

# UGT1A1の遺伝子多型を判別する DNAチップキットの開発

平山幸一\*・伊藤 茜\*<sup>2</sup>・細谷真悠子\*<sup>3</sup>・山野博文\*<sup>4</sup>

Development of DNA Chip for Detection of *UGT1A1* Polymorphisms

Koichi HIRAYAMA, Akane ITO, Mayuko HOSOYA, Hirofumi YAMANO

**Synopsis** : The toxicities of irinotecan, which is one of anti-cancer drugs, have been reported to correlate with the *UGT1A1* polymorphisms (*UGT1A1*\*28 and *UGT1A1*\*6) . In order to detect these polymorphisms, we have developed a DNA chip made by the GENE SILICON which is Toyo Kohan' s original substrate. In order to improve the DNA chip detection accuracy, we examined PCR conditions, hybridization conditions and washing conditions. In addition, the threshold to judge the allele type was established by using 952 DNA samples. By the use of this threshold, we evaluated the correlation with the Sanger sequencing. As a result, all alleles were consistent. We were able to develop the good precision DNA chip to detect *UGT1A1*\*28 and *UGT1A1*\*6.

**Keywords** : GENE SILICON; DNA chip; gene polymorphism; *UGT1A1* gene

## 1. 緒言

近年、ヒトゲノム解析の発展により、遺伝子情報と薬剤の薬効や副作用などとの関連が徐々に明らかになってきており、個人の遺伝子情報に基づき治療方針を決定する個別化医療が身近になっている。遺伝子情報と薬効や副作用との関係性の研究開発が進み、多くの医薬品に対する遺伝子マーカーが発見されることで、多様な遺伝子マーカーの組み合わせを同時に検出できる遺伝子診断ツールが非常に有用となる。その一つの検出・診断ツールとして、DNAチップを用いた遺伝子診断キットが挙げられる。

抗がん剤イリノテカン<sup>1</sup>は肺がんや消化器系のがんに広く適用されている抗がん剤の一つであるが、このイリノテカンの代謝酵素UGT1A1によって強い抗がん作用を有するSN-38となる。UGT1A1の発現や酵素活性が弱い患者では、重篤な副作用発現のリスクが上昇し、この副作用リスクと遺伝子多型 (*UGT1A1*\*28及び*UGT1A1*\*6) との関連が知られている<sup>1,2)</sup>。

今回、我々はDNAを高密度に固定化できる東洋鋼板製ジーンシリコン<sup>3)</sup>を用いて、*UGT1A1*遺伝子多型を判定するDNAチップキットを開発した。本DNAチップキットを用いて*UGT1A1*\*28及び*UGT1A1*\*6の遺伝子多型 (Fig. 1) を判定することで、塩酸イリノテカン投与予定患者に対して副作用発現リスクを見積もる事が出来ることから、患者の「生活の質 (Quality Of Life)」の向上に貢献するものとする。

本DNAチップキットの開発にあたり、まずヒトDNA試料を用いて目的とするDNA領域のみを増幅するPCR条件を検討し、その増幅産物を用いてDNAチップとハイブリダイズ反応させて、各遺伝子型を判別するためにハイブリダイズ反応の特異性が最も向上するハイブリダイズ条件の検討をした。そして、これらの条件のもとで、遺伝子型が既知のDNA試料を用いて、各遺伝子型を判定するための各閾値の設定を行った。最後に、既存の*UGT1A1*遺伝子型判定法との判別結果を比較し、本DNAチップの性能を確認した。

\* 事業推進室 バイオチップ技術グループ 副主事  
\*<sup>2</sup> 技術研究所 薄板材料グループ  
\*<sup>3</sup> 事業推進室 バイオチップ技術グループ  
\*<sup>4</sup> 事業推進室 バイオチップ技術グループ グループリーダー

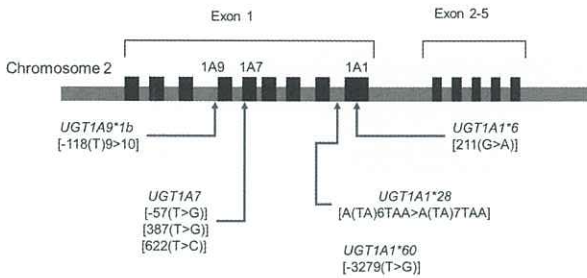


Fig.1 Schematic representation of *UGT1A* gene and genetic polymorphism

## 2. 方法

DNAチップを用いた遺伝子型の検査フローを下記に示す。

ヒトゲノム抽出 ⇒ PCR ⇒ ハイブリダイズ反応 ⇒ 洗浄 ⇒ 蛍光検出

患者より抽出したゲノムDNAから、検査に必要な遺伝子部分を選択的に増幅する (PCR)。この増幅産物を一定の環境下でDNAチップと接触させて反応させる (ハイブリダイズ反応)。DNAチップには、それぞれの遺伝子型に対応したDNAプローブが予め固定化されており、増幅産物中に該当するDNAが存在すればハイブリダイズ反応をする。反応後は未反応DNAを洗浄し、蛍光検出機にて測定する。増幅産物には蛍光標識を施しているため、外部からDNAチップへ励起光を照射するとハイブリダイズ反応量に応じて蛍光を発生する。以下に詳細な試験方法を示す。

### 2.1 DNAチップの作製と試験方法

#### 2.1.1 DNAチップの作製

3mm角のシリコン基板にDLC (Diamond Like Carbon) をイオン化蒸着法により成膜 (約40nm) し、各種反応溶液中へ浸漬処理させて、アミノ基及びカルボキシル基を順次導入した後、カルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS (N-Hydroxysuccinimide)) でエステル化させて、活性エステルが表面修飾された基板「ジーンシリコン」を作製した。活性エステルは、DNAの末端に修飾されたアミノ基とアミド結合を形成するため、ジーンシリコンに各種プローブDNAをDNAスポット装置 (SPBIO2000, 高電工業株式会社) にてスポット (φ150 μmの液滴) し、共有結合をさせることで、チップと固定化できる。

*UGT1A1\*28*及び*UGT1A1\*6*を検出するため、それぞれのアレルタイプに対するプローブDNAをジーンシリコンにスポットした (Table 1)。その後、チップとの固定化処理を行い、固定化されなかったプローブDNAを洗浄により除去して、DNAチップを作製した。その後、DNAチッ

Table 1 DNA probes

Polymorphisms	Allele type	Probe name
<i>UGT1A1*28</i>	wild	1*28W
	variant	1*28V
<i>UGT1A1*6</i>	wild	1*6W
	variant	1*6V

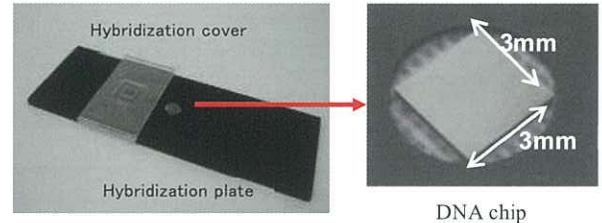


Fig.2 GENE SILICON DNA chip

プを1枚ずつ専用のハイブリダイズ用プレートに載せた (Fig.2)。

#### 2.1.2 DNA試料からのDNA増幅及び蛍光標識

DNA試料は匿名化されたヒトDNA試料を用いた。PCR液は、Table 2に示した組成で調製した。またこのとき、プライマーミックスはTable 3に示した配列のDNAを用い、\*28 reverse及び\*6 forwardに蛍光を標識した。PCR装置 (Mastercycler proS, エッペンドルフ株式会社) にてPCRを行い、DNAを増幅した。

Table 2 PCR components

component	volume(μL)	final conc.
Primer mixture	1.0	variable
dNTP mixture	1.0	200 μmol/L each
10×PCR buffer	2.0	1×
Taq DNA polymerase	0.2	0.5 U/μL
Water	10.8	-

Table 3 Primer sequences

Primer	Sequences (5'→3')
*28 forward	TAGTCGTCCTTCTTCCTCTCTGGT
*28 reverse	ATGGCGCCTTTGCTCCT
*6 forward	CCATGCTGGGAAGATACTGTTGA
*6 reverse	GATCACACGCTGCAGGAAAG

#### 2.1.3 ハイブリダイズ及び蛍光検出

得られた増幅産物とハイブリダイズ緩衝液 (2.25×SSC/0.23%SDS) とを2:1で混合した。この混合液をDNAチップ上に滴下し、ハイブリダイズカバーを被せて、ハイブリダイズ反応を行った。ハイブリダイズ反応はハイブリダイゼーションインキュベーター (HB-100, タイテック株式会社) を用いた。

ハイブリダイズ反応後に、ハイブリダイゼーションインキュベーターから取り出し、素早くハイブリカバーを外し

てDNAチップを洗浄液 (0.01×SSC/0.1 w/v% SDS溶液) に5分間浸漬して洗浄を行った後、リンス液 (1×SSC) に浸漬した。

ハイブリダイズプレートをリンス液から取り出し、余分なリンス液を拭き取り、専用蛍光検出器 (BIOSHOT, 東洋銅板株式会社) にて蛍光検出画像を得た。

#### 2.1.4 蛍光強度値及び判定値の算出

蛍光検出画像からそれぞれのスポットの輝度の中央値を算出し蛍光強度とした。さらに、遺伝子型を判別する指標として、以下の式を用いて判定値 (Index) を算出した。

$$\text{判定値} = \frac{\text{変異型アレルの蛍光強度}}{\text{野生型アレル蛍光強度と変異型アレルの蛍光強度の平均値}}$$

## 2.2 実験内容

### 2.2.1 PCR増幅条件の検討

ヒトゲノムから検査対象となる遺伝子部分を選択的に増幅するPCR増幅条件について、DNAチップでの検出に効率が良い増幅条件を選択するために、アニーリング温度、プライマー濃度、そしてPCRサイクル数を検討した。

#### (1) アニーリング温度の設定

PCR条件 (Table 4) のうち、プライマーが鋳型DNAと結合するアニーリング温度を60, 62, 64, 66, 68又は70°Cとして、PCRを行った。得られた増幅産物をDNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA, 株式会社島津製作所) にて解析した。

#### (2) プライマー濃度及びPCRサイクル数の設定

蛍光標識したプライマー (\*28 reverse及び\*6 forward) と未標識のプライマー (\*28 forward及び\*6 reverse) を Table 5に示した濃度で調製し、各プライマー濃度において31, 33, 35, 37, 39, 41, 43または45サイクルのPCR (Table 4) を行った。ただし、5:1及び10:1は、31, 33及び35サ

イクルのみとした。所定のPCRサイクル終了後、増幅産物を回収し、それぞれをチップとハイブリダイズ反応させて各遺伝子型 (\*28, \*6) の野生型プローブ及び変異型プローブの蛍光強度により評価を行った。

### 2.2.2 ハイブリダイズ反応条件の検討

増幅された遺伝子型をDNAチップで検出するために、特異性の高いハイブリダイゼーションの条件を反応温度に着目して検討した。具体的には、ハイブリダイゼーションインキュベーターを用いて52, 54, 56, 58又は60°Cでそれぞれ1時間反応させ、蛍光強度と判定値から評価を行った。

### 2.2.3 洗浄条件の検討

洗浄液 (0.01×SSC/0.1 w/v% SDS溶液) の液温を15, 20, 25, 30又は35°Cになるよう調整した。ハイブリダイズ後、各温度の洗浄液でUGT1A1プレートを5分間洗浄した。洗浄後、検出するまでUGT1A1プレートをリンス液 (1×SSC) に浸した。また、洗浄しないUGT1A1プレートは、ハイブリダイズ反応終了後、直ちにリンス液に浸した。これらについて判定値から遺伝子型の判定する特異性の評価を行った。

### 2.2.4 遺伝子型判定のための閾値設定

野生型ヒトDNA試料、ヘテロ型ヒトDNA試料、変異型ヒトDNA試料を用いて判定閾値の設定試験を行った。このとき、DNA試料は同一のものを複数回使用した。

### 2.2.5 既存遺伝子型判定法との相関性試験

105例のヒトDNA試料を用いて、既存の検査方法との相関性を確認するため、本DNAチップキットとダイレクトシーケンス法で\*6及び\*28の遺伝子型判定を行った。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 PCR増幅条件の検討

#### (1) アニーリング温度の設定

PCRでのアニーリング温度を60～70°Cまで2°Cずつ変化させて得られた増幅産物を電気泳動した結果をFig.3に示した。

アニーリング温度が60及び62°Cのとき、ごくわずかに非特異的な増幅産物が生じたが、アニーリング温度64°C以上では消失した。この非特異的な増幅産物が全増幅産物中に占める割合を算出したところ、1%以下であった。また、アニーリング温度が68及び70°Cでは増幅産物量は減少した。

最近接塩基対法<sup>4)</sup>を用いてプライマーのTm (融解温度;Melting Temperature) を算出したところ、各プライマーのTm値は66°C付近であり、アニーリング温度を68°C以上にすると、得られた増幅産物量は低下した。これは、

Table 4 PCR cycles

Step	Temp.	time	Cycles
pre-denaturation	95°C	5 min	1
denaturation	95°C	30 sec	31-45
annealing	60-70°C	30 sec	
extension	72°C	30 sec	
final extension	72°C	30 sec	1

Table 5 Primer concentration ratio

Primer concentration ratio	Fluorescein-labeled primer (μmol/L)	Non fluorescein-labeled primer (μmol/L)
1.5:1	6.0	4.0
2:1	6.0	3.0
3:1	6.0	2.0
5:1	6.0	1.2
10:1	6.0	0.6

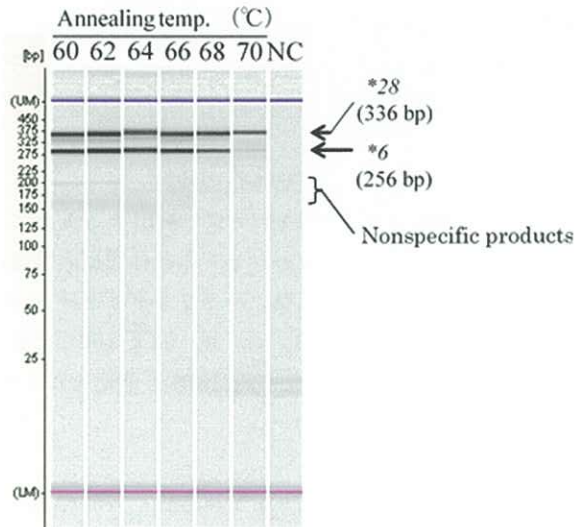


Fig.3 Effect of the annealing temperature of PCR

アニーリング温度を高くすると、鋳型DNAとプライマーがハイブリダイズしにくくなったため、PCRで生じた増幅産物が減少したと考えられた。

また、アニーリング温度が60及び62°Cのとき、副産物である非特異的増幅産物のごくわずかに生じた。この非特異的増幅産物が本DNAチップキットの遺伝子型判定に及ぼす影響を評価する必要があるかもしれないが、アニーリング温度を64又は66°Cにすることで非特異的増幅産物が生じなくなることから、非特異的増幅産物が、本DNAチップキットの遺伝子型判定に影響を及ぼす可能性は極めて低いものと結論付けた。

(2) プライマー濃度及びPCRサイクル数の設定

各サイクル時点の増幅産物を用いて、本DNAチップと56°Cで1時間のハイブリダイズ反応を行い、得られた蛍光強度値(2試行の蛍光強度値の平均値)をFig.4 (\*28)及びFig.5 (\*6)に示した。

プライマー濃度比について着目すると、プライマー濃度比が3:1のときで極大を認め、5:1及び10:1では蛍光強度値の低下が認められた。さらに、プライマー濃度比が1.5:1, 2:1及び3:1の条件下でのPCRサイクル数と蛍光強度値との関係について着目すると、35, 37又は39サイクルで蛍光強度値が最大となった。

本DNAチップキットにおいて、より高い信頼性を確保するには、より多くの増幅産物が得られ、高い蛍光強度値が得られることが望ましい。したがって、本DNAチップキットのプライマー濃度比は「3:1」に、PCRサイクル数は「37サイクル」とした。

3.2 ハイブリダイズ反応条件の検討

3.1節にて検討した最適なPCR増幅条件にてPCRを実施した後、ハイブリダイズ温度を52, 54, 56, 58又は60°C

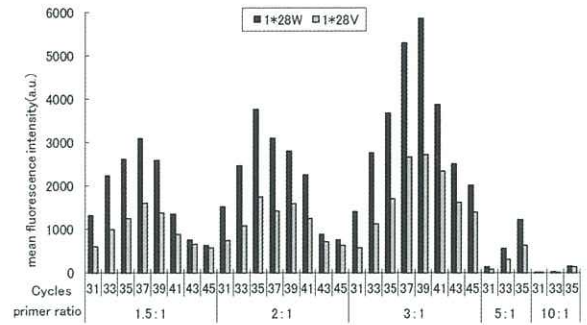


Fig.4 Effect of the number of PCR cycles and primer concentration ratio to mean fluorescence intensity of \*28

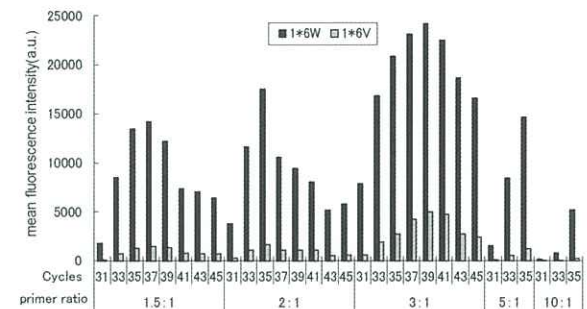


Fig.5 Effect of the number of PCR cycles and primer concentration ratio to mean fluorescence intensity of \*6

として、それぞれ1時間ハイブリダイズを行い、蛍光強度と判定値から評価を行った。得られた蛍光強度値(2試行の蛍光強度値の平均値)をFig.6 (\*28)及びFig.7 (\*6)に示し、判定値(2試行それぞれの値)をFig.8 (\*28)及びFig.9 (\*6)に示した。

蛍光強度値はハイブリダイズ温度が52°Cのとき最も高く、ハイブリダイズ温度の上昇とともに値は低下した。

\*28の判定値についてはハイブリダイズ温度の上昇とともに野生型の判定値は低下し、変異型の判定値は上昇し、56°Cのときに最小と最大を示した。さらにハイブリダイズ温度を上昇させると野生型の判定値は上昇し、変異型の判定値は減少した。また、\*6の判定値については、ハイブリダイズ温度の上昇とともに野生型の判定値は著しく低下し、変異型の判定値はわずかに上昇した。56°C以上では野生型及び変異型の判定値は大きな変動を示さなかったが、ヘテロ型の判定値は減少した。

ハイブリダイズ温度が低いあるいは高いと増幅産物とDNAプローブとが特異的にハイブリダイズできず、野生型及び変異型の判定値が1.0に近づく場合があると考えられる。本試験で検討した結果、ハイブリダイズ温度が低い52°Cの場合、\*28の変異型判定値及び\*6の野生型判定値が、温度が高い58°C及び60°Cの場合、\*28の野生型及び変異型判定値が1.0に近づいており、これらの温度では特異的なハイブリダイズができないことが明らかとなった。

また、特異的にハイブリダイズしている温度は54°C～56°Cであると考えられるが、本DNAチップキットのハイ

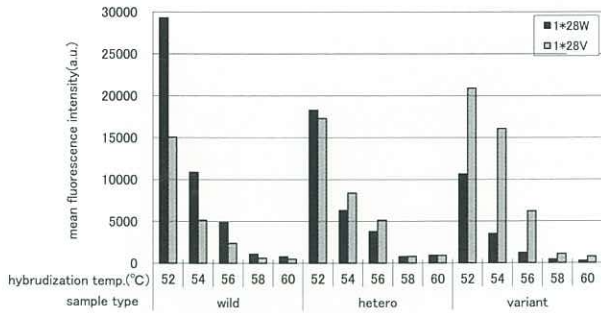


Fig.6 The relationship between hybridization temperature and mean fluorescence intensity of \*28

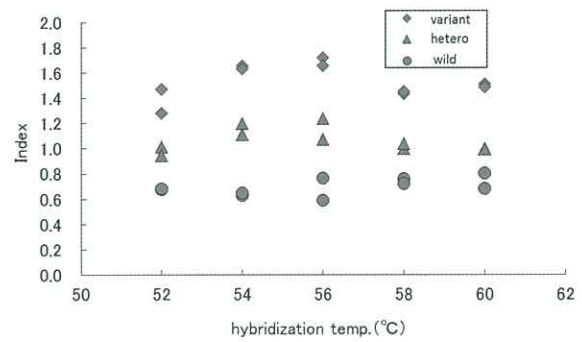


Fig.8 The relationship between hybridization temperature and \*28 index

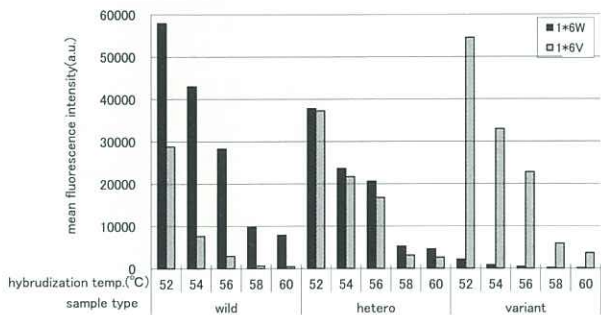


Fig.7 The relationship between hybridization temperature and mean fluorescence intensity of \*6

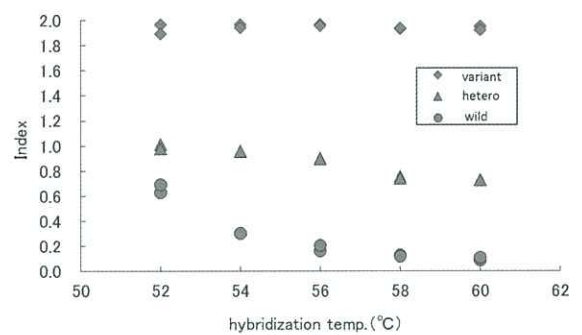


Fig.9 The relationship between hybridization temperature and \*6 index

ブリダイズ温度設定にあたっては、ハイブリダイズ温度の低下が製品の信頼性低下を招くことが明らかとなり、ハイブリダイズ反応を行う恒温槽などの開閉に伴う温度低下リスクを回避するため、ハイブリダイズ温度を56°Cに設定することとした。

### 3.3 洗浄条件の検討

洗浄液の温度を15~35°Cとしたとき、及び洗浄液に浸漬しなかったとき(-)の各条件における\*28および\*6の判定値をFig.10に示した。

判定値は洗浄液の液温の上昇に伴い、特異性が向上した。しかしながら、液温が15~20°Cでは洗浄しなかったものと判定値が近い値を示し、35°Cでは\*28の野生型の判定値が1.0に近づき、特異性を示さなかった。

使用した洗浄液での各プローブDNAの推定Tm値は約30°Cであり<sup>5)</sup>、本試験でも30°C付近で最も高い特異性が得られる結果となった。液温が35°Cのとき、\*28野生型の判定値が1.0に近づき特異性を示さなかったものの、\*6野生型の判定値は大きく変動せず、特異性を示したままだった。この原因としては、\*28はTAの繰り返し配列であるのに対し、\*6は一塩基多型であり、この違いによるものと考えられる。Tmを超える洗浄液温度では、TA繰り返し配列を有する\*28増幅産物とプローブDNAとのハイブリダイズ反応が不安定となり、特異性が消失した可能性が考えられる。

一方、20°C以下では洗浄しなかったものと判定値が大き

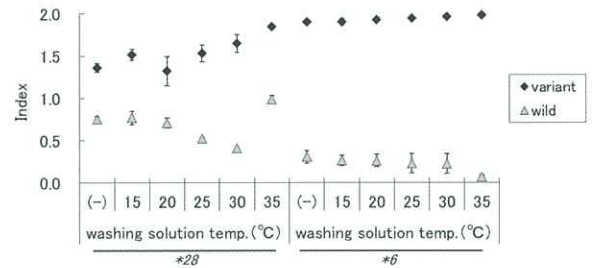


Fig.10 Effect of washing solution temperature to \*28 and \*6 index

く変わらなかったことから、ほとんど非特異的なハイブリダイズ反応を除去することができず、本DNAチップキットの信頼性をより高いものにするためには、20°C以下及び35°C以上は望ましくないと結論付けた。

したがって、洗浄液の液温は25~30°Cに設定することとした。

### 3.4 遺伝子型判定のための閾値設定

判定値閾値算出に当たって実施した試験数をTable 6に示した。得られた各遺伝子型の判定値の平均値及び標準偏差をもとに遺伝子型を判定するための閾値を定め、Fig.11に示した。

また、各遺伝子型の判定閾値間はいずれの遺伝子型としても判定することができないと考えられるため、「判定不能」と設定した。

Table 6 The number of genotyped sample

genotype	*28	*6
Wild type	373	597
Hetero type	352	215
Variant type	227	140

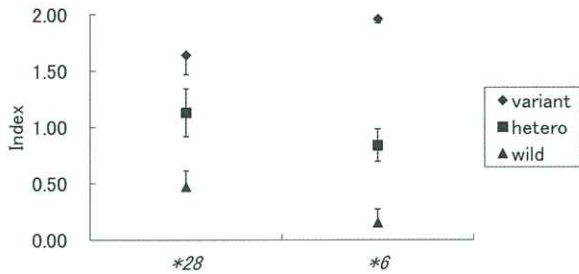


Fig.11 The determined thresholds of \*28 and \*6 index

### 3.5 既存遺伝子型判定試薬との相関性試験

DNA試料105例を用いて、本DNAチップキット及びダイレクトシーケンス法とで遺伝子型判定を行った。その結果、すべての試料において遺伝子型が一致した。このことから、本DNAチップキットは既存の遺伝子型判定法と同等の判別性能を有し、良好な相関性を有することが明らかとなった。

## 4. 結言

本DNAチップキットにおいてDNAの増幅条件とDNAチップとのハイブリダイズ反応条件の検討を行い、最適な条件を得ることができた。また、遺伝子型の判定を決定するための閾値の設定を行った。そして、既存の遺伝子型判定キットと判定結果を比較し、良好な相関性が得られた。

さらに、本DNAチップキットは2種類の遺伝子多型を判別するものであるが、それに加え、*UGT1A1\*60*, *UGT1A7\*12* (-57), *UGT1A7\*2*, *UGT1A9\*1b*のSNPと

組み合わせて検査することで、抗がん剤イリノテカンを用いた抗がん剤治療の副作用リスクを高精度に予測することができる知見が得られている<sup>6)</sup>。今後はこれらの6種の遺伝子多型を1枚のDNAチップ上で判別できるキットの開発をすすめる。

DNAサンプルのご提供とダイレクトシーケンス解析においては、山口大学大学院医学系研究科 消化器・腫瘍外科学 岡 正朗前教授 (現山口大学学長), 畠 彰一准教授, 恒富 亮一助教, 山口大学医学部附属病院 臨床検査部 岡山直子先生のご協力をいただきました。感謝とともに御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Y. Ando, H. Saka, M. Ando, T. Sawa, K. Muro, H. Ueoka, A. Yokoyama, S. Saitoh, K. Shimokata, and Y. Hasegawa: *Cancer Res.*, **60** (2000), 6921.
- 2) H. Minami, K. Sai, M. Saeki, Y. Saito, S. Ozawa, K. Suzuki, N. Kaniwa, J. Sawada, T. Hamaguchi, N. Yamamoto, K. Shirao, Y. Yamada, H. Ohmatsu, K. Kubota, T. Yoshida, A. Ohtsu and N. Saijo: *Pharmacogenet Genomics*, **17** (2007), 497.
- 3) 岡村 浩, 山野 博文: *New Diamond*, **29-2** (2013), 17.
- 4) W. Rychlik, W. J. Spencer and R. E. Rhoads: *Nucleic Acids Res.*, **18-21** (1990), 6409.
- 5) J. Meinkoth and G. Wahl: *Anal Biochem.*, **38-2** (1984), 267.
- 6) S. Hazama, H. Mishima, R. Tsunedomi, Y. Okuyama, T. Kato, K. Takahashi, H. Nozawa, H. Ando, M. Kobayashi, H. Takemoto, N. Nagata, S. Kanekiyo, Y. Inoue, Y. Hamamoto, Y. Fujita and Y. Hinoda: *Cancer Sci.*, **104-12** (2013), 1662.