

平成29年12月

橋本祐樹 学位論文審査要旨

主 査 林 一 彦
副主査 網 崎 孝 志
同 本 倉 徹

主論文

Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for simple and rapid detection of *promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α* mRNA
(前骨髄球性白血病レチノイン酸受容体 α mRNAの簡便かつ迅速な検出のための逆転写ループ介在等温増幅法の構築)

(著者：橋本祐樹、畑山祐輝、小島奈央、森下奨太、松本智子、細田譲、原文子、本倉徹)

平成28年 Yonago Acta medica 59巻 262頁～269頁

参考論文

1. Construction and evaluation of cytomegalovirus DNA quantification system with real-time detection polymerase chain reaction

(リアルタイム検出ポリメラーゼ連鎖反応を用いたサイトメガロウイルスDNA定量法の構築と評価)

(著者：畑山祐輝、橋本祐樹、原文子、本倉徹)

平成28年 Yonago Acta medica 59巻 217頁～222頁

学 位 論 文 要 旨

Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for simple and rapid detection of *promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α* mRNA
(前骨髄球性白血病レチノイン酸受容体 α mRNAの簡便かつ迅速な検出のための逆転写ループ介在等温増幅法の構築)

急性前骨髄球性白血病 (APL) は、90%以上の頻度で *promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α* (*PML-RAR α*) 融合遺伝子を有する急性骨髄性白血病 (AML) の1種である。*PML-RAR α* には *PML* 遺伝子切断点の違いにより3つの異なるタイプが存在し、検出頻度は *bcr1* が55%、*bcr2* が5%、*bcr3* が40%であると報告されている。APLは最も治療成績が良いAMLの1つであるが、現在のAPL治療における治療失敗の主な原因は、診断の遅れによる出血性合併症による早期死亡である。その問題の解決として簡便な迅速診断法が望まれる。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法はターゲット遺伝子の3'末端側と5'末端側にそれぞれ3領域ずつの6領域に対し、4つのprimerを設計し、等温で鎖置換型DNA合成酵素を反応させて核酸を増幅する新たな遺伝子増幅方法である。LAMP法の特徴としてRNAを直接増幅でき、polymerase chain reaction (PCR) 法よりも増幅スピードが速いことが報告されている。LAMP法はすでに保険適応となっている病原体遺伝子検査領域の検査キットがあり臨床検査として広く用いられているが、造血器腫瘍検査としてはほとんど使われていない。そこで、本研究ではAPLの遺伝子診断マーカーである3種類の *PML-RAR α* mRNAを従来のreverse transcription (RT)-PCR法よりもより早く、簡便に検出するRT-LAMP法の構築を目的に研究を行った。

方 法

bcr1、*bcr2*、*bcr3*のいずれであっても、*PML-RAR α* mRNAを1つの反応チューブで増幅できるようにRT-LAMP法のprimerと増幅速度を加速できるloop primerをデザインし、それぞれの *PML-RAR α* mRNA配列を含むplasmid DNAをコントロールとして作成した。そのコントロールDNAの10倍希釈系列を作成し、検出感度をLAMP法とnested PCR法で比較した。また、LAMP法の増幅産物に対し制限酵素のDdeIを用いて制限酵素処理を行い、アガロースゲル電気泳動を行ってLAMP法の増幅特異性を確認した。さらに、nested RT-PCR法で過去に *PML-RAR α* mRNAが陽性であった6症例の臨床検査終了後のRNA検体を用いて、RT-LAMP法とnested

RT-PCR法を比較し、定性検査での臨床的有用性を検討した。

結 果

コントロールDNAを用いた増幅実験では、60分以内にLAMP法による増幅が確認された。増幅産物をDdeI制限酵素処理したところ、タイプごとに期待される特異的な泳動パターンが得られたことからLAMP法の増幅特異性が確認できた。一方、DdeIで切断できない非特異的増幅産物が60分以降に観察された。1チューブあたりの検出感度の実験では、nested PCR法はbcr1が0.88 copies、bcr2が7.8 copies、bcr3が80 copiesであったのに対し、LAMP法は、bcr1が880 copies、bcr2が78 copies、bcr3が800 copiesであった。臨床検体のRNAを用いた実験では、RT-LAMP法とnested RT-PCR法ですべての検体の定性結果が一致した。また、臨床検体からRT-LAMP法で増幅された産物をDdeI制限酵素処理したところ、期待される特異的泳動パターンが得られたことからRT-LAMP法でも増幅特異性が確認できた。

考 察

検出感度についてはnested PCR法がLAMP法よりも良かったが、この違いはprimerの特性によると考えられる。本研究では1000種類以上あるprimer候補の中から5種類を検討したに過ぎず、より高感度のprimerが存在する可能性はある。作業時間はRT-LAMP法がRNA抽出後1時間以内で結果が出るのに対し、nested RT-PCR法は5時間以上かかっており少なくとも4時間以上短縮できた。また、作業効率についてもRT-LAMP法は1つの反応チューブで3種類の*PML-RAR α* を検出でき、さらにRNAを直接増幅できることから検査者の作業負担や作業に伴う偽陰性のリスクを大幅に減らすことができると考えられた。

結 論

本研究により、APL迅速診断のためのRT-LAMP法による*PML-RAR α* mRNA検査法が開発された。特に*PML-RAR α* mRNA量の多いAPL初診時では有用と考えられる検査法であり、検査者の作業負担を減らすことができる。また、シンプルな作業工程であることから、今後自動化技術の開発やベッドサイドで行う簡易検査(point of care testing)に応用されることも期待できる。