

「ジストロフィン遺伝子解析」の 検査法、精度等について

1. ジストロフィン遺伝子解析の特徴について

a)解析手法

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法 (MRC-Holland b.v.社開発)

【Schoultens J P et al : *Nucleic Acids Res* 30: 1155-1159 (2002)】

b)MLPA 法の概要

MLPA 法は、共通 PCR プライマー配列を融合させた特異プローブを標的領域にハイブリダイズ後、PCR 増幅を行い、その増幅産物の量的変化(図 4)を指標にして、標的領域を含む比較的大規模のゲノム欠失/重複(増幅)を検出することに特化された手法です。

特異プローブは標的領域一部位に対し2種設定し、それぞれが隣接してハイブリダイズするよう設計されています。(図 1)

プローブのハイブリダイゼーション後は、隣接プローブをライゲースにより連結化を行います。(図 2)

プローブは、この連結化行程を経てはじめて、共通プライマー配列を用いた PCR 増幅が可能となります。

さらに、標的配列にハイブリダイズしない合成配列(調節配列)をプローブに融合させることで、その増幅産物長の違いで各標的領域を識別できるよう設計されています。(図 1、3)

MLPA 法では、この調節配列の加減により、異なる約 40 種類を1セットのミックスとしたプローブ設計がされており、PCR 増幅産物長が 130bp~500bp の範囲で、同時に多数の領域を解析することが可能です。

また、この 1 セットに含まれる全てのプローブは、1 チューブ内で同時に PCR 増幅を行うことができ、多検体同時測定が容易です。さらに、出発材料であるゲノム DNA の必要最低量は 20ng と、比較的少量から測定が可能であると共に、全てのプローブが同一の反応条件で PCR 増幅できるので、増幅効率や定量性に優れます。

c)MLPA 法による、ジストロフィン遺伝子解析の特徴

デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー症例を対象とした MLPA 解析(P034/P035 DMD キット使用)では、ジストロフィン遺伝子の各エクソンの特定の部位を標的としたプローブ(P034とP035に2分割されています)のセットを組み合わ

図 1. プローブの設計

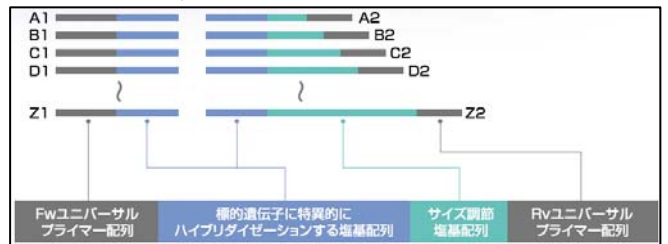


図 2. プローブのハイブリダイゼーションとライゲースによる一本化

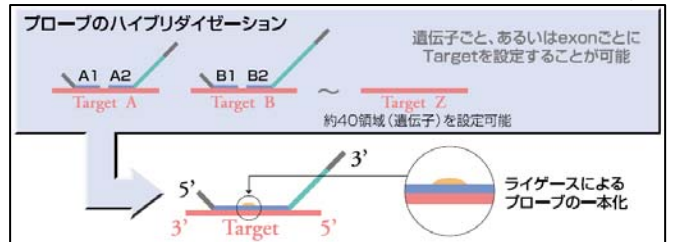


図 3. プローブの PCR による増幅

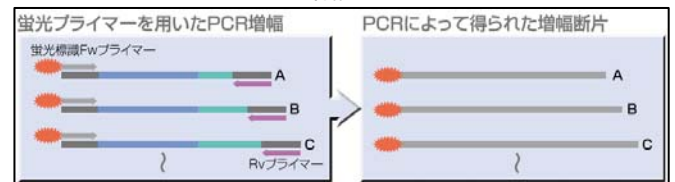
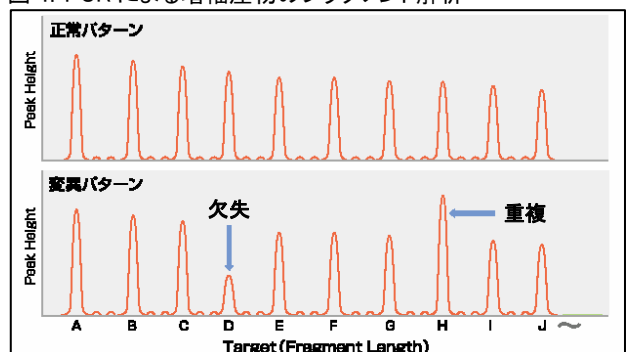


図 4. PCR による増幅産物のフラグメント解析



※図 4 は MLPA 法の理解のための概念図であり、患者測定データではありません。

せた解析により、ジストロフィン遺伝子の全 79 エクソンについて欠失/重複変異の有無を同時に検索します。

2. 検体の採取について

末梢血 7ml 程度をご提出いただきます。

採血した血液は、4℃で保存、輸送をお願いいたします。

検体受領後は、血液からゲノム DNA を抽出し、MLPA 解析に用います。

3. 精度管理上の留意事項について

①MLPA 法においては、プローブを PCR 増幅する工程を含みますので、微量のコンタミネーションが変異の判定結果へ大きく影響する場合があります。採血および検体の取扱いについては十分な注意が必要です。

②MLPA 法は、プローブが結合するターゲット領域を含む比較的大規模なゲノム欠失/重複を検出する(デュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィー患者の約 70%*)手法であるので、それ以外のミスセンス変異、ナンセンス変異及び数塩基レベルの微細な欠失/重複や挿入変異の検出はできません。

*参照【足立佳代, 他:ジストロフィン異常症 76 家系の遺伝子診断 脳と発達 34:391-397(2002)】

③MLPA 法において用いる各プローブは、40～60bp 程度の遺伝子配列を結合ターゲットとして設計されています。したがって、各プローブ設計配列以外の領域のみで大きな変異が生じて、それがプローブの反応性には影響しませんので、変異を検出することはできません。

④プローブのライゲーション部位周辺 3～4 塩基内に、SNPs(一塩基多型)などによるターゲット配列とのミスマッチがあると、プローブ増幅シグナルが低下する場合があります。特に、ライゲーション部位に隣接する塩基のミスマッチは、シグナルに大きく影響する可能性が高く、欠失変異と同程度の低下度を示す場合がありますので注意が必要です。

MLPA 法によりジストロフィン遺伝子の単一のエクソン領域にのみ欠失変異が検出された場合は、PCR 法やダイレクトシーケンシング法などの、別手法による追加確認試験が推奨されます。

4. 結果の解釈について

■ジストロフィン遺伝子の欠失/重複変異が認められた場合

患者はデュシェンヌ型、もしくはベッカー型筋ジストロフィーであることが考えられます。

(デュシェンヌ型かベッカー型かの判断は、遺伝子変異断端の詳細な塩基配列決定や、筋生検の実施が必要な場合があります。)

また、ジストロフィン遺伝子の単一のエクソン領域にのみ変異が疑われた場合は、SNPs などのミスマッチ配列の影響による疑陽性も考えられますので、患者がデュシェンヌ型/ベッカー型筋ジストロフィーであることの診断は、別手法による追加確認の実施が推奨されます。

■ジストロフィン遺伝子の欠失/重複変異が認められなかった場合

MLPA 法では、ジストロフィン遺伝子の微細な欠失/重複変異や点変異など検出できませんので、本検査の結果からは、患者がデュシェンヌ/ベッカー型筋ジストロフィーではないと判断できません。直接塩基配列決定法など、その他の方法により、ジストロフィン遺伝子の変異が発見される可能性があります。したがって、確定診断のためには、その他の検査の実施が必要です。

5. 検体の保管方法について

ご提出いただいた患者検体(血液、DNA)は、検査終了後 1 年間、当社検査室にて冷凍(-20℃以下)で保存します。保管場所については、入室者が制限される検査室の室内にて施錠保管いたします。

保管された検体は、検査結果の確認など検査目的以外には使用しません。

6. その他

■参考文献

- 1) Schoulten J P et al : *Nucleic Acids Res* **30**: 1155-1159 (2002)
- 2) B. Janssen et al : *Neurogenetics* **6** : 29-35 (2005)
- 3) Valentina Gatta et al : *Hum Genet* **117** : 92-98 (2005)
- 4) Kent K.S. et al : *Clinical Biochemistry* **11**: 228-233(2006)