

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670071

研究課題名(和文) 核酸クロマトグラフィーを利用した薬剤反応性予測SNP検出法の開発

研究課題名(英文) Development of the detection method of pharmacogenomic SNP using nucleic acid chromatography

研究代表者

平塚 真弘 (Hiratsuka, Masahiro)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50282140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在、医薬品の効果や副作用などの反応性の一部が薬物代謝酵素などの一塩基多型(SNP)の影響を大きく受けることが明らかにされている。そこで我々は、ベッドサイドや診療現場で簡便迅速に患者の薬剤反応性遺伝子のSNP検出を行うことができるデバイス(核酸クロマトグラフィーストリップ)の構築を目指した。ストリップ上に青色のラインが検出された位置を読み取ることにより、遺伝子型を1本のストリップで検出できる。

研究成果の概要(英文)：It is now apparent that some reactions such as drug effect and adverse reactions are strongly influenced by single nucleotide polymorphisms (SNP) such as drug metabolizing enzymes. So we are now aiming to construct a device (nucleic acid chromatography strip) able to detect the SNP of patient's drug responsive genes quickly and easily at the bedside or in the clinical sites. Genotypes can be detected with a single strip by reading the location where the blue line was detected on the strip.

研究分野：ゲノム薬理学

キーワード：一塩基多型 薬剤反応性 核酸クロマトグラフィー

1. 研究開始当初の背景

現在、一塩基多型 (SNP) のようなゲノム情報を利用して、患者個々に対し、より効果的かつ副作用の少ない薬物治療を実施する機運が高まっている。このような個別化薬物療法の展開は、これまでの経験的薬物療法から生じる非効率性を大きく変化させるものであり、患者を副作用から守るだけでなく、医療経済的にも影響力が大きいと考えられる。最近では DNA チップや次世代シーケンサーを用いて大量の SNP 情報を得ることが技術的に可能になっているが、検出コストが高く一部の施設でしか利用できない。また、実際に薬物投与前に臨床現場で必要とされる SNP 情報は数種類程度であることを考えると、高性能な大型解析機器よりもハンディタイプの検出キットの開発が求められている。これまでに我々は、大型機器を用いずに SNP 検出が可能な方法としてイムノクロマトグラフィーを利用した検出デバイスを開発してきた (Hiratsuka et al. Drug Metab. Pharmacokinet., 2004, 19: 303-307)。しかしながら、イムノクロマトグラフィーの欠点は、抗体タンパク質を安定供給するのが比較的困難なこと、抗原-抗体反応のクロスリアクティビティーによる誤診断がまれにあること、また、1本の検出ストリップでは1カ所の SNP しか判定できないことがあげられる。今回、核酸クロマトグラフィーを利用して、これらの欠点をすべて補える画期的な方法の開発に挑んだ。

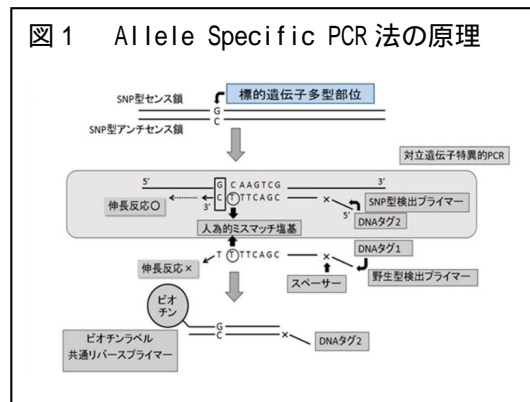
2. 研究の目的

核酸クロマトグラフィーを利用して、患者のベッドサイドや外来の診療現場で簡便かつ迅速に薬剤反応性を予測する SNP 検出法の開発が本研究の目的である。方法は、薬効や副作用発現に影響することが報告されている薬剤反応性関連遺伝子を DNA タグ及びビオチンラベルした対立遺伝子特異的プライマーを用いて PCR 法により増幅し、その産物をアビジンラベルした青色ナノ粒子を含む展開液と混合し、DNA タグと相補的な配列を持つ 10 塩基程度のオリゴ DNA がライン上に塗布されたストリップに展開する。数分後、ストリップ上に青色のラインが検出された位置を読み取ることで、SNP の有無と同時に野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体、あるいは SNP 型ホモ接合体の遺伝子型を1本のストリップで検出できる系を構築することを目的とした。特に本研究では、アミノグリコシド系抗生物質投与に由来する不可逆的感音性難聴発症の原因とされるミトコンドリア DNA 1555A>G 多型と抗凝固薬ワルファリンの薬物動態や薬効と強い関連性が明らかになっている CYP2C9 及び VKORC1 の SNP を簡易迅速に検出できる核酸クロマトグラフィー法を開発した。

3. 研究の方法

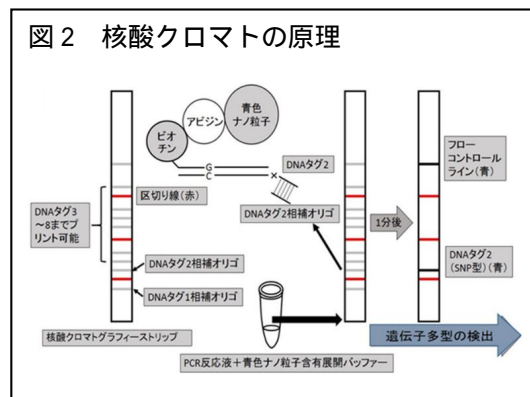
本研究では、図1に示したように SNP 部位が 3' 端になるような野生型対立遺伝子増幅プライマーと SNP 型対立遺伝子増幅プライマーとした Allele Specific PCR プライマーをそれぞれ作製した。その際に、対立遺伝子特異的プライマーの 3' 端から 2 つ目の塩基に人為的なミスマッチを導入し、プライマーの特異性を大幅に向上させた。また、5' 端にはプライマー間で配列の異なる 10 塩基程度の DNA タグを連結した。なお、DNA タグが PCR 中に 2 重鎖にならないようにスパーサーを挟んで連結した。次に 1 本の PCR チューブ内で両方のプライマーを含むマルチプレックス PCR を行った。その際に共通リバースプライマーの 5' 端をビオチンでラベルした。野生型あるいは SNP 型プライマーが鋳型 DNA の配列を特異的に認識し、得られる PCR 産物は 1 本鎖の DNA タグとビオチンが結合したものとなる。

図1 Allele Specific PCR 法の原理



次に、図2に示したようにアビジンを結合させた青色ナノ粒子を含む展開バッファーに得られた PCR 反応液を混合し、核酸クロマトグラフィーストリップに展開した。ストリップ上には、DNA タグ配列に相補的なオリゴヌクレオチドがライン上にプリントされている (最大で 8 ラインまでプリント可能)。

図2 核酸クロマトの原理



PCR 産物に連結された DNA タグとストリップ上の相補配列オリゴが結合し、青色ナノ粒子が凝集して目視可能なレベルのバンドを形成することで SNP の有無を判別することができる。同法は、検出対象がミトコンドリア

DNA 上の SNP の場合、ヘテロプラスミーがない限り単一の遺伝子型を判別することができる。それに対し、ゲノム DNA 上の SNP の場合は、野生型プライマーに連結した DNA タグのみにバンドが出現、SNP 型プライマーに連結した DNA タグのみにバンドが出現、あるいはその両方にバンドが出現することで、それぞれ、野生型ホモ接合体、SNP 型ホモ接合体、ヘテロ接合体の遺伝子型を決定することができる。

(1) 非特異的増幅を抑制したプライマーの設計および選択

ミトコンドリア DNA の 1555 番目の A が G に置換する変異を特異的に検出できるような対立遺伝子特異的プライマー配列の探索を行った。プライマー長は 20 塩基程度とした。オリゴ DNA の 3' 端に SNP が位置するように設計し、3' 端の隣の塩基を A、T、G、C にした人為的ミスマッチプライマーを野生型及び SNP 型検出用プライマーとしてそれぞれ 4 種類作製した。これらのプライマーを用いて、シングル PCR により増幅し、産物を EtBr 含有 3% アガロースゲルにより 100V で 25 分の電気泳動後、UV 照射によって確認を行った。PCR 酵素は Premix Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa) を使い、PCR 条件は 94 で 2 分の反応後、94 で 30 秒、65 で 30 秒、72 で 30 秒のサイクルを 28 サイクル行い、72 で 7 分処理した。ここでは一番非特異的増幅が少ないプライマーセットを選択した。

(2) PCR 条件の検討

1 本の PCR チューブに野生型及び SNP 型検出用プライマーの両方を含むマルチプレックス PCR の最適反応条件の検討を行った。ここでは酵素や反応温度条件について検討した。酵素は Premix Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa) と SYBR® Premix Ex Taq (TaKaRa) について比較を行った。また、反応温度条件はアニーリング温度とアニーリング時間について検討した。検出は核酸クロマトグラフィーストリップにより行った。青色ナノ粒子溶液 1 µL、展開液 10 µL、水で希釈した PCR 産物 10 µL を混合しストリップ上に展開させることで可視化したバンドを確認することで評価した。

(3) 反応条件の検討

アビジンを結合した青色ナノ粒子を含む展開液に得られた PCR 反応液を混合し、ストリップに展開することでバンドを確認した。非特異的なバンドと目的のバンドとのコントラストを明確にするため、PCR 産物の希釈に用いる水の量、展開時間の検討を行った。

(4) CYP2C9 及び VKORC1 の SNP 検出

ミトコンドリア DNA 1555A>G 多型検出系の構築と同様の手法で CYP2C9 及び VKORC1 の SNP 検出系を構築した。

4. 研究成果

(1) 非特異的増幅を抑制したプライマーの設計および選択

野生型及び SNP 型のフォワードプライマーにおいていずれも 3' 側から 2 塩基目が T であるときに、非特異的な増幅産物と目的産物の増幅量のコントラストが最も大きくなった。

(2) PCR 条件の検討

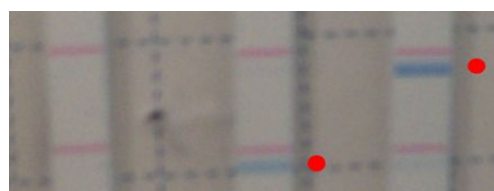
Premix Ex Taq® Hot Start Version (TaKaRa) と SYBR® Premix Ex Taq (TaKaRa) の酵素を比較した場合、SYBR® Premix Ex Taq を用いた時に、野生型の検出感度は低下してしまうが、非特異的増幅が少ない結果となった。そこで、野生型の増幅効率を高めるため、PCR のアニーリング条件を変更した。時間は 30 秒とし、60 からサイクルごとに 0.2 ずつ上昇させ 28 サイクル反応を行うことで野生型と SNP 型がはっきり判別できるようなコントラストが得られた。

(3) Single Tag Hybridization (STH) 反応条件の検討

希釈の水の量は展開溶液調製時に、PCR 産物 0.5 µL に対して 8.5 µL 添加することで PCR 産物を予め希釈することなく非特異的なバンドが少ない状態で検出可能となった。また、展開時間については 5 分から 10 分の間で検討を行ったが、バンドの濃さには影響がなかった。よって、展開溶液の組成は、青色ナノ粒子溶液 1 µL、展開液 10 µL、水 8.5 µL、PCR 産物 0.5 µL とし、展開時間は検出までの時間が短くて済む 5 分を採用することとした。以上の条件で行ったミトコンドリア DNA1555A>G 検出の結果を図 3 に示す。

図 3 ミトコンドリア DNA1555A>G の検出

NC: 陰性コントロール, Wt:1555A,
Vr:1555G



NC Wt Vr

SYBR Ex Taq II

Allele Specific PCR 法と核酸クロマトグラフィーストリップを組み合わせることで、ミトコンドリア DNA の 1555 番目の A が G に置換される変異を迅速かつ簡便に検出する方法を構築した。本法を用いることにより、血液の DNA 精製から結果を得るまでに約

2 時間で検出が可能である。また、結果がストリップ上で一本の線として可視化されるため、バンドの位置の違いから、誰でも診断が可能となる。今回 PCR 酵素として SYBR® Premix Ex Taq を用いたことにより感度良く検出可能となった。この酵素には RNase が入っていることにより DNA 抽出の際に混入の可能性がある RNA が分解されたため、その影響が少なくなったと考えられる。さらに、ミトコンドリア DNA 1555A>G 多型検出系の構築と同様の手法で CYP2C9 及び VKORC1 の SNP 検出系も構築できた（図には示さない）。今回行ったアニーリング温度条件の最適化や PAS 反応の展開時間、溶液組成の検討により非特異的バンドが少なく塩基置換の有無を検出することができたが、今後キット化する上では PCR 装置や試薬調製者の手技の影響などが考えられるため、更なる簡便化が期待される。今後取り組むべき点としては、ゲノム DNA 上の SNP 検出、本法の堅牢性の確認、毛髪や唾液などの血液以外のサンプルから遺伝子診断する方法の構築、DNA 精製を経ずにサンプルを直接 PCR して時間短縮及び簡便化することなどが挙げられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

菱沼英史、塚田智晴、菊地葵、平澤典保、平塚真弘、核酸クロマトグラフィーによる mtDNA1555A>G 多型検出系の開発、第 54 回日本薬学会東北支部大会 (2015 年 9 月 26 日、岩手医大 (岩手県紫波郡矢巾町))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 真弘 (HIRATSUKA Masahiro)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：50282140

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：