

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	平 千 明
論文審査担当者	主 査 菅 野 祐 幸 副 査 栗 田 浩 ・ 多 田 剛
論文題目	Rapid single nucleotide polymorphism based method for hematopoietic chimerism analysis and monitoring using high-speed droplet-allele-specific PCR and allele-specific quantitative PCR. (液滴型塩基特異的高速 PCR および塩基特異的定量 PCR を用いた造血幹細胞移植における一塩基多型を使用したキメリズム解析)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景と目的】 キメリズム解析は同種造血幹細胞移植においてドナー/レシピエント比率を数値定量化する方法であり、移植後の生着確認や再発予測に重要である。解析には、ゲノム DNA 上の多型領域（特に数塩基の繰り返し配列である short tandem repeat, STR 領域）を用いた STR-PCR 法が汎用されているが、PCR 増幅の非特異産物であるスタッターピークや、STR 領域の長さに依存した増幅効率の影響を受けることが知られている。近年、より正確な定量解析法として一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNP) を利用した方法が多く報告されており、塩基特異的 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) が有用である。本研究では、SNP を用いたキメリズム解析として、ドナー/レシピエント識別領域の移植前迅速スクリーニングのための液滴型高速 PCR による塩基特異的 droplet-AS-PCR 法と、レシピエント DNA の移植後定量解析のためのリアルタイム PCR による塩基特異的定量 PCR (AS-quantitative PCR, AS-qPCR) の開発を行った。</p> <p>【方法】 同種造血幹細胞移植を施行した 20 組のドナー/レシピエントからなる 40 人を対象とした。SNP は多型頻度の高い 5 領域を対象とした。プライマーの 3' 末端を修飾することで塩基特異的プライマーを作成し、droplet-AS-PCR・AS-qPCR とともに同一プライマー・プローブを使用した。ドナー/レシピエント識別率は droplet-AS-PCR による SNP ジェノタイピングにより評価した。移植後経時変化の追跡が可能であった 6 名について、AS-qPCR を用いた定量解析によりレシピエント比率を算出し、STR-PCR の結果と比較した。</p> <p>【結果】 Droplet-AS-PCR を用いることで、5 領域全ての SNP で 8 分以内にジェノタイピングが可能であった。20 組のドナー/レシピエント識別率は、5 領域単独 5-50% で、5 領域全ての SNP を用いると 95% (19/20) であった。20 組中 10 組では、2 領域以上の識別領域が得られた。AS-qPCR による 6 名の定量解析の結果、2 名が STR-PCR の結果と乖離し、患者 1 は 2 領域の SNP でレシピエント由来細胞が 2.04-2.91% 検出されたのに対し、STR-PCR では検出感度以下であった。患者 2 は 3 領域の SNP では 6 か月後を除いた全ての検出点でレシピエント由来細胞が 1.25-2.16% 検出された。</p> <p>【考察】 移植前のドナー/レシピエント識別領域選択方法として、droplet-AS-PCR を用いることで迅速で簡便にスクリーニング可能であった。識別率を 100% にするために、人種を考慮した領域選択や組み合わせが必要である。移植後の定量解析で乖離した 2 例は、いずれも STR-PCR のスタッターピークや増幅効率による偽陰性まや偽陽性が考えられた。AS-qPCR を用いることで、より正確にレシピエント DNA を検出することが可能であった。本研究で構築した droplet-AS-PCR と AS-qPCR を組み合わせたキメリズム解析は STR-PCR の欠点を補う方法であり、容易に臨床応用可能である。</p> <p>【結論】 同種造血幹細胞移植において、一塩基多型 (SNP) を指標とした移植前迅速スクリーニング法 (droplet-AS-PCR) と移植後定量法 (AS-qPCR) を組み合わせることで、迅速性かつより正確な定量性を併せ持つキメリズム解析法が構築できた。解析工程も簡便であり、臨床的有用性が期待される。</p>