

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究

オーダーメイド薬物療法のための革新的な ベッドサイド遺伝子診断法の開発と応用

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松原 洋一

平成19年（2007）3月

目 次

I. 総括研究報告

- オーダーメイド薬物療法のための革新的なベッドサイド遺伝子診断法の開発と応用
松原 洋一 1

II. 分担研究報告

1. CASSOH 法を用いた新規遺伝子診断法の確立
松原 洋一 9
2. CASSOH 法に用いる臨床検体の検討
呉 繁夫 14
3. CASSOH 法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用
水柿 道直 18
4. 日本人集団における有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集
佐々木 崇光 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 29

I . 総括研究報告書

オーダーメイド薬物療法のための革新的なベッドサイド遺伝子診断法の開発と応用

総括研究者 松原 洋一（東北大学大学院・教授）

研究要旨

本研究の目的は、私たちが独自に開発したCASSOH法を実用化・臨床応用することによって、簡便・迅速にsingle nucleotide polymorphism (SNP)が検出できるベッドサイド遺伝子診断法を確立し、オーダーメイド薬物療法を推進することにある。本年度は、1) CASSOH法に用いる第2世代イムノクロマト試験紙の作成、2) 遺伝子解析時間の大幅な短縮、3) 非侵襲的な検体を用いた遺伝子診断法の確立、を行なった。さらに、4) CASSOH法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用とともに、5) 日本人集団における有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集をおこなった。

分担研究者

呉 繁夫 東北大学大学院・助教授

水柿 道直 東北薬科大学・教授

佐々木 崇光 東北薬科大学・助手

研究協力者

鎌田 文顕 東北大学大学院
・流動研究員

作山 佳奈子 東北薬科大学・大学院生

られてきている。しかしながら、このようなpharmacogeneticsに基づく個別化薬物療法は、オーダーメイド医療の掛け声とは裏腹に、一般の医療機関では実施されていない。遺伝子解析研究成果を実際に臨床へ応用するにあたって大きな障壁となっているのは、現時点では一般病院や診療所などの臨床の現場で施行が可能なSNP検出法が存在しないことである。

臨床の場で必要とされるSNP検出は、例えばこれから処方しようとする薬剤に対する代謝酵素の遺伝子多型など少項目のSNP情報である。しかも、短時間のうちにベッドサイドや外来診療の場で判定できることが求められるため、中央施設や検査会社などに検体送付することなく、病院内の一般臨床検査技師によって実施できることが必要

A. 研究目的

ゲノム研究の進展に伴い、薬物動態、薬効、副作用発現等の個人差が薬物代謝酵素や薬物標的分子等の遺伝子多型に起因することが次々と明らかになってきた。特に遺伝子上の一塩基多型 (SNP) 診断は、薬物投与前に患者の薬剤反応性を予測する上で大いに期待されている。すでに、これまでの研究によってエビデンスが積み重ねられ、臨床的に有用と考えられるものが数多く知

である。

本研究の目的は、私たちが独自に開発したベッドサイド遺伝子診断法（CASSOH法；Matsubara & Kure, Hum Mutat 2003;22:166-172）を実用化・臨床応用することにより、一般医療機関において薬理遺伝学的遺伝子多型をその場で検出できる遺伝子診断法を確立し、個別化薬物療法が実施できる体制を確立することにある。本年度は、1) 第2世代イムノクロマト試験紙の技術的改良、2) CASSOH法に用いる臨床検体の検討、3) CASSOH法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用、および4) 日本人集団における有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集を行なった。

B. 研究方法

1) 第2世代CASSOH法の開発と臨床応用 (松原)

Schleicher & Schuell 社が Whatman 社に買収されたことにより、今後の安定供給と品質管理を見直す必要が生じた。そこで、試験紙の各素材について市販の部材で安定供給が期待されるものを広く渉猟し、比較検討をおこなった。また、PCR 増幅条件について再検討を加え、どこまで反応時間の短縮が可能かどうか検討を加えた。

2) CASSOH 法に用いる臨床検体の検討 (呉)

これまで、DNAを含む臨床検体として血液が用いられてきた。しかしながら、血液検体は、1) 血管穿刺が必要なため医療関係者でなければ採取出来ない、2) 採取に痛みの伴う、3)

感染のリスクが大きい、4) 小児などでは採取に時間がかかる、5) 直接PCR反応に添加すると増幅高率が著しく悪い、などの欠点を持つ。そこで、CASSOH 法に利用可能な血液以外のDNAを含む臨床検体を検討した。

3) CASSOH 法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用 (水柿)

CASSOH 法を利用した遺伝子診断法の感度と特異性を向上させるために、ビオチン標識プローブと競合プローブの鎖長を変化させ、指摘条件を決定した。チオプリンメチルトランスフェラーゼ (TPMT) 遺伝子の SNP (TPMT*3C(719A>G)) 検出系では、従来、野生型検出ビオチンプローブ及び競合プローブは 18mer、変異型検出ビオチンプローブ及び競合プローブは 17mer の合成オリゴヌクレオチドを用いていた。今回、12~20mer のプローブをそれぞれ合成し、最も感度良く、特異的に検出できる組合せが従来から用いてきた野生型で 18mer、変異型で 17mer のプローブであることが判明した。また、CYP2C19 遺伝子の2種の SNP 検出系 (CYP2C19*2(681G>A) 及び CYP2C19*3(636G>A)) でも、同様にプローブ鎖長の最適化ができた。また、CASSOH 法による TPMT*3C 検出系においては、唾液由来の DNA を用いた場合でも迅速な検出が可能であった。

4) 日本人集団における有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集 (佐々木)

テーラーメイド医療の展開には、薬剤反応性に影響を及ぼすと考えられる遺伝子をリストアップするとともに、特に遺伝子多型に人種差が

報告されているチオプリンメチルトランスフェラーゼ(TPMT)、CYP4A22 及び CYP2D6 遺伝子に関しては、日本人集団に特徴的な SNP が存在するため、詳細な解析が必要とされる。今回、日本人 DNA 検体を用いて TPMT、CYP4A22、CYP2D6 遺伝子の SNP スクリーニングを行った。

C. 研究結果

1) 第2世代CASSOH法の開発と臨床応用 (松原)

第2世代のイムノクロマト試験紙を完成した。この試験紙は現行の第1世代試験紙と比較して、感度が1.6倍となるとともに発色の立ち上がりが早くなった。また、汎用型のPCR機器(GeneAmp PCR System 9700)を用いたままで、増幅条件の反応について再検討を加え、増幅反応時間を71分から40分にまで大幅に短縮することに成功した。

2) CASSOH法に用いる臨床検体の検討(呉)

CASSOH法に利用可能な血液以外のDNAを含む臨床検体を検討した。その結果、唾液がDNAのソースとして優れている事が判明した。唾液の採取方法及び処理過程の簡略化と迅速化を目指して検討した結果、唾液採取後約10分でPCR反応へ利用可能なプロトコールを確立する事が出来た。

3) CASSOH法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用(水柿)

チオプリンメチルトランスフェラーゼ(TPMT)遺伝子のSNP(TPMT*3C(719A>G))検出系では、最も感度良く、特異的に検出できる組合せ

が従来から用いてきた野生型で18mer、変異型で17merのプロープであることが判明した。また、CYP2C19遺伝子の2種のSNP検出系(CYP2C19*2(681G>A)CYP2C19*3(636G>A))でも、同様にプロープ鎖長の最適化ができた。また、CASSOH法によるTPMT*3C検出系においては、唾液由来のDNAを用いた場合でも迅速な検出が可能であった。

4) 日本人集団における有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集(佐々木)

日本人DNA検体を用いてTPMT及びCYP4A22遺伝子のSNPスクリーニングを行った。また、日本人集団で報告されているCYP2D6バリエントアレル由来の酵素タンパク質をCOS7細胞に発現させ、それらの機能解析を行った。その結果、TPMT遺伝子上にアミノ酸変異を伴う新規SNPを発見した。また、CYP4A22に関しては多様なバリエントアレルが存在することが明らかになった。さらに、CYP2D6バリエント酵素の中で活性低下を示すSNPが特定することができた。

代表的な薬理遺伝学的SNPについて、日本人集団における頻度を解析した結果を表1および表2にまとめた。

D. 考察

本年度は、CASSOH法の実用化と臨床応用に向けて実地に即した各種の検討を行なった。

まず、ロット差が少なく品質管理が容易で、将来的に大量供給が可能な第2世代の試験紙を作成することに成功した。次に、非侵

襲的な迅速遺伝子診断法のために、唾液を約10分間程度の処理で、PCR反応系へ直接添加することを可能にするプロトコールを確立した。唾液検体をこのプロトコールで処理することにより、CASSOH法による遺伝子検査の迅速化を達成した。

以上の検討によって、検体採取から60分以内に遺伝子検査結果を得ることが可能となった(図1)。特殊な高額機器を用いないSNPタイピングとしては、世界でもっとも早い方法だと考えられる。この手法を用いることによって、本研究が目指した、簡便迅速に遺伝子検査を行い、その結果に基づいたテーラーメイド処方一般病院の外来で行うことができると考えられる(図2)。

また今回、日本人における新たな薬理遺伝学的遺伝子多型を見出しており、その臨床的意義を探索することが今後の課題と考えられる。臨床的に有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集と評価については、これらを整理し、国際誌(Clin. Chim. Acta, 363, 177-186 (2006))に発表した。日本人では、白人におけるSNPの頻度分布やハプロタイプに差があることから、有用性の高い情報と考えられる。

E. 結論

CASSOH法の更なる検討と改良によって、本手法による薬理遺伝的遺伝子多型の検出をもちいた前臨床試験の実施が可能と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M. Genetic testing for pharmacogenetics and its clinical application in drug therapy (Review). *Clin Chim Acta* 363:177-186, 2006
- 2) Hiratsuka M, Ebisawa A, Sakuyama K, Matsubara Y, Kure S, Soya Y, Konno Y, Sasaki T, Kishiba A, Mizugaki M. Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of pharmacogenetic single nucleotide polymorphisms (SNPs). *J Biochem Biophys Methods*. 67:87-94, 2006.
- 3) Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillesen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet*. 38:294-6, 2006.
- 4) Sasaki T, Goto E, Konno Y, Hiratsuka M, Mizugaki M. Three novel single nucleotide polymorphisms of the human thiopurine s-methyltransferase gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokinet*. 21:332-336, 2006.
- 5) Hiratsuka M, Nozawa H, Katsumoto Y, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Mizugaki M. Genetic polymorphisms and haplotype structures of the CYP4A22 gene in a Japanese population. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*. 599:98-104, 2006.
- 6) del Toro M, Arranz JA, Macaya A, Riudor E, Raspall M, Moreno A, Vazquez E, Ortega A, Matsubara Y, Kure S, Roig M. Progressive vacuolating glycine leukoencephalopathy with

pulmonary hypertension. *Ann Neurol.* 60:148-52, 2006.

- 7) Kure S, Korman SH, Kanno J, Narisawa A, Kubota M, Takayanagi T, Takayanagi M, Saito T, Matsui A, Kamada F, Aoki Y, Ohura T, Matsubara Y. Rapid diagnosis of glycine encephalopathy by ¹³C-glycine breath test. *Ann Neurol.* 59:862-7, 2006.
- 8) Kamada F, Kure S, Kudo T, Suzuki Y, Oshima T, Ichinohe A, Kojima K, Niihori T, Kanno J, Narumi Y, Narisawa A, Kato K, Aoki Y, Ikeda K, Kobayashi T, Matsubara Y. A novel KCNQ4 one-base deletion in a large pedigree with hearing loss: implication for the genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet.* 51:455-60, 2006.
- 9) Kure S, Kato K, Dinopoulos A, Gail C, DeGrauw TJ, Christodoulou J, Bzduch V, Kalmanchev R, Fekete G, Trojovský A, Plecko B, Breningstall G, Tohyama J, Aoki Y, Matsubara Y. Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia. *Hum Mutat.* 27:343-52, 2006.
- 10) Sato K, Kanno J, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. De novo and salvage pathways of DNA synthesis in primary cultured neural stem cells. *Brain Res.* 1071:24-33, 2006.
- 11) Sakamoto O, Ohura T, Matsubara Y, Takayanagi M, Tsuchiya S. Mutation and haplotype analyses of the MUT gene in Japanese patients with methylmalonic acidemia. *J Hum Genet.* 52:48-55, 2007

(2) 学会発表

- 1) Sakuyama K, Sasaki T, Hiratsuka M, Ebisawa A, Konno Y, Mizugaki M. Functional analysis

of the allelic variants of the CYP2D6 gene in the Japanese population, 16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Budapest, Hungary, September 2006

- 2) Kanno J, Hutchin T, Kamada F, Narisawa A, Aoki Y, Matsubara Y, Kure S. Genomic deletion within GLDC gene is a major cause of nonketotic hyperglycinemia: screening of 65 patients with multiplex ligation-dependent probe amplification, The 10th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Makuhari, September, 2006
- 3) 佐々木崇光、後藤英美、金野由美子、平塚真弘、水柿道直、石川正明、Denaturing HPLCを用いたチオプリン S-メチルトランスフェラーゼ (TPMT) の SNP 探索、日本薬学会第 127 年回、富山、2007 年 3 月
- 4) 菅野潤子、呉繁夫、青木洋子、松原洋一、新しい欠失変異検索法である MLPA 法による非ケトーシス型グリシン血症の遺伝子診断、第 109 回日本小児科学会学術集会、金沢、2006 年 4 月
- 5) 菅野潤子、鎌田文頭、成澤あゆみ、青木洋子、呉繁夫、松原洋一、新しい欠失変異検索法である MLPA 法による非ケトーシス型グリシン血症の遺伝子診断、日本人類遺伝学第 51 回大会、米子、2006 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ 発明の名称 「遺伝子変異検出法」
- ・ 出願番号 特願2002-323419
- ・ 国際特許出願番号 PTC/JP03/14204
- ・ 出願国 PTC

図1. 第2世代CASSOH試験紙を用いた遺伝子検査

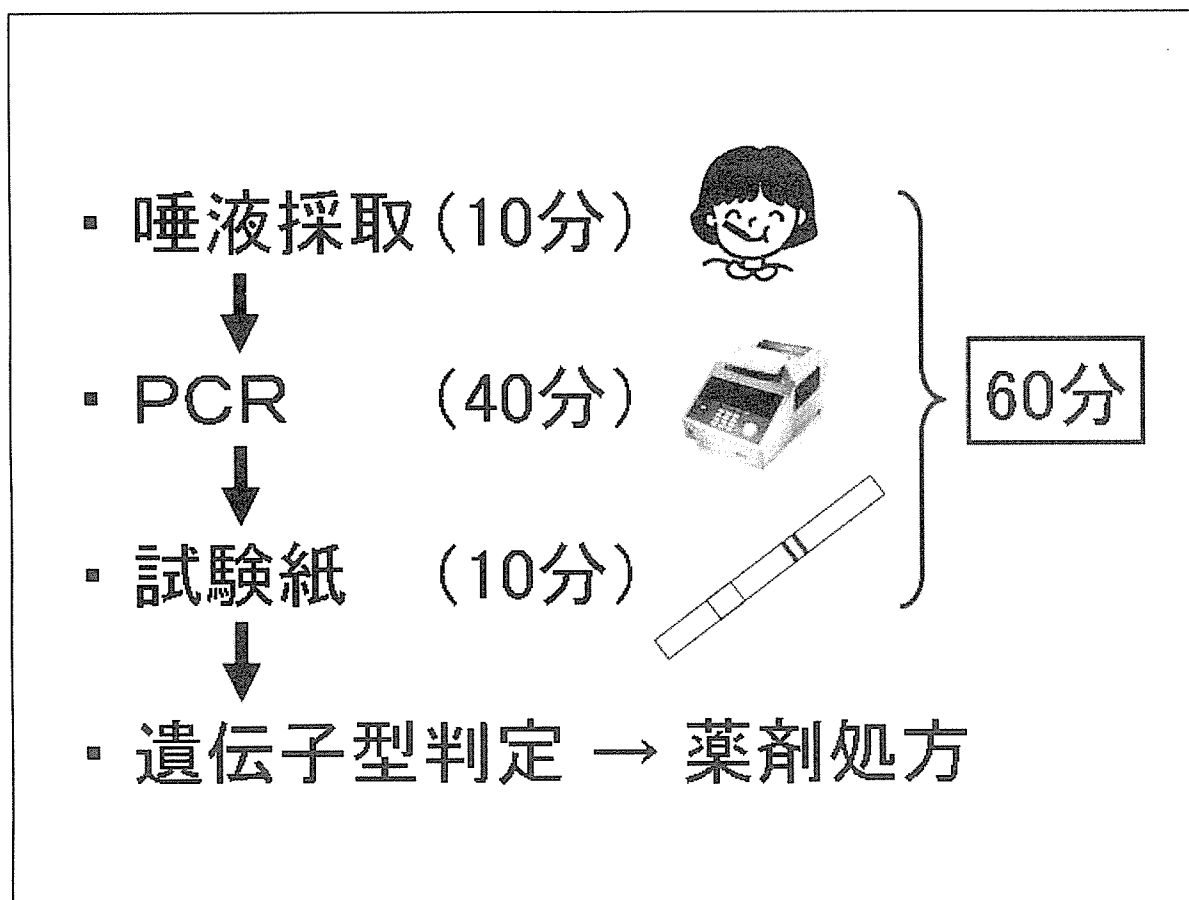


図2. 病院外来診療における薬理遺伝学的遺伝子検査と個別化処方

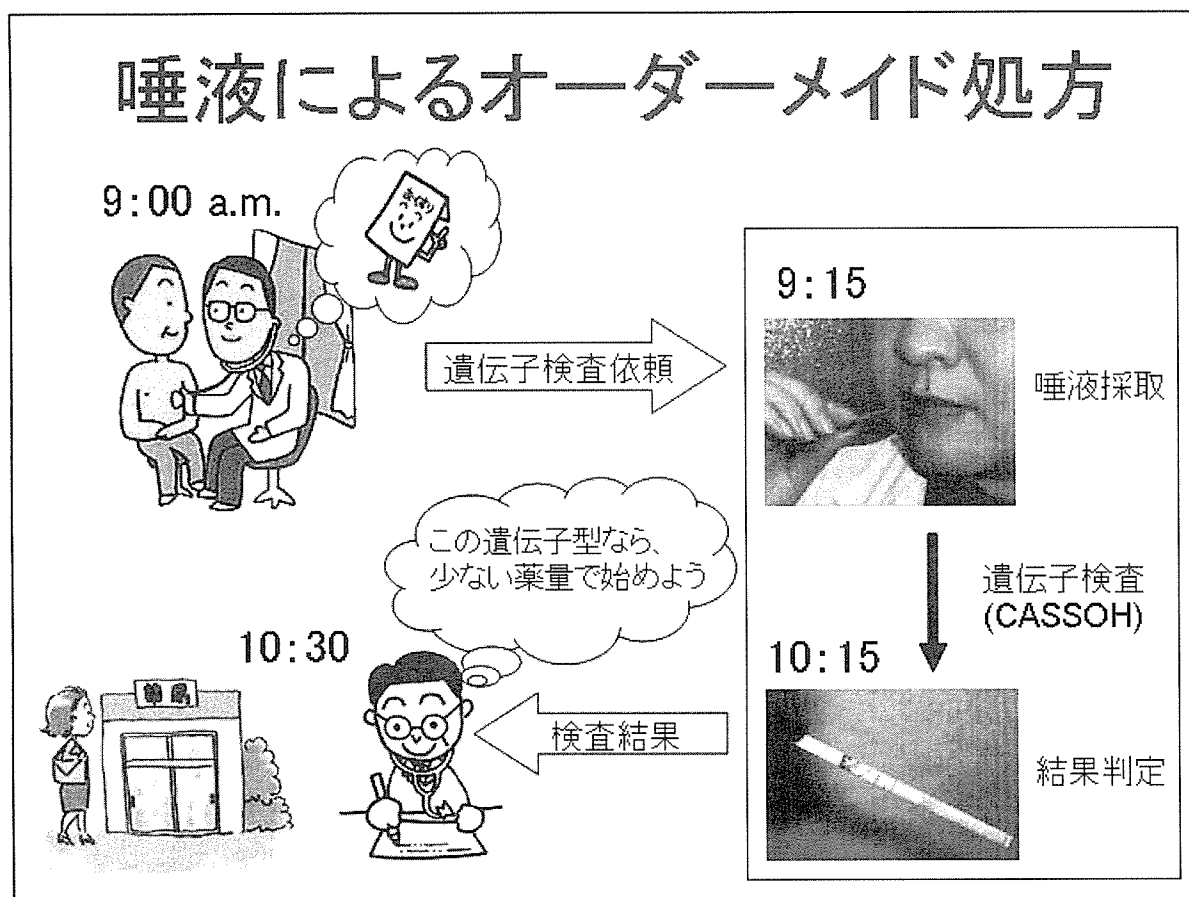


表 1. 日本人集団におけるP450関連の薬理遺伝学的遺伝子多型 (平塚)

Gene	Genotypes	Major allelic variants	Phenotypes: Frequency	
			Caucasian	Asian (Japanese)
CYP1A1	*1- *11			
CYP1A2	*1- *14	*1F, *2, *3, *4, *5, *6		
CYP1B1	*1- *26			
CYP2A6	*1- *17	*2, *4, *7, *9, *10		
CYP2A13	*1- *9			
CYP2B6	*1- *15			
CYP2C8	*1- *5			
CYP2C9	*1- *13	*3	EM: 97% PM: 3%	
CYP2C19	*1- *16	*2, *3	EM: 94-98% PM: 2-6%	EM: 80% PM: 20%
CYP2D6	*1- *51	*2 × N, *3, *4, *5, *6, *10, *17	EM: 90-97% PM: 3-10%	EM: 99% PM: 1%
CYP2E1	*1- *7	*2, *3, *4		
CYP2J2	*1- *7			
CYP2R1	*1- *2			
CYP2S1	*1- *3			
CYP3A4	*1- *19	*4, *5, *6		
CYP3A5	*1- *10	*3, *6		
CYP3A7	*1			
CYP3A43	*1- *3			
CYP4B1	*1- *7			

A description of the alleles can be found on the human cytochrome P450 allele nomenclature committee home page (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>).

EM=extensive metabolizer; IM=intermediate metabolizer; PM=poor metabolizer.

Table 3 Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes (non-P450)		Phenotypes: Frequency	
Drug-metabolizing enzymes	Gene	Genotypes	Major allelic variants
		Caucasian	Asian (Japanese)
Thiopurine S-methyltransferase	TPMT	*1 - *15	*2, *3
			EM: 73-89% IM: 11-27% PM: 0-4%
Dihydropyrimidine dehydrogenase	DPYD	*1 - *12	*2
			EM: 97% PM: 3%
N-acetyltransferase 2	NAT2	*4 - *19	*5, *6, *7, *14
			EM: 25% IM: 25% PM: 50%
UDP-glucuronosyltransferase 1A1	UGT1A1	*1 - *64	*6, *7, *27, *28, *29
			EM: 90% PM: 10%
Catechol O-methyltransferase	COMT		Val158Met
			EM: 75% PM: 25%
Glutathione S-transferase M1	GSTM1		null
Glutathione S-transferase M3	GSTM3		*A, *B
Glutathione S-transferase-P1	GSTP1		Ile105Val
Glutathione S-transferase-T1	GSTT1		null

EM = extensive metabolizer; IM = intermediate metabolizer; PM = poor metabolizer.

II. 分担研究報告

第2世代CASSOH法の開発と臨床応用

分担研究者 松原 洋一 (東北大学大学院・教授)

研究要旨

本分担研究の目的は、私たちが独自に考案したCASSOH法を改良し、一般病院でも簡便・迅速にsingle nucleotide polymorphism (SNP)が検出できるベッドサイド遺伝子診断法を確立することである。本年度はまず、CASSOHに用いるイムノクロマトグラフィー試験紙の素材について徹底的な見直しと検討を行った。その結果、ロット差が少なく品質管理が容易で、将来的に大量供給が可能な第2世代の試験紙を作成することが可能となった。つぎに、遺伝子検査時間の短縮を目的として、PCR増幅反応条件について再検討をおこなった。その結果、従来は75分であったPCR増幅反応時間を40分にまで短縮することができた。この改良に検体処理の簡素化をあわせることにより、検体採取から60分以内に遺伝子検査結果を得ることができるようになった。これは今までに開発された種々の遺伝子診断法の中で最速であり、しかも特殊な高額ハイテク機器を用いずにおこなえる遺伝子検査法としては他に類を見ないものである。今後、薬理遺伝学的遺伝子多型の臨床応用のツールとして有用と思われる。

A. 研究目的

薬物代謝酵素や薬物標的分子等の遺伝子多型に起因する薬物動態・薬効・副作用発現等の個人差をあらかじめ遺伝子検査によって同定し、その結果を基に個別化薬剤処方をおこなう「テーラーメイド医療」を具現化するためには、一般病院でも施行が可能な簡便かつ迅速な遺伝子検査法(SNP検出法)の確立が急務である。

私たちが独自に開発した遺伝子診断法(CASSOH法)は、高額な特殊機器を使用することなく2ステップの操作を行うだけの簡便・迅速な手法で、採血から2時間以内

にSNPの遺伝子型判定が可能なこれまでにない手法である(Matsubara & Kure, Hum Mutat 2003;22:166-172)。

本年度の研究は、まず、CASSOHに用いるイムノクロマトグラフィー試験紙の素材について徹底的な見直しと検討を行った。これによって、ロット差が少なく品質管理が容易で、将来的に大量供給が可能な第2世代の試験紙の作成を目指した。つぎに、遺伝子検査時間の短縮を目的として、PCR増幅反応条件について再検討をおこなった。

B. 研究方法

① イムノクロマトグラフィー試験紙の改良による第2世代試験紙の作成

Schleicher & Schuell社がWhatman社に買収されたことにより、従来のイムノクロマトグラフィー試験紙に用いていた部材（図1）の供給がなくなり、今後の安定供給と品質管理を見直す必要が生じた。そこで、試験紙の各素材について市販の部材で安定供給が期待されるものを広く渉猟し、比較検討をおこなった。

② PCR増幅条件の検討

まず、キャピラリーPCR機器を用いた高速遺伝子増幅反応とCASSOH試験紙を組み合わせた。つぎに、従来と同じく汎用型のPCR機器(GeneAmp PCR System 9700、ABI社)を用いたままで、増幅条件の反応について再検討を加え、どこまで反応時間の短縮が可能かどうか検討を加えた。

C. 研究結果

① イムノクロマトグラフィー試験紙の改良による第2世代試験紙の作成

まず、ニトロセルロースメンブランについては、4社が製造する12種類を比較検討した。その結果、A社の素材のうち1種類が現行のものと同等の性能を有しロット間のばらつきが少ないことが判明した。ボトムチップについては各社14種類の素材を比較検討し、B社のGlass fiber sheetを選定した。コンジュゲートパッドについても9種を比較した。

抗体については、将来的な安定供給と品

質管理の観点に基づき、ポリクローナル抗体からモノクローナル抗体への変更をおこなった。また、avidin塗布条件、乾燥条件についても検討をおこなった。プローブの標識物質については、現行のDigoxigeninに加えて、FITCも用いることができることを確認した。

さらに試験紙構造そのものを見直し、より部材数が少ない簡素なものとした。以上の検討により完成した第2世代のイムノクロマト試験紙を図2に示す。この試験紙は現行の第1世代試験紙と比較して、感度が1.6倍となるとともに発色の立ち上がりが早くなった。

② PCR増幅条件の検討

まずIdaho Technology社のRapidCyclerを用い、キャピラリーチューブ内でPCR反応をおこなった。その結果、増幅時間そのものを71分から20分にまで大幅に短縮することが可能であった。しかしながら、キャピラリーチューブへの反応液充填と終了後の反応液回収操作が必要であった。

つぎに、汎用型のPCR機器(GeneAmp PCR System 9700)を用いたままで、増幅条件の反応について再検討を加えた。その結果、1) 現行の3ステップの温度サイクルを2ステップとする、2) アニール温度を55°Cから65°Cに上昇させる、3) 熱変性温度を初回のみ98°Cとし、以降を92°Cとするという工夫によって、71分から40分にまで大幅に短縮することが可能であった。

D. 考察

個別化薬物療法のための遺伝子診断を一般病院で普及させるためには、「早い、安い、旨い」の三原則が必要である。すなわち、まず迅速に結果が得られ、外来で患者さんが待っている間に処方反映できることが肝要である。次に、「安い」ということは必ずしも見かけ上の1件当たりの単価が安いということではない。ヒトゲノム研究の過程で生まれたハイテクの手法は、1SNPあたり10円などという謳い文句がされているが、現実には高額な特殊機器の購入が前提となっている。また、数百から数十万種類のSNPの同時検出をした場合のコスト計算であり、その患者にとって今必要なSNP情報だけを得ようとするときわめて高額な検査費用となる。「旨い」ということは、再現性が高く信頼できる手法と言い換えることができる。

本研究で改良を加えたCASSOH法は、検体採取から60分以内に、安価に（実費で数百円）、しかも確実な遺伝子検査結果が得られることが実証済みである。さらに、手法そのものが簡便で、マイクロアレイのように習熟した技術者を要しないという点もメリットである。このような観点では、現行の手法を超えるものは存在しないといってよいであろう。

本年度の研究では、試験紙の改良によって、現行の第1世代試験紙と比較して感度が1.6倍となるとともに発色の立ち上がりが早くなり、より迅速な遺伝子型判定を可能とした。また、現行のDigoxigeninに加えて、FITCも用いることができるようになり、複数のSNPの同時検出への道を開くことが

できた。

反応時間については、キャピラリー型PCR機器の導入によって劇的な短縮が達成できた。しかしながら、キャピラリーチューブへの反応液充填と終了後の反応液回収操作に余分な操作と時間が必要であった。また、キャピラリー型PCR機器の購入が前提となるため、本研究の趣旨から外れるという難点があった。

そこで、あくまで「一般病院にすでに備わっている」汎用型の機器の使用にこだわり、これまで常識とされてきたPCR反応条件を新たな視点で見直した。その結果、全体の検査時間を約半分の60分に縮めることができた。

以上の手法を用いて、実際に臨床の現場に薬理遺伝学的遺伝子診断を導入することにより、個別化薬物療法が一般病院にも手の届くものにする可以考虑。

E. 結論

安定供給が可能な第2世代のCASSOHイムノクロマト試験紙を作成すると共に、遺伝子解析時間を従来の120分から60分に短縮した。この手法を用いることにより、一般病院において薬理遺伝学的検査を簡便かつ迅速に施行することが可能と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Hiratsuka M, Ebisawa A, Sakuyama K, Matsubara Y, Kure S, Soya Y, Konno Y, Sasaki T, Kishiba A, Mizugaki M. Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of pharmacogenetic single nucleotide polymorphisms (SNPs). *J Biochem Biophys Methods*. 67:87-94, 2006.
- 2) Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet*. 38:294-6, 2006.
- 3) del Toro M, Arranz JA, Macaya A, Riudor E, Raspall M, Moreno A, Vazquez E, Ortega A, Matsubara Y, Kure S, Roig M. Progressive vacuolating glycine leukoencephalopathy with pulmonary hypertension. *Ann Neurol*. 60:148-52, 2006.
- 4) Kure S, Korman SH, Kanno J, Narisawa A, Kubota M, Takayanagi T, Takayanagi M, Saito T, Matsui A, Kamada F, Aoki Y, Ohura T, Matsubara Y. Rapid diagnosis of glycine encephalopathy by 13C-glycine breath test. *Ann Neurol*. 59:862-7, 2006.
- 5) Kamada F, Kure S, Kudo T, Suzuki Y, Oshima T, Ichinohe A, Kojima K, Niihori T, Kanno J, Narumi Y, Narisawa A, Kato K, Aoki Y, Ikeda K, Kobayashi T, Matsubara Y. A novel KCNQ4 one-base deletion in a large pedigree with hearing loss: implication for the

genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet*. 51:455-60, 2006.

- 6) Kure S, Kato K, Dinopoulos A, Gail C, DeGrauw TJ, Christodoulou J, Bzduch V, Kalmanchev R, Fekete G, Trojovský A, Plecko B, Breningstall G, Tohyama J, Aoki Y, Matsubara Y. Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia. *Hum Mutat*. 27:343-52, 2006.
- 7) Sato K, Kanno J, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. De novo and salvage pathways of DNA synthesis in primary cultured neural stem cells. *Brain Res*. 1071:24-33, 2006.
- 8) Sakamoto O, Ohura T, Matsubara Y, Takayanagi M, Tsuchiya S. Mutation and haplotype analyses of the MUT gene in Japanese patients with methylmalonic acidemia. *J Hum Genet*. 52:48-55, 2007

(2) 学会発表

特許との兼ね合いもあることから、本研究に直接関連する学会発表はおこなっていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ 発明の名称 「遺伝子変異検出法」
- ・ 出願番号 特願2002-323419
- ・ 国際特許出願番号 PTC/JP03/14204
- ・ 出願国 PTC

<研究協力者>

鎌田文顕、呉 繁夫

図1 現行のCASSOH試験紙の概観と使用している部材

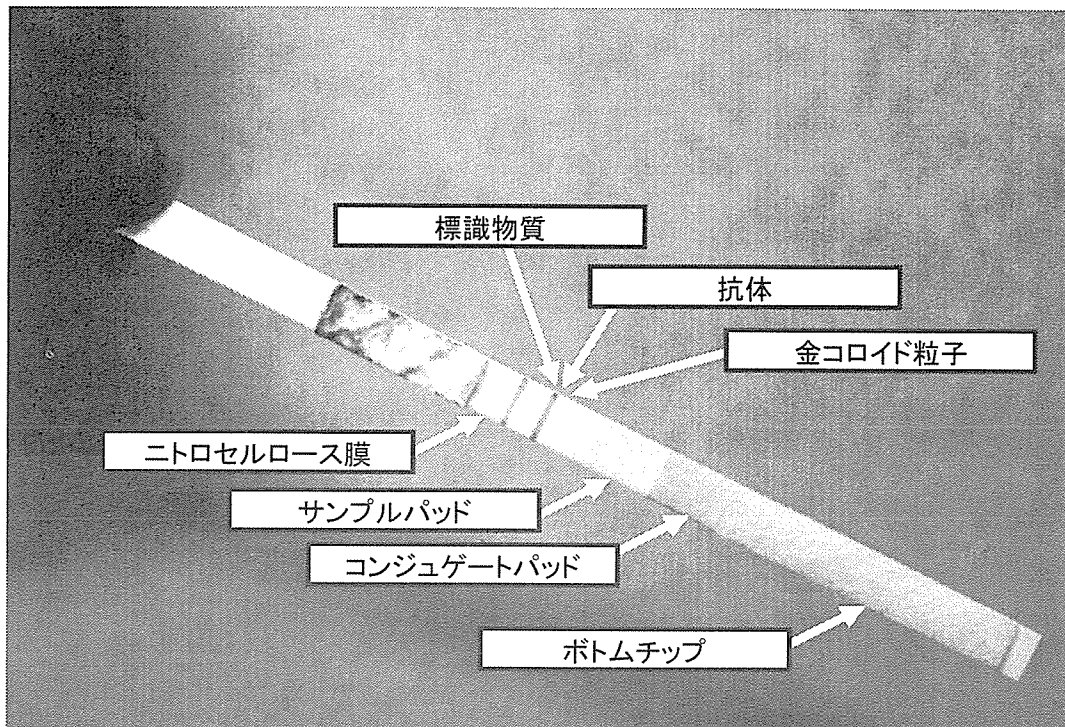
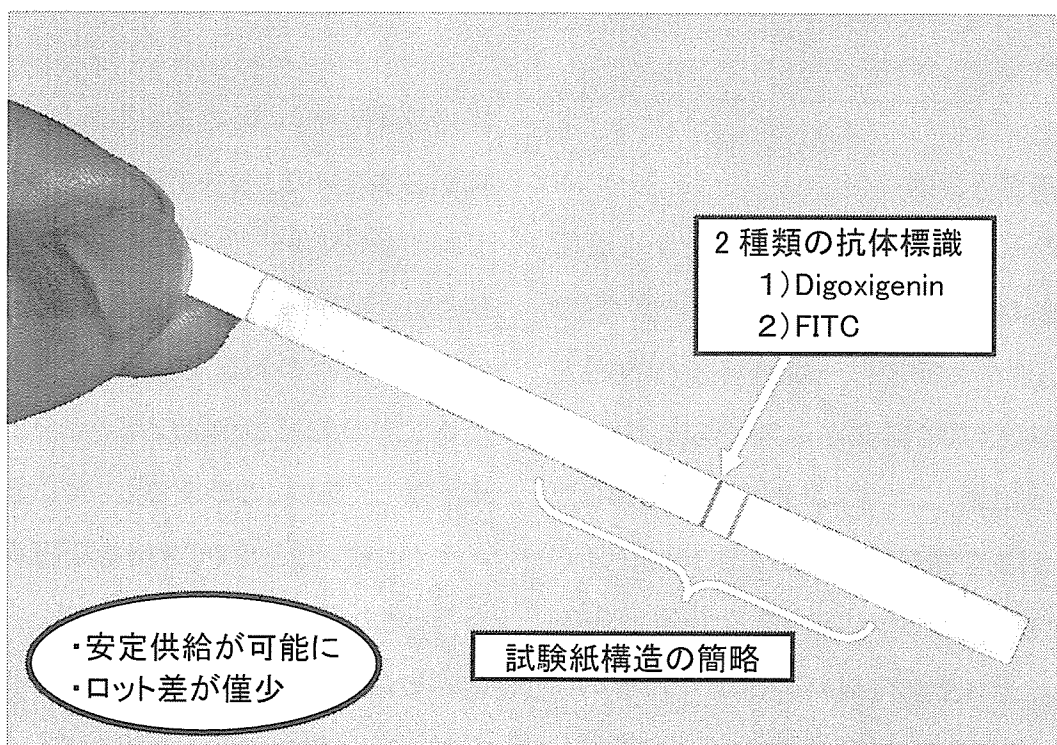


図2 第2世代CASSOH試験紙の概観



「CASSOH法に用いる臨床検体の検討」

分担研究者 呉 繁夫 (東北大学大学院・助教授)

研究協力者 鎌田文頭 (東北大学大学院・流動研究員)

研究要旨

CASSOH法実施には、DNAを含む臨床検体が必要とする。これまで、DNAを含む臨床検体として血液を用いてきた。しかしながら、血液検体は、1)血管穿刺が必要なため医療関係者でなければ採取出来ない、2)採取に痛みの伴う、3)感染のリスクが大きい、4)小児などでは採取に時間がかかる、5)直接PCR反応に添加すると増幅高率が著しく悪い、などの欠点を持つ。今回は、CASSOH法に利用可能な血液以外のDNAを含む臨床検体を検討した。その結果、唾液がDNAのソースとして優れている事が判明した。唾液の採取方法及び処理過程の簡略化と迅速化を目指して検討した結果、唾液採取後約10分でPCR反応へ利用可能なプロトコルを確立する事が出来た。

A. 研究背景と目的

オーダーメイド薬物療法を目的とする遺伝子診断法の実践のためには、ベッドサイドや外来で迅速かつ簡便に一塩基多型(SNP)を決定する検出系の開発が必須である。私たちは、この検出系としてイムノクロマトを応用したCASSOH法を開発した。CASSOH法はPCRにて増幅されたSNP部位を含む遺伝子断片に対し、それぞれの対立遺伝子に相補的な2種類のオリゴヌクレオチド・プローブを準備し、いずれのプローブが選択的に結合するかを金標識された抗体の沈降線で検出するものである。CASSOH法での検出には、DNAを含む検

体の採取とPCR反応による遺伝子断片の増幅が必要である。今までDNAを含む検体として血液が使われてきた。しかしながら、血液検体には、採取時に痛みを伴う、感染リスクが高いなどの欠点がある。更に、血液検体をPCR反応に加えDNA増幅反応を行うと増幅効率率が著しく悪い。この理由として、血液中にはヘモグロビンなどのPCR反応を阻害する物質を多く含むためと考えられている。実際、血液のみを直接PCR反応系に加えることは行われておらず、遺伝子検査の迅速化の大きな障害になっている。

私達は、今回の検討で唾液をDNAのソースとして用いる方法を考えた。

表1 唾液の特徴	血液	唾液
DNA 存在場所	大部分細胞核内	水溶液
PCR への影響	ヘモグロビンなど PCR 阻害物質が多量に含まれるため、直接 PCR 反応液へ添加する事は困難	ヘモグロビンなどの PCR 阻害物質が少ない
採取	血管穿刺が必要で、痛みを伴い、かつ、医療関係者のみ可能	無痛で、医療関係者以外でも可能
感染リスク	比較的高い	比較的低い

今回、CASSOH法に利用可能な血液検体以外の臨床検体の検討を行った。種々の臨床検体の中で、唾液は血液と比し幾つかの点で遺伝子検査におけるDNAソースとして優れた特徴を有している(表1)。この理由から、本研究では唾液の利用を念頭に置いた検索を進めた。

B. 研究方法

① 唾液検体の採取

成人ボランティアとミトコンドリア 1555A>G 変異を持つ人からの唾液検体の採取は、研究の内容、方法、意義に関し十分な説明後、インフォームド・コンセントを得た上で唾液を約2 mlの唾液を採取し以下の研究に用いた。(本研究は、東北大学医学部倫理医員会で審議され、承認されている。承認番号 2006-78)。

② 唾液の直接PCR反応系への添加

10名のボランティアから唾液を採取後、TE

バッファーで2倍希釈し、PCR反応系へ1/10量添加して増幅反応を行った。増幅した遺伝子はALDH2遺伝子エクソン12を含むDNA断片(200 bp)である。

③ 唾液処理液の利用

②と同様に10名のボランティアから提供を受けた唾液を唾液処理液で処理した後、PCR反応液へ同じく1/10量添加して増幅反応を行った。増幅した遺伝子は②と同じALDH2遺伝子エクソン12を含む遺伝子断片を用いた。

④ 唾液処理液を利用したCASSOH法

③で行った処理を行った唾液検体をミトコンドリア1555A>G変異を検出するCASSOH法により遺伝子検査を行った。増幅を終えたPCR反応液5 ulをCASSOHスティックに添加後、展開バッファーにスティックの一端を浸し、室温で5分後に結果を判定した。その他の詳しい条件は、既報(Matsubara & Kure, *Hum Mutat*, 2003)に従った。

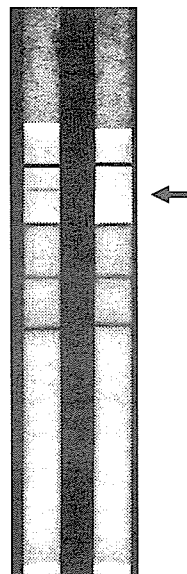
C. 研究結果

① 唾液の直接PCR反応系への添加

ボランティアから採取した唾液10検体のうちはっきり増幅が認められたのは、1検体のみであり、わずかに増幅の認められたのは4検体であった、残りの5検体では遺伝子増幅は認められなかった(下図の矢印のバンド参照)。

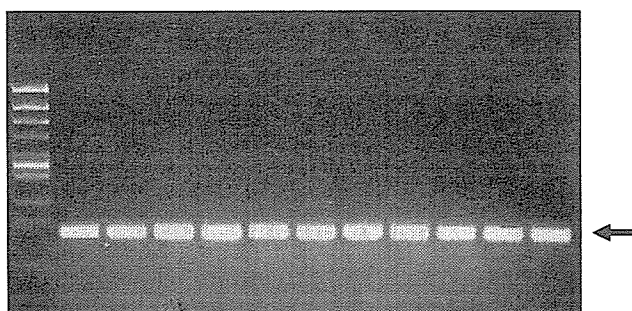


その結果、正常対照者の唾液では下図のように正常プローブを含むCASSOH反応液を展開した左のステックのみにバンドが認められた。

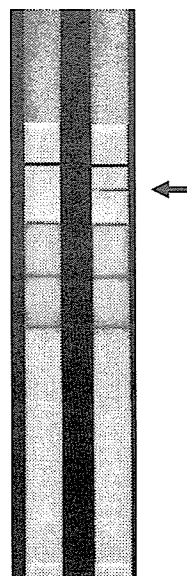


② 唾液処理液の効果

①と同様の遺伝子増幅実験を今回開発した唾液処理後に行ったのが下図である。検体の配置は上図と同様である。下図のように10検体すべてでALDH2遺伝子断片を増幅することが可能であった。



一方、ミトコンドリア1555A>G変異を持つ人の唾液の場合、変異プローブを含むCASSOH反応液を展開した向かって右のステックのみにバンドが認められた(下図参照)。



③ 唾液検体を用いてのCASSOH法

正常対照者とミトコンドリア1555A>G変異を持つ事が既に分かっている人からそれぞれ提供を受けた唾液を②と同様の方法で処理しCASSOH法を行った。