

（様式4）

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

（ 内 山 由 理 ） 印

Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic *GNAQ* mutation in Sturge-Weber syndrome

超高感度ドロプレットデジタルPCRを使用した、Sturge-Weber症候群における低頻度体細胞 *GNAQ* 変異の検出手法

Scientific Reports, published online, 09 March 2016 6:22985

Yuri Uchiyama, Mitsuko Nakashima, Satoshi Watanabe, Masakazu Miyajima, Masataka Taguri, Satoko Miyatake, Noriko Miyake, Hiroto Saito, Hiroyuki Mishima, Akira Kinoshita, Hajime Arai, Ko-ichiro Yoshiura, and Naomichi Matsumoto

1) 研究の背景と目的

ドロプレットデジタルPCR（以下ddPCR）は油滴により分画化された微小区画（ドロプレット）に1コピーのDNAを封入し、各ドロプレット内部でPCR増幅を行う手法である。TaqManプローブを用いて発光するドロプレットの数を計測し、ポアソン分布を利用してサンプル中のターゲット領域のコピー数を絶対定量することができる。本手法を用いることで、超低頻度モザイク変異を検出することが可能であり、ペプチド核酸（以下PNA）とTaqManプローブを組み合わせることにより更に感度の上昇が期待される。

Sturge-Weber症候群（SWS）は、脳内の軟膜血管腫と、顔面のポートワイン斑（毛細血管奇形）、眼の緑内障を有する神経皮膚症候群の一つである。必ずしも3所見全てが揃う必要はなく、日本では年間 50,000～100,000 出生に1人発症している。病因・病態と本変異との詳細な関係性は不明だが、罹患患者の病変組織に *GNAQ* c.548G>A の体細胞変異が80%以上の症例で同定されることが報告された（Shirley et al. N Engl J Med. 2013）。血管腫病変は健常組織も多く含むこともあり、病変組織由来のDNAの変異含有率は10%以下と低頻度となることが知られている。次世代シーケンサー解析（以下NGS解析）で既に解析を行ったSWS症例15検体（脳組織及び血液由来DNA）を使用して、低頻度体細胞モザイクの検出限界と、変異含有率を再検討した。

2) 研究方法

GNAQ c.548G>A変異の野生型、変異型クローニングプラスミドDNAを作成し、段階的に変異含有率を希釈したクローニングDNA混合液を作成した。各混合クローンDNAの総量は3000 copies/1assayで統一し、ddPCRによる絶対定量測定とPNA-ddPCR（PNA-PCR後の産物をddPCRにより解析）による定性測定を行った。それぞれ3回施行した平均値を検出限界と同定し、更に実験系が機能しているかどうか、下記統計的手法を用いて評価した。まず、混合溶液中の変異型プラスミドDNAのアレル頻度を、変異型及び野生型ドロプレット数の合計に対する変異型ドロプレット数の割合に置き換えて近似した。次に、「3回の試行で変異型プラスミドDNAが存在しない」と仮定した際の確率を、二項分布を用いて算出した。この仮定が棄却される変異含有率と実測値を比較することで、この実験系における検出限界の評価を行った。これらの結果を用いて15症例の臨床検体の検出限界を再検討した。

3) 結果と考察

ddPCRの定量検出限界は、0.25%（7.5コピー）、PNA-ddPCRの定性検出限界は0.1%（3コピー）であった。変異含有率が低くなるにつれて、変異型プラスミドDNAが1wellに存在する確率も低下する。二項分布を用いて検討した「3回の試行で、変異型プラスミドDNAが存在しない確率」では、変異含有率が0.25%のとき、検出したドロプレット数が2000個の際、3回中1回は変異型ドロプレットが存在しない場合があると予測された。一方4000個以上では変異型ドロプレットが確実に存在していると予測された。この結果は実測値と同様であり、実験系が機能していることが確認された。

SWS全15症例の結果では、変異含有率が1%以上のものは、NGS解析の結果とほぼ一致することがわかった。PNA-ddPCRではddPCR及びNGS解析で検出できなかった3症例において、*GNAQ*変異を確認した。NGS解析による変異同定率は80%（12例/15例）であったが、ddPCR/PNA-ddPCR解析により93.3%（14例/15例）へ上昇した。また、一部症例では血液や唾液由来のDNAからも同変異を検出した。SWSは血管内皮細胞の異常をきたす疾患であり、体細胞変異の起源は中胚葉であった可能性が示唆された。SWSの脳軟膜血管腫や皮膚血管腫病変の発生機序は、まだ解明されていないが、以前よりSWSの発生機序として、胎生初期の原始静脈叢の退縮不全の可能性が指摘されてきた。原始

静脈叢は皮質静脈，静脈洞の発生とともに胎生5～8週頃に退縮するが，SWSでは皮質静脈の発生不全により，原始静脈叢が遺残すると考えられている．また，血管腫が血管内皮細胞から発生している可能性も指摘されており，中胚葉由来であるならば，上記結果も妥当と考えられる．

4) 結論

ddPCR及びPNA-ddPCRは，変異アリル頻度が1%以下の既知の体細胞変異の有無を検出可能な感度の高い技術である．絶対定量を含めた正確性から，胎生初期の体細胞変異を原因とする疾患や，悪性腫瘍の診断や治療後のフォローアップなどにも非常に有用で幅広い臨床応用が期待される．