

骨髓異形成症候群に関連した *SF3B1*遺伝子変異検査キットの開発

Development of Screening Kit for *SF3B1* Gene Mutations Related to Myelodysplastic Syndromes

令和6年6月

東洋鋼鉄株式会社

骨髄異形成症候群に関連した *SF3B1* 遺伝子変異検査キットの開発

高光 恵美^{*1}・森弘 惇一^{*2}・大場 光芳^{*3}

Development of Screening Kit for *SF3B1* Gene Mutations Related to Myelodysplastic Syndromes
Emi TAKAMITSU, Junichi MORIHIRO, Mitsuyoshi OHBA

Synopsis : Myelodysplastic syndromes (MDS) are refractory hematopoietic tumors caused by clonal abnormalities of hematopoietic cells, and the number of patients is increasing in Japan as the population ages. Many of the causative genetic abnormalities have been identified. According to the revised 4th edition of the WHO classification, presence of *SF3B1* mutations is one of the diagnostic criteria for MDS. However, in Japan, there are only a limited number of laboratories that can test for *SF3B1* mutations. Therefore, we developed a kit that can simultaneously test for multiple *SF3B1* mutations associated with MDS.

SF3B1 mutation sites were amplified with fluoresce-labeled primers by multiplex PCR. The PCR products were hybridized to DNA chips bonded with specific probes for these wild or mutated sequences in the presence of oligonucleotide blockers. After washing to remove unhybridized products, the fluorescence intensity of each probe was detected. Index defined as fluorescence intensity ratio [mutant probe intensity / (wild probe intensity + mutant probe intensity)] were used to analyze these mutations.

By optimizing the probe sequence and hybridization conditions, and by suppressing nonspecific hybridization reactions with oligonucleotide blockers, a detection sensitivity of 5% was achieved for all *SF3B1* mutations to be analyzed. In addition, analysis of MDS patient samples showed that the results of this product were consistent with those of the existing method, direct sequencing. Thus, our microarray-based assay kit is useful for identifying *SF3B1* mutations in patients with suspected MDS.

Key Words : myelodysplastic syndromes (MDS) ; *SF3B1* mutation; DNA chip analysis

1.はじめに

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes, MDS) は、造血細胞のクローン性異常によって発症する疾患¹⁾であり、造血不全と急性骨髄性白血病への移行を特徴とする。貧血、倦怠感、発熱などを伴うが、症状がほとんどなく健康診断などの血液検査結果の異常をきっかけに診断される場合もある。本邦では高齢化に伴い患者数が増加している²⁾とされる難治性の造血器腫瘍である。

MDS の確定診断には、骨髄検査によって骨髄細胞に骨髄異形成の形態異常および骨髄細胞の染色体検査で核型異常を同定することが必要である³⁾が、近年の網羅的遺伝

子解析技術の進歩とともに原因となる遺伝子異常の多くが明らかとなってきた^{4,5)}。WHO 分類改訂第4版⁶⁾にて MDS の診断基準に *SF3B1* 遺伝子変異が取り入れられたが、これに続き WHO 分類第5版⁷⁾では遺伝子異常で定義される MDS と形態異常で定義される MDS に病型が区分され、遺伝子異常は疾患を特徴づける情報として重要性が増している。とくに、環状鉄芽球を伴う MDS については WHO 分類第5版にて形態学的特徴よりも *SF3B1* 遺伝子変異との関連がより強調されることとなった。*SF3B1* 遺伝子変異は、コドン700における変異である K700E の頻度が最も高く、コドン700の他、変異のホットスポット

*1 技術研究所 機能化技術研究部 ライフサイエンス技術グループ 遺伝子診断薬チーム チームリーダー

*2 事業推進室 ライフサイエンス事業グループ

*3 技術研究所 機能化技術研究部 ライフサイエンス技術グループ グループリーダー

としてコドン666, 662, 622 及び625 が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。またMDSに伴う貧血の治療薬であるluspatercept (2024年1月承認)は*SF3B1* 遺伝子変異を持つ環状鉄芽球を伴うMDS (MDS-RS)では有効性が高いとされる¹¹⁾。しかしながら、本邦では検査が可能な施設は設備の整った大規模な大学病院などに限られ、*SF3B1* 遺伝子変異の有無は診断に重要な情報であるにも関わらず、検査を受けられていないケースが多いと予想される。そこで、我々の保有するジーンシリコンDNA チップ技術¹²⁾を応用し、MDSに関連した複数種類の*SF3B1* 遺伝子変異の有無を同時検査が可能なキット (以下、本品)を開発した。本稿では同時検査のためのプローブ設計やハイブリダイズ条件の最適化、ブロッカーによる非特異的ハイブリダイズ反応の抑制等の検討結果や、既存法との比較を含む本品の性能について記述する。

2. 方法

2.1 材料

プローブ、プライマー、ブロッカーとして用いたオリゴヌクレオチドDNAはThermo Fisher Scientific社から購入した。プライマーの蛍光色素標識にはIC5-OSu (N-Ethyl-N'-[5- (N''-succinimidylloxycarbonyl) penty]-3,3,3',3'-tetramethyl-2,2'-indodicarbocyanine iodide, 株式会社同仁化学研究所)を用いた。健康人末梢血由来ゲノムDNAはBiochain社から購入した。PCR試薬はFastStart Taq DNA ポリメラーゼ, dNTPack (Sigma-Aldrich社)を用いた。オリゴヌクレオチドDNAの融解温度 (Tm) 計算にはIDT社の提供するOligoAnalyzer

(<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>)を用いた。DNAチップの作製方法は前報¹³⁾に記されたとおりとした。

2.2 PCR 反応

SF3B1 遺伝子の解析対象領域 (エクソン14 およびエクソン15)を2plex PCRにより同時増幅した。DNAプローブとハイブリダイズする鎖のプライマーの5'末端を予め蛍光色素で標識することによりDNAプローブにハイブリダイズする増幅産物の5'末端を蛍光色素で標識した。

PCR反応は95℃で5分間、酵素を活性化後、95℃で30秒、60℃で30秒、72℃で90秒を40サイクル繰り返した。その後、72℃で10分間伸長させ、4℃で静置した。PCRにはApplied Biosystems Veriti サーマルサイクラー (Thermo Fisher Scientific社)を用いた。

2.3 ハイブリダイズ反応と蛍光強度の検出

PCR反応後の反応液とブロッカーオリゴDNAを添加した2.25×SSC, 0.225%SDSを含むハイブリダイズ緩衝液とを2:1で混合し、ハイブリダイズサンプルとした。

ハイブリダイズサンプル中でDNAチップを49.5℃で30分間静置し、増幅産物とプローブをハイブリダイズした。0.1×SSC, 0.1%SDS溶液で洗浄し未反応のサンプルを除去後、1×SSC溶液中にてDNAチップ上の各スポットの蛍光強度を検出した (励起波長640nm)。ハイブリダイズ反応および蛍光強度検出は遺伝子解析装置 BIOSHOT HT-32 (東洋鋼鈑株式会社)を用いた¹⁴⁾。

2.4 判定

遺伝子解析装置BIOSHOT HT-32が検出した各スポットの蛍光強度から判定値 (Index = 変異型検出プローブ蛍光強度/野生型検出プローブと変異型検出プローブの和)を算出した。検査検体の判定値が予め設定したカットオフ値以上の場合、変異陽性と判定した。カットオフ値は5%の変異が存在する状態を模した変異モデル検体の判定値のバラつきを考慮し、設定した。

3. 結果

3.1 解析対象領域の遺伝子増幅

遺伝子変異情報データベース (COSMIC)にて*SF3B1* 遺伝子変異を調べた。データベース上の発生頻度や文献情報等を元に本品での解析対象変異を決定した (Table 1)。

Table 1 Detection target mutations in *SF3B1* gene.

Target mutation	Target sequence
p.E622D	c.1866G>C
p.E622D	c.1866G>T
p.R625C	c.1873C>T
p.R625H	c.1874G>A
p.R625L	c.1874G>T
p.H662Q	c.1986C>G
p.K666E	c.1996A>G
p.K666Q	c.1996A>C
p.K666T	c.1997A>C
p.K666R	c.1997A>G
p.K666M	c.1997A>T
p.K666N	c.1998G>C
p.K666N	c.1998G>T
p.K700E	c.2098A>G

Table 2 Primer sequences.

Target	Primer	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Fluorescent label	Product size (bp)
Exon 14	Fw	GTCTGGCTACTATGATCTCTACCA	55.0	-	240
	Rv	TTCTAAGATGTGGCAAGATGGCA	56.6	IC5	
Exon 15	Fw	TGGGGCATAGTTAAACCTGTGT	56.6	IC5	321
	Rv	AGAGGAATAAGATACCCAATAGCCT	54.9	-	

SF3B1 遺伝子配列から解析対象変異が含まれるエクソン14およびエクソン15領域を増幅するプライマーをそれぞれ設計した. 増幅に用いたプライマーをTable 2に示した. 蛍光色素標識と非標識のプライマー濃度比を9:1とした非対称PCRにてこれら2領域を同時増幅した. 増幅産物を電気泳動したところ, 副産物を生成することなく2領域をバランスよく増幅可能であることを確認した (Fig.1).

3.2 プローブの設計

全ての解析対象変異にて同時にハイブリダイズ反応を可能とするため, T_m (°C) が近い値となるよう野生型および変異型を検出するためのプローブを設計した.

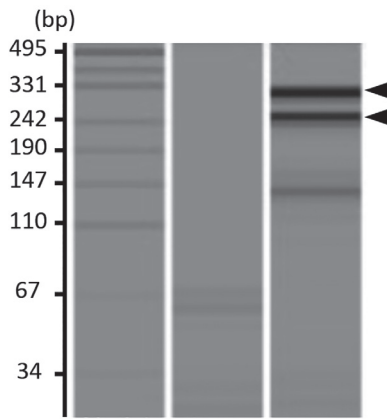


Fig.1 PCR amplification of *SF3B1* gene exon14 and exon15. Left lane; molecular size marker, Middle lane; water (negative control) , Right lane; genome DNA.

SF3B1 遺伝子の野生型および変異型配列からそれぞれの検出用プローブを設計した. プローブ配列をTable 3に示した. これらをDNA チップ上にスポットし, 健康人末梢血由来ゲノムDNA およびK700E 変異を有するMDS患者由来ゲノムDNA を解析した. DNA チップレイアウト, 検出画像をFig.2に示した. 対応するスポットで良好な蛍光強度を検出した.

Table 3 Probe sequences.

Probe	Probe sequence (5'-3')	T_m (°C)
E622-W	CATGGATGAGTATGTCCG	49.6
E622D (G>T)	ACATGGATGATTATGTCCG	49.4
E622D (G>C)	TAACATGGATGACTATGTCCG	51.7
R625-W	AGTATGTCCGTAACACAACAG	52.2
R625C	TGAGTATGTCTGTAACACAAC	49.8
R625H	GTATGTCCATAACACAACAGC	51.5
R625L	ATGTCCTTAACACAACAGCT	51.8
H662-W	AGCGAGACACACTGGTA	52.7
H662Q	AGCGAGACAGACTGG	50.5
K666-W	AACTGGTATTAAGATTGTACA	49.0
K666E	ACTGGTATTGAGATTGTAC	46.2
K666Q	ACTGGTATTGAGATTGTAC	46.2
K666T	ACTGGTATTGAGATTGTAC	48.9
K666R	AACTGGTATTAGGATTGT	47.7
K666M	ACTGGTATTATGATTGTACAA	46.5
K666N (G>C)	CTGGTATTAACATTGTACAACA	48.4
K666N (G>T)	AACTGGTATTAATATTGTACAA	47.5
K700-W	IAACTTCTGCTGCTCAT	49.7
K700E	IAACTCCTGCTGCTCAT	52.0

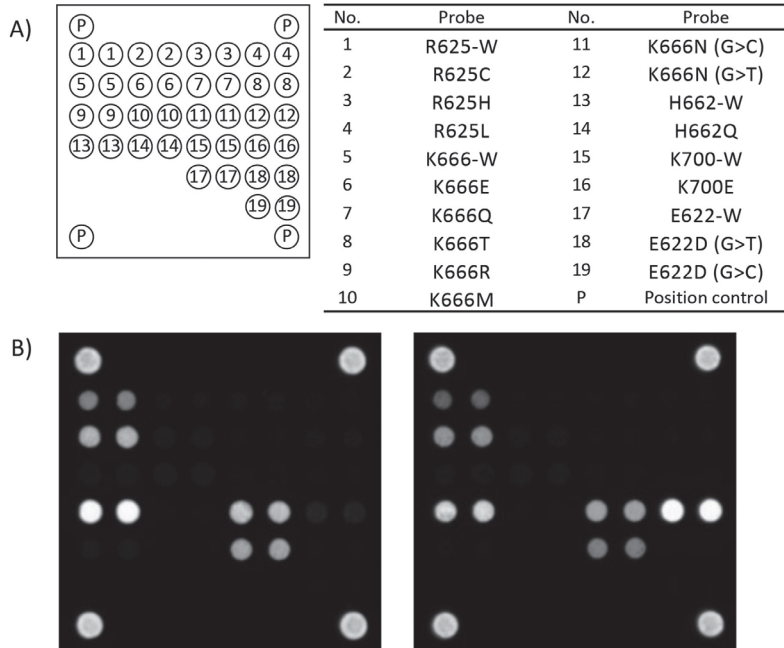


Fig.2 *SF3B1* chip analysis.

A) Spotting layout of *SF3B1* chip. B) Scanning image of *SF3B1* chip after hybridization. Left panel; Wildtype genome DNA sample from healthy donor. Right panel; K700E mutation genome DNA sample from a patient affected with MDS.

3.3 プローブ配列に含まれるSNPの影響

データベース上の遺伝子配列は多数を占める代表的な配列であり、その塩基配列には個人差がある（遺伝子多型）ことが知られている。遺伝子多型による塩基配列の違いによりプローブの反応性に差異が生じ、変異判定結果に影響する可能性がある。そこで、一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism, SNP）、1～数塩基の置換、挿入/欠失、反復等の情報を集約したデータベース（dbSNP ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>）にてプライマー及びプローブ配列付近に存在する遺伝子多型を調査したところ、K700E 変異周辺にSNP（rs16865307, C>A, 日本人集団の頻度は約0.3%）が認められた。

SNPの影響を調べるため、当該SNP配列にマイナーアレルであるAおよびT塩基を有する人工遺伝子を作製し、プローブとハイブリダイズ反応したところ、野生型検出プローブ、変異型検出プローブともに蛍光強度が大きく減少した（Fig.3, B）。メジャーアレル（CC）以外の配列では当該SNP配列にプローブとのミスマッチが生じたためと考えられた。そこで、プローブの当該SNP配列にユニバーサル塩基として知られるデオキシイノシンを組み込み（Fig.3, A）、ミスマッチの解消を試みた。その結果、デオキシイノシンを組み込んだプローブでは大幅な改善が認められ、検査に十分な蛍光強度を得た（Fig.3, C）。本品の解析対象のうち最も発生頻度の高いK700E変異では、プローブ中のSNP配列にデオキシイノシンを採用することで個人差のあるSNPの影響を可能な限り排除して検査が可能となった。

3.4 ブロッカーの設計

ハイブリダイズ反応において、変異量が低い検体では野生型配列由来の増幅産物が大部分を占めるため、野生型由来の増幅産物が変異型検出プローブへ非特異的にハイブリダイズし変異検出を妨げる場合がある。そこで、ハイブリダイズ反応液へブロッカー（野生型配列と相補的なオリゴヌクレオチドDNA）を添加し野生型増幅産物との2本鎖を形成させ、野生型増幅産物の変異型検出プローブへの非特異的なハイブリダイズを抑制することで検出感度の向上を試みた。

SF3B1 遺伝子では、MDS関連遺伝子変異はE622DとR625Lのように近傍に存在するものが報告されている。従来、ブロッカーは変異型増幅産物とのミスマッチ塩基が中央になるように設計していたが、E622DとR625Lのように近傍に存在する変異をターゲットとするブロッカーは相互に作用し合うことが予想された。

そこで、従来の方法と同様に変異型配列とのミスマッチ塩基が中央となるようにE622とR625の変異をターゲットとしてそれぞれ別に設計したブロッカーと、両方の変異箇所を単独でカバーするブロッカーを設計し（Fig.4, A）、性能を比較した。E622D, R625L変異ともに、それぞれの変異のみをターゲットにして従来の方法で設計したブロッカーでは、野生型検出プローブ、変異型検出プローブともにブロッカー濃度に伴い判定値は向上したものの蛍光強度が大きく減少した（Fig.4, B, D）。一方、一つで両方の変異箇所をカバーするように設計したブロッカーでは、E622D, R625L変異ともにブロッカー

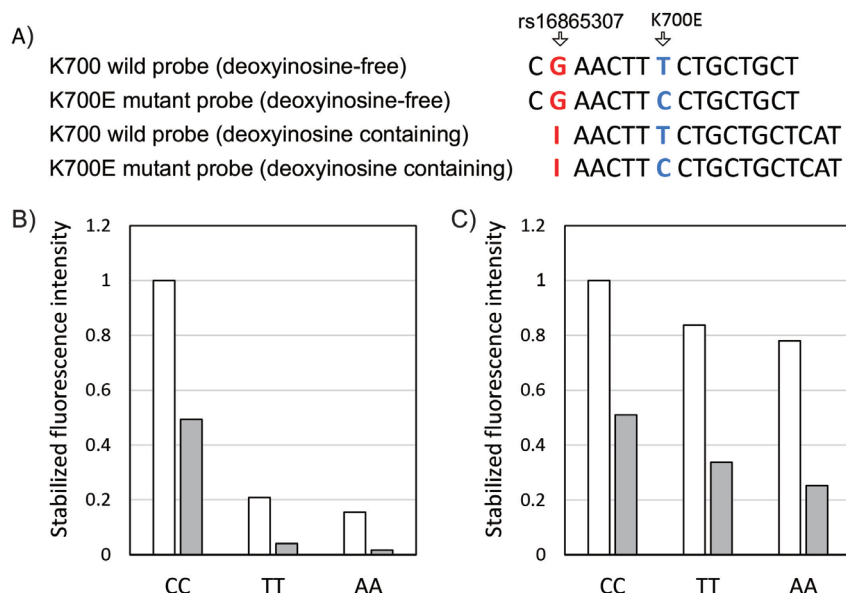


Fig.3 Correlation between fluorescence intensity and rs16865307 genotype.

A) Probe sequences for K700E mutation. SNP (rs16865307) position is indicated. B) Deoxyinosine-free probes at SNP position base. C) Deoxyinosine containing probes at SNP position base. Open bar represents stabilized fluorescence intensity detected by wildtype probe, shaded bar represents stabilized fluorescence intensity detected by mutant probe. Model samples were used which containing (CC) or (TT) or (AA) at SNP position, and also 5% *SF3B1* gene K700E mutant allele.

濃度に伴い変異型検出プローブの蛍光強度は保ったまま判定値が向上した (Fig.4, C, E). 以上の検討結果から, H662, K666 の変異をターゲットにしたブロッカーでも同様に両方の変異箇所をカバーするように設計し, 配列を最適化した. 決定したブロッカーオリゴヌクレオチド DNA の配列をTable 4に示した.

3.5 カットオフ値の設定

本品の目標検出感度は5%としたため, 野生型配列および変異型配列を有する人工DNA を作製し, これらを混合して5% 変異が存在する状態を模した変異モデル検体を調製した. この変異モデル検体を用いて, 野生型配列を有する健康人末梢血由来ゲノムDNA とともに繰り返し

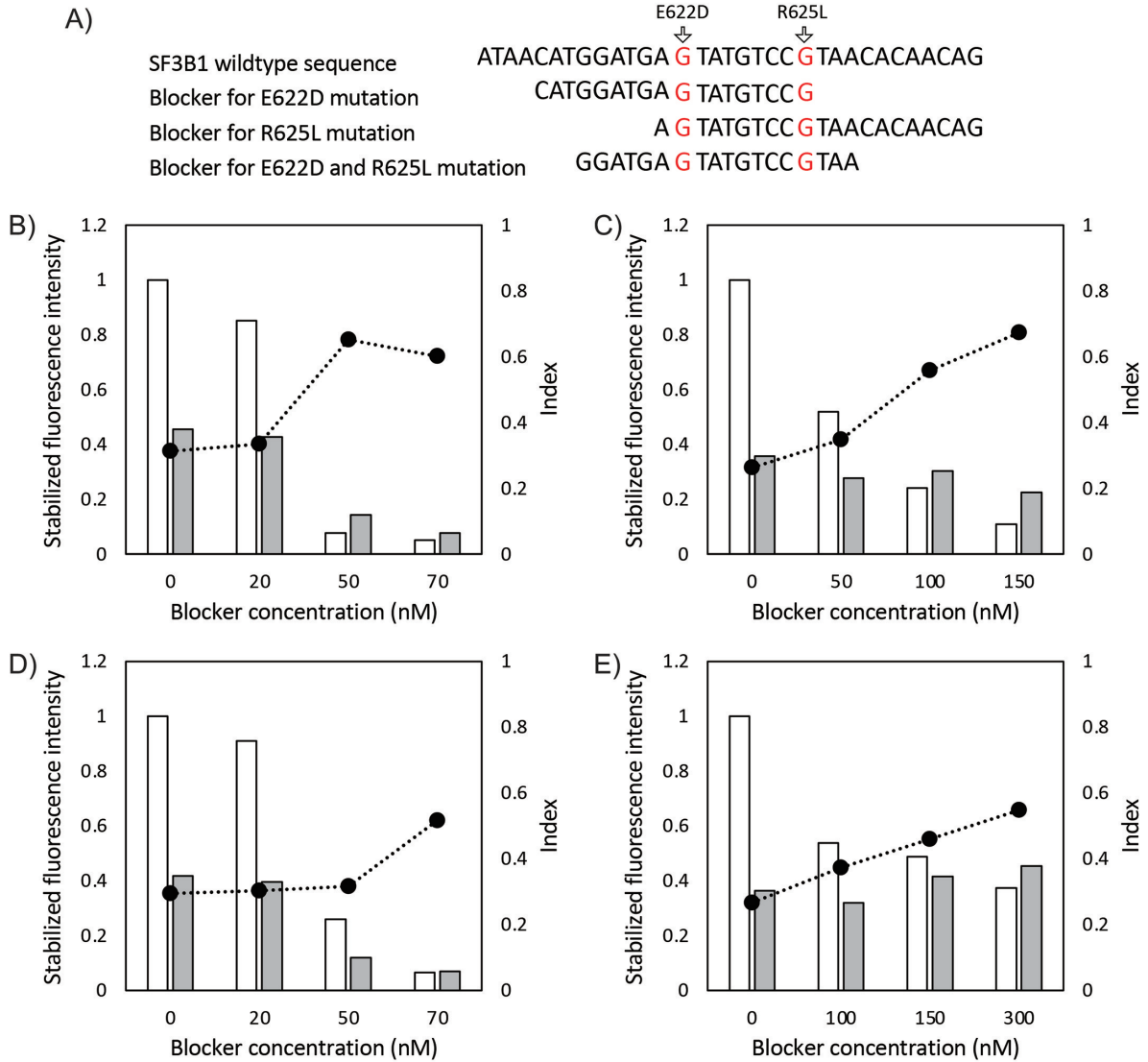


Fig.4 Relationship of fluorescence intensity and index to blocker sequences and concentrations.

A) E622D fluorescence intensity and index to blocker for E622D mutation, B) E622D fluorescence intensity and index to blocker for E622D and R625L mutation, C) R625L fluorescence intensity and index to blocker for R625L mutation, D) R625L fluorescence intensity and index to blocker for E622D and R625L mutation. Open bar represents stabilized fluorescence intensity (FI) detected by wildtype probe, shaded bar represents stabilized fluorescence intensity detected by mutant probe, filled circle represents index. Index were calculated as follows: (FI of mutant probe) / (sum of FIs of both probes) . E) Comparative sequences of the SF3B1 gene wild type and blocker oligonucleotides.

Table 4 Blocker sequences.

Target	Blocker sequence (5'-3')	Tm (°C)
E622-R625	TGAGTATGTCCGTAACAC	48.4
H662-K666	CACACTGGTATTAAGATTG	45.3
K700	AACTTTCTGCTGCT	43.5

試験を行った。結果をFig.5に示した。また、これらの結果から判定値の平均値及び標準偏差を算出し、測定のパラツキを考慮して変異の有無を判定するためのカットオフ値を設定した。設定したカットオフ値と野生型検体の判定値のパラツキは重複しなかったことから、野生型検体を偽陽性と誤判定することなく変異の有無判定が可能と考えられる。MDS患者の骨髓液から抽出されたゲノムDNAを用いて検査を実施したところ、設定したカットオフ値以上の判定値が得られ、これらの検体では*SF3B1*変異陽性と判定された。

3.6 既存法との比較

前項のMDS患者検体を用いた本品による変異の有無判定の結果を、一般的な遺伝子変異解析法であるダイレクトシーケンス法の結果と比較した。結果をTable 5に示した。両法ともに検査を実施したすべての検体で変異が検出された。また、検出された変異は本品と既存法で一致した。以上の結果から、本品は既存法と同様に変異検出が可能であることを確認した。

4. 終わりに

MDSに関連した*SF3B1*遺伝子変異の有無を判定するキットを開発した。*SF3B1*遺伝子にはエクソン15の700位のほか、エクソン14に位置する620～666位のアミノ酸にも様々な変異が報告されている。本品では解析対象とした2つの領域の同時増幅、DNAチップに搭載した各変異型検出プローブの最適化とブロッカーによる非特異的ハイブリダイズ反応の抑制により14種類の遺伝子変異の同時解析を可能とした。また、本品の解析対象遺伝子変異のうち最も発生頻度の高いK700E変異では個人によって遺伝子配列に差のあるSNPが変異近傍に存在するが、プローブ中のSNP配列にデオキシイノシンを採用することでSNPの影響を可能な限り排除して検査が可能となった。

本品の性能について、*SF3B1*遺伝子変異の検査方法として一般的な方法であるダイレクトシーケンス法と比較したところ、両法の解析結果は解析例の全てで一致した。ダイレクトシーケンス法は設計したプライマーセットの範囲内に存在する変異であれば原理的にはどのような変

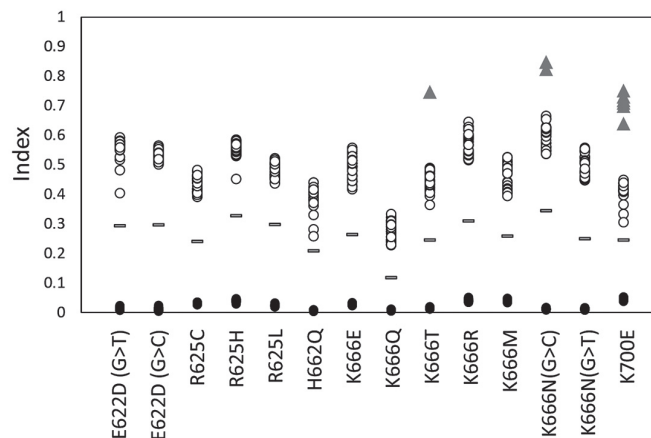


Fig.5 Distribution of determination value.

Filled circles represent genome DNA from healthy donors. Open circles represent mutant model sample containing 5% mutant allele. Gray triangles represent genome DNA from MDS patients. Bars are threshold values for each mutations.

Table 5 Correlation between *SF3B1* gene mutation analysis results from our DNA chip and conventional assay.

No.	Our DNA chip	Sanger sequencing
1	K700E mutation	K700E mutation
2	K700E mutation	K700E mutation
3	K700E mutation	K700E mutation
4	K700E mutation	K700E mutation
5	K666N (G>C) mutation	K666N (G>C) mutation
6	K666N (G>C) mutation	K666N (G>C) mutation
7	K700E mutation	K700E mutation
8	K700E mutation	K700E mutation
9	K666T mutation	K666T mutation

異も検出できるが, 検出感度は10%とされ, 波形として表示された解析結果は目視による確認が必要である. また, エクソン14 とエクソン15 を同時に解析することはできない. 一方, 本品は設計した14 種類の変異型プローブに解析対象変異は限られるものの, 検出感度は5% 以上を達成しており, エクソン14 とエクソン15 は同時に検査が可能である. また, 専用ソフトにより変異の判定が自動化されており, 結果の確認が容易という利点がある. 以上から, 本品は既存法と同等以上の検出感度で複数領域の遺伝子変異の同時解析が可能であり, 判定の自動化は目視での結果読み取りに伴う人為的エラーを防止し, 検査所要時間の短縮に寄与すると考えられる. 現在, 本品は研究用として臨床受託検査に利用されている.

謝辞

本品の開発にあたりまして, 山口大学大学院医学系研究科病態検査学講座湯尻俊昭教授には終始多大な御助言と御協力を賜りました. ここに深謝いたします. また, 岡山直子先生をはじめ山口大学医学部附属病院臨床検査部の皆様にも御協力を頂きましたこと, 感謝申し上げます.

引用文献

- 1) M. Cazzola: *N Engl J Med*. 383 (2020), 1358-1374.
- 2) 骨髓異形成症候群診療の参照ガイド令和1 年改訂版
- 3) 造血器腫瘍診療ガイドライン2023 年版
- 4) E. Papaemmanuil, et al: *Blood*. 122 (2013), 3616-3627.
- 5) T. Haferlach, et al: *Leukemia*. 28 (2014), 241-247.
- 6) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC, Lyon, (2017), 98-106.
- 7) J.D. Khoury, et al: *Leukemia*. 36 (2022), 1703-1719.
- 8) L. Malcovati, et al: *Blood*. 118 (2011), 6239-6246.
- 9) E. Papaemmanuil, et al: *N Engl J Med*. 365 (2011), 1384-1395.
- 10) E.R. Venable, et al: *Am J Clin Pathol*. 156 (2021), 679-690.
- 11) P. Fenaux, et al: *N Engl J Med*. 382 (2020), 140-151.
- 12) 岡村浩, 山野博文, 平山幸一, 市原輝久: 東洋鋼鈑, 34 (2004), 41-46.
- 13) 中村憲章, 平山幸一, 山野博文: 東洋鋼鈑, 39 (2017), 33-39.
- 14) 森弘惇一, 津田稔也, 山野博文: 東洋鋼鈑, 40 (2019), 35-43.