

図14. 2塩基繰り返しマイクロサテライトの検出－温度管理条件1

本実験においてシグナルとして検出されるべきプライマーは、12回繰り返しのものであるが、耐熱性のリガーゼを用いて80℃でリガーゼ反応を行い、12回繰り返しプライマーにおいて高いシグナル強度を得た。

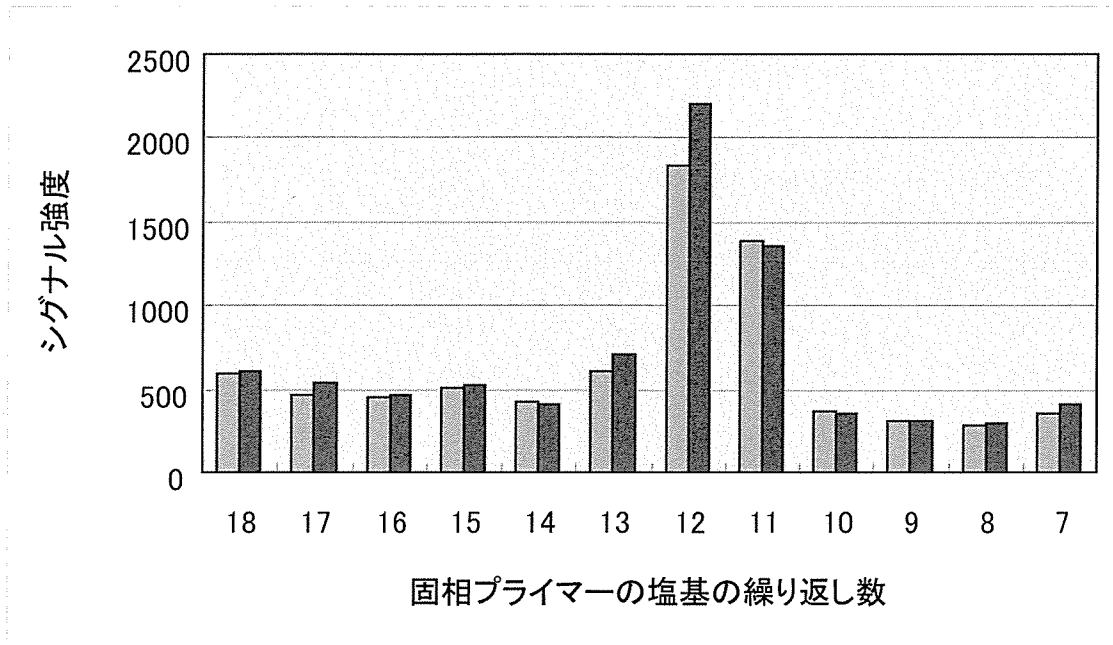


図15. 2塩基繰り返しマイクロサテライトの検出—温度管理条件2

本実験においてシグナルとして検出されるべきプライマーは、12回繰り返しのものであるが、耐熱性のリガーゼを用いて、ハイブリ工程とリガーゼ反応工程を分けて、80°Cでリガーゼ反応を行った。12回繰り返しプライマーにおいて高いシグナル強度を得た。温度管理条件1に比較し、固相プライマーのシグナル強度分布は改善された。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究年度終了報告書

MPEX法による薬剤応答遺伝子の
多型判定法の開発に関する研究

分担研究者

猪子 英俊 東海大学 医学部 医学部長
森川 實 ジェノダイブファーマ株式会社
代表取締役社長

本研究の目的は、テーラーメイド医療の現場での使用を念頭においた遺伝子診断法の開発・確立である。本年度は、疾患感受性遺伝子のSNPsおよび医薬品の副作用に関連した遺伝子の多型性(HLA)を対象に、MPEX法によるそれらの検出系の検討を行うとともに、遺伝子診断システムの基礎的検討を行った。

A. 研究目的

本研究は、薬剤応答性や副作用に関連した遺伝子や疾患感受性遺伝子におけるSNPsなどの多型を指標とした遺伝子診断に利用しうる、「迅速・簡便・安価・正確・高感度」な遺伝子診断法の開発を目的とする。前年度に我々は、住友ベークライトバイオ製

開発プロジェクトチームが開発した、プラスチック製DNAマイクロアレイ用基板上での高感度のDNA伸長・増幅反応であるMPEX (Multiple Primer Extension) 法の反応・検出系の条件検討について、ヒトDNAサンプルを用いておこなった。その結果、HLA (human leukocyte antigen : ヒト白血球抗原)

の多型性を示す領域を PCR-SSP (PCR-sequence specific primers) 法により特異的に増幅後、MPEX法により SNPsを検出する系を確立し、この手法をHLA-A, -B, -DRB1の特定アレルの検出に応用することにより、薬剤の副作用に関連したハプロタイプ存在の推定が可能であることを明らかにした。一方、遺伝的背景に基づいた患者個々人の最適な医薬品投与や疾病の予防・治療方法が、副作用の低減や患者のQOLの向上につながることから、患者個々の場合に応じた対象薬剤に対する代謝能や応答性に関する遺伝子、あるいは特定の疾病に関する易罹患性や病態進行予測に関する遺伝子診断など、ますます汎用性に富む診断法が切望されている。したがって、基板上に固定するオリゴDNAを替えることで多目的な診断法が可能となるという特徴を持つ我々が開発を進めている診断法は、臨床・検査の現場において大変実用的であり、かつ大きな進歩をもたらすと考えている。

本年度は、1) 疾患感受性や薬剤応答に関連したSNPsの選定、2) ヒトの生体サンプルを用いたMPEX法による選定したSNPsの検出検討、各多型に適した検出系の確立、および遺伝子診断システムの実用化にめどをつけることを目的とした。対象とするSNPsとして、1) 疾患感受性に関連したSNPsに

ついては、東海大学・ジェノダイブファーマ (株) で見いだしている関節リウマチ感受性遺伝子から5種類のSNPおよびHLA-DRB1遺伝子、2) 薬剤応答に関連したSNPsについては、医薬品の副作用と関連性が報告されている3種類のHLAアレルを選定した。疾患感受性は、一般的には、複数の遺伝子上に存在する各1種類のSNP (多型)、HLAアレルは単一遺伝子上に存在する複数のSNPs (多型) により規定される。よって本研究では、複数の遺伝子上に存在するSNPsの同時検出、および単一遺伝子上に存在する複数のSNPsの同時検出 (HLA遺伝子タイピング) について、MPEX法の有用性を検討した。

B. 研究方法

1. DNA 試料

MPEX 法による SNPs 検出の検討に用いた DNA 試料は、以下の3種類である。1) ボランティア健康人の血液試料より QIAGEN 社の QIAamp DNA Blood Mini kit を用いて DNA 抽出・精製をした DNA 試料、2) 関節リウマチの感受性 SNPs の SNP アレル解析に用いた DNA 試料から、東海大学より報告している文献 (Tamiya, G. et al. Hum. Mol. Genet. 2005 vol.14 2305-2321) を基に選抜した DNA 試料、そして 3) ECACC (European Collection of Cell Cultures) より購入した HLA アレル既

知の DNA 試料である。これら DNA 試料の濃度測定には、Molecular Probe 社の PicoGreen を用いた。

2. SNP 解析

上記の DNA 試料 1) における HLA タイピングは、GSL 社のジェノサーチ HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 kit をそれぞれ使用し、Luminex 測定装置を用いた蛍光プローブ SSO (sequence specific oligonucleotide) 法にておこなった。また、細分別 (high resolution) でタイピングをおこなう場合は、PCR 産物を QIAGEN 社の QIAquick PCR Purification kit を用いて精製し、Applied Biosystem 社の Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1 および Applied Biosystem 社の 3100 Genetic Analyzer を用いた塩基配列決定によりおこなった。上記の DNA 試料 2) の各関節リウマチ感受性遺伝子 SNPs のアリル解析は、TaqMan アッセイ法または PCR 産物の直接シーケンシング解析法にておこなった。TaqMan アッセイ法には、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いた。シーケンシング解析法には、ABI3700 DNA analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

3. PCR 反応

1) 関節リウマチ感受性遺伝子 SNPs の SNP アリル検出法の検討

1-1) 関節リウマチ感受性遺伝子 SNPs

リウマチ感受性遺伝子 (候補領域) として報告されている 12 遺伝子、46 候補領域 (Tamiya, G. et al. Hum. Mol. Genet. 2005 vol.14 2305-2321) の中から、Pc 値と Odds 比を考慮して 5 SNPs (rs N, rs O, rs P, rs Q, rs T) と HLA-DRB1*0405 遺伝子を選択した。

1-2) PCR 用プライマーおよび MPEX 反作用固定化オリゴ DNA の設計

5 SNPs において、PCR 反応に用いるプライマーは、塩基配列データベース (UCSC [<http://genome.ucsc.edu/>]、NCBI ホームページ上の dbSNP [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>]) をもとに、検出する SNP の位置を中心にプライマー間で挟むように変異が報告されていない領域内に設計した (図 1)。HLA-DRB1*0405 遺伝子を検出するための PCR 反応に用いるプライマーは、全ての HLA-DRB1 アリルのエクソン2領域を特異的に増幅するように設計した (図 2)。一方、MPEX 反応において基板に固定する検出用オリゴ DNA は、リウマチ感受性遺伝子関連の 5 SNPs については、正鎖または逆鎖の方向からそれぞれの SNP 位置が 3'末端になるように設計した (図 1)。同様に、HLA-DRB1*0405 遺伝子検出用オリゴ DNA においては、

エクソン2領域内の3カ所のSNPsをそれぞれ検出するように設計した(図2)。これらオリゴDNAの5'末端には基板に固定化するためのC6アミノ化修飾、3'末端には道川らの報告に従いLNA(Locked Nucleic Acid)修飾を施した(図3およびMichikawa, Y et al. Anal. Sci. 2006 vol.22 1537-1545)。

1-3) PCR 反応

PCR反応は、ゲノムDNA 10ngを鋳型にし、DNA polymerase 緩衝液、0.2 mM dNTPs、各0.25 μMプライマー、TaKaRa Taq HS DNA polymerase (TaKaRa) から構成される総量10 μlの反応液でおこなった。反応温度条件は、95°C、30秒→(95°C、10秒→60°C、20秒→72°C、30秒)×35サイクルとし、ABI社のGeneAmp 9700遺伝子増幅装置を用いた。得られたPCR産物は、1.5%アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色により確認した。さらに、ABI社のABI PRISM 7000 Sequence Detection Systemを用いたリアルタイムPCR法によるDissociation curve解析により増幅産物にプライマーダイマーや非特異的な増幅がないことを確認した。

2) Tiopronin (肝機能改善薬) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-A*33 の検出法の検討

肝機能改善薬 Tiopronin の服用によ

りまれに重度な肝障害が引き起こされるが、それにはHLA-A遺伝子の特定のアリルA*33との関連が示唆されている(Kurosaki, M et al. Dig. Dis. Sci. 2000 vol.45 1103-1108)。

2-1) PCR 用プライマーおよび MPEX 反作用固定化オリゴDNAの設計

HLA-A増幅のためのPCR反応には、報告(Mitsunaga S et al. Eur J Immunol 1998 vol. 25 15-17)されているプライマーと反応条件を用いた。これらは、HLA-A遺伝子のエクソン1およびエクソン3の保存領域に位置し、全てのHLA-Aアリルでエクソン2およびエクソン3を含む領域を増幅させる(図4)。一方、MPEX反作用のHLA-A*33検出用オリゴDNAは、エクソン2の多型領域内の2カ所のSNPsをそれぞれ検出するように設計した(図4)。その際にプローブの末端(領域)のLNA化が特異性に与える有効性を調べるために、固定化オリゴDNAの3'末端を、①何も修飾を施さない、②3'末端をLNA修飾、③3'末端および3'末端から5塩基内側までのSNPを全てLNA修飾の3種類を設計し、SNPs検出の特異性や検出感度について比較をおこなった。

2-2) PCR 反応

PCR反応は、ゲノムDNA 10ngを鋳型にし、DNA polymerase 緩衝液、0.2 mM dNTPs、各0.25 μMプライマー、TaKaRa EX Taq DNA polymerase

(TaKaRa) から構成される総量 10 μ l の反応液でおこなった。反応温度条件は、96°C、3 分→(96°C、30 秒→71°C、1 分) ×35 サイクルとし、ABI 社の GeneAmp 9700 遺伝子増幅装置を用いた。得られた PCR 産物は、1.5% アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色により確認した。

2-3) Quantitative PCR (QPCR) 反応

QPCR 反応は、ゲノム DNA 10ng を鋳型にし、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いた。QPCR 反応に用いるプライマーは、MPEX プローブの 5'末端アミノ化修飾を除いたオリゴ DNA である。反応温度条件は、95°C、10 分→(95°C、10 秒→65°C、30 秒) ×50 サイクルとし、ABI 社の ABI PRISM 7000 Sequence Detection System を用いた。

3) Carbamazepine (抗てんかん薬) および Allopurinol (尿酸合成阻害剤) 服用による副作用の遺伝子マーカー

3-1) Carbamazepine (抗てんかん薬) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-B*1502 の検出法の検討

Carbamazepine 服用により、まれに Stevens-Johnson syndrome が引き起こされるが、それには HLA-B*1502 との関連が報告 (Chung, WH et al. Nature. 2004 vol. 428 p486) されている。

3-2) Allopurinol (尿酸合成阻害剤) 服

用による副作用の遺伝子マーカー HLA-B*5801 の検出法の検討

Allopurinol 服用により、まれに重度皮膚障害 (SCAR: severe cutaneous adverse reactions) が引き起こされるが、それには HLA-B*5801 遺伝子との関連が報告 (Hung, Sl et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005 vol. 102 4134-4139) されている。

3-3) PCR 用プライマーおよび MPEX 反作用固定化オリゴ DNA の設計

HLA-B 増幅のための PCR 反応には、報告 (Anthony, S et al. Blood 1999 vol. 94 1471-1477) されているプライマーと反応条件を用いた。これらは、HLA-B 遺伝子のイントロン 1 およびイントロン 3 の保存領域に位置し、全ての HLA-B アリルにおいて、エクソン 2 およびエクソン 3 を含む領域を特異的に増幅させる (図 5)。一方、MPEX 反作用の HLA-B*5801 および HLA-B*1502 検出用オリゴ DNA は、エクソン 2 およびエクソン 3 の多型領域内のそれぞれ 1 カ所の SNP を検出するように設計した (図 5)。そして、2-1) と同様に、固定化オリゴ DNA の 3'末端の修飾 (LNA 化の有無) について 3 種類設計した。

3-4) PCR 反応

PCR 反応は、ゲノム DNA 10ng を鋳型にし、DNA polymerase 緩衝液、0.2 mM dNTPs、各 0.25 μ M プライマー、TaKaRa EX Taq DNA polymerase

(TaKaRa) から構成される総量 10 μ l の反応液でおこなった。反応温度条件は、95°C、4 分 → (94°C、30 秒 → 66°C、1 分 → 72°C、30 秒) × 35 サイクルとし、ABI 社の GeneAmp 9700 遺伝子増幅装置を用いた。得られた PCR 産物は、1.5% アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色により確認した。

4. MPEX 反作用固定化オリゴ DNA の陽性および陰性オリゴ DNA の設計

MPEX 伸長反応により得られる各オリゴ DNA のシグナル強度を相対的に比較し、SNP アリルの判定をおこなうために、シグナル強度の基準 (シグナル 100%) として陽性オリゴ DNA を、バックグラウンドの補正として陰性オリゴ DNA をそれぞれ設計し、目的のオリゴ DNA と一緒に基板上に固定化した。

4-1) 陽性オリゴ DNA

関節リウマチ感受性遺伝子 SNPs および HLA アリル遺伝子の検出用の全ての基板上に、ヒト由来でない塩基配列からなるオリゴ DNA の 5'末端を C6 アミノ化、3'末端をビオチン化修飾したものを固定化した。

さらに、HLA アリル遺伝子検出用基板においては、HLA-DRB1 遺伝子座、HLA-A 遺伝子座、HLA-B 遺伝子座において、それぞれエクソン 2 またはエ

クソン 3 領域内で高度に保存されている領域の塩基配列を HLA-DRB1 遺伝子、HLA-A 遺伝子、HLA-B 遺伝子における内部陽性オリゴ DNA (internal control) として設計し、5'末端を C6 アミノ化、3'末端は何も修飾を施さず、固定化した。

4-2) 陰性オリゴ DNA

関節リウマチ感受性遺伝子 SNPs および HLA アリル遺伝子の検出用の全ての基板上に、ヒト由来でない塩基配列からなるオリゴ DNA の 3'末端を C6 アミノ化修飾したものを固定化した。

5. MPEX 反応

5-1) 基板へのオリゴ DNA の固定化

各 SNP 検出用基板は、最終濃度 0.2 μ M プライマーを基板表面へスポットし、80°C、1 時間の加熱処理による固定化後、アルカリ処理によるブロッキングをおこなった。

5-2) MPEX 伸長反応

それぞれの PCR 産物 (関節リウマチ感受性遺伝子 SNPs においては、各 1 μ l、HLA-A、HLA-B、HLA-DRB1 遺伝子においては各 2~3 μ l) を鋳型にして、1 × ThermoPol II (Mg-free) 緩衝液 (NEB 社)、4 mM MgCl₂、10 μ M Biotin-dUTP (Fermetas 社)、各 10 μ M の dATP、dGTP、dCTP、HotStar Taq DNA polymerase (QIAGEN 社) から構成される総量 100 μ l の反応液を調整し

た。反応溶液を、95°C、15 分間の熱処理後、室温で 5 分間放置した後に、基板上に展開し、ハイブリダイゼーションオープン内で、65°C、1 時間反応させた。反応終了後に、TBS-T (10 mM Tris, pH 7.6、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) 溶液で基板を洗浄した。

5-3) ビオチン-アビジン反応

TBS-T 溶液で 100 倍希釈したアルカリフォスファターゼ共役ストレプトアビジン (Bio-Rad 社) を基板上に展開させ、室温で 30 分間反応後、TBS-T 溶液で基板を洗浄した。

5-4) 可視化反応

0.1% Tween 20 を加えた 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphatase (BCIP) / nitro-blue tetrazolium chloride (NBT) (Perkin Elmer 社) 溶液を基板上に展開させ、室温で 30 分間反応後、0.1% Tween 20 溶液で基板を洗浄し、遠心処理 (1000 rpm、1 分間) により水分を除去した。

5-5) 発色像のシグナル解析

発色像をデジタルカメラにて撮影した。画像を Adobe Photoshop Version 7.0 software (Adobe Systems) を用いて画像補正をおこない、「誰でも DNA アレイ解析ソフト ver. 1.0」(DYNACOM) により、各スポットのシグナル強度を数値化した。そして、陽性コントロール (リウマチ感受性 SNPs では、陽性オリゴ DNA、HLA 遺

伝子では各アリルの内部陽性オリゴ DNA) のシグナルを 1 として、各スポットのシグナル強度の相対値を計算し、SNP アリルの判定をおこなった。

6. 倫理面への配慮

本プロジェクト推進にあたり、分担研究機関である東海大学の医の倫理委員会 / 臨床研究審査委員会に対して、研究課題「HLA 領域におけるゲノム多様性を簡便に検出する技術の開発研究」を申請し、血液採取ならびにヒトゲノム・遺伝子解析研究計画が承認され、また分担研究機関であるジェノダイブファーマ株式会社においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に対して、前述の研究計画が同社倫理審査委員会にて審議され、承認されている。

C. 研究結果

1. 関節リウマチ感受性遺伝子 SNPs の SNP アリルの検出法の検討

1-1) PCR 反応

使用する DNA 試料は、始めに TaqMan アッセイ法または塩基配列決定法により SNP アリルを決定し、各 SNP における 3 種類の SNP アリル (アリル 1 のホモ型、アリル 1 とアリル 2 のヘテロ型、アリル 2 のホモ型) を偏りなく総計 24 サンプル採取したものである。選定した 5 SNPs について、

MPEX 反応の鋳型となる PCR 産物を得るためにそれぞれ PCR 反応をおこなった。rs Q と rs T は、近傍に位置するので 2 SNPs を含んだ領域を増幅させるようなプライマーを用いた PCR 反応をおこなった。得られた PCR 産物は、電気泳動法により目的のサイズであること (図 6)、さらにリアルタイム PCR 法における Dissociation curve 解析により非特異的な増幅はないことを確認した (data not shown)。

1-2) MPEX 反応による SNP アリルの検出

MPEX プローブは、5 SNPs 検出用のそれぞれの対応プローブを全て同一基板上に固定した。そして、鋳型として各 SNP を含んだ 4 種類の PCR 産物 (rs N、rs O、rs P、rs Q-rs T) を等量ずつ加え、同一基板上で 5 SNPs の MPEX 反応をおこなった。各 SNP において得られたシグナル強度から SNP アリルを決定した (図 7)。5 SNPs において各 3 種類の SNP アリルに対応するシグナル強度比がそれぞれ得られることを確認した。24 サンプルについて MPEX 法で得られた 5 SNPs のそれぞれの SNP アリル判定結果が、TaqMan アッセイ法または塩基配列決定法により決定された SNP アリルと一致していた。さらに、それぞれの SNP アリルより得られたシグナル強度を 2 次元グラフ上で一点として表した散布

図を作成することにより、各スポットが 3 種類の SNP アリルに対応する 3 つのクラスターに分けられた (図 8)。3 つのクラスターの境界がはっきり識別できる SNP については、SNP アリル検出の精度がより高く、一方境界が隣接するまたは重なるような SNP においては、誤判定を引き起こす可能性があると考えられる。本実験では、rs T を除く 4 SNPs において、クラスターの識別が比較的明瞭であることから、設計した MPEX プローブは特異的であり検出系は有用であると判断した。一方、rs T については、検出精度のさらなる向上を目指し、G アリルまたは A アリル陰性におけるバックグラウンドのシグナル値を抑えるような MPEX プローブの改良の必要性が示唆された。

2. 関節リウマチと関連する HLA-DRB1*0405 遺伝子の検出法の検討

2-1) PCR 反応

使用する DNA 試料は、始めに HLA タイピング法により HLA-DRB1 アリルを決定したものである。29 サンプル全ての HLA-DRB1 アリルにおいて、得られた PCR 産物は、電気泳動法により目的のサイズであり、その他の非特異的な増幅がないこと (図 9) を確認した。

2-2) MPEX 反応を用いた HLA-DRB1*0405 遺伝子の検出

多型性に富む HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 領域内において、3 カ所の SNPs [(G/A)(T/A)(T/A)]をそれぞれ検出し、[(G)(T)(T)]の SNP アリルが陽性である場合に HLA-DRB1*0405 遺伝子陽性であると判定した (図 10)。MPEX 反応において得られた各 SNP アリルのシグナル強度比より、3 SNPs のそれぞれの SNP アリルを決定した。この MPEX 反応で得られた SNP アリルの組み合わせの結果とタイピング法で既知の HLA-DRB1 アリルより予測される SNP アリルの組み合わせを比較することで、各 MPEX プローブの特異性について検討した。その結果、本実験で用いた DNA サンプルにおいて、3 カ所の SNPs の SNP アリルが、[(G)(T)(T)]の組み合わせが陽性のサンプルは、全てタイピング結果において HLA-DRB1*0405 陽性であった。しかしながら、一部の DNA サンプルにおいて、例えば図 10 に示した a) DRB1*0405, DRB1*1501 のように、HLA-DRB1 アリルがヘテロであり、SNP アリルのシグナル強度比が共に同程度得られると予想されながら、実際は、一方の SNP アリルのシグナル強度が対立する SNP アリルのシグナル強度を低下させるようなシグナル強度の偏りが認められた。また、図 10

の各グラフに表した左から 3 つめの SNP である、3-A SNP アリルのシグナル強度比は、c) DRB1*1502 ホモ型のサンプルでは、ほとんど検出されないが、b) DRB1*0405, DRB1*1302 ヘテロ型や d) DRB1*0401 ホモ型の DNA サンプルでは、非特異的な高いシグナルが検出されていることから、より特異性を示すようなプローブの再設計が必要であると考えられた。以上のことから、一部の MPEX プローブについては特異性の向上が求められるものの、基本的な MPEX 法による HLA-DRB1*0405 遺伝子検出系は、有用であることが示唆された。

さらに我々は、MPEX プローブの特異性およびシグナル強度の向上を目指すための検証実験として、プローブの 3'末端の LNA 修飾の有無について比較検討した (図 11)。なお、図 10 でのシグナル強度比は、3'末端を LNA 修飾したプローブを用いて得られた結果である。シグナル強度においては、LNA 修飾の方が高い (LNA>Normal) SNP が 3 種類 (2-T、3-T、3-A)、変化なし (LNA≒Normal) SNP は、1 種類 (1-A)、修飾を施さない方が高い (LNA<Normal) SNP は 2 種類 (1-G、2-A) であった。一方、特異性においては、LNA 修飾から Normal にすることで、特異性が向上した SNP (1-G/A)、変化しない SNP (2-T/A)、低下した

SNP (3-T/A) とそれぞれ傾向は異なっていた。このことから、配列によっては、プローブの T_m 値や二次構造を考慮することで、LNA 修飾を施さずとも特異性を保持しながらシグナル強度を上げることが可能であることが示唆された。そこで、以降の実験において、プローブの 3'末端修飾における比較検討をおこなった。

3. Tiopronin (肝機能改善薬) 服用による副作用の遺伝子マーカーHLA-A*33の検出法の検討

3-1) PCR 反応

使用した DNA 試料は、予め蛍光プローブ SSO 法または直接塩基配列決定法により HLA-A アリルを決定したものである。全てのサンプルにおいて、得られた PCR 産物は、電気泳動法により目的のサイズであること (図 12) を確認した。

3-2) MPEX 反応を用いた HLA-A*33 遺伝子の検出

多型性に富む HLA-A 遺伝子のエクソン 2 領域内において、2 カ所の SNPs [(C/G)(T/C)] をそれぞれ検出し、[(C)(T)] の SNP アリルが陽性である場合に HLA-A*33 遺伝子陽性であると判定した (図 13)。図 13 に示すように、MPEX 反応により得られた各 HLA-A アリルの SNP アリル判定結果は、既知の HLA-A アリルより予測さ

れる SNP アリルの組み合わせと一致していた。また、全てのサンプルにおいても同様の結果が得られ、MPEX 法により HLA-A*33 遺伝子の特異的に検出できることが示された。さらに、MPEX プローブの 3'末端修飾における比較検討を特異性、増幅効率、シグナル強度を指標に QPCR 法および MPEX 法を用いておこなった (図 14)。HLA-A*33 検出用 MPEX プローブの 3'末端の修飾方法は、検出する SNP アリルの近傍の多型性により、①何も修飾を施さない、②3'末端を LNA 修飾、③3'末端および3'末端から5塩基内側までの SNP を全て LNA 修飾の3種類 (F2 の SNP) および①と②の2種類 (F4 の SNP) となった。QPCR 法において、陽性サンプルと陰性サンプルにおける増幅産物由来の蛍光シグナルを検出する開始サイクル数 C_t の差である ΔC_t が 10 サイクル以上のプローブは、特異性が保持され、SNP アリルの検出に有用であると Michikawa, Y らの論文において報告されている。実際、Normal と LNA 修飾のプライマーを用いて得られたシグナル検出開始サイクル数の差 ΔC_t を比較すると、LNA 修飾の方が大きく、さらに複数修飾をおこなうに従い、 ΔC_t がさらに大きくなる傾向が認められた。しかしながら、一方で LNA 修飾を複数おこなった場合、 C_t 値が大きくなり、PCR

増幅効率の低下が引き起こされることが示された。増幅効率の低下は、MPEX 反応におけるシグナル強度の低下と密接に関係するため、特異性の保持、伸長・増幅効率、シグナル強度の3つのバランスが大変重要となる。さらに、MPEX 反応における各プローブ由来のシグナル強度および検出特異性を比較したところ、シグナル強度は、Normal の方が高いまたは、LNA 修飾との有意な差異は認められず、共に高いという結果が得られた。一方で、特異性においては、Normal および LNA 修飾共に大変高く保持されていた。したがって、3'末端に何も修飾を施さない MPEX プローブを用いた HLA-A*33 遺伝子検出系は、有用であることが示された。

4. Carbamazepine (抗てんかん薬) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-B*1502 の検出法の検討

4-1) PCR 反応

使用した DNA 試料は、始めに蛍光プローブ SSO 法または直接塩基配列決定法により HLA-B アリルを決定したものである。全てのサンプルにおいて、得られた PCR 産物は、電気泳動法により目的のサイズであること (図 15) を確認した。

4-2) MPEX 反応を用いた HLA-B*1502 遺伝子の検出

多型性に富む HLA-B 遺伝子のエクソン2およびエクソン3領域内において、2カ所の SNPs [(T/G)(C/A)] をそれぞれ検出し、[(T)(C)] の SNP アリルが陽性である場合に HLA-B*1502 遺伝子陽性であると判定した (図 16)。Normal および LNA 修飾の MPEX プローブについて検討した結果、HLA-B*1502 検出系において、Normal プローブが LNA 修飾よりシグナル強度が高いこと、バックグラウンドのシグナル強度は両者間で変わらないことを確認した (data not shown)。そこで、図 16 には、Normal プローブを用いて得られた各 SNP アリルのシグナル強度比を示した。B*1502 陽性の DNA サンプルにおいて、MPEX 反応で得られた各 SNP アリル判定結果は、予測される SNP アリルの組み合わせ [(T)(C)] と一致していた。しかしながら、F1 (T/G) における上記の SNP アリル T のシグナル強度比は、対立する SNP アリル G に比べて低いことが a) B*1502, B*1512/19 や b) B*1502, B*5201 のヘテロ型サンプルの結果より明らかとなった。また、F2 (C/A) において SNP アリル A のシグナル強度は d) B*0702 ホモ型では高いのに対し、b) B*1502, B*5201 ヘテロ型では、B*5201 由来の SNP アリル A のシグナルが全く認められなかった。したがって、MPEX 法による HLA-B*1502 検出

系は、一部の SNP アリルのシグナル強度をさらに上げるような MPEX プロブの改良が必要だが、基本的には有用であること、そして、今後、様々な HLA-B アリルの組み合わせからなる DNA 試料を用いて MPEX プロブの有用性を検討することが重要であると考えられた。

5. Allopurinol (尿酸合成阻害剤) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-B*5801 の検出法の検討

5-1) PCR 反応

4-1) PCR 反応に従った。

5-2) MPEX 反応を用いた HLA-B*5801 遺伝子の検出

多型性に富む HLA-B 遺伝子のエクソン2およびエクソン3領域内において、2カ所の SNPs [(C/G)(A/T)] をそれぞれ検出し、[(C)(A)] の SNP アリルが陽性である場合に HLA-B*5801 遺伝子陽性であると判定した (図17)。なお、図17に示している各 SNP アリルのシグナル強度比は、末端を LNA 化していない Normal プロブを用いて得られた値である。B*5801 陽性の DNA サンプルにおいて、MPEX 反応で得られた各 SNP アリル判定結果は、予測される SNP アリルの組み合わせ [(C)(A)] と一致していた。しかしながら、B*5801 陽性サンプル間において、例えば a) B*5801, B*5601 ヘテロ型で

は、B*5801 由来の SNP シグナル C と B*5601 由来の SNP シグナル G のシグナル強度比が同程度であるのに対し、b) B*5801, B*0702 ヘテロ型サンプルにおいては B*5801 由来の SNP シグナル C 強度比が B*0702 由来の SNP シグナル G に対して半分に低下しているというように、一部の DNA 試料でシグナル強度比の偏りが見られた。一方、他方の F2 (A/T) SNP アリルにおいては、十分なシグナル強度比と特異性が認められた。このように、F1 SNP の SNP アリル C のシグナル強度比が安定するような MPEX プロブの改良が必要だが、MPEX 法による HLA-B*5801 検出系は、基本的には有用であることが明らかとなった。

D. 考察

本研究は、「迅速・簡便・安価・正確・高感度」な遺伝子診断法の開発を目的としている。そこで、本年度は、実際の薬物応答に関する SNPs の抽出、疾患の発症リスクに相関性を示す SNPs の抽出をおこない、ヒトの生体サンプルを用いて、各々の SNPs 検出における検証実験をおこない、データの蓄積、遺伝子診断システムの基礎構築を目指した。

始めに、疾患感受性遺伝子の SNPs のモデルとして、関節リウマチの発症に相関性を示す5種類の感受性遺伝子

SNPsおよびHLA-DRB1*0405遺伝子を抽出した。そして、薬剤応答性に関するSNPs（副作用マーカー）として、HLA-A*33 遺伝子（肝機能改善薬 Tiopronin）、HLA-B*1502遺伝子（抗てんかん薬 Carbamazepine）、HLA-B*5801遺伝子（尿酸合成阻害剤 Allopurinol）の3種類のHLAアリルを抽出した。次に、これら各々のSNPアリルの検出における検証実験をおこない、データの収集をおこなった。その結果、各々SNPsの基本的な検出系をそれぞれ構築することができ、MPEX法によるSNPs診断法は有用であることが示された。また同時に解決すべき問題点を明らかにすることができたので、以下に具体的に示す。

1. SNPs間における検出難易度の差

SNPs診断法は、大きく2つに区分される。それは、1つのSNPアリルを検出するか、または複数のSNPアリルを検出し、それらの組み合わせから判定するかである。今回抽出したSNPsは、前者のモデルとして関節リウマチ感受性SNPの5 SNPs、そして後者のモデルとして、4つのHLA遺伝子（HLA-DRB1*0405、HLA-A*33、HLA-B*1502、HLA-B*5801）に分けられる。本実験では、検出難易度の指標として、a. MPEXプローブの設計、b. MPEXプローブの特異性、c. シグナル強度比の主に3つが課題となった。

a. MPEXプローブの設計

標的SNP以外が共通の配列であり、1つのSNPアリルを検出する場合は、基本的に検出したいSNPがプローブの3'末端に位置するように設計する。したがって、一般的に一对のSNPアリルに対してそれぞれ順鎖、逆鎖から設計しても最大4種類となり、その中で最適なプローブを1つずつ選択する。一方、図18で示しているように、HLA遺伝子の特定のアリルを検出するなど高度な多型性を示す領域内の複数のSNP検出では、検出するDNAサンプルがホモ型、ヘテロ型の場合でも標的となる遺伝子型を検出ができるか（つまり検出するSNP同士のシーストランスの関係を考慮する）、また標的SNPアリルの近傍にも多型領域が存在する場合に、(実際のHLA-Bアリルにおける配列5'—gGATggC-3'、5'—gAGAggA-3'、5'—gGACggA-3'間での3'末端SNPアリルC/Aが標的SNPの場合) どのように設計するか、など多面的に考慮して設計する必要がある。

b. MPEXプローブの特異性

HLA-DRB1*0405遺伝子の検出系において、大部分のDNA試料では一方のSNPアリルのシグナルが陰性であり、プローブの特異性を示すにも関わらず、一部のDNA試料では予測シグナル

と異なり、陰性シグナルが陽性シグナルと近似のシグナル強度比を示していた。このように、様々なHLAアレルからなる多くのDNA試料を用いて、MPEXプローブの特異性を検討する必要性が示された。

c. シグナル強度比

HLAアレルがヘテロ型であるDNA試料で、かつそれぞれのHLAアレルが一对 (2つ) のSNPアレル陽性である場合、通常、SNPアレル検出において、最適なMPEXプローブでは、同程度のシグナル強度比を示すのに対し、本実験では一部のDNA試料において、一方のSNPアレルシグナル強度比が対応する別のSNPアレルシグナル強度比を半減させるというような、シグナル強度比の偏りが見られた。シグナル強度比の偏りは、ヘテロ型のSNPアレル判定に誤判定を引き起こすため、原因の追求と改善をはかる必要がある。これらシグナルの偏りは、HLA-A、-DRB1、-B遺伝子でそれぞれ数例ずつ認められた。しかしながら、これらの傾向が特定のHLAアレルによるものとは特定できていない。そこで、各SNPアレルのシグナルが安定して検出されるようなMPEXプローブの改良が必要だと考えられる。

2. MPEXプローブの3'末端修飾

特異的に目的のSNPアレルが検出できるようなプローブ設計は、MPEX法においてきわめて重要である。しかしながら、本実験において、SNP特異性の向上とシグナル強度比の低下、伸長反応・増幅効率の低下が密接に関連していることが明らかとなり、これら3要素のバランスを保ちながらプローブ設計をおこなうことの必要性が強く示唆された。LNA修飾は、オリゴDNAのT_m値を数度上昇させ、特異性の増大やエクソヌクレアーゼによる分解に耐性を示すことから、SNPタイピングに広く使用されている。しかしながら、我々は、高精度かつ安価な診断法を目指しており、本実験においても、LNA修飾にこだわらず、エクソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼ酵素を用いたMPEX反応をおこない、NormalオリゴDNAのT_m値調整による、プローブの特異性の向上やシグナル強度の上昇に一定の成果を出している。その他に、3'末端にミスマッチ塩基を挿入した、ミスマッチオリゴDNAにより、特異性が向上するとの報告 (Baohui L et al. Genomics 2004 vol. 83 311-320) もあり、今後さらに改善の必要があるMPEXプローブにおいて検討していくことにする。

さらに、現在、MPEX法によるSNPs診断法の改良として、PCR反応と

MPEX反応を同一基板上で、並行しておこなう方法について取り組んでいる。これまでは、始めにヒトの生体サンプルを用いてPCR反応をおこない、目的のSNPアリルを含んだ領域を増幅する行程が必要であったが、今後、同時に2つの行程が進行する系が確立すれば、かなりの時間短縮が実現できる。そして、この系の確立と並行して、我々は、さらなる改良を目標に、標的のSNPアリルを含む目的領域の増幅過程も一定温度でおこなう等温増幅法とMPEX法による検出反応を同一基板上でおこなう系の検証をおこなう計画である。この系のこれまではない大きな特長は、温度サイクルをおこなう機器は必要とせず、65℃付近の一定温度を保てるような恒温槽において、SNPs診断が可能になるということである。このように増幅反応とMPEX反応を同時に行う系が実現できれば、我々が目指す「迅速・簡便・安価・正確・高感度」の遺伝子診断法の実現を可能にするだろう。

E. 結論

本年度は、疾患の発症リスクに相関性を示すSNPsとして関節リウマチ感受性遺伝子SNPsのうち5 SNPsとHLA-DRB1*0405遺伝子を、薬物応答に関するSNPsとして、4種類の薬剤の副作用マーカーとして3つのHLAアリ

ルをそれぞれ抽出し、ヒトの生体サンプルを用いて、各々のSNPs検出における検証実験をおこない、データの蓄積、遺伝子診断システムの基礎構築をおこなった。次年度は、目的のSNPアリルを含む検査領域の特異的な増幅過程とSNP検出系を同一基板上で同時におこなうシステムの構築を目指し、「迅速・簡便・安価・正確・高感度」の遺伝子診断法の実現に向けて注力する。

F. 健康危険情報

特に記載すべき内容はなし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

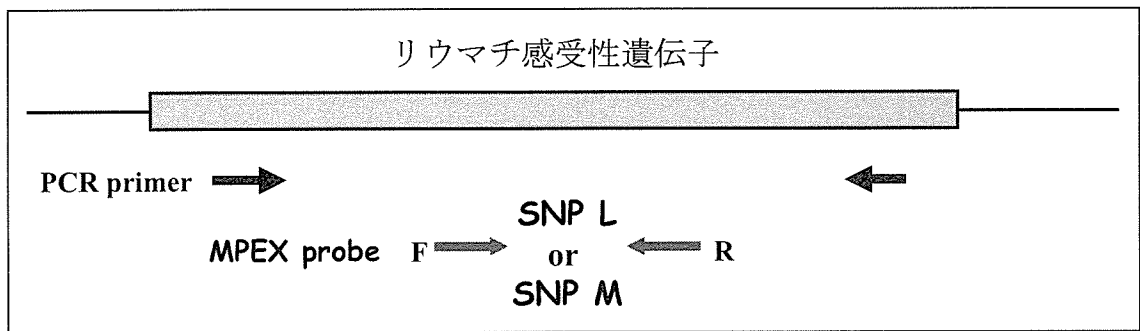


図1 リウマチ感受性遺伝子 SNPs の SNP アリル検出における PCR プライマーおよび

MPEX プローブの位置

検出する SNP の位置を挟むように変異が報告されていない領域内に PCR 用プライマーを設計した。MPEX プローブは、正鎖 (F) または逆鎖 (R) の方向からそれぞれの SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。

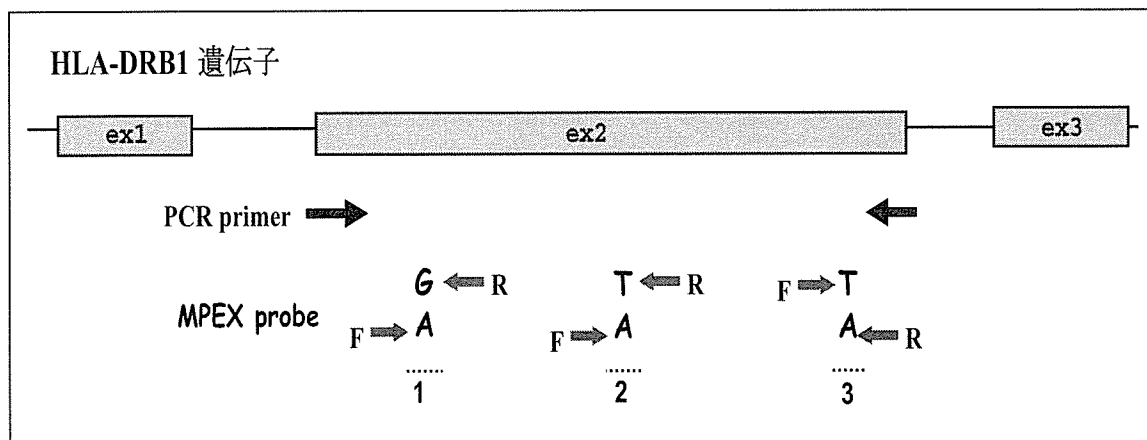


図2 HLA-DRB1 遺伝子の多型検出における PCR プライマーおよび

MPEX プローブの位置

検出する SNP の位置を挟むように変異が報告されていない領域内に PCR 用プライマーを設計した。MPEX プローブは、エクソン 2 領域内の 3 箇所 (1 [G/A], 2 [T/A], 3 [T/A]) をそれぞれ検出するように、正鎖 (F) または逆鎖 (R) の方向からそれぞれの SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。

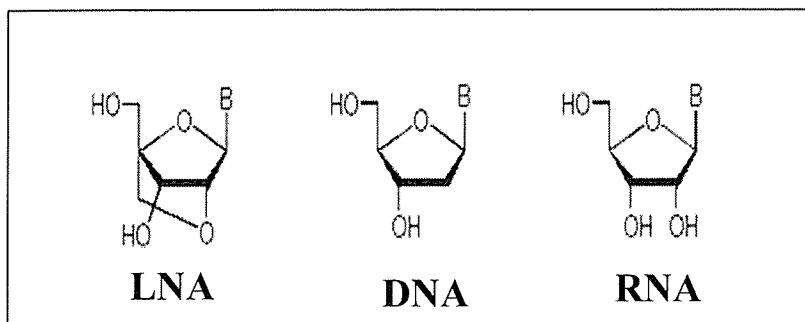


図 3 LNA の構造

LNA は、リボヌクレオシドの 2' 部位の酸素原子と 4' 部位の炭素原子がメチレンを介して結合している 2 つの環状構造をもつ核酸である。

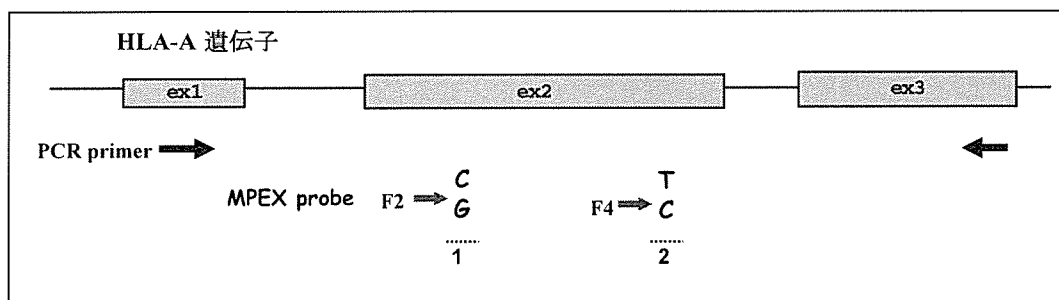


図 4 HLA-A 遺伝子の多型解析における PCR プライマーおよび MPEX プロブの位置、

検出する SNP の位置を挟むようにエクソン 1 およびエクソン 3 の保存領域内に PCR 用プライマーを設計した。MPEX プロブは、エクソン 2 領域内の 2 箇所の SNPs (1 [C/G], 2 [T/C]) をそれぞれ検出するように、正鎖 (F) の方向から SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。

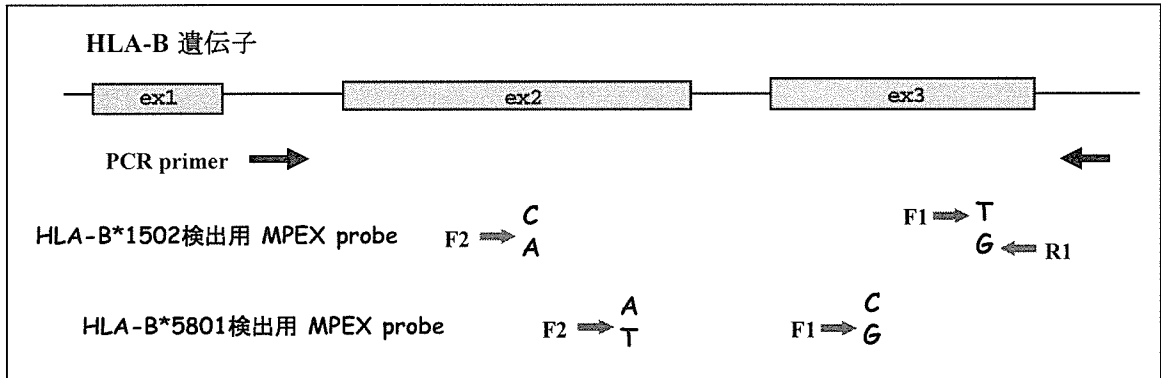


図 5 HLA-B 遺伝子の多型検出における PCR プライマーおよび HLA-B*1502 用 MPEX プローブ、HLA-B*5801 用 MPEX プローブの位置

検出する SNP の位置を挟むようにイントロン 1 およびイントロン 3 の保存領域内に PCR 用プライマーを設計した。

HLA-B*1502 検出用 MPEX プローブは、エクソン 2 領域内の SNP (C/A) について正鎖 (F) の方向から、エクソン 3 領域内の SNP (T/G) について正鎖 (F) または逆鎖 (R) の方向から SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。

HLA-B*5801 検出用 MPEX プローブは、エクソン 2 領域内の SNP (A/T) およびエクソン 3 領域内の SNP (C/G) について正鎖 (F) の方向から、SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。