

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：32425

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15517

研究課題名(和文)重症薬疹の発生リスク回避を目指した革新的HLAタイピング法に基づく診断薬の開発

研究課題名(英文) Development of HLA typing method to avoid the risk of severe cutaneous adverse drug reactions

研究代表者

長部 誠 (Osabe, Makoto)

日本薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40700985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：限界希釈法を応用し、両親由来の染色体を分離することで、高解像度かつ正確なHLAタイピングを行った。複数の変異を持つハプロタイプを形成するHLAでも、次世代シーケンサーを用いずに6桁レベルの正確な高解像度HLAタイピングが可能となった。抗がん剤モガムリズマブを投与した成人T細胞白血病患者のうち、重篤な皮膚障害を発症する頻度が高くなる特定のHLAタイプを同定するための塩基変異部位を同定した。また、アレル特異的PCRと金ナノ粒子によるDNAプローブを組み合わせた遺伝子診断法を開発し、目視でもHLAアレルの判定をすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として、両親から伝わる2種類の遺伝情報をそれぞれ識別しながら解読することで、HLAの解析のみならず、他の遺伝的背景を持った疾患の解析が推進される。その結果、一人ひとりの遺伝的背景に合わせた、より高い精度での個別化治療が実現可能となることが期待される。現在、モガムリズマブは複数のがんを対象とした他の分子標的薬との併用療法の臨床試験も行われている。そのため、モガムリズマブは今後益々使用されていくと予想され、ある特定のHLAタイプをもつ人では、モガムリズマブの投与により重篤な皮膚障害が発症する危険性が高いため、その副作用回避のための事前診断の重要性は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：High resolution and accurate HLA typing was performed by using the limiting dilution method to separate chromosomes derived from parents. Although HLA forms haplotypes with multiple mutations, accurate high-resolution HLA typing at the 6-digit level was performed without using a next-generation sequencer. We have identified a specific HLA type in adult T-cell leukemia patients who received the anticancer drug mogamulizumab, which is associated with a higher incidence of serious skin disorders, and now a mutation site for determining that HLA was identified. A gene diagnosis method that combines allele-specific PCR with DNA probes using gold nanoparticles was developed, enabling us to determine HLA alleles by naked eyes.

研究分野：医療系薬学

キーワード：HLA 遺伝子診断 限界希釈 ナノ粒子 モガムリズマブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

医薬品による副作用として発症する発疹のうち、生命予後を脅かす危険性の高いものを重症薬疹といい、これらの副作用の発症頻度は低いものの、失明等の後遺症や、死亡の転帰をとる場合があり、極めて重篤な副作用である。近年、薬物による重症薬疹の発症と HLA (human leukocyte antigen, ヒト白血球型抗原) のある特定のタイプとの関連が明らかになってきている。我々はこれまでに、抗 CCR4 (C-C chemokine receptor 4) 抗体モガムリズマブを使用した ATL (成人 T 細胞白血病) 患者において重篤な皮膚障害を発症した患者と発症しなかった患者の検体を集積し、その遺伝子関連解析を行い、副作用発症のバイオマーカーとなる遺伝子を探索してきた。その結果、特定の HLA タイプを持つ患者が皮膚障害発症群に多いことを見出している。

### 2. 研究の目的

HLA 遺伝子型は一般的なゲノム塩基配列の個人差である 1 塩基多型 (SNP) と比較して高い発症リスクをもつ例が多いため、ゲノム情報にもとづく個別化医療の実現においても実用性が高いと期待されている。さらに、米国食品医薬品局 (FDA) は 2014 年より新規開発タンパク性医薬品で効果減弱や副作用が発症した患者の HLA タイプの評価を求めており、その重要性が増してきている。これまでの HLA タイピング法では複数の変異が同じ染色体上に位置するか、異なる染色体上に位置するのかわけられないため、曖昧さ (Ambiguity) のある、みなしタイプングであった。近年開発された、NGS (次世代シーケンサー) による HLA タイピング法では正確なタイプングが可能であるが、その費用、時間、操作の複雑さ、膨大なデータ解析といった問題があり、臨床現場への普及には簡略化、迅速化、自動化などの取り組みが必要である。

そこで本研究では、臨床現場で利用可能でかつ高精度の HLA タイピング法を開発し、副作用回避のための HLA 事前診断法の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 両親由来染色体の分離手法と各 HLA 遺伝子の特異的な増幅方法の確立：これまでの遺伝子解析方法では、両親由来の染色体 DNA が混ざったままであるため、個人の遺伝情報として完全ではない、または複雑な解析手法が必要となっていた。

水溶液中で DNA を希釈分散させると、DNA が不安定化して断片になったり、容器内に吸着したり、など不都合が多くなるが、アガロースゲル中ならば安定に取り扱うことができる。アガロースゲルはその網目構造により巨大分子の出入りを防ぐ一方で、酵素やプライマーのような比較的小さな分子は自由に出入りが可能である。そのため、ゲル内部に埋め込まれた DNA でも外部から添加した酵素溶液により増幅反応を行うことができる。

そこで、DNA をアガロースゲル中で 1 分子レベルにまで希釈分散 (限界希釈) させることで、両親由来の染色体 DNA の分離を試みた (図 1)。最適な希釈ウェル数の検討や遺伝子増幅の反応時間の検討などを行った。増幅産物は加熱によりアガロースゲル内部から回収し、塩基配列を確認することで 1 本の染色体由来のハプロタイプであるかの確認を行った。

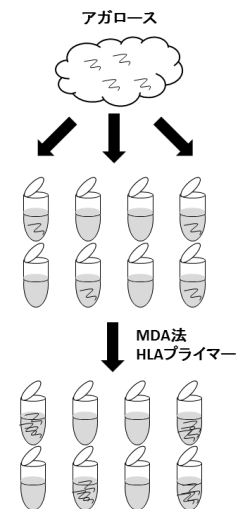


図1 染色体分離とHLA遺伝子の増幅

(2) モガムリズマブの副作用回避のための事前診断法の開発：モガムリズマブ投与による重症薬疹の副作用を回避するため、モガムリズマブ投与前に患者の該当 HLA の有無を調べる、簡便かつ正確な事前診断法が必要であり、金ナノ粒子を用いた診断法の開発を行った。

これまで金ナノ粒子が遺伝子診断に用いられてきた仕組みは、DNA を結合させた金ナノ粒子間を分析対象となるプローブ DNA が橋渡し (架橋) することで、粒子が三次元的な網目構造を形成し、凝集による色調変化を検出する仕組みであった。近年では非架橋メカニズムによる凝集反応が見いだされ、この凝集反応は架橋反応による凝集反応に比べて、迅速であり数分で平衡に達するものであることから、迅速な診断に応用が可能であると考え、目視による HLA タイピングに応用することを検討した。

### 4. 研究成果

(1) 限界希釈法による染色体分離法：DNA が分離できているかどうかを確認するために行ったサンガーシーケンスの結果、ゲノム DNA を用いた場合、安定した 1 分子レベルの分離は難しかった。これは、ゲノム DNA は非常に長い DNA 鎖であるため、操作の間に一度は分離された DNA 鎖が再アニーリングしやすいためであると考えた。操作を高温で行うことで再アニーリングを防止することができると思われるが、扱う DNA 溶液が希薄であるため不安定になりやすいことから、ゲノム DNA を用いることは適切ではないと判断した。そのため、HLA 領域を PCR 増幅した DNA サンプルを限界希釈することとした。

増幅した PCR 産物はアガロースゲル中で希釈分散させた後、1 分子ゲノムシーケンシング用

の DNA ライブラリーの調製に用いられている MDA 法 ( Multiple Displacement Amplification ) によって増幅させることができた。MDA 法は、読み取り精度が高く、一定温度 ( 30 ) で DNA の増幅が可能であったことから、PCR の機械も必要としないという大きな利点があった。HLA 遺伝子変異は Exon 2, 3 領域に集中していることから、Exon 2, 3 領域のみを増幅し、増幅が確認できたサンプルを陽性と判定した。陽性サンプルの DNA の塩基配列を解析することによって、HLA タイプを 6 桁レベルまで決定することができた。この結果から、複数の変異を持つハプロタイプを形成する HLA でも、次世代シーケンサーを用いずに高解像度の HLA タイピングが可能となった。

(2) モガムリズマブの副作用回避のための事前診断法の開発：抗がん剤モガムリズマブを投与した成人 T 細胞白血病患者のうち、特定の HLA タイプ ( 未発表 ) を有すると重篤な皮膚障害を発症する頻度が高くなることから、該当 HLA を同定するためにどの塩基の変異を明らかにすればよいのか検討するため、該当 HLA が属する HLA クラスの塩基配列を網羅的に収集し、解析を行った。その結果、3 か所の塩基 ( 343G, 379G, 419A ) を明らかにすることで、該当 HLA ただ一つに決定できることが明らかとなった。

3 つの塩基のうち両側の 2 つの塩基の検出にはプライマーの 3' 末端のミスマッチを感知する HiDi DNA polymerase を使用することで該当 HLA を含む両端が 343G/419A である HLA アレルを検出することができた ( 図 2 )。続いて、中央の 379G を検出するため、金ナノ粒子に一本鎖 DNA を結合させた DNA プローブを用いた解析を行った。



図2 アレル特異的PCR

金ナノ粒子は最も古くから研究されてきているナノ粒子であり、金ナノ粒子は水溶液中で分散している場合、赤色を呈する。DNA を結合した金ナノ粒子に塩を加えていくと、凝集を観察することができるが、相補的な DNA を加えた系、ミスマッチの DNA を含む系ではその凝集や色調に変化が認められた ( 図 3 )。完全相補鎖 DNA の場合には、凝集に基づく色調の変化があり、吸収ピークが 520 nm から 560 nm に変化するのに対して、末端塩基にミスマッチがある場合は分散状態であり、ピークの変化は観察されなかった。この凝集反応は 10 分程度で目視での色調変化が観察できることから、迅速な診断に応用が可能である。また、4 で 1 時間反応させることで金ナノ粒子は沈殿することから、さらに目視での判断が容易となった ( 図 4 )。

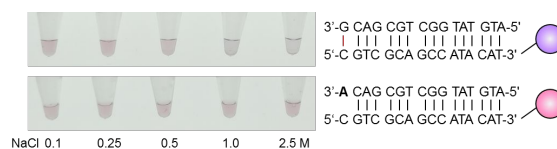


図3 末端ミスマッチによる色調変化

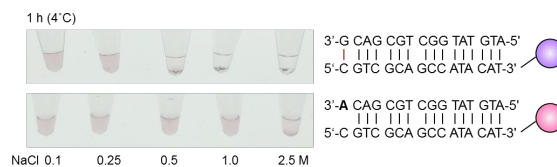


図4 反応温度による色調変化

この機構は粒子外側に位置する末端塩基の違いを判別するため、遺伝子診断に用いるには一工夫が必要であり、プライマー1 塩基伸長反応が有効である ( 図 5 )。まず、ゲノム DNA から該当 HLA をアレル特異的 PCR で増幅する。続いて目的の変異 ( 379G ) の直前までのプライマーと 4 種類のジデオキシヌクレオシド三リン酸 ( ddNTP ) を用いて、伸長反応を行い 1 塩基のみ伸長させる。その伸長された塩基を判定するために、プライマーに相補的な DNA の末端に 379G に相補的な C が 1 塩基追加された DNA を結合させた金ナノ粒子を加えると、379G のみ凝集反応によって色調が変化し、判定が可能になることが実証された ( 図 6 )。以上の結果から、一塩基の違いを目視で確認できるように、DNA 解析における金ナノ粒子の利用は多いに可能性がある。

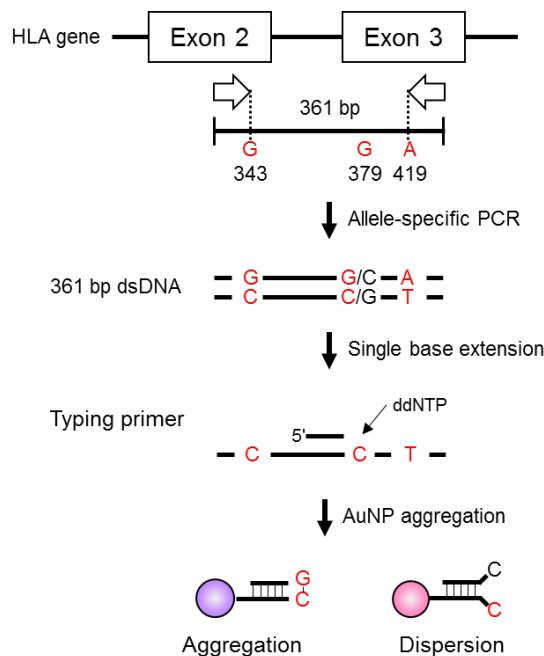


図5 金ナノ粒子による遺伝子診断ワークフロー

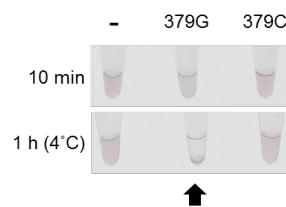


図6 HLA目視診断

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Osabe M., Tajika T., Tohkin M., Allopurinol suppresses expression of the regulatory T cell migration factors TARC/CCL17 and MDC/CCL22 in HaCaT keratinocytes via restriction of NF- $\kappa$ B activation. *J. Appl. Toxicol.* **38**(2):274-283 (2018). 査読有

〔学会発表〕(計1件)

中嶋琢人, 亀位涼, 坂部彩, 岡本秀人, 長部誠, 頭金正博, CLC Genomics Workbenchを用いたHLAタイピング法と他のタイピングソフトとの比較, 第4回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム, 9月, 東京(2018).

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者氏名: 長部 誠

ローマ字氏名: OSABE, Makoto

所属研究機関名: 日本薬科大学

部局名: 衛生薬学分野

職名: 講師

研究者番号(8桁): 40700985

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。