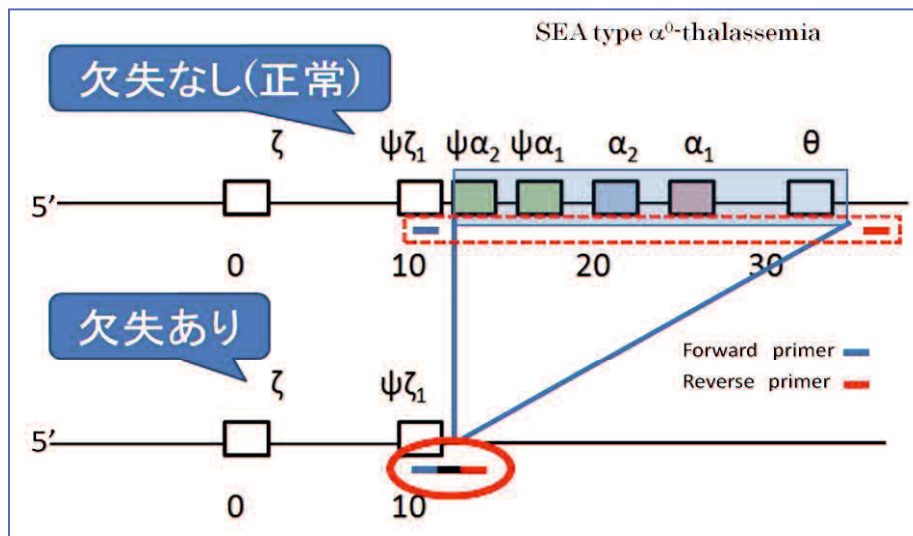


図 3 GAP PCR

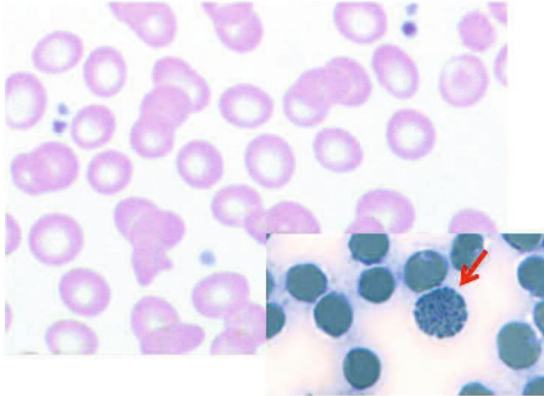
上：欠失がない正常の場合。欠失していないと，primer から primer までの距離が長く，PCR を行うことはできない。

下：SEA 型欠失の場合。欠失がある分 primer から primer の距離が短くなり，PCR が可能となる。欠失している部分が既知のため，SEA 型欠失特有のバンドが得られる。

SEA 型欠失を例に説明する。SEA 型欠失では図 3 に示す青で囲っている約 20kb が欠失している。その領域を挟むようにして primer を設計する。欠失がなければ PCR 領域が長すぎて増幅することができないが，SEA 型の欠失があれば特異的な（短い）PCR 産物が得られる。

図 4 に 2 つの症例のデータを示す。症例 1 は，血液生化学検査から小球性低色素性の赤血球増多症で，末梢血標本では標的赤血球が確認できる。ヘモグロビン・スクリーニング検査からは HbH 封入体が数万個に 1 個の割合で見られる。図中の赤い矢印で示したものが HbH 封入体である。これらのデータから，2 つの α -globin 遺伝子が欠失 ($--/\alpha\alpha$) した α

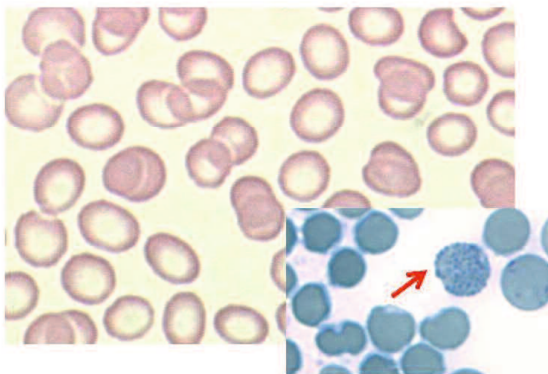
症例1 • 24yr Male



HbF	↑ 2.0 %
HbA ₂	2.1 %
GLT ₅₀	49 sec
HbH封入体	1/数万個

LD	196	IU/L
T.Bill	0.6	mg/dL
D.Bill	0.2	mg/dL
Ferritin	182.8	ng/mL
Transferrin	237	mg/dL
Serum Fe	123	μg/dL
Haptoglobin	126	mg/dL
WBC	5000	/μL
RBC	↑ 679	万/μL
Hb	14.1	g/dL
Ret	12	%
MCV	↓ 67.0	fL
MCH	↓ 20.8	pg
MCHC	↓ 31.0	g/dL
Mentzer Index	↓ 9.9	

症例2 • 25yr Male



HbF	0.4 %
HbA ₂	2.4 %
GLT ₅₀	41 sec
HbH封入体	1/数万個

LD	182	IU/L
T.Bill	0.6	mg/dL
D.Bill	0.2	mg/dL
Ferritin	47.3	ng/mL
Transferrin	210	mg/dL
Serum Fe	67	μg/dL
Haptoglobin	76	mg/dL
WBC	5800	/μL
RBC	↑ 660	万/μL
Hb	14.3	g/dL
Ret	10	%
MCV	↓ 71.7	fL
MCH	↓ 21.7	pg
MCHC	↓ 30.2	g/dL
Mentzer Index	↓ 10.9	

図 4 症例 1, 症例 2

具体的な 2 症例の比較。どちらも同じ(--/αα)型だと予想できる。

サラセミアだと推測できる。

同様に症例 2 も，小球性低色素性で赤血球増多症が認められ，HbH 封入体が数万個に 1 つの割合で見られることから、2 つの α -globin 遺伝子が欠失 ($--/\alpha\alpha$) した α サラセミアだと推測できる。

SEA 型欠失確認のための GAP PCR 後の PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像を図 5 に示す。図 5.左図は症例 1 で陽性コントロールと同じサイズの PCR 産物が得られているため SEA 型欠失の患者であると診断できる。しかし，右図の症例 2 は陽性コントロールと同じサイズの PCR 産物が認められないため，SEA 型欠失の患者では無いと言える。

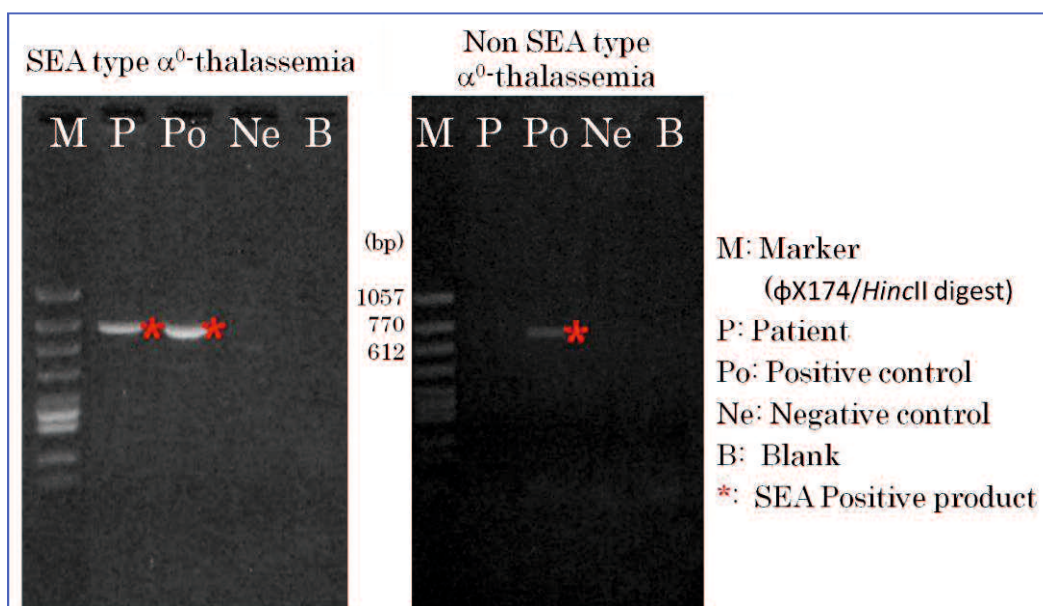


図 5 GAP PCR 泳動像

左図(症例 1) : SEA 型欠失をもつ患者結果。特異的なバンドが見られ，SEA 型欠失であることが分かる。

右図(症例 2) : SEA 型以外の欠失をもつ患者結果。バンドは得られず，正常であるのか，他の欠失型をもっているのか判別ができない。

他の頻度の高い FIL 型欠失や THAI 型欠失などを GAP PCR でチェックし Non SEA・FIL 型欠失の α サラセミア症例として報告した。しかし、この結果からだけでは、本当に遺伝子欠失かどうかの判断することはできない。正確な診断をするためには GAP PCR で判定ができない場合、 *α -globin* 遺伝子定量を行って遺伝子欠失の有無を確認する必要がある。

我々の調査では、未知の広範囲遺伝子欠失（日本人特有）の α サラセミアも多数存在する。臨床症状や血液生化学検査、ヘモグロビン・スクリーニング検査から α サラセミアが疑われる場合は、 *α -globin* 遺伝子の定量による診断が必要となる。

遺伝子定量には real time PCR 法が幅広く用いられている。real time PCR 法とは、倍数希釈により正常 DNA の濃度を調整し検量線を引き、目的遺伝子の定量を行う方法である。 *β -globin* 遺伝子群では比較的容易に診断可能であった。欠失があれば対照遺伝子との比が 0.5,なければ 1.0 付近となる（図 6）。

real time PCR 法は *β -globin* 遺伝子群では比較的容易に診断可能であったが、 *α -globin* 遺伝子群では測定は困難であった。これは *α -globin* 遺伝子群は繰り返し配列が多く存在したことや、 α_2 と α_1 -*globin* 遺伝子の相同性の高さや高い GC 含量が原因だと考えている。原理的に real time PCR 法では、検量線とサンプルの PCR 効率がほぼ 100%（2 倍／サイクル）でなければ正確なデータを出すことはできない。PCR 阻害剤の存在や、相同性の高い配列部分には適さない方法であるといえる。

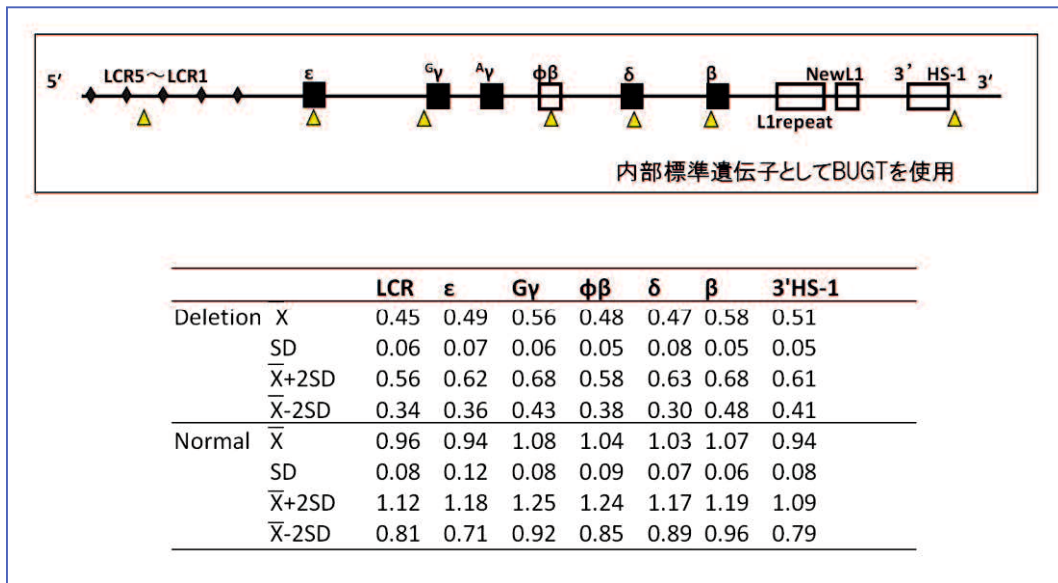


図 6 Real Time PCR による遺伝子定量法

上図： β -globin 遺伝子群簡易図である。黄色い矢印部分に primer セットをそれぞれ設計した。

上段：欠失のある患者検体の測定結果。対照遺伝子との比が 0.5 付近となっている。

下段：正常検体の測定結果。対照遺伝子との比が 1.0 付近となっている。

そこで我々は次世代 PCR とも呼ばれる Droplet Digital PCR(ddPCR)法を用いた α -globin 遺伝子の定量を試みた。

2) ddPCR

ddPCR とは、サンプルを無数の droplet に分注し、各 droplet 内で特定の遺伝子の PCR 増幅の有無を調べるものである。この分注がポワソン分布に従うとすれば、遺伝子のコピー数を測定することが可能となる。droplet 内には、PCR 用試薬と共に、Probe が添加してある。この probe の 5' 末端には蛍光物質、3' 末端にはその発光を抑えるクエンチャーが標識してある(図 7)。

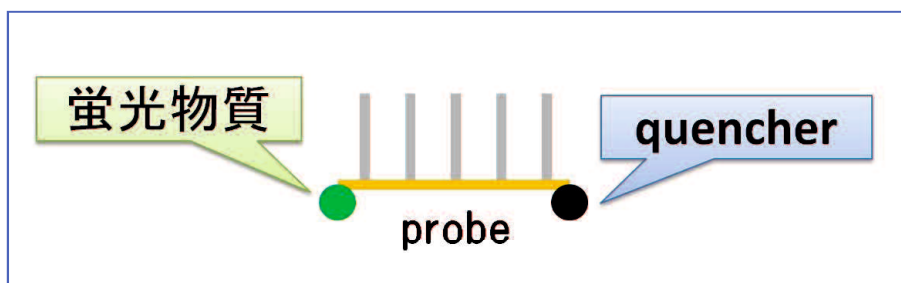


図 7 ddPCR probe

Probe には蛍光物質と quencher が近くに存在する。quencher は蛍光を抑える働きをしており、probe の状態では蛍光物質は蛍光を発しない。しかし、目的遺伝子が droplet 内に存在し PCR が行われれば probe は加水分解され蛍光物質と quencher が切り離される。切り離された蛍光物質は quencher から離され、蛍光を発する。

蛍光物質とクエンチャーが近くに存在するとクエンチャーの働きにより蛍光が抑えられている。droplet 内に目的遺伝子が存在し PCR で増幅されると probe は加水分解され、クエンチャーと蛍光物質が切り離され、蛍光を発するようになる。各 droplet の蛍光強度をフローサイトメトリーの要領で測定する。何個の droplet が蛍光を発しているかを測定することで目的の遺伝子の絶対数を計算することができる(図 8)。

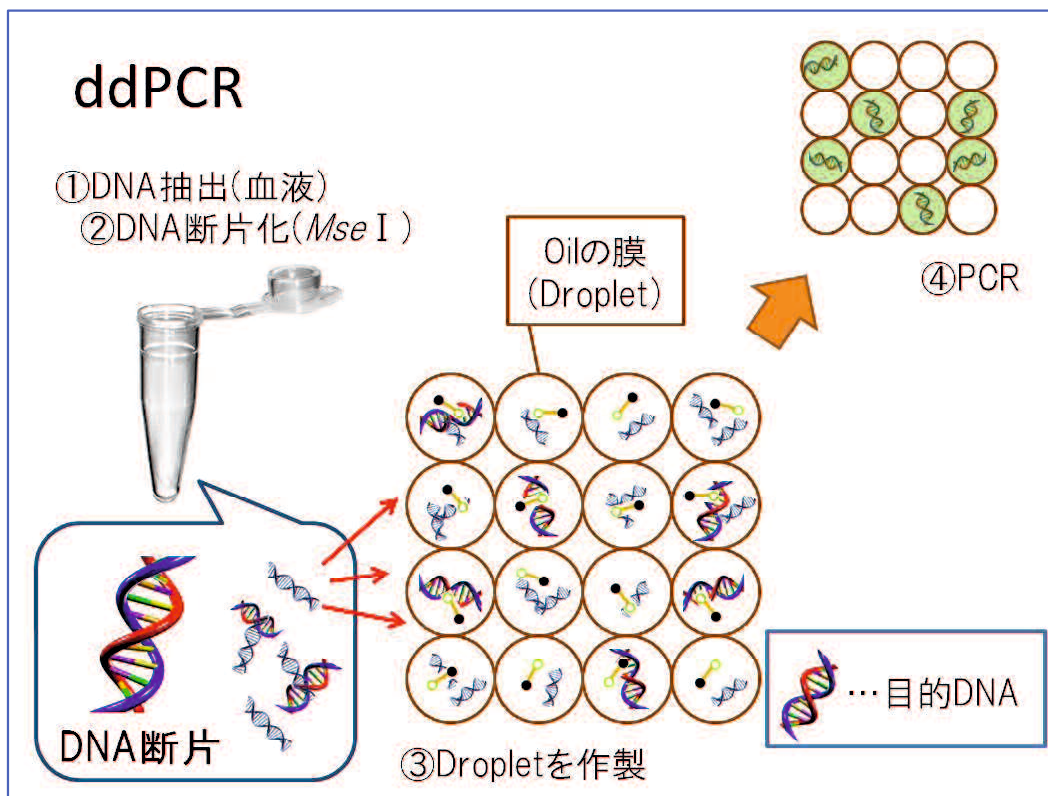


図 8 ddPCR

ゲノム DNA は非常に長いため、効率よく droplet に分注されない。そこで抽出した DNA を目的遺伝子に適切な酵素で消化し、断片化する。断片化した DNA を試薬とともに droplet 内に分注する(油の膜で閉じ込める)。Droplet 内に目的遺伝子があれば probe が分解され蛍光を発する。フローサイトメーターの要領で各 droplet の蛍光強度を測定し、濃度を計算する。

real time PCR 法による遺伝子定量では、検量線を作成するため PCR の 1 サイクルで正確に 2 倍に増幅される必要があるが、インヒビターの存在などの要因で正確に 2 倍に増幅されない場合が多々ある。また、real time PCR 法による遺伝子定量は相対的な定量に過ぎないが、ddPCR では絶対量の定量が可能であり、より正確な数値を出すことが可能である [11-13]。

Ⅲ.目的

ほとんどの原因が広範囲欠失である α サラセミアの検査を行うためには, α -globin 遺伝子の定量が必要である。しかし, よく利用されている遺伝子定量法である LightCycler を用いた real time PCR では, α -globin 遺伝子群の定量は困難であった。 α -globin 遺伝子群の繰り返し配列の多さや相同性の高さによる PCR 効率のバラツキが原因だと考えられる。そこで PCR によるバイアスの少ない ddPCR を使った定量法の確立を試みた。

Ⅳ.方法

1)対象

DNA は EDTA を抗凝固剤として用いられた血液からフェノール・クロロフォルム法により抽出した。健常人検体は血液生化学的に正常と判断された 62 人を用いた。 α サラセミア検体は山口大学に診断の目的で送られてきた患者検体を用いた。全ての症例は既に診断がついたものを利用した。 $-\alpha^{3.7}$ 型欠失 α サラセミア(Hetero)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 症例を使用した。また, 血液生化学検査及びヘモグロビン・スクリーニング検査から(--/ $\alpha\alpha$)の α サラセミアが考えられるが, GAP PCR で SEA 型欠失も FIL 型欠失も検出されなかった α サラセミア (Non SEA・FIL 型欠失) 50 症例も測定した。合計 296 検体を使用した。いずれも GAP PCR で anti -3.7 および-4.2 による α -globin 遺伝子が 3 つ存在する triplication などの存在を否定した検体である。使用した検体を表 1 にまとめた。

表 1 実験に使用した検体

Type	n
Normal	62
-3.7kb Hetero	35
-3.7kb Homo	19
SEA	83
FIL	19
HbH(-3.7/SEA・FIL)	24
HbH(α CS/SEA)	4
Non SEA・FIL	50
Total	296

2)ゲノム DNA 抽出

フェノール・クロロホルム法[14]を用い、EDTA 加末梢血の白血球から DNA 抽出を行った。

[操作]

- ①EDTA 採血管に 2 mL 採血を行い、その血液を 15mL コーニングチューブに移した。
- ②Lysing 溶液を 13mL 加え、室温で 5~10 分間振盪し、赤血球を溶血させた。
- ③室温で 3,000rpm, 5 分間遠心を行った。
- ④遠心後の上清（溶血液）をアスピレーターで除いた。
- ⑤②~④の操作をもう二度繰り返し、白血球以外をできるだけ除いた。
- ⑥白血球のペレットに STE を 4mL 加え振盪し懸濁させた。
- ⑦Proteinase K (10mg/mL)を 40 μ L 加えて軽く混和した。
- ⑧10% SDS を 0.2mL (1/20 容) 加えた。

- ⑨37°Cで一晩インキュベートを行った。
- ⑩5mL（等量）の TE 飽和フェノールを加え、穏やかに 5～10 分間混和後、室温で 3,000rpm, 5 分間遠心を行った。
- ⑪15mL コーニングチューブにあらかじめクロロホルムを約 5mL 入れておき、遠心後の上清を移した。
- ⑫ ⑩～⑪の操作をもう一度繰り返した。
- ⑬50mL のコーニングチューブに 99.5%エタノールを 45mL 入れ、そこに遠心後の水層（上清）をピペットで移した。
- ⑭穏やかに混和すると、空泡を伴った DNA が析出してくる。マイクロピペットを用いて掬い取り、1.5mL マイクロチューブに移した。
- ⑮1.5mL のエタノールを加え、室温で 10,000rpm, 5 分間遠心を行った。
- ⑯エタノールを捨て⑮の操作をもう一度繰り返した。
- ⑰エタノールをピペッティングで注意深くできるだけ取り除いた。
- ⑱ドライアップ後、100 μ L の TE を加え、4°Cにて保存し、DNA を完全に溶解させた。

3)酵素処理

ゲノム DNA は非常に長く、抽出したままの DNA では効率的に droplet に閉じ込めることが困難である。そこで、制限酵素処理を行って DNA を断片化した。今回の目的遺伝子と対照遺伝子の primer 間を切断しない適切な酵素として *Mse* I (New ENGLAND BioLabs) を使用した。

[操作]

- ①抽出した DNA を 50ng/ μ L に調整した。
- ②表 2 に示したように試薬を調整した。
- ③37°C で 1 時間以上インキュベートした。
- ④インキュベート後, SDW にて 20 倍希釈し, それをテンプレートとした。

表 2 試薬構成(酵素処理)

10 × H buffer	1.0(μ L)
<i>Mse</i> I	0.2
SDW	3.8
DNA(50ng/ μ L)	5.0
Total	10.0

4)ddPCR

α_2 -globin 遺伝子と α_1 -globin 遺伝子を目的遺伝子とした。 α_1 及び α_2 -globin 遺伝子の増幅は共通の Primer を使用した。加水分解 probe は α_1 , α_2 -globin 遺伝子に特異的な場所である 3' 末端側に設計し 5'末端に FAM を 3'末端にはクエンチャーとして IBFQ を標識した。対照遺伝子として *RNase P* 遺伝子を用いた。対照遺伝子としては, 細胞内に 2 コピー存在するものであればどの遺伝子でも使用することができたが, *RNaseP* 遺伝子増幅用 primer と probe の Tm 値が α -globin 遺伝子用の primer 及び probe と近似していたため, *RNaseP* 遺伝子を対照遺伝子として採用した。Probe には α_1 及び α_2 -globin 遺伝子とは異なる蛍光色素 VIC を標識し, クエンチャーには MGBNFQ を標識した。目的遺伝子の primer と probe を表 3 に, 対照遺伝子の primer と probe を表 4 に示した。

表 3 目的遺伝子の primer・probe

Alpha primer F	5'-GGTTGCGGGAGGTGTAG-3'
Alpha primer R	5'-CAGTGGCTTAGGAGCTGTG-3'
Alpha1 Probe	5'-FAM-CTGGGCCCTCGGCC-IBFQ-3'
Alpha2 Probe	5'-FAM-CTGGGCCGCACTGA-IBFQ-3'

表 4 対照遺伝子の primer・probe

RNaseP primer F	5'-GATTTGGACCTGCGAGCG-3'
RNaseP primer R	5'-GCGGCTGTCTCCACAAGT-3'
RNaseP Probe	5'-VIC-CTGACCTAAGGCTCT-MGBNFQ-3'

[操作]

- ①twin.tec semi-skirted 96-well plate の各ウェルに表5に示した通りテンプレート以外の試薬を調整した。
- ②5～6回ピペッティングを行い試薬とテンプレートをよく混ぜながらテンプレートを各ウェルに入れた。
- ③気泡が目立つ場合はチップの先で割り、気泡を消した。
- ④プレートシールにより蓋をした。
- ⑤プレート遠心機によりスピンドウンを行った。
- ⑥プレートボルテックスにより1分間混和した。
- ⑦プレート遠心機によりスピンドウンを行った。

⑧Automated Droplet Generator(BIORAD)によって Droplet を作成した。Droplet の数は 2

万個に設定した。

⑨表 6 の条件で PCR を行った。

⑩測定・解析は QX200 Droplet Reader(BIORAD)を用いて行った。

表 5 試薬構成(ddPCR)

2×ddPCR MasterMix(BIORAD)	10.0(μL)
Target primer F(50μM)	0.4
Target primer R(50μM)	0.4
FAM Probe(10μM)	0.5
RNaseP primer F(50μM)	0.4
RNaseP primer R(50μM)	0.4
RNaseP Probe(10μM)	0.5
SDW	1.4
Template	8.0
Total	22.0

表 6 ddPCR の PCR 条件

95℃	10:00	45Cycle
94℃	00:30	
60℃	01:00	
98℃	10:00	
4℃	∞	

5) Non SEA・FIL 型欠失の欠失領域決定の試み

①real time PCR による遺伝子定量法

LightCycler[®]480 II (Roche, Tokyo)を用いた Real time PCR 法により遺伝子定量を行うことで、*α-globin* 遺伝子群における欠失の有無を検索した。

倍数希釈により正常 DNA の濃度を調整した。3.75ng/μL(A), 1.88ng/μL(B), 0.94ng/μL(C), 0.47ng/μL(D)の4濃度を用い、この系列から検量線を描いた。各症例のDNAについては、倍数希釈により濃度を調製し、欠失の有無にかかわらず検量線内に入るよう1.88ng/μL(B)に調整した。

α-globin 遺伝子群の各領域に Real time PCR に用いるプライマー(表7)を設計した。それぞれのプライマーペアについて、PCR産物が良好に生成されているかを確認するため、融解曲線を描き、確認した。融解曲線とは、PCR終了後にアニーリングの温度プラス5℃から99℃まで0.1℃/secで徐々に温度を上げ、2本鎖DNAが1本鎖DNAに解離していく様子を測定し、その蛍光強度の微分を示したものである。PCR産物が特異的な場合にはこれが一峰性のピークとなり、その産物を電気泳動しても一つのバンドとして検出されるが、非特異的な場合にはピークが二峰性となり、電気泳動でもエキストラバンドが検出される。

同時に対照遺伝子(内部標準遺伝子)である LPL9 に設計したプライマーを用いて測定を行い、そのコピー数の比(目的遺伝子/対照遺伝子)を出すことで判定を行った。欠失がなければ各遺伝子と LPL9 のコピー数の比は約1.0となり、欠失が存在する場合にはこの比が約0.5となる。

表 7 real time PCR primer

primer		sequence	product	Elongation時間
MCS-R2	Forward	5'-GTGCAGGAGGCTCTCAGGAACAAG-3'	334bp	30sec
	Reverse	5'-CCCTGAAGCCTGGCTGTGAACACT-3'		
下流90kb	Forward	5'-GTCCTTGCCTTTCTTTTGTGGGTTT-3'	141bp	10sec
	Reverse	5'-TGTTAGTGTACTTTATGTGTGGCCC-3'		
下流165kb	Forward	5'-GGGCCTTTCATACGAACAGTGCTGG-3'	316bp	30sec
	Reverse	5'-TCAGGTACAGAGAGGAGACGAGGAG-3'		
LPL9	Forward	5'-CCTTGTCTACATGGCATATTCACA-3'		
	Reverse	5'-CTCAGGATGCCAGTCAGCTTTAG-3'		

[操作]

- ①検量線用正常 DNA の濃度を(A)～(D)まで調整した。
- ②検体 DNA の濃度を調整した(B)。
- ③LightCycler® 480 Multiwell Plate 96(white)の各ウェルに表 8 に示すように試薬を調整した。
- ④表 9 に示した条件で PCR を行った。72°Cの Elongation 時間は、使用した primer によって適当な時間に設定した(表 7)。
- ⑤LightCycler®480 II (Roche, Tokyo)を使い、4濃度の正常DNA を用いて検量線を描き、対照遺伝子と目的遺伝子のコピー数を測定した。

表 8 試薬構成(Real time PCR)

FastStart Essential DNA Green Master (Roche)	10.0(μL)
Forward & Reverse primer Mix(5μM each)	2.0
SDW	4.0
Template	4.0
Total	20.0

表 9 PCR条件(Real time PCR)

95°C	05:00	
95°C	00:10	45Cycle
60°C	00:10	
72°C	00:10~00:30	

V.結果

1) 健常人による ddPCR プロトコールの決定

正常検体を用いてプロトコールの検討を行った。 α_2 -globin 遺伝子は、最初に設定した PCR 条件で十分にポジティブとネガティブを分けることができるほど増幅させることが可能であった(図 9A)。しかし、 α_1 -globin 遺伝子は増幅効率が悪く、ポジティブとネガティブを分けることが困難であった(図 9B)。そこでサイクル数を 40 サイクルから 45 サイクルに変更し、PCR を行った。その結果、 α_1 -globin 遺伝子も十分にポジティブとネガティブを分けることが可能となった(図 9C)。

作業効率を考え、 α_1 -globin 遺伝子、 α_2 -globin 遺伝子ともに PCR 条件を 95°C10 分間 DNA polymerase 活性化を行ったのち、94°C30 秒、60°C1 分を 45 サイクル繰り返したのち、98°C10 分で droplet を安定化したのち、4°Cで保存を行うこととした。

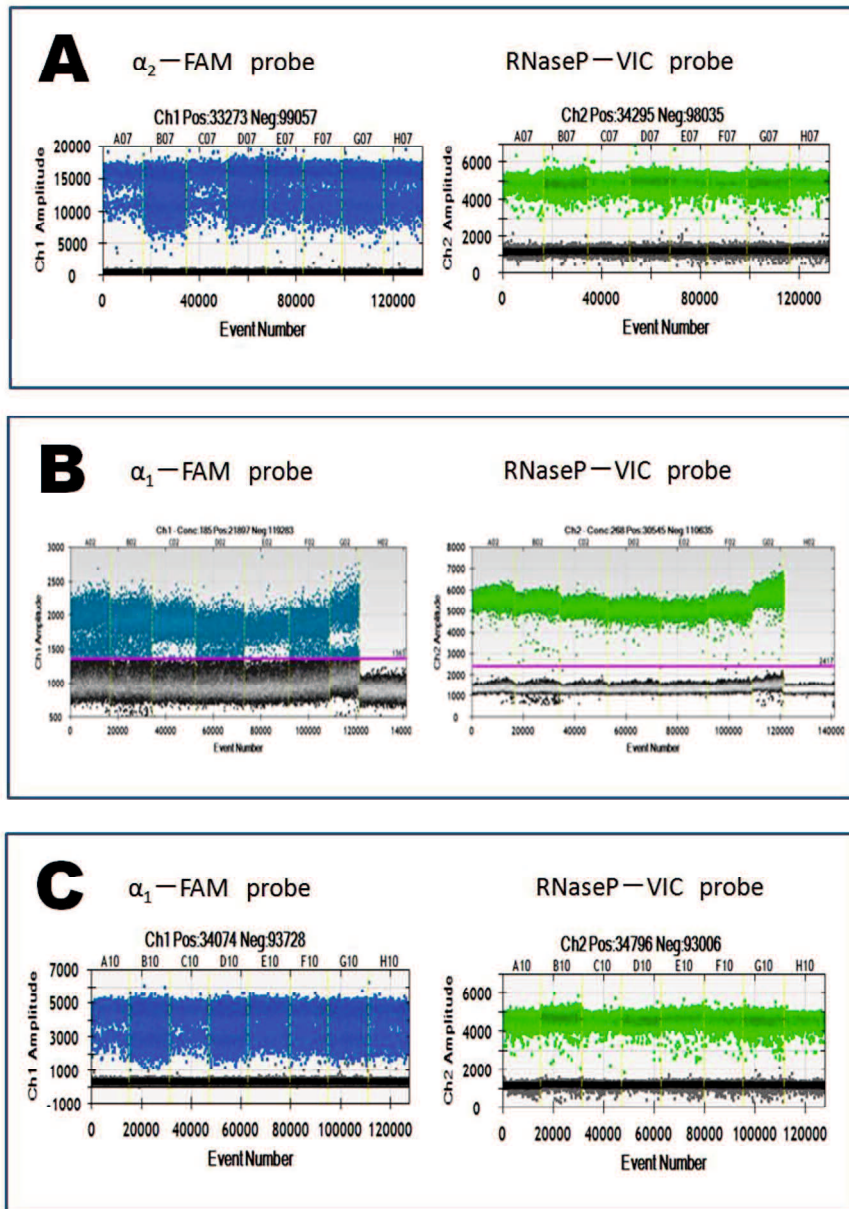


図 9 正常検体を用いたプロトコルの検討結果

縦軸は各 droplet の蛍光強度を示し、横軸はイベント数(droplet の数)を示す。A : α_2 -globin 遺伝子の ddPCR 結果。B : α_1 -globin 遺伝子の ddPCR 結果。PCR のサイクル数は 40 回。C : α_1 -globin 遺伝子の ddPCR 結果。PCR のサイクル数は 45 回。 α_2 -globin 遺伝子は、PCR サイクル数 40 回でポジティブとネガティブを充分に分けることができたが、 α_1 -globin 遺伝子では 40 回 (B) では充分な分離ができないことから 45 回に増やすことによって分けることが可能になった(C)。

結果の評価は CNV(Copy Number Variation)を用いて行った。CNV とは、対照遺伝子のコピー数を 2 とした時の目的遺伝子のコピー数の値である(図 10)。両親から受け継いだ遺伝子の両方が欠失していれば 0、片方が欠失していれば 1、欠失がなければ 2 付近の値となる。

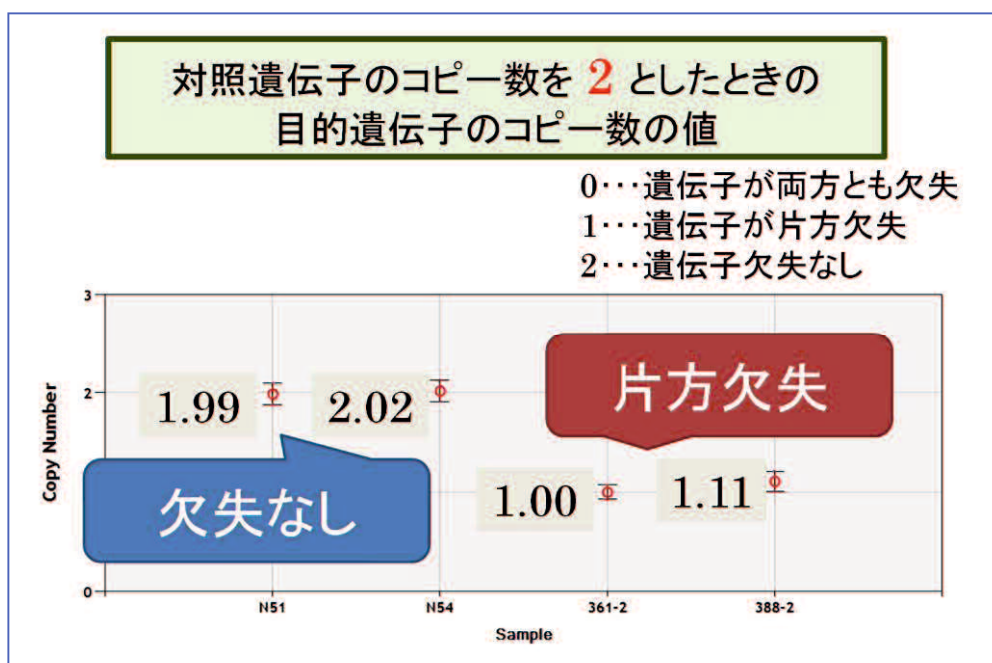


図 10 CNV 値

対照遺伝子のコピー数を 2 としたときの目的遺伝子のコピー数の値。目的遺伝子/対照遺伝子 $\times 2$ として計算した。両親から受け継いだ遺伝子の両方が欠失していれば 0、片方が欠失していれば 1、欠失がなければ 2 付近の値となる。CNV 値は、対照遺伝子との比であるため DNA 量によるばらつきに影響されない。

当初は、ddPCR はコピーナンバーを正確に測定できるため、コピーナンバーを用いて評価を行う予定であった。しかし、コピーナンバーでの評価は数値のばらつきが想定異常に大きく、困難であることが分かった(図 11A)。これは、最初に DNA を 50ng/μL に希釈する時点での誤差であると考ええる。今回我々は分光光度計を用いて希釈を行ったが、より正確な測定の行える方法ではこの誤差は少なくなるかもしれない。しかし、作業が煩雑であるため、CNV 値を用いての評価を採用した。CNV 値は、DNA 量によるばらつきに影響されない。よってより簡易に評価が行えるようになった (図 11B)。

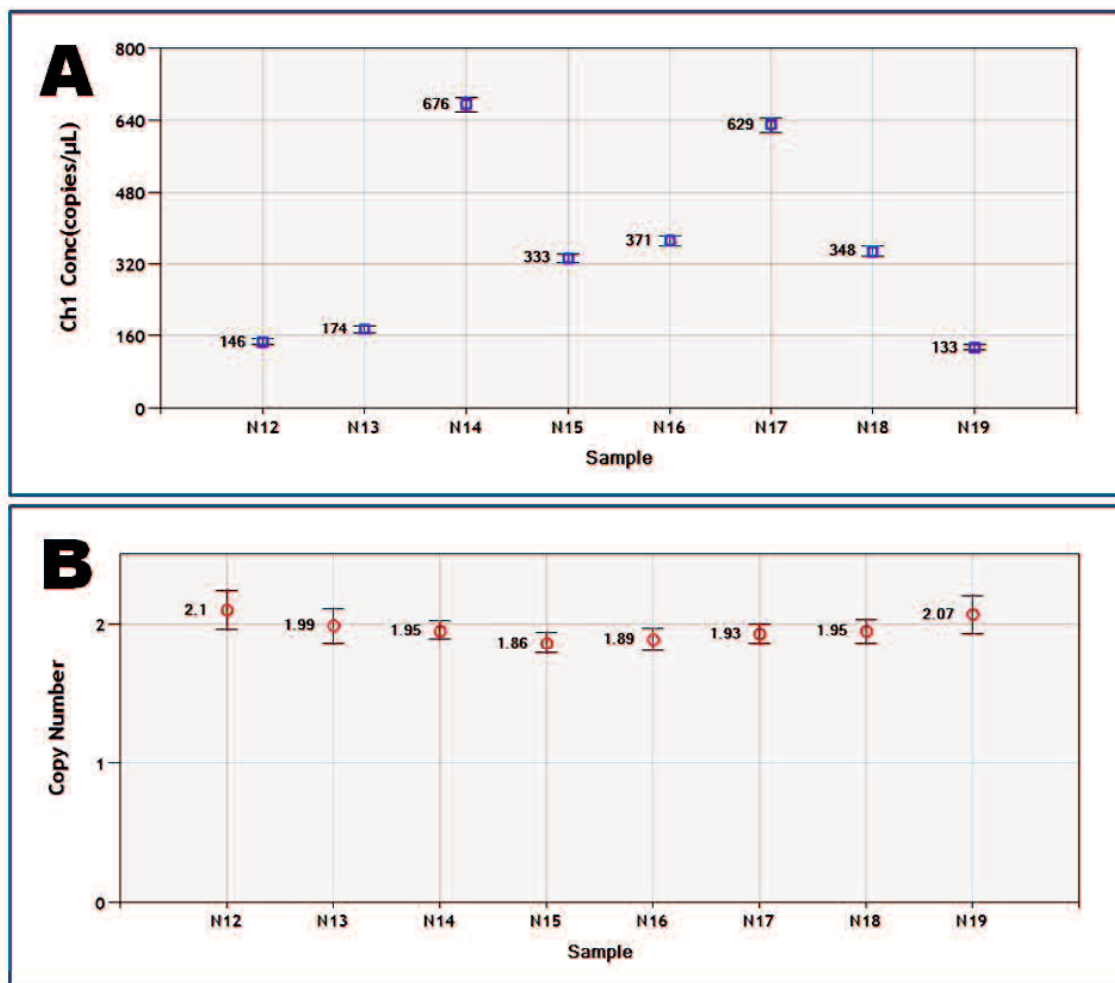


図 11 CNV を用いた評価法

A：縦軸は α グロビン遺伝子の 1 μL 当たりのコピー数を表し、横軸はサンプルを示している。分光光度計を用い DNA を 50ng/ μL に調整してあるものの、コピー数にばらつきが生じ、評価が困難である。

B：縦軸は CNV 値(標的遺伝子のコピーナンバー/対照遺伝子のコピーナンバー)、横軸はサンプルを表す。対照遺伝子を用いることによって欠失がなければ 2、あれば 1 か 0 と評価可能となった。

2)健常人および α サラセミア検体の測定(表 10A~J 参照)

健常人検体(n=62)の遺伝子型は、欠失がないため($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)となり、予測 CNV 値は(α_2, α_1) = (2,2)となる。測定した結果、CNV 値は平均で(α_2, α_1) = (1.94,1.95)となり、 α_2 (Min : 1.79, Max : 2.22, Reference Range : 1.76~2.12), α_1 (Min : 1.77, Max : 2.16, Reference Range : 1.80~2.11)となった(表 10A)。この結果は、予測値と一致しているといえる。 $-\alpha^{3.7}$ 型欠失・ $-\alpha^{4.2}$ 型欠失(Hetero) (n=35)の欠失は、遺伝子型が($-\alpha/\alpha\alpha$)となる。 $-\alpha$ は $\alpha_1\alpha_2$ 融合体であるため、その融合体は probe を設計した場所の都合により、 α_1 とカウントされるため、予測 CNV 値は(α_2, α_1) = (1,2)となる。測定した結果、CNV 値は平均で(α_2, α_1) = (0.97,1.93)となり、 α_2 (Min : 0.86, Max : 1.07, Reference Range : 0.87~1.07), α_1 (Min : 1.75, Max : 2.07, Reference Range : 1.79~2.06)となった(表 10B)。また、 $-\alpha^{3.7}$ 型欠失・ $-\alpha^{4.2}$ 型欠失(Homo) (n=19)の場合も同様に融合体を有しているため、予測 CNV 値は(α_2, α_1) = (0,2)となる(表 10C)。droplet 中に目的の遺伝子が1つもなければ No Call となるが、その場合は表中に(-)と表記した。片方のアレルの α_1 と α_2 が欠失している SEA 型欠失(n=83)(表 10D)や FIL 型欠失(n=19)(表 10E)は遺伝子型が($--/\alpha\alpha$)となる。よって予測 CNV 値は(α_2, α_1) = (1,1)となる。HbH 症(n=24)は、 $-\alpha^{3.7}$ 型欠失と SEA・FIL 型欠失の組み合わせがほとんどで、遺伝子型は($--/\alpha$)となる。予測 CNV 値は(α_2, α_1) = (0,1)となる(表 10F)。遺伝子は存在しているが、遺伝子変異によってサラセミアになっている α CS が含まれた HbH(α CS /SEA)症(n=4)の場合、遺伝子型は($--/\alpha^T\alpha$)となり、予測 CNV 値は(α_2, α_1) = (1,1)となる(表 10G)。測定した結果、どの欠失型も平均 CNV 値・Reference Range とともに矛盾のない数値となった。

Non SEA・FIL 型欠失(n=50)は、血液生化学データから α サラセミア($--/\alpha\alpha$)が疑われるが

GAP PCR で SEA 型欠失や FIL 型欠失などの既知の広範囲遺伝子欠失による α サラセミアが否定された症例である。遺伝子型は(--/ $\alpha\alpha$)であるため、予測 CNV 値は(α_2, α_1) = (1,1)となる。測定の結果、予測 CNV 値と一致した検体は 50 検体中 44 検体で、CNV 値は平均で(α_2, α_1) = (0.97,0.97), α_2 (Min : 0.89, Max : 1.12, Reference Range : 0.87~1.07), α_1 (Min : 0.81, Max : 1.05, Reference Range : 0.87~1.07)となった(表 10H)。一致しなかった 6 検体(12%)は CNV 値が(α_2, α_1) = (2,2)付近となり α_1 -globin 遺伝子, α_2 -globin 遺伝子ともに遺伝子欠失が認められなかった(表 10I)。

表 10 ddPCR 結果(NCV)

A) Normal($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)

No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV	No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV
1	1.86	1.85	33	1.95	1.90
2	1.96	2.11	34	1.93	1.87
3	1.92	1.92	35	1.85	1.88
4	1.86	2.02	36	1.89	1.91
5	1.97	2.03	37	1.92	2.00
6	2.00	1.98	38	1.95	1.84
7	1.97	1.80	39	1.79	1.94
8	1.84	1.93	40	1.88	1.90
9	1.95	1.91	41	1.96	2.03
10	1.97	2.10	42	1.90	1.86
11	2.11	1.99	43	1.89	1.97
12	1.94	1.95	44	1.83	1.88
13	1.93	1.89	45	1.89	1.99
14	1.93	1.93	46	1.85	1.99
15	1.92	1.95	47	2.01	1.99
16	1.94	2.07	48	2.03	1.94
17	1.90	2.13	49	1.83	2.00
18	1.86	1.92	50	2.07	2.02
19	2.00	1.97	51	1.87	1.92
20	1.93	1.95	52	2.06	1.92
21	1.85	1.88	53	1.93	1.92
22	2.04	2.01	54	1.91	1.93
23	2.05	1.98	55	1.99	1.98
24	1.88	1.96	56	1.98	2.16
25	1.91	2.01	57	2.19	2.00
26	1.80	1.77	58	1.91	1.92
27	2.02	1.98	59	1.89	2.11
28	1.97	1.95	60	1.92	1.98
29	2.04	1.82	61	2.22	1.98
30	2.10	1.95	62	1.80	1.80
31	1.90	1.90			
32	1.82	1.96			

B) $-\alpha^{3.7}$ or 4.2 Hetero(- α/α)

C) $-\alpha^{3.7}$ or 4.2 Homo(- α/α)

No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV	No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV
1	0.95	1.75	1	-	1.85
2	0.94	1.87	2	-	1.94
3	0.96	1.97	3	-	2.15
4	1.07	1.86	4	-	1.92
5	0.87	1.90	5	0.01	1.85
6	0.94	1.91	6	-	1.86
7	1.01	1.97	7	0.01	2.00
8	0.89	1.91	8	0.00	1.91
9	1.04	1.91	9	0.04	1.85
10	1.00	1.98	10	-	1.81
11	1.02	1.94	11	-	2.22
12	0.97	1.90	12	0.00	1.95
13	0.86	1.90	13	-	1.89
14	0.95	1.78	14	-	2.04
15	0.94	1.91	15	0.00	2.07
16	1.02	1.88	16	0.02	2.04
17	0.98	1.97	17	-	1.96
18	1.04	1.91	18	-	1.94
19	0.94	1.91	19	0.03	2.06
20	0.99	1.97			
21	1.06	1.87			
22	0.92	1.97			
23	1.02	1.97			
24	0.99	2.02			
25	0.92	1.87			
26	1.01	1.97			
27	0.95	1.89			
28	0.91	1.90			
29	1.00	2.07			
30	1.02	1.99			
31	0.96	1.98			
32	0.98	1.86			
33	1.01	1.91			
34	0.97	2.00			
35	0.94	2.05			

D) SEA(--/ $\alpha\alpha$)

No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV	No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV
1	0.91	0.92	43	0.92	0.95
2	1.01	1.07	44	0.99	1.00
3	1.06	1.06	45	0.93	0.89
4	0.93	1.05	46	0.93	0.97
5	1.02	1.03	47	1.16	1.07
6	0.96	0.97	48	1.01	1.00
7	0.89	0.88	49	0.96	0.94
8	0.87	0.89	50	0.98	0.99
9	0.99	1.02	51	0.97	0.97
10	0.99	0.96	52	1.04	1.03
11	0.75	0.83	53	1.04	1.03
12	0.94	0.94	54	1.05	1.03
13	0.99	1.16	55	1.01	0.98
14	1.07	0.96	56	1.04	1.01
15	1.00	0.97	57	1.03	1.03
16	0.94	0.91	58	1.00	0.90
17	1.00	0.92	59	1.02	0.96
18	0.94	0.96	60	0.98	1.10
19	1.00	0.95	61	0.95	0.93
20	0.90	0.87	62	0.97	0.91
21	1.00	1.03	63	0.95	0.97
22	0.94	0.96	64	1.08	0.96
23	0.97	0.96	65	1.00	0.94
24	0.97	0.90	66	0.96	1.05
25	1.02	0.95	67	0.96	1.03
26	0.98	1.00	68	0.94	1.03
27	0.85	0.82	69	1.06	0.99
28	0.95	0.95	70	0.95	0.95
29	1.00	1.01	71	0.96	0.92
30	1.23	1.25	72	0.94	1.11
31	1.07	1.10	73	1.06	0.93
32	0.96	1.05	74	0.90	0.92
33	0.94	0.93	75	1.02	0.96
34	0.99	0.98	76	1.00	0.99
35	0.89	0.89	77	0.97	0.94
36	0.81	0.82	78	0.97	0.98
37	0.89	0.83	79	1.00	1.12
38	0.92	0.94	80	1.03	1.03
39	0.97	1.00	81	0.94	0.97
40	0.99	0.99	82	0.98	1.02
41	1.02	1.02	83	1.02	0.94
42	1.04	1.03			

E) FIL(--/ $\alpha\alpha$)

No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV
1	0.93	0.89
2	0.99	0.93
3	0.94	0.93
4	0.95	0.95
5	1.02	0.96
6	1.09	0.96
7	1.12	0.96
8	1.04	0.97
9	0.94	0.98
10	1.06	0.98
11	0.96	0.99
12	0.98	0.99
13	1.01	1.01
14	0.94	1.01
15	0.94	1.02
16	1.11	1.03
17	1.01	1.07
18	0.90	1.12
19	1.29	1.19

F) HbH(-3.7/SEA • FIL) (- α /--)

No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV
1	-	0.77
2	-	0.85
3	0.00	0.92
4	0.01	0.93
5	0.02	0.93
6	0.01	0.94
7	-	0.95
8	0.00	0.96
9	0.01	0.96
10	0.01	0.97
11	-	0.97
12	0.00	0.98
13	0.01	0.98
14	-	0.98
15	-	0.98
16	0.00	0.99
17	0.01	0.99
18	0.01	0.99
19	-	0.99
20	0.08	1.00
21	0.00	1.02
22	-	1.02
23	0.04	1.03
24	0.00	1.08

G) HbH(α^{CS} /SEA) ($\alpha^T\alpha$ /--)

No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV
1	1.01	0.96
2	1.11	1.12
3	1.00	1.00
4	1.05	1.04

H) Non SEA • FIL(--/ $\alpha\alpha$)^{#1}

No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV	No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV
1	0.96	0.95	23	0.93	0.95
2	1.03	1.00	24	1.07	0.99
3	0.96	1.01	25	0.99	1.00
4	1.05	0.91	26	0.93	1.02
5	0.96	0.97	27	0.91	1.01
6	0.98	1.01	28	0.95	0.98
7	0.92	0.87	29	0.97	1.01
8	0.89	0.98	30	0.98	0.92
9	0.94	0.90	31	1.05	0.98
10	0.96	0.97	32	0.93	0.96
11	0.99	0.98	33	0.96	1.02
12	0.95	0.96	34	1.00	0.93
13	0.96	0.94	35	0.97	1.03
14	0.93	0.97	36	0.90	1.05
15	0.92	0.89	37	0.93	0.93
16	0.96	0.92	38	1.00	1.01
17	0.90	0.91	39	1.00	1.02
18	1.01	0.97	40	1.00	1.02
19	0.97	0.92	41	1.02	1.00
20	0.95	0.81	42	1.12	1.01
21	1.04	0.96	43	1.01	0.99
22	0.96	0.98	44	0.92	1.05

I) Non SEA • FIL($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)^{#2}

No.	alpha2 CNV	alpha1 CNV
1	1.85	1.88
2	1.91	1.91
3	1.97	1.90
4	1.87	1.93
5	1.96	2.03
6	1.93	1.92

#1 Samples that have deletion at α_1 and α_2 *globin* genes.

#2 Samples that don't have deletion at α_1 and α_2 *globin* genes, but have at MCRS2.

VI. 考察

軽症型 α サラセミアは、鉄欠乏性貧血に類似している。なぜなら両方とも小球性貧血を呈するからである。鉄欠乏性貧血に対する治療は、鉄剤が処方されることがあるがサラセミアでは不必要であり逆に悪化させることもある。また、両親が α サラセミアであるときに出現するHb Bart(--/--)が日本で見られた[15]。したがって、 α サラセミアの正確かつ迅速な遺伝子診断は必須である。

α サラセミアの原因のほとんどが α -globin遺伝子の広範囲欠失であるため、診断には遺伝子定量が必要となる。広範囲遺伝子欠失は、既知のものであればGAP PCRによって比較的簡単に検査できる。しかし未知の欠失であった場合、GAP PCRを行うことができないため、遺伝子欠失を確認する必要がある。

現在、遺伝子定量はreal time PCRによる定量PCRが一般的である。我々の研究室において、real time PCRによる定量PCRは、 β -globin遺伝子群では比較的容易に診断可能であったが、 α -globin遺伝子群では様々な条件で検討を行ったが、定量を行うことは困難であった。real time PCRでは、検量線を引き、それと比較して欠失の有無を検索するため、PCRの1サイクルで正確に2倍に増幅される必要がある。しかし α -globin遺伝子群はその増幅が正確に2倍になっていないと考えられる。その原因として α -globin遺伝子は相同性の高い部分が多く存在すること、GC含有量の高さなどが考えられた。実際にddPCRの各dropletの蛍光強度を見ると幅広い蛍光強度を取っている。確率論として1つのdropletに1遺伝子ではなく2、3遺伝子が入っている場合があるが、これほどのバラツキがあることがreal time PCRではうまく測定できない裏付けともなる。

ddPCRでは正確に2倍に増幅する必要はなく、droplet内で遺伝子増幅が起こり陰性よりも少しでも高い蛍光を発すればいいという点で、PCRによるバイアスがかかりにくいという利点がある。

他にもDNAの定量法として、多重連結依存性プローブ増幅(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification ; MLPA)法がある。MLPA法はマルチプレックス分析としてコピー数の微妙な変化を検出することができる。2002年にSchoutenらによって発表されて以来[16], その使用を引用する500以上の報告があった。しかし、それはキャピラリー電気泳動システムを必要とし、作業が煩雑でありDNA抽出を除いて約24時間かかる。対照的に、ddPCRは4時間以内に結果を提供することができる。また、MLPAは解析に質の高いDNAを必要とするが、ddPCRはそれほど高品質のDNAを必要としない。さらに、ddPCRは、少ないDNA量で正確な結果を出すことができ、低いDNA含有量を有する試料の分析も可能である。従って臨床応用する場合、ddPCRにより有用性があるといえる。

過去にddPCR法を用いた α サラセミアの診断の報告がある[17-18]。しかし、症例数が少ない、サラセミアの種類が少ないなどの問題があり、ddPCR法が全ての α サラセミアの診断に適応できるかなどの疑問が残った。今回我々は、健常検体を含め多数の α サラセミア症例を用い検討を行った。また、 α サラセミア変異のほとんどを網羅した。これにより、ddPCR法による α サラセミアの診断が可能であることを明らかにした。

今回測定した正常検体および α サラセミア検体すべてにおいて、最小値でも最大値でも欠失の有無を判断するには十分な数値を得ることができた。これは、今まで困難であった α -globin 遺伝子の定量が ddPCR を用いて診断可能であることを示唆する(表 11)。

表 11 (A) The predicted CNV value and the measurement result. (B) Reference Range.

A

Type	n	Predicted CNV value		CNV value mean	
		α_2	α_1	α_2	α_1
Normal($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	62	2	2	1.94	1.95
$-\alpha^{3.7\text{or}4.2}$ Hetero($-a/\alpha\alpha$)	35	1	2	0.97	1.93
$-\alpha^{3.7\text{or}4.2}$ Homo($-a/-a$)	19	0	2	0.01	1.96
SEA($--/\alpha\alpha$)	83	1	1	0.98	0.98
FIL($--/\alpha\alpha$)	19	1	1	1.01	1.00
HbH($-3.7/\text{SEA} \cdot \text{FIL}$) ($-a/--$)	24	0	1	0.01	0.97
HbH($\alpha^{\text{CS}}/\text{SEA}$) ($\alpha^{\text{T}}a/--$)	4	1	1	1.04	1.03
Non SEA \cdot FIL($--/\alpha\alpha$)#1	44	1	1	0.97	0.97
Non SEA \cdot FIL($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)#2	6	2	2	1.92	1.95

B

Type	n	α_2			α_1		
		Min	Max	Reference Range	Min	Max	Reference Range
Normal($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	62	1.79	2.22	1.76~2.12	1.77	2.16	1.80~2.11
$-\alpha^{3.7\text{or}4.2}$ Hetero($-a/\alpha\alpha$)	35	0.86	1.07	0.87~1.07	1.75	2.07	1.79~2.06
$-\alpha^{3.7\text{or}4.2}$ Homo($-a/-a$)	19	0.00	0.04	0.00~0.03	1.81	2.22	1.74~2.18
SEA($--/\alpha\alpha$)	83	0.75	1.23	0.84~1.11	0.82	1.25	0.83~1.13
FIL($--/\alpha\alpha$)	19	0.9	1.29	0.83~1.20	0.89	1.19	0.86~1.14
HbH($-3.7/\text{SEA} \cdot \text{FIL}$) ($-a/--$)	24	0.00	0.08	0.00~0.04	0.77	1.08	0.84~1.09
HbH($\alpha^{\text{CS}}/\text{SEA}$) ($\alpha^{\text{T}}a/--$)	4	1.00	1.11	0.94~1.14	0.96	1.12	0.89~1.17
Non SEA \cdot FIL($--/\alpha\alpha$)#1	44	0.89	1.12	0.87~1.07	0.81	1.05	0.87~1.07
Non SEA \cdot FIL($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)#2	6	1.85	1.97	1.82~2.01	1.88	2.03	1.85~2.05

#1 Samples that have deletion at α_1 and α_2 *globin* genes.

#2 Samples that don't have deletion at α_1 and α_2 *globin* genes, but have at MCRS2.

また、Non SEA・FIL 型欠失は、今までは血液生化学データや GAP PCR によって、 α サラセミアではあるが、SEA 型欠失でも FIL 型欠失でもない、という推測にとどまっていた。しかし本法を用いることでそのような症例を、具体的なデータを提示して欠失型であると報告が可能となった。

α サラセミアの診断に重要な点は、頻度の高い既知の欠失や挿入 (*anti3.7* などのトリプリーションを含む) は比較的安価で迅速診断のできる GAP PCR を用いて検査する。臨床症状や血液生化学データから α サラセミアが疑われるが診断のつかない未知の α サラセミアを、ddPCR を用いて検査する。その際、 *α_2 -globin* 遺伝子、 *α_1 -globin* 遺伝子が欠失しているかの有無が重要になる。したがって、我々は確実に遺伝子の欠失の有無が証明できるように *α_2 -globin* 遺伝子、 *α_1 -globin* 遺伝子に primer/probe を設計した。

血液生化学データやヘモグロビンスクリーニングで α サラセミアが疑われる場合は、まず GAP PCR 等で既知の欠失・挿入による *α -globin* 遺伝子の異常を確認する。異常が見られなかった場合はシーケンシングで変異型の確認をする。それでも診断のつかない α サラセミアを ddPCR 法で診断するという多段階的に検査を組み合わせることで、すべての α サラセミア有無を特定することができると思う。

VII.追加実験

Non SEA・FIL 型欠失についてはさらに詳しく解析を進めた。HbH 症の広範囲に欠失したアレルにも、Non SEA・FIL 型欠失があったため、それも含めて検討した。

Non SEA・FIL 型欠失のうち、HbH 症も含め α_2 , α_1 -globin 遺伝子の両方が欠失していたものが 46 検体であった。頻度の高い既知の欠失は、GAP PCR で否定された。

さらに、ddPCR で予測値と違っていた 6 検体の検討も行った。この症例は広範囲欠失の臨床症状を呈しているにも関わらず、 α -globin 遺伝子に欠失がなかったものである。

新たに作成した primer を用いて Real time PCR を行った。Primer の領域は MCS-R2 領域、下流 90kb, 165kb 付近に設計した。

1)結果

結果は CNV で評価した。対照遺伝子として LPL9 を使用し、LPL9 を 1.0 とした時の目的遺伝子のコピー数を算出した。欠失があれば 0.5, なければ 1.0 付近となる。

α_2 , α_1 -globin 遺伝子の両方が欠失していた 46 検体の Real time PCR 結果を表 12 に示した。

表 12 Real time PCR 結果(--/αα)

patient No.	MCS-R2		下流90kb		下流165kb	
	欠失の有無	CNV	欠失の有無	CNV	欠失の有無	CNV
1	有	0.50	無	1.08	無	1.12
2	無	0.91	無	1.15	無	0.99
3	無	0.89	無	1.12	無	0.93
4	無	0.97	無	1.07	無	1.05
5	無	0.88	無	1.11	無	0.96
6	無	0.89	無	1.15	無	1.06
7	有	0.45	有	0.55	無	1.19
8	有	0.46	有	0.42	無	0.97
9	有	0.44	有	0.50	有	0.55
10	無	1.06	無	1.15	無	1.01
11	無	1.04	無	1.12	無	1.08
12	有	0.49	有	0.49	有	0.57
13	有	0.53	有	0.53	有	0.59
14	有	0.42	有	0.45	有	0.56
15	有	0.44	有	0.46	有	0.52
16	無	1.01	無	1.00	無	0.90
17	有	0.41	有	0.57	無	1.15
18	有	0.47	有	0.56	無	1.09
19	有	0.40	有	0.51	無	1.02
20	有	0.44	有	0.52	無	0.99
21	有	0.53	無	1.03	無	0.96
22	有	0.52	有	0.51	無	0.88
23	有	0.50	有	0.43	無	1.09
24	有	0.54	有	0.45	無	1.09
25	有	0.44	有	0.46	有	0.48
26	有	0.52	有	0.47	無	0.88
27	有	0.54	有	0.46	無	1.12
28	有	0.50	有	0.47	無	1.08
29	有	0.50	有	0.51	無	0.90
30	無	0.98	無	0.95	無	1.01
31	有	0.52	無	0.98	無	1.04
32	有	0.46	無	0.94	無	0.95
33	有	0.50	無	1.05	無	1.01
34	無	0.95	無	0.90	無	1.09
35	無	0.94	無	1.06	無	1.00
36	有	0.45	有	0.58	有	0.52
37	無	1.21	無	1.02	無	0.93
38	無	0.97	無	1.19	無	1.12
39	有	0.46	有	0.50	有	0.51
40	有	0.41	無	1.04	無	0.90
41	無	1.02	無	1.04	無	#1
42	無	1.13	無	1.26	無	#1
43	有	0.53	無	1.03	無	#1
44	無	1.11	無	1.20	無	#1
45	無	1.12	無	1.24	無	#1
46	無	1.04	無	1.17	無	#1

#1:下流165kbより上流の90kbが欠失していなかったため測定なし

ddPCR で予測値と違っていた 6 検体の Real time PCR 結果を表 13 に示した。

表 13 Real time PCR 結果(α/α)

patient No.	MCS-R2	
	欠失の有無	CNV
1	有	0.42
2	有	0.50
3	有	0.50
4	有	0.48
5	有	0.42
6	有	0.50

2)考察

Non SEA・FIL 型欠失で予測 CNV 値と一致した検体は 44 検体, HbH 症の Non SEA・FIL 型欠失は 2 検体あった。3 か所の欠失を確認したことにより, 4 種類に分類することができた。この結果より我々は日本人に特有の欠失パターンがいくつかあると考えた。仮に JAPANESE 型欠失①から④とした。 α -globin 遺伝子群簡易図と, 欠失部位をまとめた図を示した(図 12)。90kb より下流に欠失があるものは報告されていないため, 欠失③と④は新規の欠失型である。

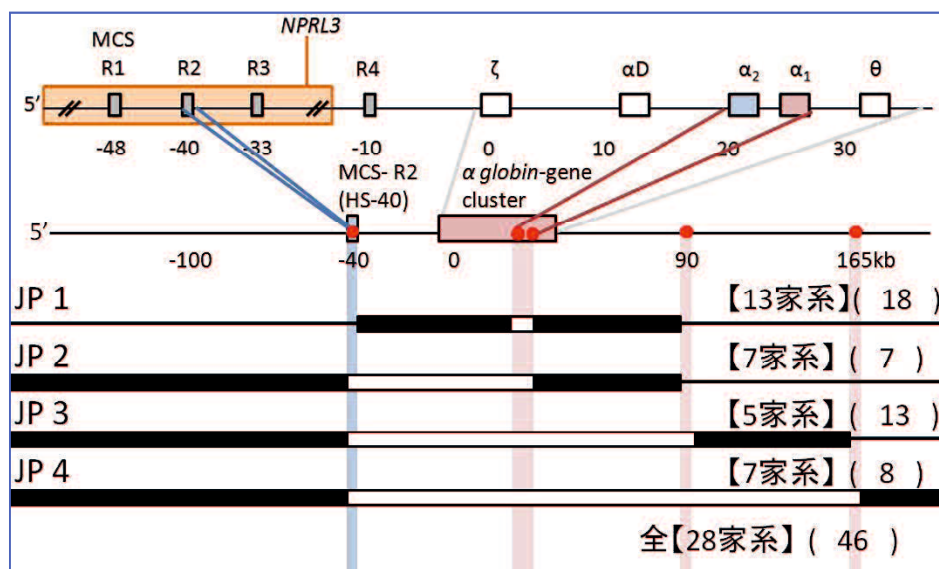


図 12 α_2 , α_1 -globin 遺伝子に欠失のある Non SEA・FIL 型欠失の欠失部位

α_2 , α_1 -globin 遺伝子に欠失のある Non SEA・FIL 型欠失の欠失部位の簡易図を示した。

JAPANESE 型欠失 (JP)①: MCS-R2, 下流 90kb, 165kb どれにも欠失が認められなかった。JAPANESE 型欠失 (JP)②: MCS-R2 に欠失を認め, 下流 90kb, 165kb には欠失が認められなかった。JAPANESE 型欠失 (JP)③: MCS-R2, 下流 90kb に欠失を認め, 165kb には欠失が認められなかった。JAPANESE 型欠失 (JP)④: MCS-R2, 下流 90kb, 165kb 全てに欠失が認められた。

Non SEA・FIL 型欠失で予測 CNV 値と一致しなかった 6 検体は α_1 -globin 遺伝子, α_2 -globin 遺伝子ともに遺伝子欠失が認められなかった。Real time PCR 法による精査の結果, α -globin 遺伝子群の発現調節領域である MCSR2(HS40)に欠失が存在した。つまり, α -globin 遺伝子の欠失はなく, MCSR2 を含む α -globin 遺伝子群の遺伝子調節領域の異常欠失による α サラセミアであった[8,19-23]。この欠失型を仮に JAPANESE MCS 欠失型とした。 α -globin 遺伝子群簡易図と, 欠失部位をまとめた図を示した(図 13)。

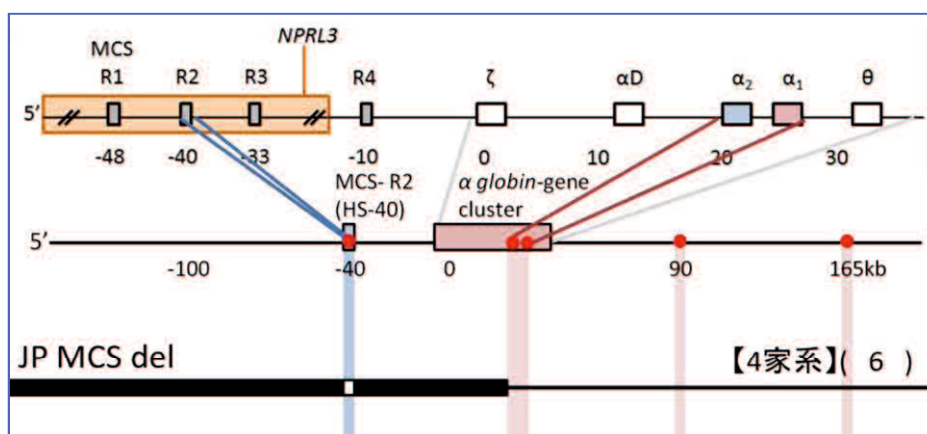


図 13 α_2 , α_1 -globin 遺伝子に欠失のない Non SEA・FIL 型欠失の欠失部位

α_2 , α_1 -globin 遺伝子に欠失のない Non SEA・FIL 型欠失の欠失部位の簡易図を示す。JAPANESE MCS 欠失 (JP MCS del) 型欠失は, α_2 , α_1 -globin 遺伝子に欠失は認められなかったが, 発現調節領域である MCSR2(HS40)に欠失が存在した。

従って, α_1 -globin 遺伝子, α_2 -globin 遺伝子に欠失が存在する全ての α サラセミア症例において, 正確な測定ができたと言える。

我々の研究室で解析した α サラセミアのまとめを表 14 に示した。

表 14 α サラセミアまとめ

Type	n	Frequency(%)
$-\alpha^{3.7\text{or}4.2}\text{Hetero}(-\alpha/\alpha\alpha)$	74	18.3
$-\alpha^{3.7\text{or}4.2}\text{Homo}(-\alpha/-\alpha)$	29	7.2
SEA(--/ $\alpha\alpha$)	206	50.9
FIL(--/ $\alpha\alpha$)	23	5.7
THAI(--/ $\alpha\alpha$)	0	0.0
JP type1(--/ $\alpha\alpha$)	17	4.2
JP type2(--/ $\alpha\alpha$)	7	1.7
JP type3(--/ $\alpha\alpha$)	13	3.2
JP type4(--/ $\alpha\alpha$)	7	1.7
JP MCS-R2 del type($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	6	1.5
HbH(-3.7/SEA•FIL) (- α /--)	43	10.6
HbH(-3.7/JP typr1) (- α /--)	1	0.2
HbH(-3.7/JP typr4) (- α /--)	1	0.2
HbH(α^{CS} /SEA) ($\alpha\alpha$ /--)	7	1.7
total	420	100.0

新しい欠失型を複数確認できた。少なくとも 4 種類の広範囲欠失が存在することがわか

り，また MCS-R2 領域の欠失が原因の α サラセミアも確認できた。

今後は今回明らかとなった JP 型欠失の正確な欠失断端の検索を進めていく必要がある。

VIII. 結語

α-globin 遺伝子発現調節領域である MCSR2(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 6 検体の Non SEA・FIL 欠失型以外の α サラセミアは、ddPCR による測定で予測値と測定値が一致した。これにより、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 α サラセミアの診断が可能であることが言える。

また、追加実験として Non SEA・FIL 欠失型 α サラセミアを Real time PCR を用いて解析した結果、日本人特有の欠失型だと予想できる新しい欠失型が最低でも 4 種類あることが確認でき、MCS-R2 領域の欠失が原因の α サラセミアも確認することができた。

IX.参考文献

- [1] 山城安啓.ヘモグロビン異常症の検査. Medical Tec. 2004;32(6):565-572.
- [2] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway:on protein death and cell life. EMBO J. 1998;17(24):7151-60.
- [3] 服部幸夫, 山城安啓. 単一遺伝子疾患における表現型の多様性.Yamaguchi Med J.2004;53(4-5): 204-5.
- [4] 山城安啓.サラセミアの基礎知識と臨床検査.Medical Tec.2015;43(10):1110-7.
- [5] Higgs DR. The molecular basis of alpha-thalassemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(1): a011718.
- [6] Y Hattori, Y Yamashiro.異常血色素およびサラセミアの遺伝子診断:特に広範囲遺伝子欠失型の欠失断端の決定 [Gene diagnosis of hemoglobinopathies--the determination of breakpoints for a large deletion].Rinsho Byori. 2003;51(6):550-555.
- [7] Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, et al. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood. 1989;73:1081-104.
- [8]D Vernimmen D. Uncovering enhancer functions using the α -globin locus. PLoS Genetics.2014;10(10): e1004668
- [9] Galanello R, Cao A.Gene test review. Alpha-thalassemia. Genet Med.2011;13(2): 83-8.
- [10] Vichinsky EP.. Clinical Manifestations of α -Thalassemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(5):a011742
- [11] Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, et al.Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time

- quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin Chem.* 2013;59(11):1670–2.
- [12] Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol.* 2013;51(2):540–6.
- [13] Pornprasert S, Phusua A, Suanta S, et al. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with SYBR Green1 and high resolution melting analysis. *Eur J Haematol.* 2008;80(6):510–4.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Extraction with phenol :chloroform. In Sambrook J. Fritsch EF, Maniatis T, eds. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1982;9.31-9.58,
- [15] Kusumi M., Katou Y., Takahashi H., et al.: A case of fetal α -thalassemia presenting cardiomegaly and hydrops fetalis. *J Perinatal and Neonatal Med.* 2008; 44(4): 1241–1245. Article in Japanese.
- [16] Jan P. Schouten, Cathal J. M, Raymond W, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.
- [17] T-Y LEE, M-I LAI, V RAMACHANDRAN, et al. Rapid detection of alpha-thalassaemia variants using droplet digital PCR. *Int J Lab Hematol.* 2016;38(4): 435-43.
- [18] Pornprasert S, Prasing W. Detection of alpha(0)-thalassemia South-East Asian-type deletion by droplet digital PCR. *Eur J Haematol.* 2014; 92(3): 244-8.
- [19] Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol*

Chem. 2001;276(17):13505–8.

[20] Carey M. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*. 1998;92(1): 5–8.

[21] Bernet A, Sabatier S, Picketts DJ, et al. Targeted inactivation of the major positive regulatory element (HS-40) of the human alpha-globin gene locus. *Blood*. 1995;86(3): 1202–11.

[22] Higgs DR, Wood WG, Jarman AP, et al. A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. *Genes Dev*. 1990;4(9): 1588–601.

[23] Higgs, DR, Wood WG. Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. *Current Opinion in Hematol* 2008;15(3):176-83