

Dr. Jan P. Schouten

## Detection of DNA copy number changes and methylation changes by MLPA and MS-MLPA.

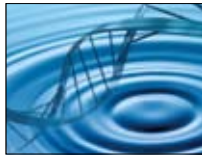
座長の松原先生（東北大学医学部 遺伝病学分野）、ご紹介いただきありがとうございました。そしてここにお招きくださり、MLPA 法の技術についてさらなる詳細を話す機会を与えてくださった主催者の方々に感謝いたします。この日本での素敵な休日と、仙台までの旅と一緒にできた私は非常に幸運です。家族と一緒に、私は美しい都、京都から、九州の温泉、そして広島宮島の宮島と旅行をしてきました。松本の美しい自然も見えました。さらに、富士山では日の出の瞬間まで経験し、そして最後に東京と仙台の街並を見物してきたわけです。

私達にとってこの旅行は非常に楽しいものでした。また、私達は日本の美しさとともに、日本人々が友好的で、親切にもてなしてくださることに感銘を受け、日本に来ることができて本当に良かったと思いました。

また私は、これまで分子生物学の世界に長くいられたことを、非常に幸運だと思っています。最初にクローニングの技術ができた時、私はアムステルダム大学の学生でした。そして、はじめて DNA シークエンシングが行われた時、はじめてサザンブロット法が確立した時、そしてまた、今やはじめてヒトのゲノムが完全に公開され、入手可能になったこの非常に興味深い時に、この分野にいられることを幸運だと感じているのです。

また、今から数年後には 1,000 人分、もしくはそれ以上の完全ゲノム配列にアクセスができるようになり、DNA 配列について何が正常で、何が異常なのかの概観をつかむことが可能となるかもしれません。今非常に大切な時期だと私は思います。それは、今こそ、過去 1970 年代から現在に至るまでに得てきたこの知識の全てを、遺伝性疾患だけでなく、また特にながんの診断法など、遺伝子解析の発展に貢献できる製品に形を変えていく時期であるからなのです。

私は、私達の MLPA 法技術を用いて、また私達の会社 (MRC-Holland 社) として、何か役に立つことをしたいと思っています。この会社は 1985 年に設立されて、既にずいぶん経ちます。私達は酵素や核酸の分野に長年取り組んできました。私達はたくさんの方々の様々な技術を開発してきましたが、研究ではよくあるように、その大部分は有用なものではありませんでした。利用できるものが時には 1 つであったり、全くなかったりするでしょうが、10 も新しいことを開発すればちょっとした成功です。



スライド1

### MLPA : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

- 主要な用途：ヒトDNA配列（例：1つないし複数の遺伝子の全エクソンのわずかなコピー数変化のマルチプレックスな検出）
- 2002年にSchouten JP et al: Nucleic Acids Res.30: e57において初めて発表された。
- 現在では、MLPAの様々な応用に関して、500を超える論文が発表されている。
- 年間1,000,000回以上のMLPA反応が実施されている。
- 75ヵ国以上において、800を超える研究施設が日常的に使用している。
- MRC-Holland社は、様々な用途に応じた250種類以上のMLPAプローブミックスを提供している。
  - 人類遺伝学
  - 細胞遺伝学
  - がん研究
- 詳細についてはwww.MLPA.comを参照

2008年8月

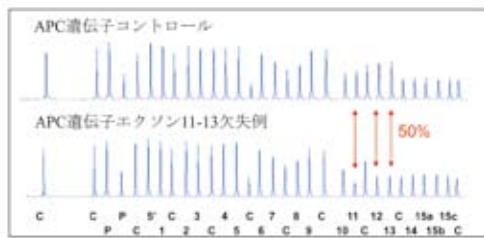


MLPA法が成功し、またそれが今年には100万人以上の患者検体に用いられていることや、75ヵ国以上の異なる国々、また日本でも多くの研究者に利用されているということで、私達は非常に幸運でした。松原先生が先ほどおっしゃったように、これは2002年に私が最初に発表し、そこから先、世界中に広まったのです。私達は全く宣伝を行っていませんが、過去6年間では、MLPA法の有用性について記述された、500以上の学術論文が報告されています。それらの文献が、この方法論や私達の製品の広告となり、そしてそれが世界中に広まっていったというわけです。

2002年以降、毎週、また時には毎日のように、新たな応用法についての要望が私達に届いています。そして私達は、できるだけ多く、その要望にこたえようと努力しています。結果として現在、主にヒト遺伝学の分野、また分子細胞生物学の分野にMLPA法が応用された、250以上の異なる製品が作られています。そして将来的には、がんの鑑別診断や、ファーマコゲノミクス、また他の分野も網羅できることを期待しております。

スライド2

### マルチプレックスPCRの特殊な形状



- 患者サンプルおよびコントロールDNAサンプル双方において、ピークのパターンが形成される。
- ピークの相対的な高さを比較。
- それらの差は、プローブが認識するゲノム配列のコピー数の変化を反映している。1回のMLPA反応で、最大50のプローブを使用可能。

2008年8月



MLPA法とは何でしょうか？ 実は、MLPA法はマルチプレックスPCRの一種といえます。MLPA法では、患者サンプルとコントロール用のサンプル双方でマルチプレックスPCRを行い、それらを比較します。これら2つのサンプルのピークの高さまたはピーク面積を比較すると、いくつかの差があることがわかります。この症例におけるこれらの差は、APC遺伝子のエクソン11、12、13におよぶ欠失によるものです。

MLPA反応は、様々な異なる遺伝子に設計されたプローブのセットを用いて行いますが、それらは私達の会社から購入可能です。例えばAPC遺伝子などの、ある特定の遺伝子の全エクソンのそれぞれに対するプローブを含むものも、入手が可能です。しかし、とあるプローブは、例えば染色体の各サブテロメア領域、またはセントロメア領域、もしくはそれぞれ異なる染色体腕上に座位する、多くの異なる遺伝子にも設計されています。そして、各プローブの設計領域については、それぞれ個別にコピー数を決定することができます。したがって今のところMLPA法は、マルチプレックスなコピー数解析が、主な用途となっています。

スライド3

### MLPAの特徴

- PCRを基本とした反応で、一度に50のゲノムDNA配列のコピー数異常を検出することができます。
- MLPAは、以下の用途にも使用することができます：
  - mRNAの相対定量
  - インプリンティング領域+遺伝子プロモータ領域のメチル化状態の判定
  - 既知の変異およびSNPsの検出
- わずか20ngのヒトDNA（3,000個の細胞相当）で試行することができます。
- わずか1ヌクレオチドの違いも識別することができます。
- MLPAでは、パラフィン包埋組織やホルマリン処理された組織から抽出されたDNAなど、部分的に分解したDNAでも使用することができます。
- MLPAは、標的配列の相対的量的変化を検出する。女性二倍体と三倍体細胞とを識別することはできない。

MRC-Holland  
MLPA

2008年8月

MLPA法を用いると、1回の反応で、ゲノムDNA配列のコピー数変化を、最大50まで検出することができます。後ほどお話しますが、MLPA法はまた、mRNA発現のプロファイリングや、メチル化状態の判定にも用いることもできるのです。MLPA法は、既知の変異の検出にも用いることができますが、ダイレクトシーケンシング法やDHPLC法のような、点突然変異検出法の代わりとして用いることができるような方法ではありません。それらの手法に付け加えて行ったり、補助的な用途で有用していただくための方法です。ダイレクトシーケンシング法やdHPLC法といった方法論では、細胞中にまだ正常アレルが1コピー分存在している場合、もう片方のアレルでは生じている、遺伝子の部分的もしくは完全な欠失を検出することはできないでしょう。

またMLPA法においては、必要なDNAは少量ですし、そして非常に重要な点としては、他の多くの手法では困難な、1塩基単位の配列の違いも識別できるということです。一般的なPCR法では、遺伝子と偽遺伝子を見分けるのは困難な場合があります。

スライド4

### 必要機器



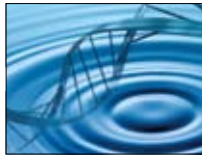
- サーマルサイクラーおよびシーケンサー型の電気泳動解析システムしか必要としない。
- 結果は24時間以内に得ることができる。
- 1回の試験で最大96のサンプルを処理することができる。
- MLPA1反応当たりの単価は約2,000円。

MRC-Holland  
MLPA

2008年8月

MLPA法に用いる機器は、ほとんどの研究室にありますし、私達が機器を売る必要はありませんので、それが大きな助けとなっています。事実私達は、現在MLPA法を使用している研究室については、すべからく訪問して、案内対応する必要性はありませんでした。

とても簡便なプロトコルで、シンプルな手法でありますので、試薬を私達か、もしくは代理店から購入するだけで、すぐに使用することができます。



スライド5

### MLPAの原理

- サンプル中の核酸ではなく、サンプルに添加されたプローブがPCR反応によって増幅される。
- 各プローブは、2つのオリゴヌクレオチド鎖から構成される。
- プローブの標的配列がサンプルに存在した場合、隣接するように2つのプローブが互いにハイブリダイズし、ライゲーションによって連結される。
- これらの連結化プローブは、マルチプレックスPCRで増幅される。
- 各プローブは、固有の長さの増幅産物を生成する。
- 全てのフラグメントの増幅において、わずか1組のPCRプライマーしか必要としないため、PCR反応の再現性が非常に高い。
- 増幅産物 (130-490nt) は、キャピラリー電気泳動によって解析される。
- サンプル中のプローブ標的配列の相対量の違いは、サンプルとコントロール間で、PCRピークの相対的な高さの違いとあらわれる。

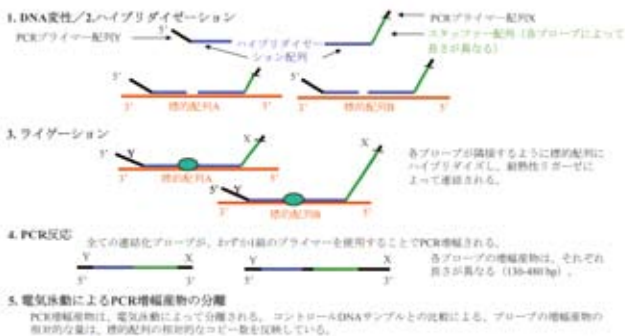
2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

では、MLPA法の原理はどのようなものなのでしょうか？  
MLPA法は一般的なPCR法とは異なり、検体中の核酸の増幅は行いません。DNAサンプルに添加されたプローブだけを増幅するのです。各プローブは2本のオリゴヌクレオチド鎖で構成されますが、そのうち1本はリン酸化されています。それらは隣り合うようにして、サンプルDNA上に即座に結合します。それから双方がサンプルDNAにハイブリダイズすることで、ライゲーション反応による連結化が可能になります。そして、プローブが一旦ライゲーションされると、青いタグのプライマー配列部分になります。それらを用いたPCR増幅が可能になります。MLPA反応においては、50までのそれぞれ異なるプローブ全てが、同じ組のPCRプライマーで増幅されます。それにより、相対的にみて非常に安定性のある、マルチプレックスPCRのシステムを開発することができたのです。

スライド6

### MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)



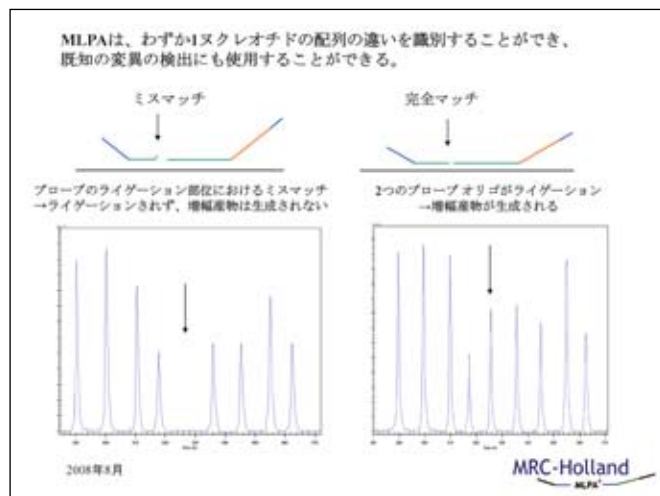
Schouten, J.P. et al. Nucleic Acid Res. 30, 457.

MRC-Holland  
MLPA

このスライド上では、2つの異なるプローブが確認できますが、それらはこのようにそれぞれの標的配列に対しハイブリダイズします。結合配列が異なることに加えて、それらにはもう一つ違いもあります。各プローブのそれぞれが増幅してできる、産物の長さが異なるということです。私達の製品においては、最も鎖長の短いプローブですと、約130ヌクレオチドの増幅産物が得られます。そして最長のプローブの場合は、500ヌクレオチドに近い増幅産物となります。それら全ての増幅産物は、キャピラリー電気泳動によって、非常に良好に分離されます。また、患者サンプルとコントロール用のサンプルとで、それぞれから得られるPCRピークのプロファイルと比較すると、患者サンプルにおける各領域の量的な差がわかるようになるのです。

この手法は全体的にいって、非常に操作が簡単です。まずDNAを変性させます。次にプローブを加え、そのプローブを一晩の間ハイブリダイズさせます。そして次の日の朝、プローブをライゲーションさせるのです。それからPCR法によってライゲーション産物の増幅を行い、その後そのPCR産物を電気泳動で分離します。ですから、24の異なるサンプルを試験するとしても、手技にかかる時間は合計でも2時間以内となります。

スライド 7

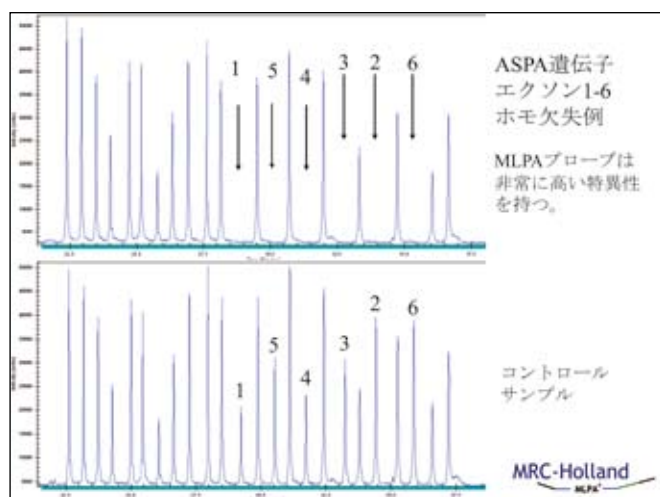


プローブが PCR 増幅されるためには、それらのライゲーション反応を必要しますので、ライゲーションサイトにおける1塩基のミスマッチや、プローブ配列とサンプルの配列間のどこかで1塩基の相違があると、ライゲーション反応が抑制されることで、増幅産物の生成が容易に阻害されてしまいます。

多くの用途においては、解析対象の遺伝子なのか、相同遺伝子なのか、もしくは偽遺伝子なのか識別できることが、非常に重要となります。特定の点突然変異を検出するためにおいてもそうですが、MLPA法が1塩基変異に対する感度を持っている理由は、その理屈からくるのです。

ライゲーションサイトでミスマッチがあると、増幅産物は生成されません。完全に一致する場合に、ライゲーション産物が得られ、そして増幅産物が生成されるのです。

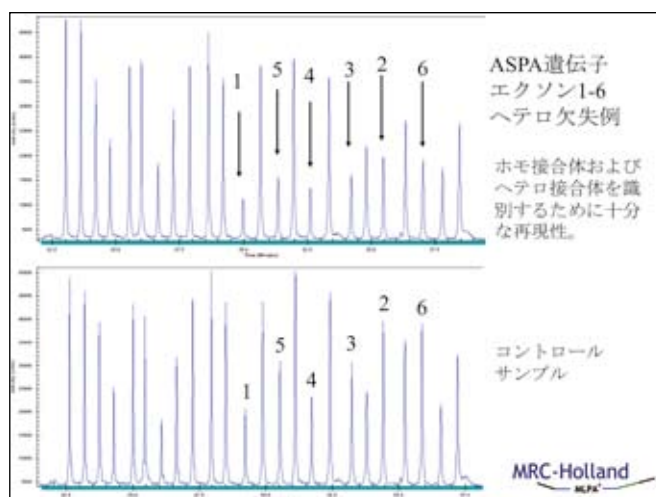
スライド 8

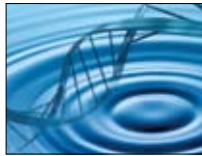


このスライドでは、遺伝子の全欠失がみられるサンプルをお示ししています。ASPA 遺伝子ですが、それは6つのエクソンのみで構成されています。ホモ欠失のサンプルでは、ASPA 遺伝子特異的なピークはまったくみられません。

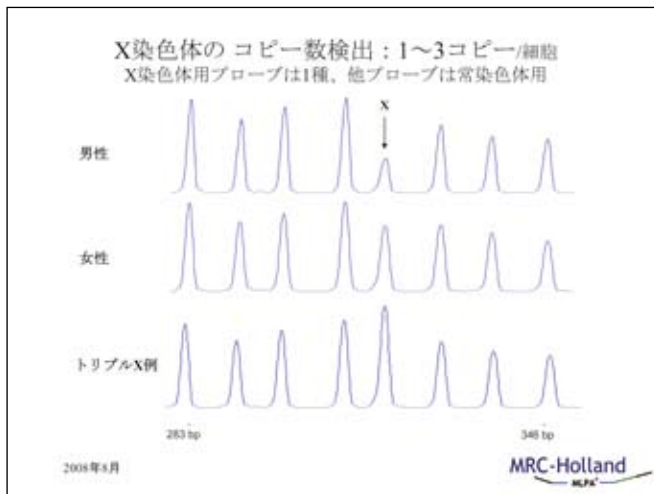
このスライドでは、プローブによって検出され得る領域がまったく存在しない場合には、そのバックグラウンドも非常に低くなることわかります。

スライド 9





## スライド 10



さらにMLPA法では、1細胞中において、遺伝子が0コピーなのか2コピーなのかを識別できるわけではありません。特に、非常に重要であることは、1コピーから2コピーの識別ができるという点です。したがって、プローブが標的とする領域の、ヘテロ接合性の欠失を検出することができます。

実際に、ある特定の配列から、それが0コピー、1~3コピーであるのか、もしくは4コピーであるかさえ、非常に良好に識別することができます。また、1回の反応で、50の異なる配列に対してそれが可能なのです。

さすがに10や11コピーもの識別については信頼性はありませんが、ほとんどの用途においては、それは必要ではないでしょう。もちろん、がん組織における遺伝子増幅も検出することが可能ですが、強度に遺伝子増幅が生じている場合ですと、正確なコピー数は、必ずしも容易には決定できません。

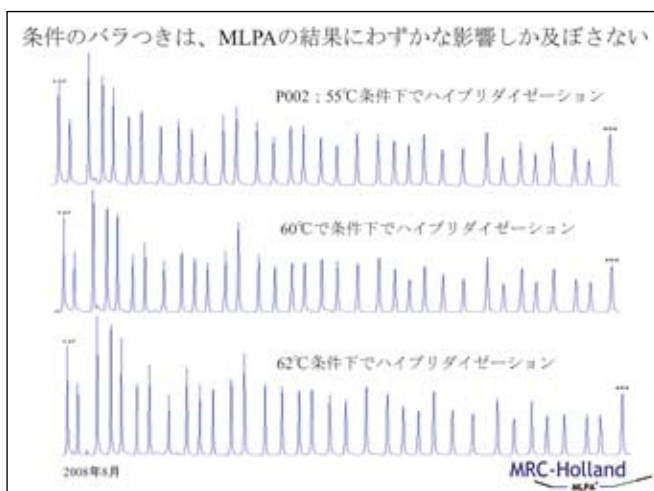
とはいえMLPA法によれば、1細胞中における遺伝子が0コピー、1~4コピーなのかについては、容易に識別ができます。

## スライド 11



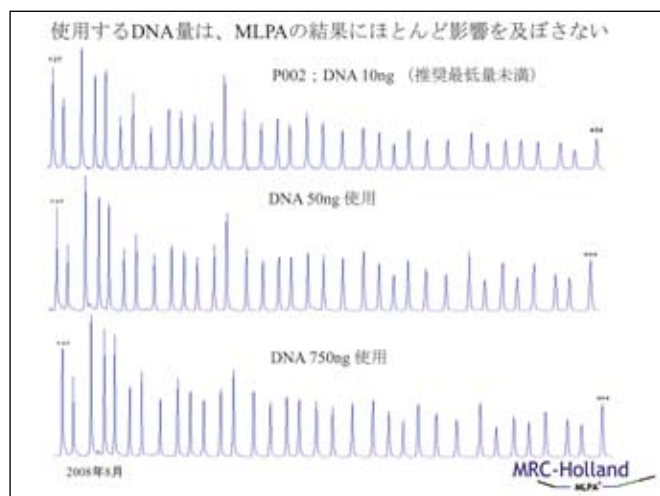
先ほどお話ししたように、MLPA解析のプロトコールは非常に簡単です。まずDNAを変性させ、プローブを添加し、一晩の間ハイブリダイゼーション反応を行った後、15分間のライゲーション反応を行います。それからPCR増幅を行い、キャピラリー電気泳動を行います。そして最後に、その結果の分析を行う必要があります。

## スライド 12



一般のマルチプレックスPCR法と比較して、MLPA法はずっとより安定した結果を出せるシステムです。ハイブリダイゼーション反応においては過剰のプローブを使用しますので、反応温度や時間に多少の差があっても、それによるピークパターンへの影響はありません。PCR反応にも、一組の共通プライマーしか使用しませんので、反応条件の差による変化も軽微です。

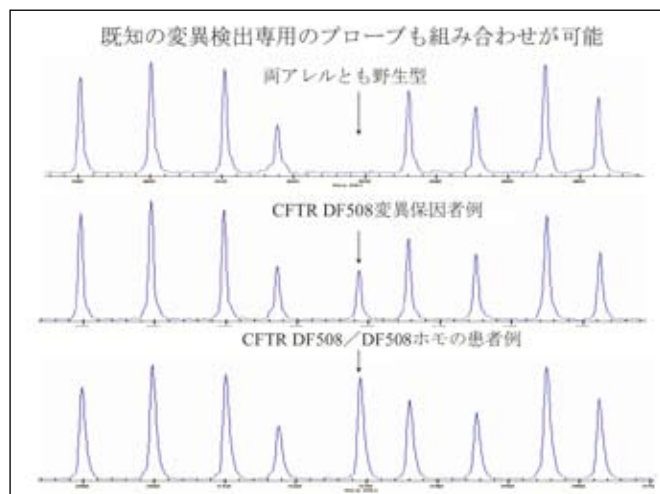
スライド 13



また、MLPA 法ではピークの高さや面積を相対的に比較して解析するだけですので、反応ごとで、必ずしもそれぞれ同じ DNA 量を用いる必要もありません。とあるサンプルでは DNA50ng、また他のサンプルでは 200ng または 500ng であっても、それらを比較することができるのです。

しかし一方で大事なことは、後ほどそれについてはお話ししますが、一般の PCR 法と比較して、DNA の質がより重要となります。MLPA 法では、DNA サンプル中の不純物や、DNA サンプルの精製法の違いに、より敏感なのです。それが原因で、異なる研究室で精製された DNA サンプルでは、比較が困難な場合があるのです。

スライド 14



MLPA 法のいくつかの応用例としては、コピー数解析用のプローブと、既知の突然変異を検出するためのプローブを一緒に組み合わせることが、とても有用となります。このスライドで示しておりますように、野生型ではなく、逆に変異特異的なプローブを、点変異の検出に用いることができます。

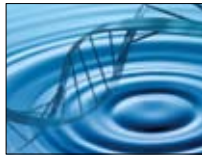
スライド 15

### MLPAの主要なアプリケーション 変異検出の用途として

- ダイレクトシーケンス法、DHPLC法、SSCE法および、その他の点変異検出用の手法では、エクソンの全領域のコピー数変化を検出することはできない。
- FISH法では、これらの小さな変異を検出することができない。サザンプロット法は手間がかかる。リアルタイムPCR法は数コピー足らずの変化に対する感度が低く、マルチプレックスな解析法ではない。
- 全エクソン領域における欠失の頻度は、遺伝子によって異なる。
  - 多くの場合、全変異の2～5%で検出される。
  - 遺伝子の多くでは、5～20%の検出率となる。(例：APC、MSH2、SPAST、PARK)
  - DMDでは、全変異の65%が欠失/重複!
- 100種類以上の遺伝子を対象としたMLPAプローブミックスが利用可能。
  - BRCA1、MSH2、MSH6、MLH1、DMD、APC、NF1、NF2、VHL、FBN1、PARK、CFTR、SPAST、RB1、NSD1、MECP2.....

2008年8月 MRC-Holland MLPA

私達のスタート地点でもありましたが、現在 MLPA 法の主な用途は、遺伝子変異の検出です。みなさんご存じのように、ダイレクトシーケンス法、DHPLC 法や、新規技術である高感度融解温度曲線解析 (HRM: High Resolution Melting temperature analysis) などが、点変異検出用の技術として主に使われています。しかしながら、これらの技術では、正常アレルがまだ片方で存在している場合、全てのエクソンそれぞれについて、そのコピー数変化は検出できませんし、遺伝子の全欠失であっても検出できません。またそれらはたいていの場合、欠失/重複変異の規模が検出限界より小さすぎて、FISH 法は用いることができません。遺伝子を分断させるような欠失や重複変異の多くは 10kb より小さく、一方 FISH 用プローブは 100kb の規



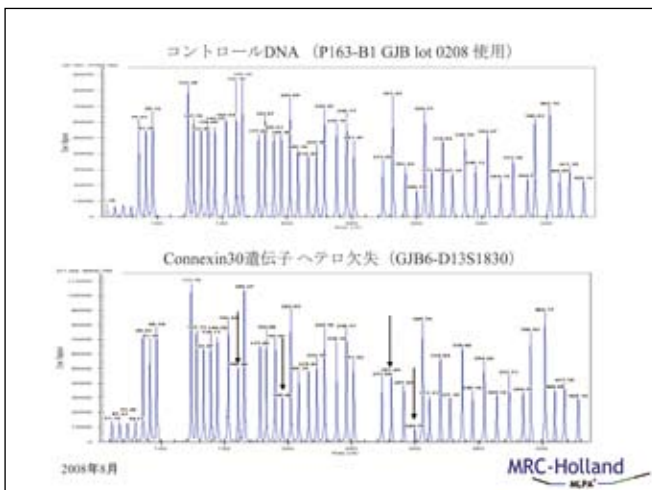
模にも及びます。FISH 法はまた、マルチプレックスな技術としては現実的ではありません。したがって、遺伝子を不活性化させるような欠失や重複変異の規模が小さいものについては、FISH 法で検出するのは非常に困難です。リアルタイム PCR 法は小規模のコピー数変化に対しては感度が低いですし、現実的なマルチプレックス法ではありません。例えば、DMD 遺伝子の 79 エクソン全てに対して、欠失変異のスクリーニングを行なうためには、リアルタイム PCR 法では実に多くの異なる試験を行うことが必要となるでしょう。

遺伝子を不活性化させるような欠失 / 重複変異の頻度に関しては、様々な遺伝子ごとで大きく異なります。ある遺伝子では、検出される全ての変異の 2%または 5%にすぎないこともあります。これは点変異がずっと多くみられるためです。しかし MSH2 遺伝子や SPAST 遺伝子、または Parkinson 遺伝子の主要なものについては、20%またはそれ以上で検出される場合もあります。そして、巨大な DMD 遺伝子については、点変異よりもエクソン単位の欠失や重複変異がより頻度が高く、全患者の 65%において、その原因としてみとめられます。ですから、私達は研究者の要望にこたえて、多くの異なる遺伝子を対象としたプローブミックスを開発してきました。私達は今でも、新しい遺伝子についての要望を受けていますし、しばしば稀少疾患に係る遺伝子についての要望も受けます。このようにして、私達は多くの新しい MLPA 製品の開発を続けています。

強調したい点が 1 つありますが、これは私の考えですが、患者それぞれに対してゲノムワイドなスクリーニング方法を用いるよりも、むしろ、異なる疾患それぞれに対して、製品が個別に分れているということが、非常に重要であるということです。ある人が、自分の家族に大腸がんの遺伝的な素因がみとめられる可能性があるため、検査を受ける場合、調べようとしている以外のことは、知りたいとは思わないでしょう。パーキンソン病の素因を持っているのか、または若年性アルツハイマーの素因があるのか、あえて知りたいとは思わないでしょう。仮にそれらがあったことがわかったとして、その事実を耐えるのは非常に難しいことです。ですから、皆さんが検査を行うなら、皆さんが知りたい特定の遺伝子についてのみ特化された、遺伝子検査を用いるべきなのです。ルーチン的な検査の場合は、皆さんは不必要な情報をたくさん得ようとは思わないでしょう。

私の考えでは、今ますます使われるようになったマイクロアレイ法は、研究分野においては完璧なツールです。私は、それらが将来的にはさらに広く用いられ、そこからより多くの事実が得られるようになることを望んでいるのです。しかし、DNA 検査室での一般的な用途においては、よりシンプルな技術が必要なのです。マイクロアレイ法をルーチン検査として使用するにしても、その資金もありませんし、全てのアレイ実験の結果を正確に解釈できる専門家は多くないと思います。したがって、私の考えでは、特定の疾患に関する遺伝子のみを対象とした、より多くの個別に特化された検査が必要だと思います。

## スライド 16



これは典型的な遺伝子欠失の例ですが、この例では難聴遺伝子を扱っています。GJB3 遺伝子欠失により、4 つのプローブのピーク高が 50%の減少を示しています。実際にこれは、この遺伝子で頻繁にみられる変異で、その他の手法ではなかなか検出されないものとなっているのです。

スライド 17

MLPAの主要なアプリケーション  
微細欠失症候群

- SALSA MLPA kit P245 Microdeletion syndromesは、1反応で20種類の異なる微細欠失症候群の責任領域を検出することができる！各症候群に対応したプローブが2~3種類ずつ含まれている。
  - Williams症候群；Prader-Willi/Angelman症候群；NF1；Cri-du-Chat症候群；DiGeorge症候群（22q11+10p15）；Miller-Dieker症候群；Langer-Giedion症候群；MECP2/Xq28増幅；1p36；2p16；3q29；9q22；15q24；17q21；Smith-Magenis症候群；Sotos症候群；WAGR症候群；Phelan-McDermid症候群；22q13；Wolf-Hirschhorn症候群
- 微細欠失症候群に関しては、各責任領域により多くのプローブが設計された、専用のSALSA MLPAキットも購入可能。
  - P250 kit（DiGeorge症候群用）
  - P026 kit（Sotos症候群用） など

2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

MLPA法のもう1つの主な応用法は、特に精神遅滞がみられる小児の、微細欠失症候群における解析です。私達は21の異なる微細欠失症候群を、1つのMLPAキットに組み合わせましたし、また、マイクロアレイ法を用いた研究で、昨年発見されたばかりの微細欠失症候群も、いくつか組み込みました。

これら新規の症候群では多くの症例で、明確な表現型がありません。私達はこれを精神遅滞がみられる全ての小児に対し、最初に行う検査の1つとして推奨しています。

これは21の異なる微細欠失症候群がカバーされた、一般的なキットであるP245キットですが、これにより微細欠失が検出された場合は、別の二次的なMLPA解析で、追加確認することができます。特定の微細欠失症候群ごとで、より多くのプローブが適用されている個別のMLPAキットがあるのです。

スライド 18

MLPAの主要なアプリケーション  
サブテロメア領域のスクリーニング

- P036およびP070プローブミックスには各々、1回のMLPA反応においてあらゆるサブテロメア領域を対象とするプローブが、1つずつ含まれている。
- P036またはP070で得られた結果を迅速に追加確認するため、ほとんどのサブテロメア領域に特別対応した専用のプローブミックスを販売している。
  - P208プローブミックスは、9q用に13種類のプローブ、10q用に8種類のプローブ、11q用に14種類のプローブ、12q用に9種類のプローブが設計されている（全て、これら遺伝子の6 Mb端）。
- 精神遅滞患者に対しては、P245（微細欠失症候群用）+P036（サブテロメア領域用）の両方の使用が推奨される。MLPAは比較的安価なため、軽度精神遅滞患者に対する検査の適用も受け容れられやすい。
- セントロメア領域用のプローブミックスも購入可能（P181/P182）。これらは、マーカー染色体を含んだサンプル解析に使用できる。

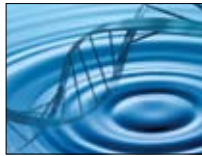
2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

同様に、特に精神遅滞のみられる患者において、サブテロメア欠失におけるコピー数変化を検索することもできます。各サブテロメア領域全てについて、それぞれ1つずつプローブが設計されている、P036、P070という2種類のプローブミックスがあります。これらはDNAをサンプルとして、サブテロメア領域の構造変異の、初発のスクリーニング検査として用いられています。この初発のスクリーニングの後、陽性が出れば、その検体はいくつかあるサブテロメア領域確認用のプローブミックスを用いて、追加確認が可能です。例えば、これらのプローブミックスの1つでは、9q、10q、11q、12q領域にそれぞれ10ほどのプローブが組み込まれています。これらの追加確認用のプローブミックスを用いることで、サブテロメアの欠失/重複変異の範囲についての情報がさらに得られるのです。

しかし、陽性サンプルに対して、これらの確認用プローブミックスを使用する場合であっても、別のサブテロメア領域のスクリーニング検査を追加で行うことをおすすめします。健常者であっても、サブテロメア領域にはコピー数多型が多くみられますので、これは非常に一筋縄ではいかない方法です。したがって私達は、変異陽性例においては、両親にも検査を行うことをすすめています。子どもに何か変化をみつけた場合、それが1Mbまたは2Mb、もしくはそれ以上の欠失変異の場合であっても、それが真にde novoの変異なのかの確認をしてみてください。なぜなら、健常な両親であってもいく例かは、大規模な欠失/重複変異が見つかることがあったからです。

サブテロメア領域用のプローブミックスと同様に、セントロメア領域用のプローブミックスがあります。例えばそれらは、マーカー染色体を指標としたサンプル解析に対して用いられています。



## スライド 19

### MLPAの主要なアプリケーション 脊髄性筋萎縮症

- SMN1およびSMN2遺伝子は、非常に近縁な遺伝子である。
- 唯一のはっきりとした違いは、エクソン7上の1ヌクレオチドの違いのみである。
- P021 SMAプローブミックス
  - SMN1およびSMN2のコピー数解析が可能
  - 患者サンプルの解析用
- P060 SMAプローブミックス
  - SMN1のコピー数解析が可能
  - 変異保因者のスクリーニング解析用
- 0, 1, 2, 3, 4コピー数のSMN1またはSMN2の存在を、決定することができる。
- 95%の症例において、SMAの原因となるような遺伝子変異を1度のMLPA反応で検出することができる。

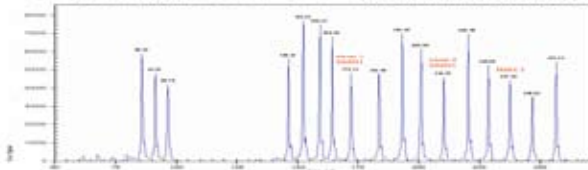
2005年8月

MRC-Holland  
MLPA

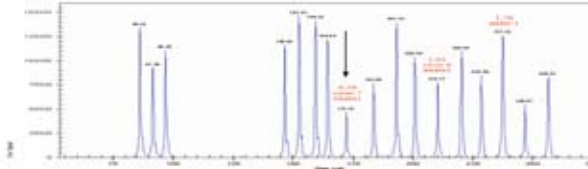
その他の MLPA 法の用途で非常に重要であるものとしては、脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Dystrophy; 以下、SMA) における保因者のスクリーニングです。SMN1 遺伝子と、関連遺伝子である SMN2 遺伝子とは、わずか 1 塩基の違いしかありません。SMN2 遺伝子は、実際には偽遺伝子ではありませんが、その活性はずっと低い SMN 関連遺伝子です。しかしながら、保因者のスクリーニングにおいては、これら SMN1 および SMN2 遺伝子を識別することが重要なのです。

## スライド 20

リファレンス: SMN1 エクソン7 2コピー (SALSA MLPA kit P060 SMA使用)



SMN1 エクソン7 1コピー = SMA保因者



2005年8月

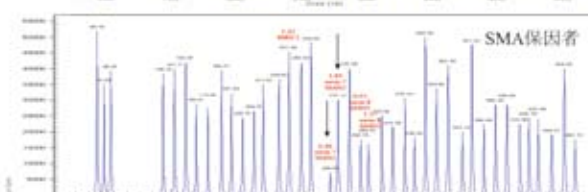
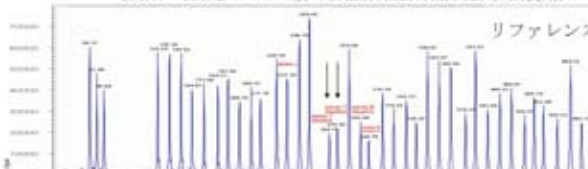
MRC-Holland  
MLPA

そしてこのスライドでお示しのように、P060 という特別なプローブミックスがありますが、これは SMA の保因者スクリーニング用で、SMN1 遺伝子を定量的に解析するものです (SMN2 遺伝子は解析できません)。保因者スクリーニングで唯一本当に重要なプローブは、SMN1 遺伝子のエクソン 7 を対象としたプローブであります。SMA 保因者では、これが 2 コピーから 1 コピーに、50%減少します。

この疾患については、人口の 2 ~ 3%で保因者が存在するのですが、いくつかの国では全ての妊婦で、SMA 保因者検査が病院で提供されています。もしその女性が保因者であるとわかれば、その夫も検査がなされ、そして、両親のどちらも保因者の場合、必要とされれば出生前診断が提供されます。

## スライド 21

SMN1 + SMN2のコピー数 (SALSA MLPA kit P021 SMA使用)



2005年8月

MRC-Holland  
MLPA

SMA 患者の検査については、SMN1 遺伝子だけでなく SMN2 遺伝子のコピー数を解析できる、異なるプローブミックスがあります。SMN2 遺伝子のコピー数が、疾患の進行度合に大変影響するため、この疾患リスクを持つ新生児にとっては、それを知ることも非常に重要なことなのです。

スライド 22

### MLPAの主要なアプリケーション インプリンティング領域

- コピー数の変化およびメチル化状態の変化を1度のMLPA反応で検出することができる。
- ME028プローブミックス：Prader-Willi / Angelman症候群対象  
ME030：Beckwith-Wiedemann / BRS症候群対象
- 現在欧州において、これらの症候群の検査法として、最も広く使用されている。
- 米国のMayoおよびBaylorの両クリニックによって推奨されている検査法である。

2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

その他のMLPA法の重要な用途としては、インプリンティング領域の解析です。最初の方で少しお話したように、MLPA法はメチル化解析にも用いることができますが、それがどのような仕組みになっているのかは、この後で説明します。

MLPA法には、Prader-Willi/Angelman症候群、またBeckwith-Wiedemann/Silver-Russell症候群を対象としたプローブミックスがあります。これらの症候群に関してヨーロッパでは、MLPA法は現在最も多く用いられている検査手法ですし、私達のキット製品は、米国やその他の地域でも、その利用が増加してきています。これらは、両親に検査結果が伝えられるまでに必要な時間が、より短くて済むので、非常に有用だと思っています。多くの国々では、これらの疾患の検査結果が医師から両親へ伝えられるのに、数ヶ月を要しております。それは、サザンブロット法で検査が行われていたり、また、患者のサンプルがいくつか集まってから、検査室がこれらの検査を開始したりしているからです。MLPA法であれば、患者1人だけ、または1組ないし2組の患者の検査であっても行えますし、検査そのものも大変な作業ではありません。

スライド 23

### MLPAの将来的な応用

- ファーマコゲノミクス：コピー数+点変異/SNPs解析
- 腫瘍診断：コピー数解析+メチル化解析+BRAF V600Eなどの一般的な点変異解析
- 微生物のサブタイピング：SNPs+コピー数解析.....
- MRC-Holland社は毎週、いくつかの新規アプリケーションの依頼を受け付けている。
- 毎週のように、新規MLPAプローブミックスを1つずつリリースしている。
- 全ての製品は、病院または大学と共同で開発されている。我々は全てのアプリケーションに関してスペシャリストというわけではない。

2008年8月

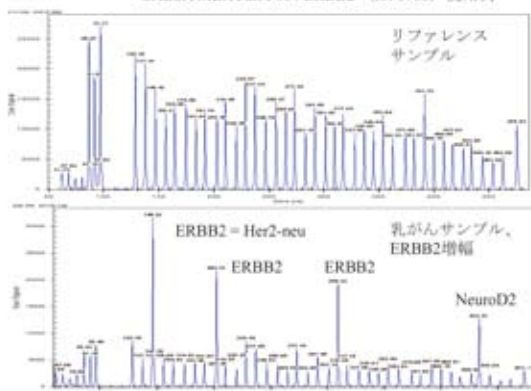
MRC-Holland  
MLPA

将来的に、私はファーマコゲノミクスやがんの診断で、さらに多くの応用ができることを期待していますが、また、微生物学といった分野への応用法もあります。私達は現在、サルモネラ(チフス)菌や結核菌群の識別に用いられるプローブミックスを開発中です。MLPA法は実にベーシックな方法ですから、獣医学分野への応用など、その他さらに多くの分野への応用が可能です。

私達はいくつか新しい応用法への要望を毎週受けていますし、少なくとも1週間に1つはその実現ができるよう努力をしています。結果として現在は、新しい製品が1つは毎週出ているのです。Webサイトには約250の製品が出ていますが、その他、とある特定の研究室で検討中であつたり、または現在開発中の製品が、あと100あります。

スライド 24

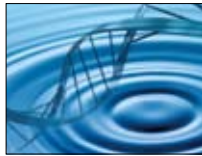
SALSA MLPA kit P004 ERBB2 (lot 0708) 使用例



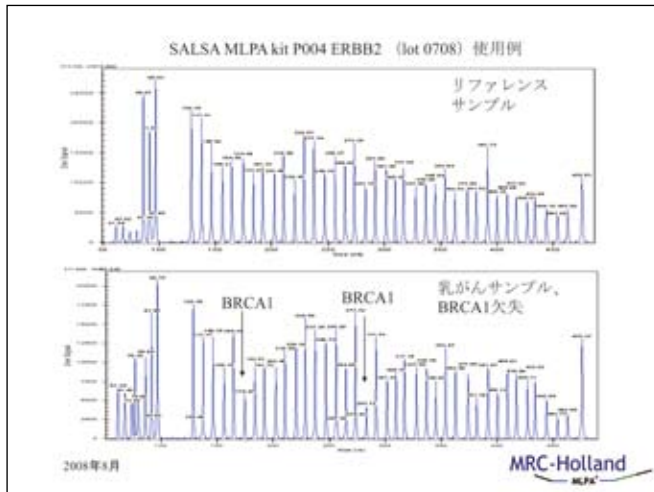
2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

がんの診断領域のお話ですが、このスライドは、ERBB2遺伝子の増幅を示す乳がんサンプルの、典型的な結果を示しています。このP004プローブミックスには、ERBB2遺伝子を対象とした3種類の異なるプローブが含まれています。この3つのプローブ全てが、ERBB2遺伝子の増幅を示しています。その他のプローブについては、ERBB2遺伝子付近の、他の遺伝子についても増幅を示してはいますが、また同じく、TOP2A遺伝子については増幅を示していません。例えばオランダのがん協会などでは、患者に対する最良の治療を決定する上で、こういった結果を用いております。



スライド 25



ERBB2 遺伝子領域に加えて、P004 プローブミックスには、乳がん患者の治療に対して重要となる他の多くの遺伝子も、対象として組み込まれています。

このスライドは、別の乳がん組織において、同じ P004 プローブミックスを用いて得られた結果を示しています。これは、がん組織に BRCA1 遺伝子の欠失がみられた患者で、つまりその疾患の遺伝的な原因が示唆されるということを示しています。同様に、BRCA2 遺伝子についても、またその他の重要な遺伝子についても、同じプローブミックスに対象として組み込まれています。

可能な限り最良の製品を共に開発するためには、MLPA 法のユーザーと、私達の会社との意思伝達が大切だと思います。私達が行っている全ての分野の専門家になることはできません。私達は、全ての遺伝性疾患または微細欠失症候群と同様に、出生前診断、がんの全種類、結核菌のどれをとってもその専門家ではないのです。これらの製品は全て、ユーザーと私達の共同で開発してきました。そして、もし皆さんにいい考えがあったり、アドバイスがあったりすれば、遠慮せずに私達に e-メールでアドバイスをください。皆さんのお考えを教えてくださいと思います。

スライド 26

品質管理は比較的容易

1. プローブの増幅シグナル形成は、2つの異なるオリゴヌクレオチドが必要である：プローブミックスの作成が適切に行われないと、リファレンスDNAサンプルにおいて異常なピークパターンとして現れる。
2. 全ての試薬が液体である。
3. プローブミックスのバッチサイズは>50,000反応が可能
4. 試薬のバッチサイズは>300,000反応
5. 人工的な陽性コントロールを作成することができる。プローブによって検出される配列（例：変異特異的なプローブによって検出される配列）の全てを含むプラスミドなど、ヒトDNAと人工プラスミドを混合することで、複数のプローブの重複と同じ状態にできる。
6. 全てのプローブミックスには、以下を用途としたコントロールフラグメントが含まれる：
  1. 使用したサンプルDNAの量の検定
  2. サンプルDNAの変性度合の検定
  3. XおよびY染色体のコピー数確認（性別判定）

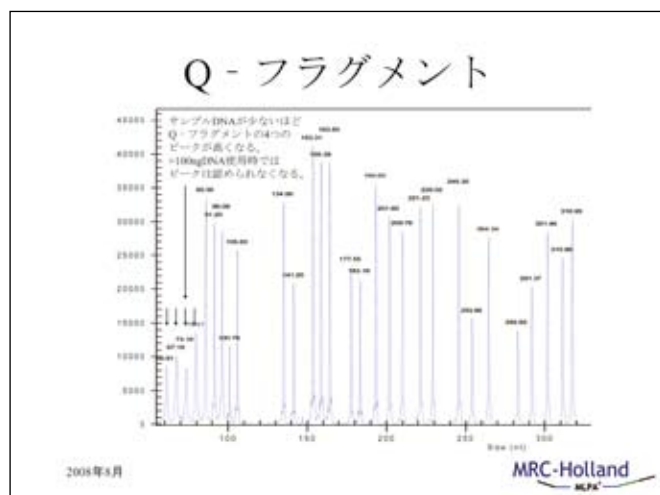
2008年8月



MLPA法の利点は、品質管理が比較的簡単であるということです。また、構成試薬は全て液体で、それらの生産のバッチサイズは、かなり大きくすることができます。さらに、全てのプローブミックスには、反応の塩梅をみることができる、異なるコントロール用プローブが含まれています。

また私達は将来、人工の陽性コントロールサンプルも供給できれば望ましいと思っております。既知の欠失 / 重複変異がみられる患者サンプルを得ることはとても困難ですし、また顧客にそのようなサンプルを配ることはできません。それで私達は、現在人工的なコントロール試料についての取り組みをしているのです。

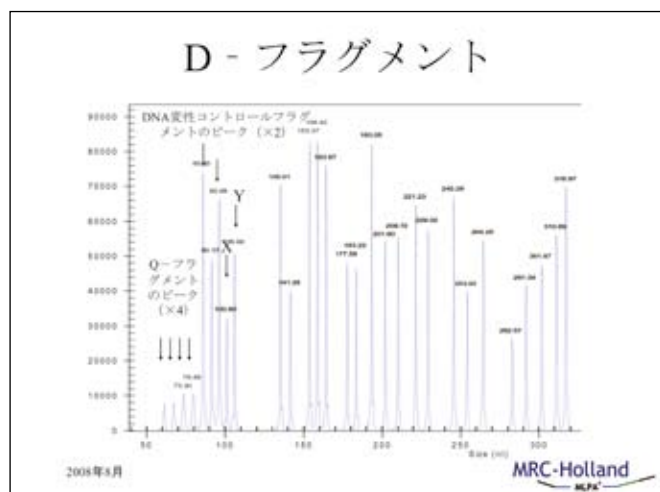
スライド 27



プローブミックス中に含まれるコントロールプローブのいくつかを、ここにお示します。それらは実際の解析対象となる増幅産物より、短いフラグメント位置にピークが出ます。たいていの場合、実際の解析対象となる増幅産物は、130 ヌクレオチドから始まって、最大約 500 ヌクレオチドまで続きます。1 つのプローブミックスでは、最大 50 までのプローブを組み込むことができますが、実際の解析対象となる増幅産物の短いフラグメントの側に、異なるコントロールプローブのフラグメントが位置しています。

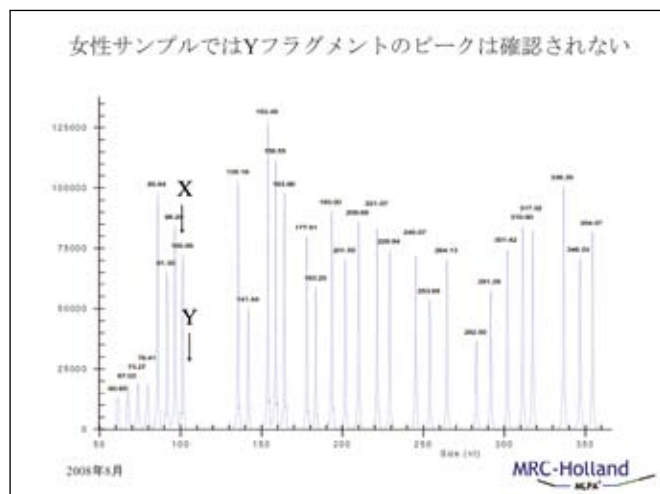
64-70-76 と 82 ヌクレオチドの 4 つの短いフラグメント (Q-フラグメント) は、添加した DNA サンプル量の指標となります。それらはほとんど見えないこともあります。それは、十分な DNA 量が添加されたときです。しかし DNA 量が不十分なときは、それらが顕著にあらわれてきますので注意となります。

スライド 28

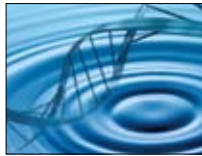


2007 年以降は、DNA サンプルの変性が不完全であった場合に顕著となるコントロール (D-フラグメント) も加えています。

スライド 29



そして最終的に、2008 年の初頭から、X または Y 染色体に特異的なコントロールを追加しています。このスライドでは、女性のサンプルなので Y 染色体のプローブシグナルは無く、X 染色体プローブのシグナルのみがあらわれています。



## スライド 30

### 研究用途としてのMLPA

M13由来SALSA MLPAプローブ (MRC-Holland)

- SALSA MLPAプローブの増幅産物は、130~490nt長
- 特殊なM13ファージ由来クローンから、制限酵素消化によって調製
- 時間およびコストがかかる
- >10,000種類のクローンが用意されている。

合成MLPAプローブ (自作用)

- 研究用途として、2つの合成オリゴヌクレオチド鎖から成るプローブを作成することができる。
- 長鎖では、合成オリゴヌクレオチド鎖の品質が不十分のため、増幅産物の長さは90~160ntに制限される。
- 合成プローブの設計プロトコルは、www.MLPA.comから入手可能。
- 「自作プローブ」は、Q-フラグメントおよびリファレンスプローブを含むP200またはP300プローブミックスに加えて使用可能。
- P200 : 64-70-76-82ntのQ断片および172-250ntからの14種類のリファレンスプローブ
- P300 : P200+88-92-109-129-148ntの追加リファレンスプローブ

2008年8月

現在、私達は多くの様々なプローブミックスを販売しておりますが、しかしもちろん、多くの人は研究目的で MLPA 法を用いたいと考えておりますし、また私達の会社の市販製品には頼ろうとしない人も多いのです。当然、MLPA 法を全くの研究用途で用いることは可能です。私達はプローブの調製に関して特殊な方法を持っていて、増幅産物の非常に長いプローブの生産も可能なのですが、一方で、複雑な方法で作らなければなりません。全てのプローブについて、私達は M13 ファージ DNA にクローン化しています。そしてこの M13 ファージ DNA から、1本鎖 DNA を調製します。この DNA は制限酵素消化して調製します。その開発行程には時間がかかり、高い費用もかかります。しかしそのおかげで、1つのプローブミックスの中でたくさんの異なるプローブを用いることができるようになるのです。そして現

在では、約 10,000 のプローブをフリーザーに保管しています。これらは素晴らしいコレクションではありますが、研究を行う上では、まだ十分なものではありません。

研究目的での用途においては、それぞれの研究室で、合成の MLPA プローブを用いることで、独自のものを用意することができます。高品質のオリゴヌクレオチドを提供している会社なら、どこからでも可能ですが、全プローブについて、1領域あたり、それぞれ2つずつの合成オリゴヌクレオチドを注文するだけのことです。これを使用した経験のある方の1人が松原先生で、丁度うかがったのですが、GLDC 遺伝子用のプローブをご自身で開発されたそうです。このように、各々の研究室で、そういったことが可能なのです。プローブの設計に必要な情報の全ては、私達の Web サイトに掲載されています。

しかし、合成オリゴヌクレオチドのプローブには、品質的な限界があります。長鎖の合成オリゴヌクレオチドとなると、私達が行っているような M13 ファージ DNA 由来のオリゴヌクレオチドよりも、品質が落ちるのです。このことが理由で、合成オリゴヌクレオチドプローブの長さは約 90 ~ 160 ヌクレオチドに限定されるのですが、その範囲ですと、おそらく 15 から 18 ぐらいの異なるプローブが設計できます。私達は最近、P200 と P300 というプローブミックスの販売を開始しましたが、これに皆さんが独自で作成した合成プローブミックスを加えることができるようになってきました。これら P200、P300 プローブミックスに含まれるプローブは全てリファレンス用で、また DNA 量を検定できるコントロール用のプローブ (Q-フラグメント) も含まれています。

## スライド 31

### 合成MLPAプローブの一例

- 非リン酸化オリゴヌクレオチドプローブ :  
GGGTTCCTAAGGGTTGGA-  
CTTCTGCGCACCCACCTGCTGCATCTT
- 5'リン酸化オリゴヌクレオチドプローブ :  
AGTTCAGTCGGCTCTAGAGTAGTAACCGCCAGAAAGGAGTCG-  
TCTAGATTGGATCTTGCTGGCCG

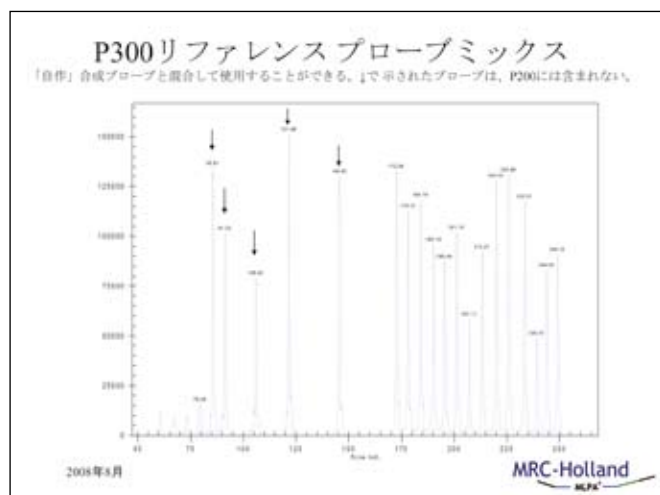
太字 = 全合成プローブに共通の部位 (PCRプライマー配列)

- 合成MLPAプローブをMRC-Holland社のプローブミックスに加える、あるいは、合成プローブミックスを1から作成することができる。プローブ設計に関する規則 (プロトコル) は、www.MLPA.comから入手可能。

2008年8月

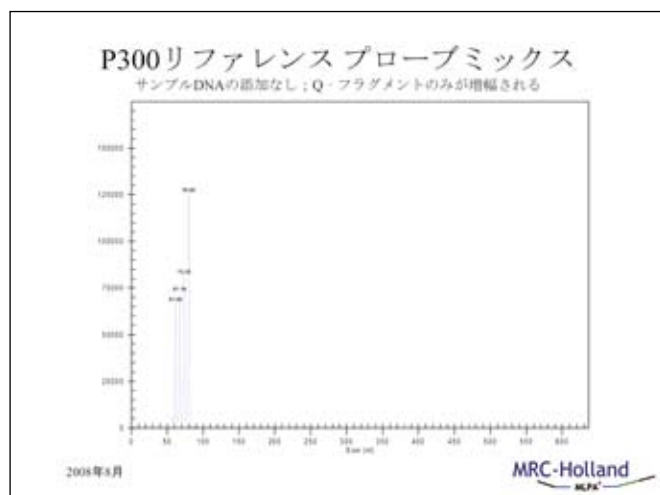
合成 MLPA プローブの例がこちらです。太字の部分が、PCR プライマー用の配列を表していて、その隣からが、サンプル DNA にハイブリダイズする配列です。そして、私達の Web サイトにある設計ルールにしたがっていただければ、これらの合成 MLPA プローブの設計は非常に簡単です。

スライド 32



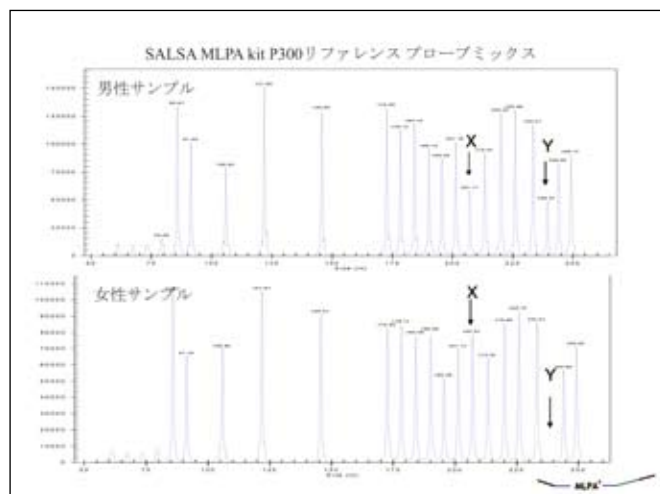
例えば、この P300 プローブミックスに、ご自身の合成プローブを加えることができます。P200 についてもまったく同様ですが、P200 には、このスライド上の矢印が示している、5 つのプローブは含まれません。86 ヌクレオチドと 175 ヌクレオチドの間は完全に空いています。ですから、そこにはかなり多くの合成プローブを加えることができます。

スライド 33

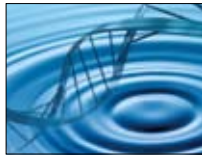


またこれらのプローブミックスには、DNA 量の指標となるコントロール用のプローブ (Q-フラグメント) も含まれています。サンプル DNA を全く加えずに反応させた場合は、これら 4 つのプローブシグナルのみが認められます。サンプル DNA がまったく存在しないか、もしくはサンプル DNA の量が不十分な場合は、それらが顕著にあらわれてくるわけです。

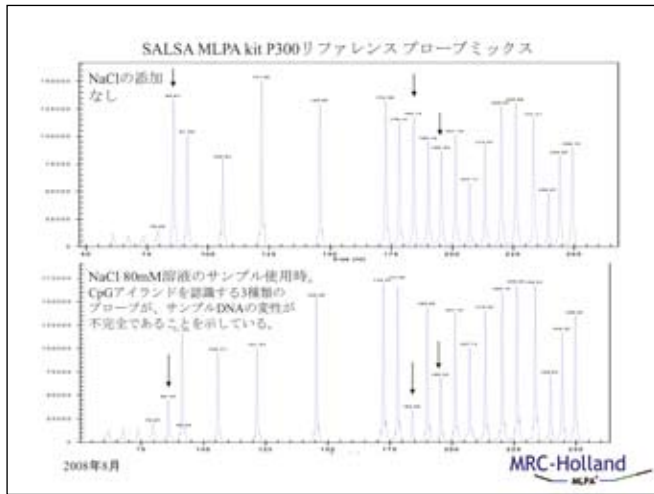
スライド 34



P200 および P300 プローブミックスには、X 染色体または Y 染色体を対象としたプローブが含まれています。さらに、DNA の変性が不完全な場合の指標となるプローブ (D-フラグメント) が、それらには含まれています。ゲノムの領域の中には、特に CpG アイランドなど、他の領域と比較して非常に変性が困難な領域がありますので、これらはコントロール用プローブとして有用です。



スライド 35



サンプル中の塩濃度が高かったり、または鉄やマグネシウムイオンの量が少ない場合、CpG アイランドが完全に変性されないことがしばしばあります。TE や水に溶かした DNA で変性を行う場合は全く問題ありません。しかし、例えばサンプル中の塩化ナトリウム濃度が 80mM であったり、もしくは塩化マグネシウムが 0.2mM とか少量の場合、サンプル DNA の 98℃ 熱変性が不完全となり、CpG アイランドに設計されたコントロールプローブのシグナルが低下します。

スライド 36

### メチル化の定量

- エピジェネティクス
  - プロモーター領域内のCpG配列のメチル化による、転写の調節
  - 例：脳腫瘍におけるMGMTプロモーターの過剰メチル化
- インプリンティング
  - 両親からの遺伝と同じ仕組みで、メチル化パターンが維持されるゲノム領域
  - 例：15番染色体のPrader-Willi/Angelman症候群責任領域、および、11番染色体のBeckwith-Wiedemann症候群責任領域

→CpGアイランドの異常メチル化の検出

2008年8月 MRC-Holland MLPA

DNA コピー数解析の用途のご紹介に続いて、これからメチル化の定量に関する MLPA 法 (MS-MLPA) の応用例についてご説明したいと思います。メチル化の定量については、2つの重要な分野への用途があります。第一には、例えばがん抑制遺伝子のプロモーター配列の転写制御に関わるメチル化です。第二には、Prader-Willi/Angelman 症候群の責任領域である、染色体 15 q 11 領域や、Beckwith-Wiedemann 症候群の責任領域のような、インプリンティング領域に関する DNA のメチル化などです。

スライド 37

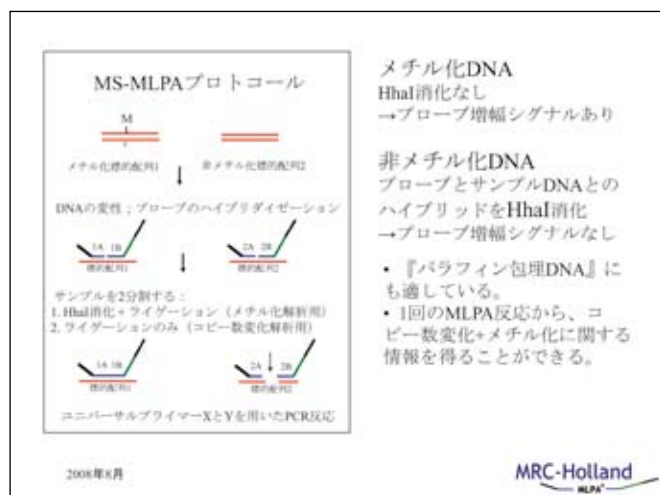
### メチル化特異的MLPAのプロトコール (MS-MLPA)

1. DNA変性
  - 98℃で10分間加熱。
2. ハイブリダイゼーション
  - SALSAプローブミックスとMLPAバッファーを追加する。
  - 95℃で1分間インキュベートし、60℃で16時間のハイブリダイゼーション反応。
3. ライゲーション (サンプルを2分割)
  - ハイアルC (コピー数解析用)
    - リゾーゼミックスを追加し、34℃で15分間インキュベート。
    - 98℃で5分間加熱し、リゾーゼを不活性化。
  - ハイアルM (メチル化解析用)
    - リゾーゼミックス+HhaIを追加して、49℃で30分間インキュベート。
    - 98℃で5分間加熱し、リゾーゼを不活性化。
4. PCR反応
  - プライマー、dNTPsおよびポリメラーゼを追加する。
  - PCR反応をスタート。
5. キャピラリー電気泳動
  - フラグメント長およびピーク面積をExcelにペースト。
  - 結果を解析。

2008年8月 MRC-Holland MLPA

メチル化解析のプロトコールは、一般的な MLPA 法のものにとってもよく似ています。それは非常に簡単ですし、そしてそれによって、メチル化についての情報だけでなく、コピー数変化についての情報も得られます。いくつかの用途においては、その性能があることは非常に重要なものとなります。例えば、Prader-Willi/Angelman 症候群では、症例の大部分はコピー数変化によるものですが、最大 30%程度が、メチル化状態の変化によるものとされています。ですから、特にこれらの疾患では、両方の解析を行うことが不可欠なのです。

スライド 38



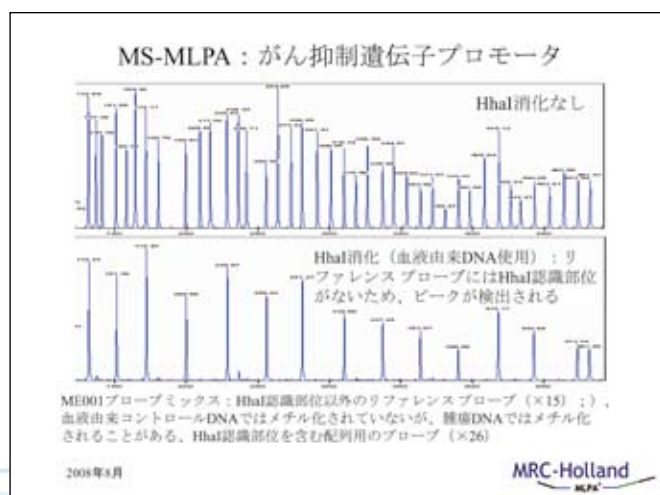
メチル化解析で特別に行っている操作としては、MLPA 反応だけでなく、メチル化感受性の制限酵素消化も行っていることです。そして、この制限酵素消化は、サンプル DNA に対して行うのではなく、サンプル DNA とプローブのハイブリッドに対して行います。実際には、ライゲーション反応と制限酵素消化は同時に一緒に行われます。

では、なぜそうするのかということについてお話しします。一般的な MLPA 法とごく同様に、まずサンプル DNA の変性処理を

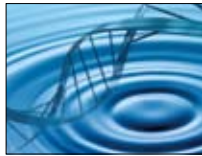
行い、その後プローブを加え、一晩の間ハイブリダイゼーション反応を行います。次の日の朝からは、反応行程は 2 つに分かれます。1つは、一般的な MLPA 法とちょうど同じように、ライゲースで処理する行程です。この反応により、コピー数変化の情報が得られます。もう1つは、ライゲースと Hha I、Hpa IIといった、メチル化感受性制限酵素を用いて反応させる行程です。サンプル DNA がメチル化されていれば、ハイブリッド形成された配列は、メチル化感受性制限酵素では切断されません。そして 2 つのプローブはライゲーションされ、PCR 増幅可能な DNA 断片となるのです。しかし、サンプル DNA がメチル化されていなければ、添加された制限酵素が、プローブとサンプル DNA のハイブリッドを切断します。そして結果として、PCR 増幅され得る DNA 断片が形成されないのです。

このプロトコールにしたがえば、ホルマリン固定組織やパラフィン包埋組織から抽出された DNA についても、メチル化状態の変化が検出できます。この種の組織から抽出した DNA はしばしば、そして少なくとも部分的には変性しています。DNA 変性が起こっていると、制限酵素による切断ができません。しかし、プローブとサンプルでハイブリッドを形成することで DNA を二重鎖にすると、そのサンプル DNA がメチル化されていなかった場合には、切断が起きます。

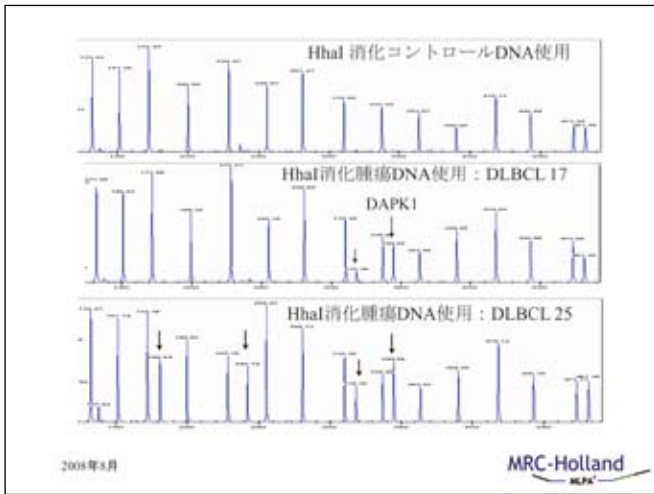
スライド 39



このスライドは、がん抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態の測定試験を行った場合、それがどのような感じに見えるかを示したものです。私達の使用するプローブミックスには、用いられる Hha I 酵素の認識部位をもたない、リファレンス用のプローブがいくつか含まれています。これらのプローブについては、制限酵素消化の有無に関らず、シグナルが生成されます。これらのリファレンス用プローブの間には、この酵素の認識部位を有するその他のプローブがありますが、これらはがん抑制遺伝子のプロモーターの、CpG アイランドに対して設計されています。おわかりのように、血液由来の DNA を用いた場合は、これらのプローブは完全に消化され、そして結果として、プローブのシグナルは完全に消失しています。これは、血液由来の DNA においては、これらの領域がまったくメチル化されていないからです。



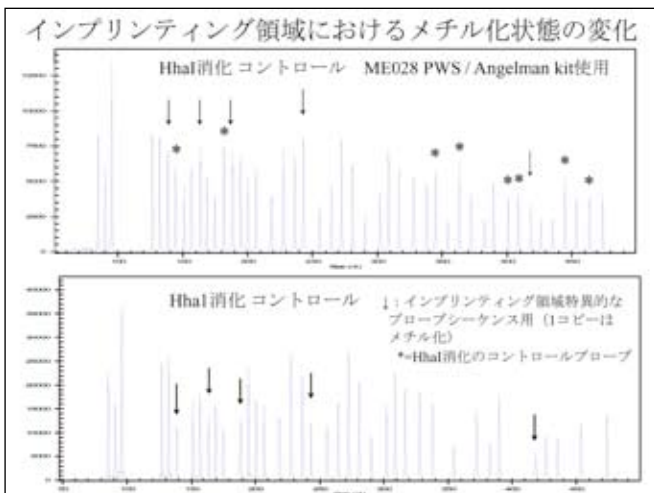
スライド 40



しかし、MS-MLPA 反応において、血液から得た DNA と、がん組織から得た DNA とで比較しますと、このスライドの場合にはリンパ腫の検体なのですが、がん抑制遺伝子のプロモーター配列に特異的なプローブに関して、ピークがあらわれているのがおわかりでしょう。そして DLBCL25 の場合は、4 つもの異なるピークが現れています。これは、この特殊なサンプルにおいては、4 つの遺伝子について、それらのプロモーター領域がメチル化されていたからなのです。

こういったものは、例えばがんの再発スクリーニングなど、がんの診断に有用化できます。私達は現在、尿から分離させた細胞中の、DNA メチル化状態の変化を指標にして、再発膀胱がんが検出できるような検査の開発に取り組んでいます。

スライド 41



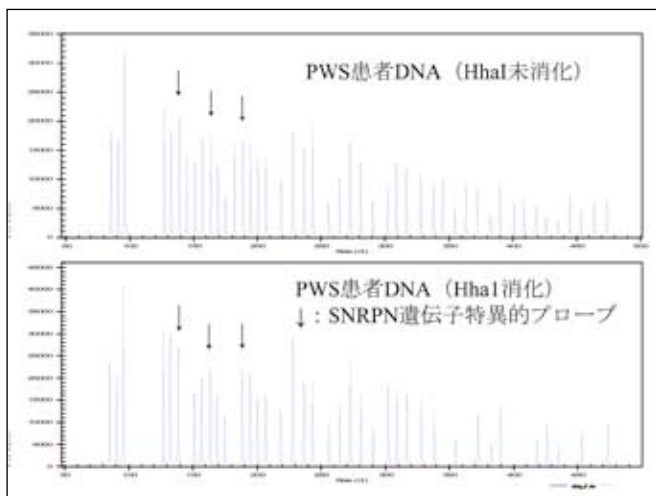
MS-MLPA 法のもう 1 つの用途は、インプリンティング領域の解析です。この症例では、インプリンティングされた染色体 15q11 領域の解析を行っています。制限酵素反応を行っていない場合と、行った場合とで比較をすると、いくつかのプローブについて、シグナルがおよそ 50%に減少していることがわかります。矢印で示されているプローブは全て MS-MLPA 用で、染色体 15q 領域のインプリンティング領域上に設計されており、それら

のシグナルは、制限酵素反応時には 50%まで減少します。その理由は、これらの領域はインプリンティング領域であり、正常細胞中では、父親由来のアレルはメチル化されており、一方、もう片方のアレル、つまり母親由来の方はメチル化されておらず、1 コピー分のシグナルしか得られないからです。

この 50%のシグナルの減少は、健常者由来の DNA ではみられますが、Prader-Willi 症候群の患者由来 DNA で解析すると、そのいくつかについては、両アレルともメチル化されている状態のため、MS-MLPA プローブがまったく制限酵素消化されません。そして、Angelman 症候群の患者由来 DNA で検査すると、染色体 15q11 領域のメチル化特異的なプローブのシグナルは、完全に消失します。それは、サンプル DNA 中の両アレルともが、非メチル化状態のためです。

この Prader-Willi/Angelman 症候群検査用の ME028 プローブミックスには、がん抑制遺伝子のプロモーター領域に設計された、制限酵素消化に関するコントロール用のプローブが含まれています。このスライドで、\*印で示されているものがそれです。これらの遺伝子は、血液由来 DNA ではたいていの場合メチル化されておらず、その結果、そのプローブシグナルは完全に消失します。これは、制限酵素消化が完全に行われていることを示しています。

スライド42



MS-MLPA 法はとても簡単に、メチル化状態とコピー数変化を同時に検出できます。そして、Prader-Willi/Angelman 症候群、Beckwith-Wiedemann 症候群、Silver-Russell 症候群に関しては、少なくともヨーロッパでは、現在最も広く行われている検査方法です。

スライド43

### MLPAのその他の用途

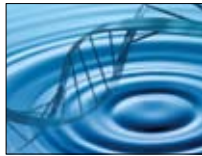
- mRNAの相対的定量解析：プローブミックスは、どの組織から採取されたRNAサンプルかに応じて、最適化する必要がある。多量のmRNAにより検出される高いシグナルは、競合オリゴを加えることで低下させることができる。
- 既知の変異検出：種族特異的なプローブを開発する必要がある。変異の箇所が非常に近接する場合は、プローブの組み合わせは難しい。

2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

また MLPA 法では、mRNA の定量が可能となるプローブミックスを作成することもできます。しかし、異なる組織ごとでは、mRNA の発現が非常に多様なので、適切なプローブの作成はより困難となります。ですから、ある特定の mRNA 用プローブミックスを開発する場合は、特定の組織由来の RNA 用に最適化する必要があります。そのため現段階では、わずか一握りのプローブミックスしか製品がありません。

DNA 解析の方に戻ると、既知の変異を検出できるプローブミックスを作成することも可能ですが、同様に、これもまた非常に複雑です。その主な理由は、たいていの遺伝子変異は、世界中の集団に等しく分散していないからです。少なくともほとんどの遺伝子では、日本における変異検出頻度は、西洋、インドネシアもしくはアフリカなどでみとめられる変異検出率とは完全に異なります。ですから、MLPA 法による既知の変異検出に関しては、人種特異的なプローブミックスが必要となるでしょう。それは可能なのですが、しかしとても多大な作業となるのです。



## スライド 43

### MLPAの欠点

- MLPAは、通常のPCRよりもサンプル中の不純物に対する感度が高い。
- 異なるラボにおいて異なる方法によって精製されたサンプルでは、比較が困難なことがある。
- MRC-Holland社は、データ解析ソフトウェアを無償で提供しているが、現時点では、操作性に若干の問題がある。2008年末に改良版がリリースされる予定。
- 「自作プローブ」の設計用ソフトウェアが提供されているが、現時点では十分に満足できるものではない。手動でプローブを設計することが推奨される。
- プローブミックスには、顧客からの指摘に基づいて多くの改善が施されている。したがって、新しいロットと古いロットのもので仕様が異なることがある。
- プローブシグナルの減弱が、稀な一塩基多型/SNPs（例：日本人特有の遺伝子多型）に起因する可能性がある。単一のプローブのみで検出された欠失は、別の方法で確認が必要である。
- できるだけ最良のプローブセットを設計するためには、遺伝子配列に関する十分な情報が必要である。現時点で、ゲノム配列が完全に解読されているのは、わずか5名でしかない。今後3年間で、異なる集団における1,000のゲノム解読が完了すると期待されている。これらが完了してはじめて、SNPsおよびCNVsについて十分な知識が得られることになるだろう。

2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

もちろん、MLPA 法には欠点もあります。このテクニックで全てを行えるわけではありません。1つ例を挙げれば、二倍体の雌性細胞と三倍体の雌性細胞の識別はできません。これは、全ゲノム DNA 配列の相対的な量関係については、これらの細胞においては同じだからなのです。MLPA 法では、様々なプローブで検出される DNA 配列の、相対的な量をみているだけなのです。もう1つの欠点は、一般的な PCR 法と比較して、MLPA 法はサンプル中の不純物に対してより敏感だということです。ただ、一般の研究室では、どんどん DNA 抽出が自動化に切り替わってきておりましたが、その品質は継続的に改善され続けていますので、この問題はだんだん小さなものとなってきています。実際、QIAGEN 社のような DNA 精製法の開発を行っている会社は、現在 MLPA 法も使って、抽出サンプルが MLPA 法のような用途に適するかどうかを判断しています。

MLPA 反応のデータ解析については、必ずしも簡単というわけではありませんが、無料で入手いただけるソフトウェアパッケージがあります。この“Coffalyser” ソフトは、私達の Web サイトからダウンロードできます。しかし現段階では、まだ本当に使い勝手の良いソフトとはいえず、私達はその改善に取り組んでいるところです。また、いくつかの大学や企業から、入手または購入可能なソフトもあります。

最後に、特定のプローブについて、白人のサンプル DNA では全く問題なく作用するけれども、例えば、中国南部の人種から得たサンプルでは問題が起こるといことが有り得ます。現段階の公共のデータベースでは、異なる人種の健常者におけるコピー数多型や一塩基多型について、得られる情報が不足しています。幸いにも私達は、プローブの性能について、顧客からたくさんフィードバックをもらっています。この顧客からのフィードバックによって、また製品の改善を試みるのです。ただこの欠点としては、もし皆さんが同じ製品を今から1年後もしくは2年後に買ったとしても、プローブミックス中の1つか2つぐらいいは、プローブが変更されている可能性があるということです。私達は今からの2年間で、全てのプローブミックス製品が、多くの異なる人種から得られたサンプルで十分に検証が行われること、そして、私達の製品が本当に長い間変わること無く残り続けることを希望しています。

特に、2002年に私達が最初の MLPA 製品を発売し始めたときには、健常者におけるコピー数多型や一塩基多型についての情報は、本当にごくわずかしかありませんでした。今はずっと多くの情報が得られるようになってきていますので、過去に比べ、より優れたプローブを設計することが可能になってきています。

スライド 45

### MLPAの長所

- 1回のシンプルな操作のPCRを基本とした反応で、40~50のゲノムDNA配列のコピー数異常を検出することができる。
- わずか20ngのヒトDNA (3,000個の細胞/0.5mLの羊水相当) しか必要としない
- わずか1ヌクレオチドの塩基配列の違いも識別することができる。
- サーマルサイクラーおよびシーケンサー型の電気泳動装置しか必要としない。
- 共通のプロトコールで多くの異なるアプリケーションに利用することができる。
- 高い処理能力；結果は24時間以内で得られる。
- 大きなロットサイズ (>50,000反応) が利用できる。全ての試薬について、高い安定性が確認されている。
- 各プローブシグナルを得るには、2つの特異的なオリゴヌクレオチドが必要。
- 全ての試薬は液体である→品質管理が容易。
- 電気泳動を含めた試薬コストの合計は1反応当たり<15ユーロである。

2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

MLPA法の利点をまとめてみましょう。MLPAは、小規模のDNAコピー数変化の検出に、特に有用です。そして一度の反応で、最大50までのゲノム配列を解析することができます。また、操作も簡単で、多量のDNAは必要としません。しかし、1細胞相当のDNA量では解析することはできませんし、サンプルの調製にWGA (Whole Genome Amplification) 法を組み合わせたい方はできませんが、ほとんどの調製法では、十分なDNA量以上のものが得られます。さらに、わずか1ヌクレオチ

ドしか異ならない配列を識別することができます。

また、重要なこととしては、必要な装置はサーマルサイクラーとキャピラリーシーケンサーのみで、たいいていの研究室、また少なくともたいいていの大学病院では、既に利用しているものであるということです。どの用途の製品であっても、同じ試薬と同じプロトコールが使えます。そして、多くの検体を同時に試験できます。1つか2つのサンプルでも試験できますし、また96サンプルであっても、1日で試験することもできるのです。そして、各試薬は非常に安定です。実際に、全ての酵素類、バッファー類、プローブやPCRプライマーが全部そろった試薬キットを、室温で3ヵ月そのまま放置したとしても、まだちゃんと使用することができるのです。ですから、全ての酵素類、特にプローブミックスは、-20℃で何年間も保管しておくことができるのです。

製品の品質管理上とても重要な点は、プローブのシグナルを得るには、2つの異なるオリゴヌクレオチドの存在が必要だということです。私達の研究室で調製ミスが起こった場合はいつも、あるプローブのシグナルがあらわれないことで、明確にわかってきます。そしてまた、全ての試薬が液体であることも品質管理を容易にしています。最後に、MLPA反応の全体的なコストはわずかです。現在、キャピラリー電気泳動の消耗品コストを入れて、1回の反応につき、約20ドル程度です。

スライド 46

### MLPAの限界

- MLPAは、1細胞に対して使用することはできない。少なくとも3,000個の細胞を必要とする。
- 現時点では、MLPAは、WGA方法(全ゲノム増幅法)によって増幅されたサンプルに対して使用することはできない。
- MLPAは、染色体均衡型転座を検出することができない。染色体テロメア領域特異的なプローブミックスを使用することで、不均衡型転座のほとんどをMLPAで検出することができる。
- MLPAは、女性三倍体と二倍体細胞とを識別することはできない。
- mRNA定量のためのMLPAアッセイは、どの組織を用いるかで最適化する必要がある。MLPAでは、ダイナミックレンジが限定されている。
- MRC-Holland社でM13ベクターシステムを使用し、新規のMLPAアッセイを開発するには、時間がかかり困難である。研究目的では、合成プローブを使用するラボが増加している。
- MRC-Holland社は、250以上の異なるMLPAキットを提供している。毎週、新しいキットが1つリリースされている。
- ヒトDNA解析用途を重点に、キットの開発が進められている。

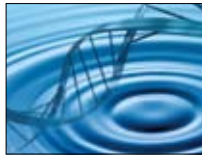
2008年8月

MRC-Holland  
MLPA

しかし、先で述べたように、限界もあります。1細胞の試料からはMLPA法に用いることはできません。WGA法と組み合わせて用いることはできません。均衡型転座を検出することもできません。MLPA法は、完全には染色体分析の代替となること

はできないでしょう。しかし、現在オランダでは、出生前羊水検査は、主にMLPA法によって行われています。例えば、ただダウン症候群の疑いのみを調べる場合は、染色体分析の代わりに、多くの症例でMLPA解析が行われます。

最後に、新しいMLPA法アッセイの開発には時間がかかり困難なのですが、研究用として独自に合成プローブのセットを作成することができますので、もちろん私は、これを試みていただくことをお勧めします。しかし、世界の他の研究室にとっても有用と期待されるような、また、今から数年は役立つことができると思われる用法について、皆さんがアイデアをお持ちの場合は、是非私達に連絡してください。私達は、現在のMLPA法の幅をさらに超えていくのに役立つような、新しいプローブミックスの共同開発に常に関心があります。現在、私たちは約250の異なるMLPA製品を販売していますが、毎週平均1つは新しい製品を発売しています。私達の業績はヒト遺伝学の分野が中心ですが、これまでお話したように、RNAの分野についてもMLPA法の可能性はあるのです。



Detection of DNA copy number changes and methylation changes by MLPA and MS-MLPA.

スライド 47



スライド 48

**MRC-Holland社**

|                     |                  |                    |
|---------------------|------------------|--------------------|
| Maureen Schouten    | Jan Schouten     | Bouchra Ben Saddik |
| Ulla Sow            |                  | Nives Bahonjic     |
| Helena Duarte       |                  | Karim Saadi        |
| Eline Sepers        |                  | Sou Cheng          |
| Bektas Ayyun        |                  | Mayda Paguay       |
| Abdel Errami        |                  | Petra van Os       |
| Sylvia Lens         |                  | Roel Brekelmans    |
| Paul Schokker       |                  | Martijn Jonkers    |
| Selma Sencan        |                  | Friedrich Schmitt  |
| Widad Rifi          |                  | Robert Schuit      |
| Renske Boschloo     |                  | Youssef Elalaoui   |
| Johanneke Oud       |                  | HaciAli Ygittop    |
| Karel de Groot      |                  | Joseph Cabahug     |
| Claudia Albuquerque |                  | Nadja Laddach      |
| Martin Loden        |                  |                    |
| Jordy Coffa         | Raymon Vijzelaar |                    |
|                     | Suet-Ching Liu   |                    |

2008年8月

**MRC-Holland**  
MLPA

最後に、アムステルダムの真ん中の古い学校の建物にある、私の研究室のスライドをお見せします。MRC-Holland 社の研究室は、私のオフィスのごくすぐ近くにあつて、実は私の家にも非常に近いです。家から研究室まで、また研究室からオフィスまで、歩いて1分以内で行けます。幸運にも、私達は多くの様々な国籍の、立派な若者たちとチームを構成しています。彼らのほとんどはとても若く、また非常に意欲的です。そして私達は、皆さんのためにこれからも新しい製品を開発できることを、嬉しく思っております。

どうもありがとうございました。



Detection of DNA copy number changes and methylation changes by

# MLPA and MS-MLPA

2009(平成21)年4月1日 発行

企画・編集・発行

株式会社ファルコバイオシステムズ 遺伝子事業部

京都市中京区河原町通二条上清水町346番地 TEL. 075-257-8541  
URL. <http://www.falco-genetics.com/>

MRC-Holland b.v.  
MLPA

FALCO

# MLPA<sup>®</sup> Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MLPA法。それは従来法では難しかった、遺伝子の大規模欠失・増幅変異の検出で高いパフォーマンスを発揮する、新しい概念の遺伝子解析法です。

安定した  
解析結果

シンプル操作

必要機器はサーマルサイクラーと  
シーケンサーのみ

MLPA法は、  
その高い解析能力で  
遺伝子解析を強力に  
サポートいたします。



MLPAでは多彩な疾患／遺伝子を対象とした、さまざまなKitをご用意しております。

|            |   |
|------------|---|
| 家族性／遺伝性腫瘍  | 家族性乳がん・卵巣がん、家族性大腸線種症 (FAP)、遺伝性非ポリポーシス大腸がん (HNPCC)、I型・II型神経線維種、 など |
| 先天性／遺伝性疾患  | デュシェンヌ／ベッカー型筋ジストロフィー、脊髄性筋萎縮症、ペリツェウス・メルツワッハ病、 など                   |
| 染色体数的／構造異常 | Ch1-22-X-Y (各染色体の特定領域)、 サブテロメア領域 など                               |

※上記は一例です。また、その他DNAメチル化解析用、mRNA発現解析用のKitのラインアップもございます。

詳しいご案内・ご注文は、ファルコバイオシステムズ 遺伝子事業部の  
ホームページ「Salsa<sup>®</sup> MLPA<sup>®</sup> Kitのご案内」から

➔ [http://www.falco-genetics.com/salsa/salsa\\_f.html](http://www.falco-genetics.com/salsa/salsa_f.html)

Detection of DNA copy number changes and methylation changes by

# MLPA and MS-MLPA

MLPA法は、これまで検出することが難しいとされてきた遺伝子欠失/増幅変異の検出に特化された、まったく新しい概念の遺伝子解析手法です。

本セミナーでは、MLPA法の開発者であるJan Schouten氏を招き、その技術的特性や利点、応用例などのご紹介をしております。



講師：Dr. Jan P. Schouten (MRC-Holland Company Amsterdam, the Netherlands)

日時：平成20年8月1日(金)

会場：仙台市戦災復興記念会館