QX Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)を用いた限局性皮質異形成症(FCD)タイプIIbにおける*MTOR* 体細胞モザイク変異率のバリデーション

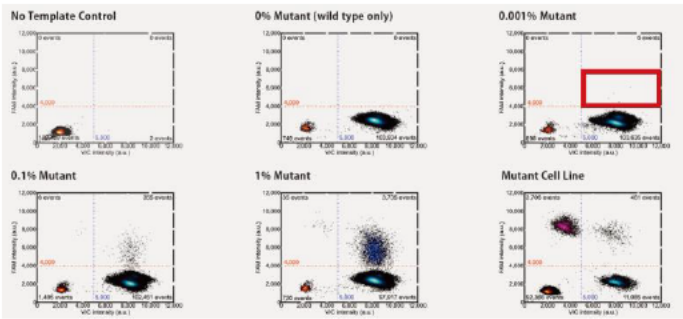
Key words :難治性希少疾患, 体細胞モザイク, NGS, データバリデーション

ddPCR for Rare Mutation Detection

レア変異を高感度に検出するアプリケーションが求められる場合、Droplet Digital PCRは従来の手法よりも優れています。表1に示すようにリアルタイムPCRと比較すると感度や手間に関して有利な点が多くあげられます。

	従来の リアルタイムPCR法	QX ddPCRを用いた 超高感度検出法
感度	1%以下の変異 検出困難	>0.005%の変異を 検出可能
手間	・検量線が必要(相対定量) ・データ間の比較には インターナルコントロール が必要 ↓ アッセイの 構築困難	・検量線が不要(絶対定量) ・データ間の比較には インターナルコントロール 必要なし ↓ アッセイの 構築容易

表1 従来のリアルタイムPCR法との比較
リアルタイムPCR法とQX200 ddPCR法との違いをまとめた。



参考データ1 ddPCRによるBRAF V600Eをターゲットとした変異検出結果(バイオ・ラッド提供※)
TaqManプローブを用いたduplex PCRにより変異検出を行った。FAMプローブのターゲット遺伝子:BRAF V600E, VICプローブのターゲット遺伝子:wild type 0.001%オーダーのMutantの検出に成功した。(上図赤枠部分)

※本データはバイオ・ラッド提供によるものであり(C10561L 1904e, P9)、論文掲載データとは異なります。

Research Background

限局性皮質異形成症(FCD)は、大脳皮質に限局的な発生異常・皮質構造異常を伴い、抗てんかん薬に対し抵抗性を示す難治性てんかんの一つです。FCDは、病理学的に異型細胞は認めず皮質構造異常のみ呈するタイプ I、皮質構造異常に異型神経細胞を示すタイプ II、更に異型性部位とは別に他の病変を伴うタイプ IIIに分別され、このうちタイプ IIは更に、異型神経細胞は認めるがballoon細胞を認めないタイプ IIaと、異型神経細胞とballoon細胞の両方を認める IIbに分類され、近年徐々に原因遺伝子の同定が進みつつあります。

孤発性で原因同定が困難であった難治性希少疾患の原因遺伝子同定には、近年の著しい次世代シーケンス(NGS)技術の進歩が大きく寄与しており、FCDを含む難治性希少疾患に関する研究も日々進展しつつあります。

しかし病因が、一般的な生殖細胞系列変異ではなく、体細胞集団の一部の変異(体細胞モザイク変異)に由来する疾患で、さらに罹患組織に潜在する体細胞モザイク変異が低頻度である場合、得られたデータの正確性をNGS以外の方法でバリデーションすることでデータの信頼性は飛躍的に向上します。

ddPCRはサンプルを多数の微小区画に分割し、一区画当りの変異存在比を上昇させることにより、従来型のqPCRでは詳細解析が難しかった数%以下の変異解析データの信頼性を向上させます。今回の文献中でのQX200 ddPCR使用に関しまして下記の特長およびメリットが挙げられます。

Application Advantages

- これまでqPCRでは精確な検出が難しかった低頻度の体細胞モザイクの詳細測定が可能
- 次世代シーケンサ(NGS)データの詳細なバリデーションによりデータの信頼性の飛躍的向上が可能
- NGSを用いたゲノム創薬などのスクリーニングデータのバリデーションなどにも有用

BIO-RAD

Content

今回、横浜市立大学 医学部 遺伝学教室　松本 直通先生のグループがAnnals of Neurology 誌でご報告された *MTOR* 遺伝子における低頻度体細胞変異が引き起こす限局性皮質異形成症（FCD）タイプIIbについてご紹介します。

論文には同一患者由来のペアサンプル（病巣：脳、正常対照部位：血液）を用い、NGSとQX ddPCRという異なる2つの方法で*MTOR*遺伝子変異モザイク率の比較を行った結果、見された体細胞*MTOR*遺伝子変異のアミノ酸配列ドメインの同定、さらに同定した*MTOR*遺伝子変異と基質タンパクとを導入したHEK293T細胞でのキナーゼ活性の変化など数々の興味深い結果が掲載されています。詳細は下記Publicationに記載されている論文をご参照ください。

Conclusion

今回の論文により、難治性希少疾患である限局性皮質異形成症（FCD）の原因遺伝子の一つとして*MTOR*遺伝子の活性型低頻度体細胞モザイク変異が同定されました。

更に、これら変異体のうち一部では*MTOR*アロステリック阻害剤であるラパマイシンに感受性を持つことから、これら変異を持つFCDタイプ IIb患者の難治性てんかん症状軽減にラパマイシン系の薬剤が使用できる可能性も示唆されました。

変異アリル頻度が1%付近の低頻度の体細胞モザイク変異のバリデーション・確認では、リアルタイムPCRでは検出することが困難です。よってQX Droplet Digital PCR（ddPCR）は、存在比率が極めて少ない体細胞モザイク変異の検出や正確なモザイク率の検討に大変有用なツールであると考えられます。

※ 本資料作成に当たり、横浜市立大学 医学部 遺伝学教室　松本 直通先生より監修を頂いております。

Publication

Somatic Mutation in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type Ⅱb

Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, Shiina M, Shirozu H, Masuda H, Watanabe K, Ohba C, Tsurusaki Y, Miyake N, Zheng Y, Sato T, Takebayashi H, Ogata K, Kameyama S, Kakita A, Matsumoto N.

Ann Neurol., 2015 May 78(3)

Related Articles

・**Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells**
Abyzov A, Mariani J, Palejev D, Zhang Y, Haney MS, Tomasini L, Ferrandino AF, Rosenberg Belmaker LA, Szekely A, Wilson M, Kocabas A, Calixto NE, Grigorenko EL, Huttner A, Chawarska K, Weissman S, Urban AE, Gerstein M, Vaccarino FM.
Nature. , Dec 2012; 492(7429):438-42.

論文検索サイト

ddPCRを用いた論文の検索サイトはこちら（**www.bio-rad.com/ddPCR/publications**）

BIO-RAD　バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社　取扱店

ライフサイエンス　www.bio-rad.com
本　社　〒140-0002　東京都品川区東品川 2-2-24　TEL：03-6361-7000
大阪営業所　〒532-0025　大阪市淀川区新北野 1-14-11　TEL：06-6308-6568
福岡営業所　〒812-0013　福岡市博多区博多駅東 2-5-28　TEL：092-475-4856
※学術的お問い合わせは　TEL：03-6404-0331

※価格(税抜き）、仕様などは予告無く変更することがありますので、ご了承ください。
※価格は2019年7月現在のもので、メーカー希望小売価格（税別）です。
※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。

C12121L 1907a