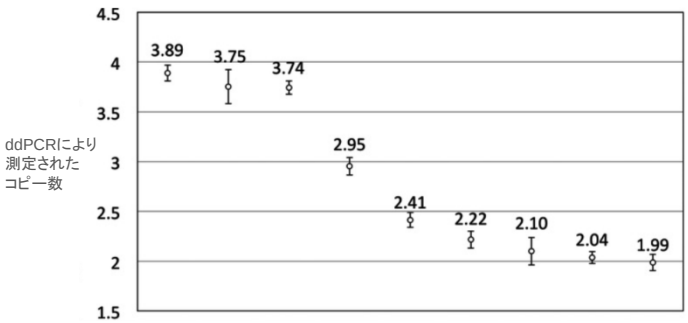
QX Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)を用いたPallister-Killian症候群（PKS）における12p イソ染色体モザイク率・コピー数のFISH法との定量比較

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

Research Background

Pallister-Killian症候群（PKS）は通常2コピーの12番短腕染色体が、マーカー鏡像染色体（イソ染色体）により、4コピーにとなる事により発症する染色体異常症の一つです。PKSの染色体異常は核型正常細胞とマーカー染色体を有する核型異常細胞が混在したモザイクを呈します。PKSの症状として重度の精神運動発達遅滞、難聴、さらに高頻度のてんかん、先天性心疾患、胃食道逆流症といった合併症を伴うことから、出生後なるべく早期かつ堅牢なPKS診断法の確立により、早期治療による重篤な合併症の回避が望まれます。

通常こうした染色体異常は末梢血リンパ球を用いたGバンド分析による核型分析やFISH法などが利用されますが、残念なことにPKSでは末梢血リンパ球での12p過剰染色体の検出は難しく、またさらに皮膚繊維芽細胞や口腔粘膜検体を用いた場合でも、モザイク率が数%台と低い場合では、FISH法での1患者あたりの解析細胞数は、10^2細胞以上を必要とするため、熟練した技師ですら非常に大きな負担を強いられるとともに、技師ごとのばらつきの原因となる可能性も危惧されます。



	PKS1	PKS2	PKS3	PKS4	PKS5	PKS6	PKS7	Control	PKS8
Mosaic ratio by FISH	85%	78%	77%	67%	27%	9%	17%	Not tested	0%
Copy number	3.7	3.56	3.54	3.34	2.54	2.18	2.34	2	2

図1 FISH法により測定されたモザイク率およびコピー数（表：下段）とddPCRによる実測コピー数（グラフ：上段）の比較・確認
8名のPKS患者および1名の健常人由来皮膚繊維芽細胞株を用いてそれぞれ10^2細胞の12pイソ染色体のFISH分析を行い算出したモザイク率と予想コピー数（表：下段）を、ddPCRを用いて測定した12pイソ染色体のコピー数（グラフ：上段）を用いて比較した。

Content

今回、東京大学　分子細胞生物学研究所　ゲノム情報解析研究分野　泉幸佑先生と白髭克彦先生のグループがMolecular Genetics & Genomic Medicine誌でご報告されたドロップレットデジタルPCRを用いたPallister-Killian症候群における12pイソ染色体のモザイク率定量についてご紹介します。

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%以下の染色体変異モザイクのデータ解析の信頼性を向上させます。今回の文献中で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

- これまで非常に大きな労力と熟練した技術が必要とされたFISH法をddPCRで代用できる可能性がある。
- 様々な染色体異常（異数性, 転座, 逆位）を低コスト、かつ短時間（約6時間）で解析できる可能性がある。
- 臨床検体の場合制限される低DNAサンプル量（数10ng）、生存状態が悪い非分裂細胞でも対応可能。
- モザイク染色体異常症で懸念されるPHA(phytohemagglutinin)による選択的細胞増殖によるバイアスの影響を受けにくく出来る。
- FISH法以外にも、アレイCGH法やSNPアレイ法による定量の代用やデータバリデーションなどにも有用。

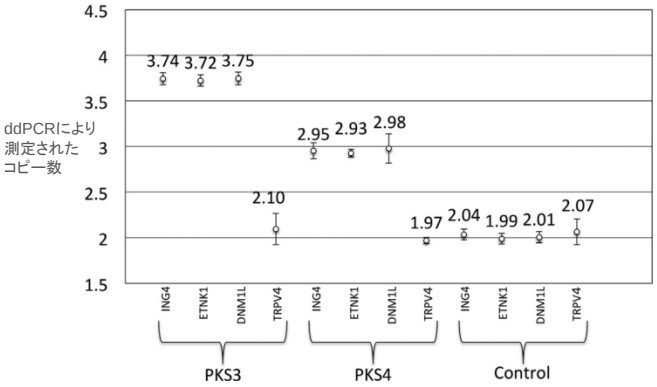


図2　ddPCR法により検出された12pイソ染色体コピー数とPKSの相関
PKS患者では3つの異なる12p領域でのプローブ（ING4, ETNK1, DNM1L）のいずれかを用いた場合でも、同様レベルでのイソ染色体（コピー数の増加）が測定され、12q領域のプローブ（TRPV4）では正常サンプルと同様に2コピー付近のデータが得られた。健常人コントロールでは12p、12qいずれの領域も2コピー付近のデータが得られた。

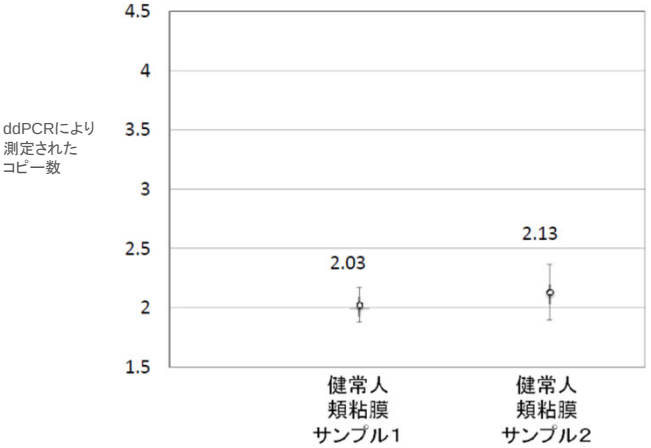


図3　PKS臨床診断検査に用いられる口腔粘膜検体（健常人由来）を用いたddPCR法による測定検証
2名の健常人由来口腔粘膜検体由来のゲノムDNAを用いてddPCR法により12p領域のコピー数を測定した。いずれの検体においても2コピー付近のデータが得られた。

Conclusion

今回の論文により、Pallister-Killian症候群における12pイソ染色体のモザイク率やコピー数の測定をFISH法と同様に正確に行うことができることが示唆されました。これまでのFISH法による解析は、熟練した技師の技術が必要であるとともに、特にモザイク率が低い染色体異常の解析ではコスト面・労力・時間において非常に大きな負担が必要でした。一方で、QX Droplet digital PCR（ddPCR）法では（1）DNAの抽出に約1時間、反応から解析まで3-4時間と短時間で12pコピー数解析が完了できること、（2）特別に熟練した技術を必要とせず解析が可能であること、また(3）臨床サンプルにおける解析に用いるサンプルDNA量やサンプル細胞の質（間期や中期の染色体像を得るために細胞分裂ができる状態であること）の制約を受けにくいといった利点があります。このためQX Droplet digital PCR（ddPCR）は、ゲノム上のコピー数変動やミューテーションのモザイク現象の正確な検出・定量において、研究解析の非常に効果的なツールとなりうると考えられます。

※　本資料作成に当たり、東京大学　分子細胞生物学研究所　ゲノム情報解析研究分野　泉幸佑先生よりデータをご提供頂いております。

Publication

Mosaic ratio quantification of isochromosome 12p in Pallister–Killian syndrome using droplet digital PCR

Katsunori Fujiki, Katsuhiko Shirahige, Maninder Kaur, Matthew A. Deardorff, Laura K. Conlin, Ian D. Krantz & Kosuke Izumi

Mol Gene Genomic Med., 2016;4(3):257–261. Published 2016 Jan 20. doi:10.1002/mgg3.200

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.

・Somatic mutations 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 Sep;78(3):375-86.

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。

C12127L 1907a