

200707015A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による
薬剤応答性遺伝子診断システムの開発
に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 藤原 一彦

平成20（2008）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による 薬剤応答性遺伝子診断システムの開発に関する研究	----- 1
藤原 一彦	
II. 分担研究報告	
1. MPEX法の実用化に関する研究	----- 19
木下 健司	
横山 兼久	
藤本 健太郎	
2. 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	----- 45
猪子 英俊	
森川 實	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 77

厚生労働科学研究費補助金・創薬基盤推進研究事業
平成19年度総括研究報告書

迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による
薬剤応答性遺伝子診断システムの開発

主任研究者 藤原 一彦 住友ベークライト株式会社
S-バイオ開発部 部長

研究要旨

本研究の目的は、臨床の現場において適用し得る遺伝子診断手法の開発と確立にある。本年度は、簡便性と迅速性を追求した遺伝子診断技術を確認することを念頭に検討を行った。

ハード面の検討として、基板上PCR専用のサーマルサイクラーの試作と専用の基板の開発並びに諸条件の検討により、約30分で、遺伝子の増幅から検出まで出来る条件を確認した。さらに、操作性並びに検査精度の向上を図るため、基板のデザインの検討を行い、基板本体とハイブリッドカバーが嵌合した構造の基板の開発を行った。この基板と、上記の基板用サーマルサイクラーの組み合わせにより、迅速、簡便、高感度を達成した、臨床検査の現場にも適用し得る、PCR&MPEx法の基礎技術の確立が出来た。

又、医薬品の副作用に関連した遺伝子の多型性（HLA：human leukocyte antigen ヒト白血球抗原）を対象に、等温増幅法の一つである Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) を Multiple Primer Extension (MPEX) 用プラスチック基板（以下プラスチック基板）上でおこなわせることにより、迅速・簡便・高感度な新しいタイピング法を開発・確立した。

分担研究者

木下健司

武庫川女子大学・薬学部

教授

横山兼久

住友ベークライト株式会社

S-バイオ開発部 部長研究員

藤本健太郎

住友ベークライト株式会社

S-バイオ開発部 研究員

猪子英俊

東海大学医学部 教授

森川實

ジェノダイブファーマ株式会社

代表取締役社長

A. 研究目的

SNPを含む遺伝子多型解析は、「テーラーメイド医療」確立のための、一つの根幹を成すものである。

現状、SNPs解析の一手段であるDNAチップは特異性・選択性が低く、低感度で再現性が低いことが指摘されており、臨床・検査用としてはまだ見通しが立っていないのが実状である。我々は、住友ベークライトの基板技術を応用し、ポリメラーゼによりDNA鎖を伸長させることにより検体中の遺伝子を検出する方法（以下、MPEX法と記載。）を、住友ベークライトのプラスチック製基板を用いて実現出来る可能性を見出した。このMPEX法による遺伝子検出は、原理的に、従来のDNAマイクロアレイに比較し、遺伝子検出特異性が高く、特

にSNPsの検出に適するものである。

平成17年度は、住友ベークライトのグループは、MPEX法についての基礎技術検討を行い、本MPEX法の完成度を高めることが出来た。遺伝子の検出特異性の確保、MPEX反応時間の短縮化、簡便化に寄与すると思われる可視化による検出法を確立した。東海大のグループは、HLAの多型性を示す領域をPCR-SSP法により特異的に増幅後MPEX法による検出する系を確立し、これをHLAの特定なアリル検出に用いることによって、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となった。

平成18年度は、本MPEX法によるSNP検出法をベッドサイドでのテーラーメイド医療に適応させることを目的として研究を進めた。

住友ベークライトのグループは、MPEX法による遺伝子の検出のさらなる高速化と高感度化を達成するため、MPEX法の改変研究を行った。さらに、SNPと並んで薬剤応答性の個人差に関与するマイクロサテライトの検出をMPEX法により実現するための検討を行った。

東海大のグループは、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法による検出系の検討を行った。

最終年度となる今年度は、臨床現場での診断に適応し得る、簡便さと迅速さ（高速性）を確保することを目的と

して、住友ベークライトのグループでは、高速でヒートサイクルをかけられる、基板専用サーマルサイクラーの開発と、このサーマルサイクラーにおいて、効率よく熱の伝導を行える基板の設計および量産のための射出成形方法の確立、さらには、操作性に優れた基板の設計と試作をおこない、臨床現場での診断に用いることが出来る遺伝子検査システムとして、本PCR & MPEX法を確立することを目的とした。東海大のグループは、ヒートサイクルを用いない方法の確立を目指し、

対象となる SNPを含む目的領域の増幅過程（LAMP）と発色反応によるSNP検出を一定温度条件下でかつ同一基板上で並行しておこなう系の検証および確立をおこなうことを目的とした。この反応系は、PCRによる増幅後に増幅産物を分注してMPEX反応を行う以前の方法と比べ、増幅産物によるクロスコンタミネーションの確率を低減し、またマルチプレックス化を可能とする。本実験において対象とするSNPsとして、薬剤応答に関するSNPsに着目し、医薬品の副作用と関連性が報告されているHLAアレルを選定した。LAMP法とは、鎖置換型反応を利用した等温増幅反応である。6種類のプライマーを用いることによる極めて高い特異性と、PCR法より高い増幅効率という特長を有する。最初に、LAMP法により、同一DNA鎖上（シス）に存在する複数の多型領域を同時に検索するDNAタイピングが可能であるかを、1)HLAクラ

スII遺伝子およびHLAクラスI遺伝子におけるアレルのグループ分け（low resolution）、2)ある薬剤の副作用に関連するHLAアレルの検出により、検討した。次に、標的多型を特異的に検出するオリゴDNAプローブを固定したプラスチック基板上において、LAMP反応をおこない、標的領域の特異的増幅および多型の特異的検出を同時におこなうことが可能であるか検討した。

B. 研究方法

1. MPEX法の実用化研究

1-1. 基板用サーマルサイクラー

基板上でPCRを行うための専用サーマルサイクラーの開発を行った。反応時間の短縮を図るため、ヒートサイクル効率を高いサーマルサイクラーを設計した。

従来のチューブ用のサーマルサイクラーは、ヒートブロックの温度を変えてチューブの加熱や、冷却を行うものであるが、ヒートブロックの温度制御に時間がかかるため、ヒートサイクルに要する時間も30分～1時間程度かかることから、ヒートブロックの温度を変化させない新しい方式を採用することとした。

PCRでのヒートサイクルの各々の温度に設定したヒートブロック（3つ）を用意し、各々のヒートブロックの上を基板が移動する方式のサーマルサイクラーの試作をおこなった。

基板を基板移動用のステージに搭載し、ステージが各温度に設定されたヒートブロック間を移動し、所定の温

度に設定されたヒートブロックは、基板を上下からはさみ込み、基板の上下からの加温および冷却することにより、効率よくヒートサイクルをかけられる。

各ヒートブロック間の移動は、シーケンサーにより制御を行うこととした。

1-2. PCR&MP EX法用基板の設計検討

上記サーマルサイクラーの試作と並行して、基板の仕様の検討を行った。基板には、反応部となるウェル部を備え、ウェル中に反応溶液等を充填し、ウェルにカバーフィルムを被せる方式とした。

基板の試作は、COC基板に窓を設け、COCフィルムと貼り付けることにより、ウェルを形成した基板を試作することとした。

プラスチックは、熱伝導性が悪いことからヒートサイクルを効率良く基板の反応部に伝えるには、ウェル部（反応部）の底部の肉厚を薄くすることが必要である。

ウェル底部の肉厚を検討するにあたり、厚さの異なるフィルムを数種類調達し、ウェル底の厚みが異なる基板を試作した。

ウェル底の厚みによる、スキャナーでのスポットの認識性や、基板全体の剛性等の評価を行い、適切なウェルの底部の厚みを検討した。

1-3. 射出成形によるPCR&MP EX法用基板の作製検討

本基板の量産化検討のため、射出成形による基板の作製について検討を行った。

基板ウェルの底部の厚さは、熱伝導性を優先させ、ウェル底部の厚さは、当初は0.1mmを目標とし射出成形用の金型を設計した。実際に射出成形を行い成形品の状況の確認を行い、基板ウェル底部厚みの変更等の改良検討を行った。

1-4. 基板ウェル内温度状況の把握

上記射出成形の検討により得た基板を用いて、基板用サーマルサイクラーでの基板上温度サイクルの状況の確認を行った。各ヒートブロックの設定温度とヒートブロックと基板との接触時間と基板ウェル内の温度変化の状況を把握した。

1-5. 基板上PCR&MP EX反応の検討

本システムによりSNPsの検出が可能か評価実験を行った。ALDH2酵素遺伝子の野生型および変異型を用いSNPsの検出性の評価を行った。

射出成形により得られた基板にMP EX反应用表面処理を施し、固相化プライマーを、ウェル底面にスポットし固定化した。

サンプル溶液を調製し、基板ウェル内に分注し、ウェルの上からカバーシールを貼付し、基板用サーマルサイク

ラーにより、PCRおよびMPEX反応を行い、ウェル内でのPCRによる遺伝子の増幅状況並びに、MPEX法での特異的な遺伝子の検出性の評価を行った。

1-6. 操作性改善基板の検討

サンプル溶液のウェルへの分注の後、ウェル上にフィルムシートを貼付けウェルを密閉しサンプル溶液の保持を行ってきたが、本方法では、フィルム貼付の際ウェル内に気泡が残り易く、気泡の混入は、基板上での遺伝子検出特異性の低下につながる。簡単な操作でウェル中へ気泡が入らない基板の検討が必要となった。

鋭意検討を行い、基板本体とウェルカバーが嵌合するかたちの基板の試作を行った。

試作は、COC樹脂性基板に切削加工を施し、基板本体とカバーを試作した。

2. MPEX法による薬剤応答遺伝子診断システムの開発

2-1. DNA 試料

MPEX法によるSNPs検出の検討に用いたDNA試料は、文書によりインフォームドコンセントを得たボランティア健常人の血液試料またはボランティア健常人由来の不死化したB細胞より、FUJI FILM社のQuick Gene-610Lを用いてDNA抽出・精製をしたDNA試料追加検体およびECACC (European Collection of Cell Cultures) より購入したHLAアリル既知の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。

2-2. SNP 解析

上記のDNA試料における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、アリルレベル (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。

2-3. リアルタイムLAMP反応

1) LAMP用プライマーの設計

栄研化学株式会社によるLAMP法プライマー設計支援ソフトウェアPrimerExplorerをもとに、プライマーの設計をおこなった。なお、プライマーのT_m値は、Nearest Neighbor法により算出した。

2) LAMP反応溶液の組成

LAMP反応は、ゲノムDNA 20ngを鋳型にし、10 mM KCl、20 mM Tris-HCl (pH8.8)、10 mM (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、8mM MgSO₄、1.6M Betaine、1mM dNTP、6.4U *Bst* DNA polymerase、0.2 μM F3 および B3 プライマー、0.8 μM

LF および LB プライマー、1.6 μ M FIP および BIP プライマー、60nM ROX、0.3 \times SYBR GreenI から構成される総量 20 μ l の反応液でおこなった。

3) リアルタイム LAMP 反応の温度条件

反応温度条件は、(66 $^{\circ}$ C、5 秒 \rightarrow 65 $^{\circ}$ C、55 秒) \times 60 サイクルとし、反応終了後、95 $^{\circ}$ C、2 分の熱処理をおこない酵素活性を失活させた。反応には、ABI 社の ABI PRISM 7000 Sequence Detection System を用いた。

2-4. SYBR GreenI 滴下による可視判定

増幅反応溶液 20 μ l に 100 \times SYBR GreenI を 1 μ l 滴下し、混和後の反応溶液の色の変化をみた。溶液の色がオレンジ色の場合は増幅反応が陰性、緑色の場合は陽性と判定した。

2-5. プラスチック基板上での LAMP 反応および MPEX 反応

1) LAMP 用プライマーの設計

栄研化学株式会社による LAMP 法プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer をもとに、プライマーの設計をおこなった。なお、プライマーの T_m 値は、Nearest Neighbor 法により算出した。

2) プラスチック基板上へのオリゴ DNA プローブの固定

2-1) 陽性オリゴ DNA

ヒト由来でない塩基配列 (ATATAC) 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。

2-2) 陰性オリゴ DNA

ヒト由来でない塩基配列 (GGAGGGTTATTGGACCCGGC) 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。

2-3) 各標的遺伝子における内部陽性オリゴ DNA

HLA 遺伝子エクソン 2 領域において、すべてのアレルを含む遺伝子座共通の塩基配列からなるオリゴ DNA の 5' 末端に C6 アミノ化修飾をおこなった。HLA-A、-B、-DRB1、-DQB1 遺伝子座それぞれについて設計した。

2-4) 基板へのオリゴ DNA の固定化

各 SNP 検出用基板は、最終濃度 10 μ M プライマーを基板表面へスポットし、80 $^{\circ}$ C、90 分の加熱処理による固定化後、アルカリ処理により残存している活性化エステル基を分解した。

3) LAMP 反応および MPEX 伸長反応

ゲノム DNA 20ng を鋳型にし、10 mM KCl、20 mM Tris-HCl (pH8.8)、10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% Triton X-100、8mM MgSO_4 、1.6M Betaine、1mM dNTP (-dTTP)、0.97 mM dTTP、0.03 mM Biotin-dUTP、16U *Bst* DNA polymerase、0.2 μ M F3 および B3 プライマー、0.8 μ M LF および LB プライマー、1.6 μ M FIP および BIP プライマーから構成される総量 50 μ l の反応液を調整した。なお、LAMP プライマーの一つを基板上に固定した場合は、固定したプライマーの反応液中に加える濃度を通常量の 1/5 量にした。プローブを固定した基板上に反応溶液を展開し、ハイブリダイゼーションオープン内で、65 $^{\circ}$ C、90 分間反

応させた。反応終了後に、TBS-T (10 mM Tris-HCl pH 7.6、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) 溶液で基板を洗浄した。

4) 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 5 分間反応後、TBS-T 溶液で基板を洗浄した。

5) 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 15 分間反応後、0.1% Tween 20 溶液で基板を洗浄し、遠心処理 (2000 rpm、2 分間) により水分を除去した。

2-6 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も、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. MPEX法の実用化研究

1-1. 基板用サーマルサイクラー

当初要求仕様に基づき、基板用サーマルサイクラーの試作を行い、装置が完成した。温調部と操作部の 2 パートよりなる。温調部は、上下 3 組のヒートブロックを有している。基板はステージに固定され、ステージが水平方向に移動し、各ヒートブロックの位置で停止し、上に位置するヒートブロックが下降し、ステージ上の基板を上下のヒートブロックにより挟み、加温 (冷却) を行う構造となっている。基板固定ステージの動作、各ヒーターの動作等、各動作状況は良好であった。当初の目標仕様を満たした装置を完成することが出来た。

基板ウェル内の温度の状況はヒートブロックの温度及び基板とヒートブロックとの接触時間により、PCR におけるヒートサイクルを再現することが可能であることが確認された。また、1 ヒートサイクルあたりの時間も 20 秒以内で可能であることも確認した。

1-2. PCR&MPEX法用基板の設計検討

本サーマルサイクラー用基板の設計のため、形状検討基板を試作した。スライド状基板の切削加工によりウェル開口部となる窓を形成した基板を作製し、一方、ウェルの底部を形成するフィルムを張り合わせたウェル基板を試作した。

フィルムは、100 μ m、200 μ m、500 μ mの厚さのものを用いた。熱伝導性は、100 μ mのものが良好であり、ヒートブロックの温度への追従性は高かった。

スキャナーでのスポットの検出状況はウェル厚みが100 μ mのものが良好であった。

以上の結果を踏まえて、射出成形による基板の作製の検討にあたり、ウェル底部の厚みは100 μ mを目標とすることとした。

1-3. PCR&MPEx法用基板の射出成形検討

射出成形用の金型を作製した。基板には、耐熱性、低蛍光性、透明性が必要なことから、COC（飽和環状ポリオレフィン系樹脂）を使用することとした。

基板の成形の結果、ウェル底面が0.1mmの厚みでは、ウェル底面への樹脂の充填は全く不可能であった。

ウェル底面への樹脂の充填を改善するため、ウェル底面厚みを0.2mmに変更し、成形を行ったが、ウェル底面へ樹脂の充填は可能となったが、ウェルドの発生による、ウェル底面の穴の発生が見られた。また、ウェル底面の歪みも発生しており、蛍光マイクロレイスキャナーによる検出も困難であった。

ウェル底面のウェルドの発生を抑えるべく、基板のウェル近くのデザインを変更し、ウェル底部への樹脂の流れを優先するよう細工を行った結果、

ウェル底面でのウェルドの発生はなくなった。また、ウェル底面の歪みもなくなり、蛍光マイクロレイスキャナーによる検出も可能となった。

1-4. 射出成形基板による基板上PCR&MPEx法検討

1) サーマルサイクラーによる温度精度の確認

まず、ヒートブロックの設定温度と、加熱時間と実際の基板上液相温度の測定を行い、目標とするヒートサイクルが得られるかを確認した。ウェル内にPCR用溶液を満たし、ウェル内に熱電対を挿入しウェル上部から、PCR用のフィルムシールを貼付し、ウェル内の液中の温度変化を測定した。ヒートブロックの設定温度と実際の液相温度では、20 $^{\circ}$ C程度の差があることがわかった。この差を保つことにより、PCRに必要なヒートサイクルを確保できることが判った。

複数のヒートサイクルによる、基板上液相中の温度変化の再現性を見たが、10ヒートサイクルずつ5回のヒートサイクルにより、温度変化の再現性をみたが、高い温度サイクルの再現性を確保できていることを確認した。

2) 遺伝子増幅の確認

ヒトALDH2を組み込んだプラスミド（提供：東京家政大学藤森准教授）を用い、遺伝子増幅実験を実施した。PCR溶液をウェル中に充填した後、溶液の漏れ防止のためPCR用シールフィルムを基板ウェル部分に貼付し、基板用サーマルサイクラーにセットし、ヒートサイクルを付与し、基

板上PCRの進行状況を確認した。

ヒートサイクル条件により、遺伝子増幅の度合いは異なるが、遺伝子の増幅を確認した。

3) 遺伝子検出性の評価

基板上PCR&MPLEX法によるSNPs検出性の検討を、上記ヒトALDH2プラスミドを用いて実施した。

基板上に、ALDH2の野生型(−/−)および変異型(+/+) 検出のためのプライマーをポットし固定化した。

基板上PCR&MPLEX法を実施し、SNPsの検出状況を確認した。各々のPNPsについて特異性のある検出が出来ていることを確認した。

1-5. 操作性改善基板

1) 基板の作製

上記のように、PCR溶液をウェルに充填した後、PCR用フィルムシートを貼付する方法では、フィルムシート貼付の際ウェル中に気泡を巻き込みやすく、気泡の混入によると思われる、遺伝子増幅反応の阻害が確認されていた。

また、フィルムを貼ることは、検査における操作性も悪いことから、基板本体とウェル上カバーを作製することとした。

基板本体とカバーが嵌合する構造とし、嵌合部には、シリコンゴムを導入し、基板本体とカバーを接着させる構造とした。基板の作製は、COC樹脂製の1mmのスライド基板に切

削加工を施すことにより作製することが出来た。

基板本体とカバーをシリコンゴムにより接着後、溶液注入口から溶液を注入充填し、注入口をシールにより塞ぎ、サーマルサイクラーにてヒートサイクルを付与し、溶液の漏れの有無等を確認した。

ヒートサイクル時の溶液の漏れも観察されずまた、気泡の混入及び発生も観察されなかった。また、反応後カバーの分離及び離脱も容易であり、カバーを外して蛍光スキャナーによるスポットの検出も容易であった。

2) 遺伝子検出性の評価

ウェル内にヒトALDH2検出用野生型および変異型各々のプライマーをスポットし固定化した後、基板本体にカバーを嵌合しシリコンゴムにより接着した。同様にして基板用サーマルサイクラーにより、ヒートサイクルを付与し、基板上PCR&MPLEX法によるSNPsの検出を行ったが、射出成形による基板に比較し、シグナルが弱い、特異的にSNPsの検出を行うことができた。

2. MPLEX法による薬剤応答遺伝子診断システムの開発

2-1. リアルタイム LAMP 反応における HLA クラス II 遺伝子(HLA-DRB1、-DQB1)および HLA クラス I 遺伝子(HLA-A)におけるアレルのグループ分けの検討

HLA-DRB1、-DQB1、-A 遺伝子において日本人に見られるHLAアレルをほぼ

2 桁の（血清学的タイピングと同程度の分解能）レベルでのタイピングを目指していくつかの群に分けた。

1) HLA-DRB1 遺伝子

HLA-DRB1 遺伝子を 11 群に分けて、各群特異的な多型領域について、5' 末端または 3' 末端に多型が位置するようにプライマーを設計した。

直接塩基配列決定法または PCR-SSO 法 (Luminex) により、HLA アリルが既知の DNA サンプルを用いて LAMP 反応をおこなった。その結果、すべての群において各群特異的な増幅反応が認められた。ABI PRISM 7000 において、検査 DNA サンプル中に標的のアリルが存在しているという増幅反応の陽性シグナルを検出する開始時間は、上述の DNA 濃度の場合、すべての群において 60 分間の反応時間において 40 分以内であった。

リアルタイム LAMP 反応による増幅曲線による陽陰性の判定法の他に、LAMP 反応溶液への SYBR GreenI 滴下による目視判定を検討した。これは、SYBR GreenI が有する 2 本鎖特異的インターカレーターの性質を利用したものであり、溶液の色が緑色に変わると陽性、オレンジ色に変わると陰性を示す。本実験において、陽性サンプルを鋳型にした反応溶液は緑色を、陰性サンプルを鋳型にした反応溶液はオレンジ色を呈した。これらの陽陰性の判定結果は、リアルタイム LAMP 反応の増幅曲線による判定結果と同一であった。

2) HLA-DQB1 遺伝子

HLA-DQB1 遺伝子を 9 群に分けて、HLA-DRB1 遺伝子と同様にプライマー設計および LAMP 反応をおこなった。その結果、すべての群において各群特異的な増幅反応が認められた。

1-1) HLA-A 遺伝子

HLA-A 遺伝子を 8 群に分けて、HLA-DRB1 遺伝子と同様にプライマー設計および LAMP 反応をおこなった。その結果、すべての群において各群特異的な増幅反応が認められた。

2-2. リアルタイム LAMP 反応における薬剤の副作用に関連する HLA アリルの検出の検討

血栓、塞栓の治療ならびに血流障害の改善において服用される抗血小板薬、塩酸チクロピジンの服用により引き起こされる重度な肝障害と、特定の HLA 遺伝子型との関連が示唆されている (Hirata, K *et al.*, *Pharmacogenomics J.* 8, 29-33, 2008.)。この遺伝子型は、日本人において 2 番目に高い頻度のハプロタイプ (HLA-A*3303、-B*4403、-Cw*1403、-DRB1*1302、-DQB1*0604) である。

それぞれの HLA アリルを特異的に増幅させるプライマーを設計し、HLA アリルが既知の DNA サンプルを用いたリアルタイム LAMP 反応をおこなった。リアルタイムにより得られる増幅曲線と陽性シグナルの検出開始時間により、陽陰性の判定をおこなった。各 HLA アリルにおけるプライマーの有用性の検討結果として、DNA サンプルご

との 60 分間の反応における検出開始時間を示した。HLA-A*3303 アリルは、35 検体中、A*3303 検体 10 検体すべてで検出された。HLA-B*4404 アリルは、28 検体中、B*4404 検体 7 検体すべてで検出された。HLA-Cw*1403 アリルは、29 検体中、Cw*1403 検体 12 検体すべてで検出された。HLA-DRB1*1302 アリルは、28 検体中 DRB1*1302 検体 9 検体のすべてで検出された。HLA-DQB1*0604 アリルは、29 検体中、DQB1*0604 検体 9 検体すべてで検出された。また、何れの場合も、当該アリル以外の検体では増幅が見られなかった。従って、ここで用いた LAMP 法によって、各 HLA アリルを特異的に検出することができ、塩酸チクロピジンによる肝障害と相関する特定のハプロタイプの有無の判定が可能であることが明らかとなった。

2-3. プラスチック基板上での HLA アリルのタイピング

リアルタイム LAMP 反応において確立した反応条件とこれまでに確立した MPEX 反応条件を組み合わせ、プラスチック基板上で一定温度下における標的領域の増幅および標的多型の検出を並行しておこなう反応系の確立を目指して、HLA アリルのタイピングをモデルとして検証をおこなった。

最初に、リアルタイム LAMP 反応においてプライマーの有用性を明らかにした HLA-DRB1 遺伝子の各群特異的なプライマーセットを用いた等温増

幅反応をおこない、基板上に各群特異的な LAMP プライマー (FIP、BIP、LF) を固定した標的アリルの陽陰性の判定をおこなった。次に、HLA 遺伝子座特異的な領域を等温により増幅し、HLA アリルまたは多型特異的なプローブを複数個固定化させた基板を用いた HLA アリルのタイピングをおこなった。

1) LAMP プライマーを固定化させたプラスチック基板上での標的 HLA アリル検出の検討

a) FIP プライマーを固定化させた検出系

HLA-DRB1 遺伝子において 11 群に分けたグループの内、RG2 群の FIP プライマーを基板上に固定化させ、RG2 群特異的なアリル (HLA- DRB1*1501、*1502、*1602 アリル) の増幅反応をおこなった。その結果、RG2 陽性サンプルにおいてのみ、FIP プローブに陽性シグナルを示し、特異性が認められた。

b) BIP プライマーを固定化させた検出系

HLA-DRB1 遺伝子において 11 群に分けたグループの内、RG8 群の BIP プライマーを基板上に固定化させ、RG8 群特異的なアリル (HLA- DRB1*0802、*0803、*0809 アリル) の増幅反応をおこなった。その結果、RG8 陽性サンプルにおいてのみ、BIP プローブに陽性シグナルを示し、特異性が認められた。

c) Loop プライマーを固定化させた検出系

HLA-DRB1 遺伝子において 11 群に分けたグループの内、RG9 群の LF プライマーを基板上に固定化させ、RG9 群特異的なアリル (HLA- DRB1*0901 アリル) の増幅反応をおこなった。その結果、RG9 陽性サンプルにおいてのみ、LF プローブに陽性シグナルを示し、特異性が認められた。

2) HLA アリルまたは多型特異的なプローブを固定化させたプラスチック基板上での標的 HLA アリル検出の検討

a) HLA-DRB1*13 アリルおよび HLA-DRB1*14 アリルの特異的検出の検討

プラスチック基板上に、HLA-DRB1*13 または HLA-DRB1*14 アリル特異的な検出用オリゴ DNA を固定化し、液相下において、すべてのアリルを含む HLA-DRB1 遺伝子座共通の領域を LAMP 反応にて増幅した。その結果、DRB1*13 陽性サンプルにおいてのみ HLA-DRB1*13 オリゴ DNA に陽性シグナルが、DRB1*14 陽性サンプルにおいてのみ HLA-DRB1*14 オリゴ DNA に陽性シグナルが認められた。

b) HLA-DRB1*13 オリゴ DNA におけるプローブの特異性およびシグナル強度の検討

HLA-DRB1*13 特異的オリゴ DNA において、多型を含む配列の長さを 18 mer から 14 mer、T_m 値を 61.28 から 48.25 の範囲に位置する 5 種類のオリゴ DNA

を設計した。同一基板上に 5 種類のオリゴ DNA を固定化し、HLA-DRB1*13 アリルの特異的検出能およびシグナル強度について比較検討した。その結果、すべてのオリゴ DNA において、HLA-DRB1*13 は特異的に検出された。しかしながら、シグナル強度の差異は、オリゴ DNA 間で認められた。オリゴ DNA の長さが短くなり、T_m 値が低くなるのに伴って、シグナル強度が低下した。

c) HLA-DQB1*02、*03、*04 アリルの特異的検出の検討

プラスチック基板上に、HLA-DQB1*02、*03、*04 アリル特異的な検出用オリゴ DNA をそれぞれ固定化し、液相下において、すべてのアリルを含む HLA-DQB1 遺伝子座共通の領域を LAMP 反応にて増幅した。その結果、各アリル陽性サンプルにおいてのみアリル特異的オリゴ DNA に陽性シグナルが認められた。

2-4. プラスチック基板上での医薬品副作用マーカー、特定 HLA アリル検出の検討

a) 塩酸チクロピジン (抗血小板薬) やチオプロニン (肝機能改善薬) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-A*3303 の検出の検討

特定の HLA アリルが医薬品服用による副作用と関連していることが多数報告されているが、チクロピジン (Hirata, K *et al.* *Pharmacogenomics J.* 8, 29-33, 2008.) やチオプロニン

(Kurosaki, M *et al. Dig. Dis. Sci.* 45 1103-1108, 2000.)の服用により引き起こされる重度な肝障害では、HLA-A*3303 遺伝子との関連が示唆されている。

すべてのアリルを含むHLA-A 遺伝子座共通の領域を増幅させるようなプライマーを設計し、リアルタイム LAMP 反応における増幅曲線によりプライマーの有用性を明らかにした。エクソン 2 における増幅領域内の HLA-A*3303 特異的な多型が位置する 2 カ所をそれぞれ検出するオリゴ DNA

(Probe 1 および Probe 2) を設計した。

(1) Probe 1 における特異性の検討

オリゴ DNA の配列内における HLA-A*3303 アリル特異的な多型の位置を 3 種類設計し、さらに個々の種類に対して 3 段階の Tm 値を設計し、総計 9 種類のオリゴ DNA を比較検討した。その結果、HLA-A*3303 アリル特異的なシグナルを有するオリゴ DNA (P2、P3、P4) が見いだされた。一方、HLA-A*3303 陰性サンプルまたは DNA 鋳型がないサンプルの反応系においても非特異的シグナルを示すオリゴ DNA が認められた。しかしながら、これら反応系において、HLA-A 遺伝子の内部陽性オリゴ DNA のシグナルは検出されていないことから、増幅産物によるクロスコンタミネーションの可能性は極めて低い。Probe 1 においては、多型位置を 3' 末端でなく、3' 末端から 4 塩基内側においたオリゴ DNA に特異シグナルが認められた。

(2) Probe 2 における特異性の検討

Probe 1 と同様に総計 9 種類のオリゴ DNA を設計し、比較検討をおこなった。その結果、HLA-A*3303 アリル特異的なシグナルを有するオリゴ DNA (P21、P22、P27) が見いだされた。その他のオリゴ DNA は、非特異的なシグナルを示した。Probe 2 においては、多型位置を 3' 末端でなく、3' 末端から 4 塩基内側においたオリゴ DNA に特異シグナルが認められた。

b) カルバマゼピン (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 およびアロプリノール (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 の検出の検討

カルバマゼピン服用により引き起こされる Stevens-Johnson syndrome と HLA-B*1502 との関連が報告されている (Chung, WH *et al. Nature* 428, 486, 2004.)。また、アロプリノール服用により引き起こされる重度皮膚障害 (SCAR: severe cutaneous adverse reactions) と HLA-B*5801 遺伝子との関連が報告されている (Hung, S1 *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 4134-4139, 2005)。

すべてのアリルを含む HLA-B 遺伝子座共通の領域を増幅させるようなプライマーを設計し、リアルタイム LAMP 反応における増幅曲線によりプライマーの有用性を明らかにした。

HLA-B*1502 または HLA-B*5801 検出用オリゴ DNA において、アリル特異的

な多型領域を含むオリゴ DNA の長さ、配列内の多型の位置 (3' 末端または 3' 末端から何番目に位置しているか) および T_m 値を考慮してそれぞれのアリルごとに複数種類設計した。これらプローブを用いて、各アリル特異的な検出の検討をおこなったが、適切なオリゴ DNA を見いだすことができなかった。

D. 考察

1. MPEX法の実用化研究

基板上にて、PCRによる遺伝子の増幅とMPEX法による遺伝子の検出を同時に行う方法を検討してきた結果、本方法が、SNPsの検出に有効であり、簡便で高感度検出方法として適用できることが確認された。しかしながら、ベッドサイドでの診断に適用するには、改善しなければならない点があった。

その一つは、反応時間の短縮であった。この、基板上での固相プライマー伸長法によるSNPs検出においては、DNAの切り出しと増幅が必要である。遺伝子の増幅法には、LAMP法等種々のものがあるが、PCR法が正確に遺伝子の切り出しが行え、同時に行う固相プライマーの伸長反応における特異性も確保しやすいという利点がある。しかし、PCRはヒートサイクルをかける必要があり、このことが、基板上PCR&MPEX法における迅速性の確保の妨げとなっていた。

従来のサーマルサイクラーは、ヒー

トブロックの温度をペルチェ素子等により、変化させ、ヒートサイクルを加える方法であるが、ヒートブロックの温度を加温や冷却により変化させることは、温度変化に時間を要することとなり、多数回のヒートサイクルを行うには、トータルで長時間の増幅時間を要することとなり、従来のヒートサイクル法では、飛躍的な反応時間の短縮は期待できないと考えられる。

本検討においては、形状が基板状であることから、予め温度設定がされたヒートブロック上を基板が移動する方法を採用することが出来た。今回の試作機においては、各々の設定温度のヒートブロックを上下から挟んで加温する方法により効率良く熱を伝えることが出来た。

基板は、プラスチック製であり熱伝導性が悪く、従来のようなヒートブロックの温度を変化させる方法では、従来のPCRに用いるプロピレン製の容器のように基板をかなりの肉薄にする必要があったと思われるが、本検討による複数温度に設定したヒートブロックを用いる方法では、基板の厚みによる熱伝導性の悪さ加味して、実際に必要な温度よりも、加熱工程では、設定を高め、冷却工程では低めに設定することにより、ヒートサイクルにおける各過程の時間を長くすることなく、ヒートサイクル時間を短く保ったままでの、PCRによる遺伝子の増幅が可能となる。

基板上PCR&MPEX法では、遺伝子の検出確認のために、マイクロア

レイ用スキャナーを用いることもあり、基板全体の剛性の確保する必要があり、基板の厚みを薄くするには限度がある。

以上から、本検討における複数の温度設定したヒートブロックを用いるヒートサイクル法は、プラスチック基板を用いたPCRによる増幅法では、最も適したヒートサイクル法であると考えられる。

切削加工により作製した基板では、SNPsの検出評価にてシグナル強度が低い結果となった。基板上でのプライマーの伸長反応が進まなかったためと考えられる。プライマーの伸長反応が、何らかの要因によって阻害されたと考えられるが、その要因としては、基板本体とカバー嵌合後の接着に用いた接着剤が酵素を阻害した可能性が高いと考えている。酵素反応を阻害しない接着剤の選択により、克服できると考えられる。

基板上でPCRとMPEX法を同時に行う基板用サーマルサイクラーと基板を開発し、遺伝子の増幅から検出までを約30分で行うことが出来た。30分という時間は、ベッドサイドにおける検査待ち時間として許容できる範囲であると考えられる。しかしながら、本増幅反応の前に、DNAサンプルの調製が必要なことを考慮すれば、遺伝子の増幅と検出の部分を20分程度以内に納める必要があると考える。血液サンプルから簡便に迅速にDNAを抽出し、PCRによる増幅のための前処理用キットも市販さ

れており、このようなキットとの組み合わせで一層の簡便化、迅速化が図れるものと考えられる。また、近年、基板に微細流路を設け、流路内で種々の操作や反応を行う研究も進められており、本検討にて構築した技術と、微細流路技術を組み合わせることにより、さらに簡便で迅速、そして極微量なサンプルでSNPsの診断を含めた遺伝子診断システムの構築ができると考える。

ベッドサイドにおける臨床検査においては、血液サンプルの採取から検出まで、一貫した閉鎖系で実施できることが、安全性の確保からも必要であり、微細流路基板を用いる検査システムは有用である。今後、微細流路技術も取り入れ、より迅速、簡便であり、極微量なサンプル量でより安全にSNPs診断を可能とする遺伝子検査システムの構築を検討していきたい。

2. MPEX法による薬剤応答遺伝子診断システムの開発

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、標的SNPs検出の際に鋳型となる増幅産物を生成するためのPCR反応による前工程を必要とせず、クロスコンタミネーションの確率を低減し、マルチプレックス化が可能な、一定温度下(60-65℃)、プラスチック基板上で標的領域の増幅および標的多型の検出を同時並行しておこなう検出系の確立を目指した。検証モデルとして、

医薬品副作用との相関が報告されている遺伝子マーカー、HLA遺伝子を選定した。

始めに、等温増幅のLAMP法によりHLAのDNAタイピングが可能であるかを、HLAクラスII遺伝子 (HLA-DRB1、HLA-DQB1) およびHLAクラスI遺伝子 (HLA-A) のアレルのグループ分けと抗血小板薬の副作用と相関している特定のHLAハプロタイプ (HLA-A*3303、-B*4403、-Cw*1403、-DRB1*1302、-DQB1*0604) の特異的検出により検討した。その結果、各HLA遺伝子の全てのグループにおいて、特異的な増幅が認められた。したがって、LAMP法を用いて日本人にみられるHLAアレルを網羅したグループ分けが可能となった。また、抗血小板薬の副作用に関連するHLA-A*3303、-B*4403、-Cw*1403、-DRB1*1302、-DQB1*0604遺伝子の特異的に検出することができ、ハプロタイプの有無の判定がLAMP法にて可能であることが明らかとなった。そして、LAMP反応にて増幅された産物は、電気泳動像による判定でなく、SYBR GreenI添加による反応溶液の色にて陽陰性の判定が可能であることを明らかにした。以上のことから、LAMP法は、一定温度で増幅の有無が目視で判定可能な簡便な方法であり、HLA遺伝子のDNAタイピングに有用であることが示唆された。

次に、有用性を確認したLAMP反応をプラスチック基板上でのプライマーの伸長反応と組み合わせることで、標

的HLAアレルを特異的にかつ可視的に検出できるか検討した。

プラスチック基板上に固定するオリゴDNAと溶液中にて増幅させるLAMPプライマーの組み合わせを2タイプに分けてそれぞれ検討した。つまり、1) HLAアレル特異的なLAMPプライマーを用いてアレル特異的な領域を増幅させ、基板上のアレル特異的なオリゴDNAにて検出する系、2) LAMP反応にて、全てのアレルを含むHLA遺伝子座共通の領域を増幅させ、基板上のアレル特異的なオリゴDNAにて、標的アレルを検出する系である。本実験において、1) の系では、固定化するオリゴDNAとしてLAMPプライマー3種類 (FIP、BIP、LF)を用いて検討した。その結果、すべてのオリゴDNAにおいて特定のHLA-DRB1アレル群が特異的に検出された。2) の系において、すべてのアレルを含むHLA-DRB1遺伝子座またはHLA-DQB1遺伝子座を増幅させ、基板上に固定したオリゴDNA特異的なHLAアレルを検出することができた。以上のことから、プラスチック基板上での等温増幅および等温での伸長反応によるHLAアレルのタイピングは有用であることを明らかにした。

一方で、検出用オリゴDNAの設計において、様々な点を考慮する必要性が明らかとなった。DRB1*13アレル特異的オリゴDNAの長さおよびT_m値を変えて、特異的検出能およびシグナル強度を比較検討した結果、長さが短くなり、T_m値が低下するにしたがい、シグナル強度の低下が認められた。また、医薬

品副作用マーカーである、HLA-A*3303 アリル、HLA-B*1502 アリル、HLA-B*5801 アリルについてそれぞれ検出系の検討をおこなったが、本実験において、適切な検出用オリゴDNAを見いだすことができなかつた。DNAの鋳型なしにおいて、または陰性サンプルにおいて生じる非特異シグナルが、オリゴDNAの長さやTm値、配列のGC含量、または塩基配列そのものの特性等に起因しているのか、規則性は全く認められなかつた。今後、個々のHLAアリルについて検討を重ねて、有用なオリゴDNAを確立する予定である。

本タイピング法は、特殊な機器を必要とせず、短時間で目視判定によるDNAタイピングをおこなうことができる。他の遺伝子の多型タイピングへの活用が可能であり、医薬品投与による副作用予測や、疾患の罹患予測等の検査という臨床現場においても実用性の高い検査法としての開発が可能であると考えている。

E. 結論

基板上PCR & MPEX用サーマルサイクラーの開発及び基板の作製を行った。遺伝子の増幅から検出まで約30分を達成し、操作も簡便な基板のデザインを実現することにより、MPEX法を基盤とした迅速かつ簡便、高感度なSNPs診断のためのハード面の基礎的技術の構築を行うことが出来た。

又、医薬品副作用マーカー、HLA 遺伝子のDNAタイピングおよび特定HLA

アリのルの検出において、目的のSNPアリルを含む検査領域の特異的な増幅とSNP検出を同一プラスチック基板上で同時におこなうシステムの検証をおこなった結果、本タイピング法が短時間で特異的に目視により判定できるという有用性を裏付けるデータの蓄積、遺伝子診断システムの基礎構築をおこなうことができた。

以上から、ベッドサイドでのMPEX法による遺伝子診断を実現するための基礎的な技術の構築をすることができた。

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

なし

2. 学会発表

- ・清水佐良子、吉川枝里、平田浩司、光永滋樹、森川實、猪子英俊
「等温増幅によるHLAのDNAタイピング法の検討」
第16回日本組織適合性学会大会
2007年9月9日～9月11日
- ・清水佐良子、光永滋樹、齋藤晋、藤本健太郎、横山兼久、木下健司、藤原一彦、田中正史、森川實、猪子英俊
「プラスチック基板上での等温増幅法を用いた遺伝子多型の検出法の検討」
第30回日本分子生物学会年会
2007年12月11日～15日

H. 知的財産権の出願・状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- ・特願 2007-149817
「複数の多型部位を有するDNA配列の特異的増幅方法」
- ・特願 2007-177200
「遺伝子の検出方法」
- ・特願 2007-232138
「遺伝子の検出方法」
- ・特願 2007-283345
「基板上での等温増幅反応による標的塩基配列の補足及び検出方法」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし