

表3 ヒートサイクル条件

	ヒートブロック		
	設定温度 (°C)	接触時間 (秒)	移動時間 (秒)
ステージ1	110	2	1
ステージ2	60	14	0
ステージ3	77	35	3

トータル
反応時間
15分

表4 PCRでの増幅結果

NO.	基板ウェルの形状	サンプル (ALDH2)	固相スポット シグナルの 強度	遺伝子の増 幅状況 (電気泳動)	気泡の 発生状況
1	円形	野生型	△	良好	多い
2	四角形	野生型	◎	良好	少ない
3	円形	野生型	○	良好	多い
4	円形	野生型	△	良好	多い
6	円形	野生型	△	良好	多い
7	四角形	変異型	◎	良好	少ない
8	円形	野生型	◎	良好	少ない

表3に示す条件にてALDH2プラスミドをサンプルとし、基板上PCR&MPEXを行い、電気泳動による増幅および固相プライマーのスポットシグナル強度の比較を行った。気泡の発生が固相スポットのシグナル強度の低下要因となることが判った。

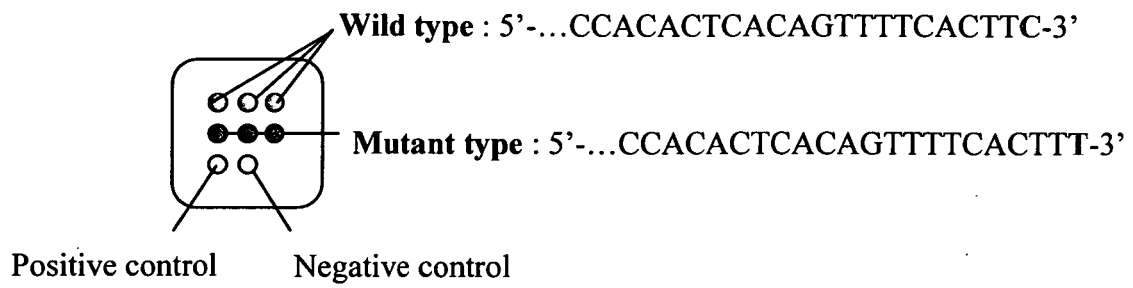
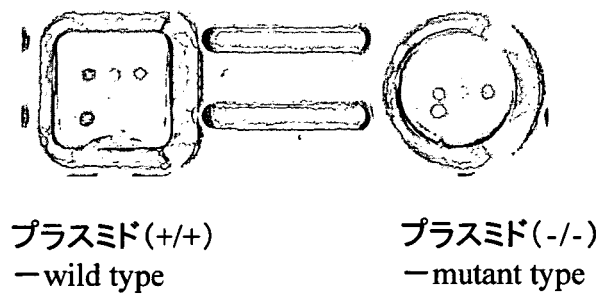


図10 ALDH2検出プライマーのスポット配置



PCRプライマー
 フォワードプライマー-CAAATTACAGGGTCAACTGCT
 リバースプライマー-CAGGTCCTGAACCTCTGGC

図11 ALDH2の検出状況

ウェル中に図10に示す配置により検出用プライマーをスポット固相化し
 上記PCR用プライマーを反応液中に添加し、ヒートサイクルを施した。
 野生型と変異型を特異的に検出することが出来ている。

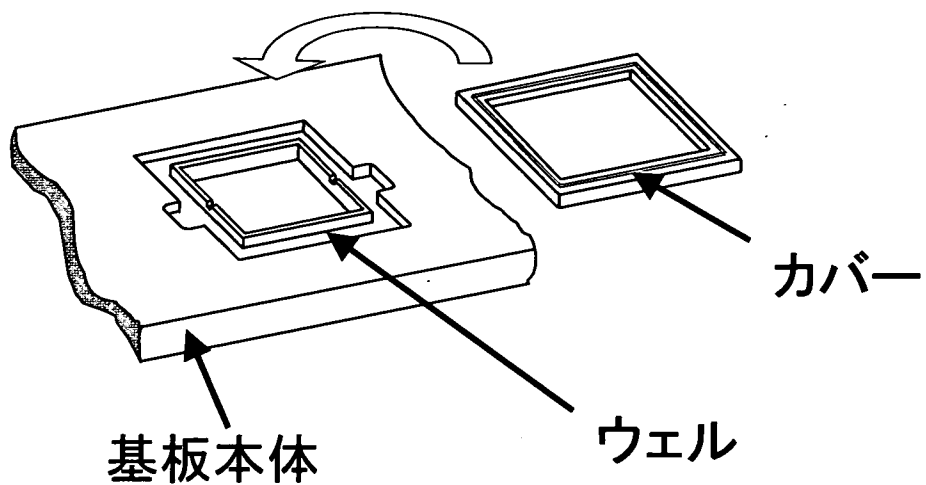


図12カバー嵌合型基板の概要

基板本体のウェル部とカバーが嵌合する構造となっており、ウェル底面に伸長用プライマーをスポット固定後、ウェルにカバーを嵌合させシリコンゴム系接着剤により接着する。サンプル溶液は、注入口から充填される。基板上PCR&MPEX反応後、カバーは容易に外すことが可能であり、各種スキャナー等によりスポットシグナルの読み取りが可能である。

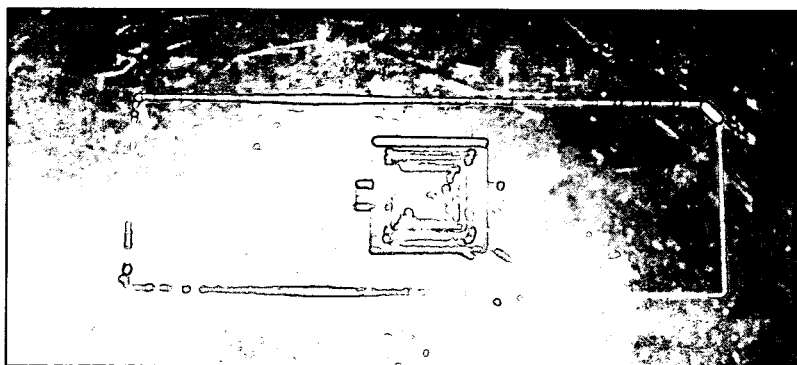
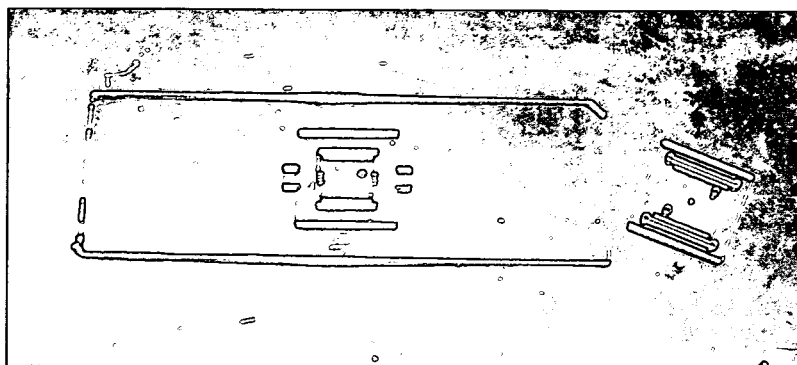


図13 カバー嵌合型試作基板

プラスチック製基板から切削加工により、カバー嵌合型基板を試作した

上: 基板本体とカバー

下: 基板本体とカバーが嵌合した状態の基板

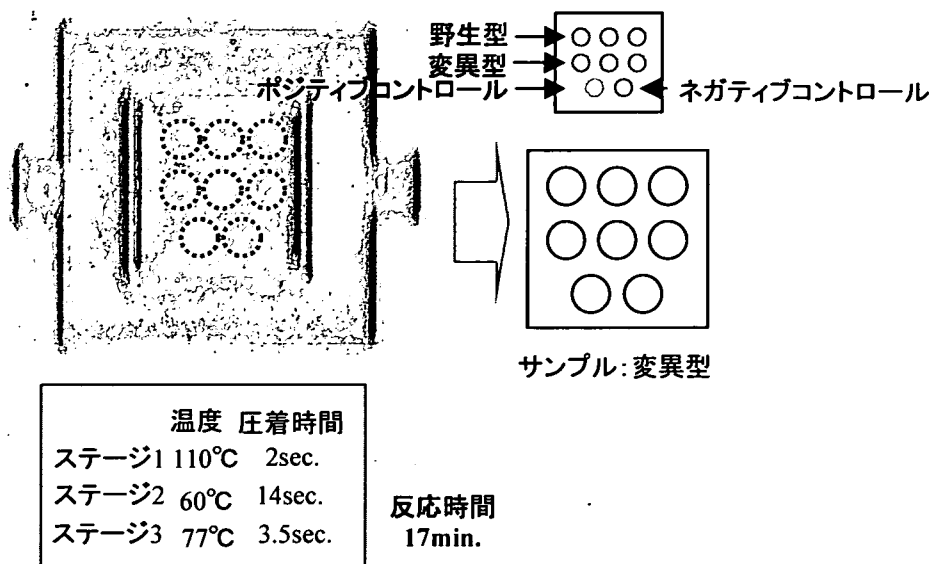


図14 カバー嵌合型基板によるALDH2 SNPの検出
 ALDH2(変異型)プラスミドにより、カバー嵌合型試作基板を用い、SNPsの検出実験を実施した。検出は出来ているが、スポット強度が弱い。

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 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

研究要旨

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、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。

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の多型マーカー (SNPs 等) や疾患感受性遺伝子の感受性 SNPs などの遺伝子マーカー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。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診断、または特定の疾病罹患率や進行度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。実際に、アメリカ食品医薬品局 (FDA) は、抗てんかん薬カルバマゼピンの処方情報にアジア系患者に対する HLA-B*1502 遺伝子検査の実施推奨を追加した。これは、カルバマゼピン服用により稀に引き起こされる、生命を脅かす重症な皮膚反応 (Stevens-Johnson 症候群) と強い相関性が明らかとなった

HLA-B*1502 の発現頻度に人種差が認められ、特にアジア人において高頻度である背景を反映している。最終的には、本計画の遂行により、高価な PCR 装置や蛍光検出機器を必要としない「基板上での等温増幅と発色アッセイを基盤とした簡便な新手法」の開発・確立し、実際の臨床・検査の現場において有用な遺伝子診断システムを構築することを目指した。

初年度に我々は、住友ベークライト(株)バイオ製品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法の反応・検出系の条件検討を、ヒトDNAサンプルを用いておこなった。その結果、HLA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の特定アリ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。

次年度に我々は、疾患感受性に 관련된SNPs (東海大学・ジェノダイブファーマ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遺伝子を選択) および薬剤応答に関するSNPs (医薬品の副作用と関連性が報告されている3種類のHLA

アリルを選定) を対象とし、ヒトのDNAサンプルを用いたMPEX 法によるSNPsの検出系の条件検討をおこなった。PCR反応をおこない、SNPを含んだ遺伝子座特異的な共通領域を増幅後、個々のSNP検出用プローブを固定したプラスチック基板上でMPEX反応をおこなった。その結果、対象となるSNPが単一遺伝子上の複数箇所に位置する場合 (HLAアリル) に複数SNPsを同時に検出することや、遺伝子上に位置する1種類のSNPを対象とする (疾患感受性アリル) 際には、複数種類の遺伝子上の個々のSNPを独立して検出することが可能であることを明らかにした。

本年度、我々は、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アリルを選定した。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遺伝子におけるアリルのグループ分け（low resolution）、2）ある薬剤の副作用に関連するHLAアリルの検出により、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 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康人の血液試料またはボランティア健康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 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。

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

(<http://primerexplorer.jp/>) をもとに、プライマーの設計をおこなった (図 1)。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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、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 μM FIP および BIP プライマー、60nM ROX、0.3 × SYBR GreenI から構成される総量 20 μl 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°C、5 秒→65°C、55 秒) × 60 サイクルとし、反応終了後、95°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。

4 SYBR GreenI 滴下による可視判定

増幅反応溶液 20 μl に 100 × SYBR GreenI を 1 μl 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。

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 (<http://primerexplorer.jp/>) 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 μM プライマーを基板表面へスポットし、80°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 (NH₄)₂SO₄、0.1% Triton X-100、8mM MgSO₄、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に加える濃度を通常の 1/5 量にした。プローブを固定した基板上に反応液を展開し、ハイブリダイゼーションオープン内で、65°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。

5 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 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) におけるアリ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 アリルをほぼ 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。

1-1) 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 (図 2)。

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(11群中2群について示す; 図2)。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(図2)。

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 Green I 滴下による目視判定を検討した。これは、SYBR Green I 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、溶液の色が緑色になると陽性、オレンジ色になると陰性を示す。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(図3)。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。

1-2) 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(図4)。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(9群中2群について示す; 図4)。

1-3) 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(図5)。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(8群中2群について示す; 図5)。

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（表 1 から表 5）。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（表 1）。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（表 2）。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（表 3）。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（表 4）。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（表 5）。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。

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（図 6）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。

3-1) 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（図 7）。

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 (図 8)。

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 (図 9)。

3-2) 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 (図 10)。

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 (図 11)。

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 (図 12)。

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 (図 13)。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 (図 13)。

(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 T_m 値を設計し、総計 9 種類のオリゴ DNA を比較検討した (図 14-1)。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 (図 14-1)。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 (図 14-2)。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 (図 15)。

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 (data not shown)。

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、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°C)、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ことを、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) のアリ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アリ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遺伝子を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アリ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アリル特異的なLAMPプライマーを用いてアリル特異的な領域を増幅させ、基板上のアリル特異的なオリゴDNAにて検出する系、2) LAMP反応にて、全

てのアリルを含むHLA遺伝子座共通の領域を増幅させ、基板上のアリル特異的なオリゴDNAにて、標的アリ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アリル群が特異的に検出された。2) の系において、すべてのアリルを含む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アリ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アリ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アリル特異的なオリゴDNAの長さおよびT_m値を変えて、特異的な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った。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った。今後、個々のHLAアレ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

本年度は、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アレルの検出において、目的のSNPアレ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。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った。

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 2007-283345

「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」

・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」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 HLA-A*3303 の特異的検出

HLA-A			HLA-A				
No.	allele		検出開始時間 (分)	No.	allele		検出開始時間 (分)
01	A*2402	A*3303	39.25	19	A*0201	A*2420	No Amp.
02	A*0201	A*3303	28.5	20	A*1101	A*1101	No Amp.
03	A*2603	A*3303	34.81	21	A*0201	A*0206	No Amp.
04	A*1101	A*3303	33.47	22	A*0101	A*0201	No Amp.
05	A*3101	A*3303	30.53	23	A*1101	A*2601	No Amp.
06	A*0207	A*3303	32.21	24	A*0201	A*0201	No Amp.
07	A*2601	A*3303	29.45	25	A*0206	A*2402	No Amp.
08	A*0206	A*3303	28.65	26	A*2601	A*3101	No Amp.
09	A*2420	A*3303	30.38	27	A*3001	A*3001	No Amp.
10	A*3303	A*3303	28.14	28	A*0301	A*0301	No Amp.
11	A*3101	A*3101	No Amp.	29	A*021701	A*021701	No Amp.
12	A*2402	A*2601	No Amp.	30	A*0207	A*0201	No Amp.
13	A*2402	A*2602	No Amp.	31	A*0206	A*2604	No Amp.
14	A*2402	A*2402	No Amp.	32	A*0201	A*2601	No Amp.
15	A*1101	A*3101	No Amp.	33	A*2602	A*3101	No Amp.
16	A*0206	A*1101	No Amp.	34	A*0206	A*3101	No Amp.
17	A*0201	A*2402	No Amp.	35	A*0207	A*2402	No Amp.
18	A*2402	A*3101	No Amp.				

表中の No Amp. (No Amplification)は、60 分の反応時間内に増幅が見られなかったことを示す。

表 2 HLA-B*4403 の特異的検出

HLA-B		検出開始時間 (分)	HLA-B		検出開始時間 (分)
No.	allele		No.	allele	
01	B*4403 B*5101	32.22	15	B*1501 B*4002	No Amp.
02	B*3501 B*4403	32.28	16	B*1501 B*3501	No Amp.
03	B*4403 B*4403	29.67	17	B*5101 B*5201	No Amp.
04	B*4001 B*4403	28.51	18	B*4001 B*5101	No Amp.
05	B*350101 B*440301	30.54	19	B*5101 B*5101	No Amp.
06	B*3501 B*4403	31.5	20	B*3901 B*5101	No Amp.
07	B*4403 B*5201	32.05	21	B*5502 B*5502	No Amp.
08	B*1302 B*1302	No Amp.	22	B*1501 B*3501	No Amp.
09	B*0801 B*0801	No Amp.	23	B*4006 B*5401	No Amp.
10	B*5101 B*5101	No Amp.	24	B*5502 B*5502	No Amp.
11	B*1501 B*1501	No Amp.	25	B*4006 B*5401	No Amp.
12	B*0702 B*0702	No Amp.	26	B*5102 B*5201	No Amp.
13	B*1501 B*1501	No Amp.	27	B*5101 B*5901	No Amp.
14	B*4601 B*4601	No Amp.	28	B*4002 B*5401	No Amp.

表中の No Amp. (No Amplification)は、60 分の反応時間内に増幅が見られなかったことを示す。

表 3 HLA-Cw*1403 の特異的検出

No.	HLA-C		検出開始時間 (分)	No.	HLA-C		検出開始時間 (分)
	allele				allele		
01	Cw*0401	Cw*1403	33.43	16	Cw*0304	Cw*0704	No Amp.
02	Cw*0304	Cw*1403	34.39	17	Cw*0702	Cw*0702	No Amp.
03	Cw*0702	Cw*1403	30.86	18	Cw*0102	Cw*1402	No Amp.
04	Cw*0303	Cw*1403	34.46	19	Cw*0702	Cw*1502	No Amp.
05	Cw*0801	Cw*1403	31.52	20	Cw*0102	Cw*0303	No Amp.
06	Cw*1202	Cw*1403	31.52	21	Cw*0701	Cw*0701	No Amp.
07	Cw*0102	Cw*1403	41.17	22	Cw*0102	Cw*0801	No Amp.
08	Cw*1202	Cw*1403	32.7	23	Cw*0701	Cw*0701	No Amp.
09	Cw*1403	Cw*1403	32.55	24	Cw*0303	Cw*0303	No Amp.
10	Cw*1402	Cw*1403	37.58	25	Cw*0303	Cw*0801	No Amp.
11	Cw*1403	Cw*1502	38.55	26	Cw*0401	Cw*1402	No Amp.
12	Cw*0803	Cw*1403	50.34	27	Cw*0303	Cw*0702	No Amp.
13	Cw*0702	Cw*1202	No Amp.	28	Cw*0102	Cw*0401	No Amp.
14	Cw*0304	Cw*0702	No Amp.	29	Cw*0401	Cw*0702	No Amp.
15	Cw*0401	Cw*0702	No Amp.				

表中の No Amp. (No Amplification)は、60 分の反応時間内に増幅が見られなかったことを示す。