

抗がん剤ゲムシタビンの副作用に関連する 一塩基多型を判別するDNAチップキットの開発

中村憲章*¹・平山幸一*²・山野博文*³

Development of DNA Chip for Detection of SNPs Involving a Side Effect of Gemcitabine

Noriaki NAKAMURA, Koichi HIRAYAMA, Hirofumi YAMANO

Synopsis : The toxicities of Gemcitabine, which is one of anti-cancer drugs, have been reported to correlate with the 4 polymorphisms (rs11141915, rs1901440, rs11719165, rs12046844). We have developed a DNA chip to detect these polymorphisms using the GENE SILICON. 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 using 171 DNA samples. Using this threshold, we evaluated the correlation with the invader assay. As a result, all alleles were consistent. We were able to develop the good precision DNA chip to analyze 4 polymorphisms.

Keywords : GENE SILICON ; DNA chip ; gene polymorphism ; Gemcitabine

1. 緒言

近年、生活習慣の欧米化によりがんの罹患数は増加しており、1980年から現在に至るまで死亡率はあらゆる疾患の中で最も高い。一方で、がんに対する治療法は日々進歩しており、治療ガイドランスにより、発がん部位や進行度に応じて治療法が細かく設定されている。

がんの治療法は3種に大別することができ、「外科的療法」、「放射線療法」、「化学療法」がある。中でも化学療法は、抗がん剤の投与によりがん細胞を破壊する手法であり、外科的療法による摘出が困難な場合や、放射線治療では効力が弱い場合に有効である。

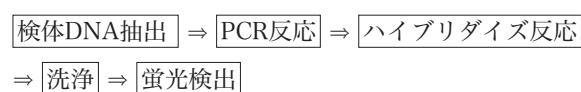
化学療法に用いられる抗がん剤は、性質の違いから発がん部位による使い分けが必要であり、膵臓がんであれば第1選択薬に代謝拮抗剤のゲムシタビンが用いられる。ゲムシタビンは、DNAの構成要素である核酸構造に近似しているため、DNA複製を過剰に行うがん細胞内に取り込ませることで、がん細胞の異常増殖を阻害する作用を有する。しかしながら、その作用機構により、健康な細胞の増殖も

阻害するため副作用が懸念される。代表的な副作用としては、倦怠感、脱毛、悪心、血管障害などが挙げられ、時には重篤な骨髄抑制により死亡する例も報告されている。

これら副作用は患者により程度の差が見られ、最近の研究からゲノム塩基配列に存在する4種類のSNP (Single Nucleotide Polymorphism) が関連することが明らかになりつつある¹⁾。SNPとは塩基配列中の特定の1塩基が母集団内でおおよそ1%以上の頻度で変異することを指し、対象となる塩基が変異していれば薬剤への反応性に影響を及ぼす場合がある。そこで我々は、抗がん剤ゲムシタビンの副作用を投薬前に予測するため、4種類のSNPを同時に解析することが可能なDNAチップの開発を行った。

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。



*1 技術研究所 研究部 ライフサイエンス技術グループ

*2 技術研究所 研究部 ライフサイエンス技術グループ チームリーダー

*3 技術研究所 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

患者から抽出した検体DNAを用いて、検査に必要な遺伝子部分を選択的に増幅する（PCR: Polymerase Chain Reaction）。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により2本鎖を形成する。反応後は未反応DNAを洗浄し、蛍光検出機にて測定する。増幅産物には蛍光を標識しているため、DNAチップに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する。以下に詳細な試験方法を示す。なお、対象である4種類のSNPの識別番号はTable 1に示す。

Table 1 Reference SNP ID numbers of Target SNP

Target SNP	ID number
SNP1	rs11141915
SNP2	rs1901440
SNP3	rs11719165
SNP4	rs12046844

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) 膜をイオン化蒸着法により成膜（膜厚 約40nm）した。その後、反応溶液中での浸漬処理により、DLC表面にアミノ基およびカルボキシル基を順次導入し、カルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS (N-Hydroxysuccinimide)) でエステル化し、活性エステルが表面修飾された基板（製品名「ジーンシリコン」）を作製した²⁾。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。ジーンシリコンにプローブをDNAスポット装置（高電工業(株)製、SPBIO2000）によりスポット（φ150μmの液滴）し、共有結合によって4種類のSNPを検出するためのプローブを基板に固定化した。プローブの詳細をTable 2に示す。また、DNAチップの外観をFig.1に示す。

2.1.2 検体DNAからのDNA増幅および蛍光標識

検証試験には匿名化された検体DNAを用いた。プライマーは最近接塩基対法³⁾を用いて設計した。各プライマーセットをTable 3に示す。PCRはサーマルサイクラー（Applied Biosystems®製、GeneAmp® PCR System 9700）を用いて行った。PCRの組成をTable 4に示す。PCR条件をTable 5に示す。

Table 2 probe of initial examination

Polymorphisms	Allele type	Probe name	Number of bases	Tm (°C)
SNP1	wild	SNP1W-25	25	64.9
	variant	SNP1V-25	25	58.8
SNP2	wild	SNP2W-29	29	56.7
	variant	SNP2V-29	29	58.7
SNP3	wild	SNP3W-29	29	62.5
	variant	SNP3V-29	29	64.9
SNP4	wild	SNP4W-29	29	54.3
	variant	SNP4V-29	29	59.1

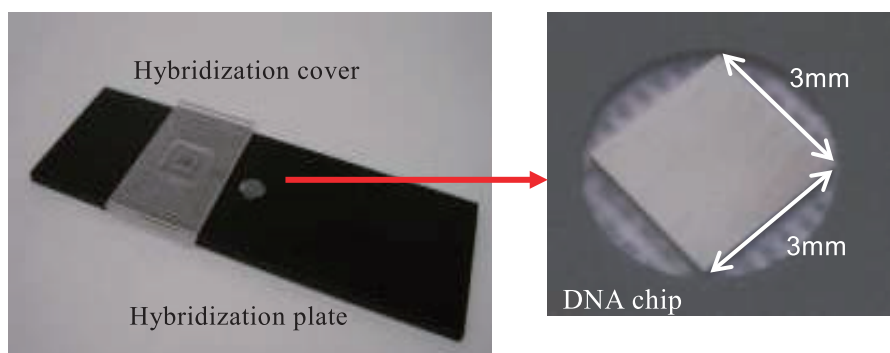


Fig.1 Gene silicon DNA chip

Table 3 Primer sequences

Polymorphisms	Primer	Sequences (5'→3')
SNP1	SNP1 forward	CATGCCAAGTCTCTGGTTGC
	SNP1 reverse	CATGCAGCCTGGTCCAATC
SNP2	SNP2 forward	TTTATACGATGTCAACAACCTCC
	SNP2 reverse	GAGTCACTTCCTTCCTTCCTGA
SNP3	SNP3 forward	GCTCTCCCTGCTTGGTTTAC
	SNP3 reverse	TGTCACAGCCAGAAATTGAC
SNP4	SNP4 forward	TCTGGTTCCTGCTGGACAG
	SNP4 reverse	AGATAATAGCAGGCCATTGGTTAAT

Table 4 PCR components

component	volume(μL)	final conc.
Primer mixture	4.0	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	8.4	-

Table 5 PCR cycles

Temp.	time	Cycles
95 °C	5 min	1
95 °C	30 sec	37
58 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	1

2.1.3 ハイブリダイズおよび蛍光検出

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3:1で混合した。この混合液をDNAチップに滴下し、ハイブリダイズカバーを被せて、一定温度で1時間ハイブリダイズ反応を行った。ハイブリダイズ反応にはハイブリダイズインキュベーター (タイテック(株)製, HB-100) を用いた。ハイブリダイズ反応後に、ハイブリダイズカバーを外し、DNAチップを洗浄液 (0.1×SSC/0.1 w/v% SDS溶液) に5分間浸漬した後、リンス液 (1×SSC) 中で10回上下に振とうした。

DNAチップ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 (東洋鋼板(株)製, BIOSHOT) にて蛍光検出画像を撮影した。

2.1.4 蛍光強度値および判定値の算出

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、(1) 式を用いて判定値 (index) を算出した。

$$\text{判定値} = \frac{2 \times \text{変異プローブ蛍光強度}}{\text{野生プローブ蛍光強度} + \text{変異プローブ蛍光強度}} \dots (1)$$

高い特異性を有したプローブを用いた場合、判定値は検体DNAの遺伝子型ごとに収束する。そのため、判定値が分離するプローブの組み合わせを選択することで、検体DNAの遺伝子型の判別が可能となる。ヒトの遺伝子型は3種類あり、両親から受け継いだ2セットのゲノムから決定

される。両親から野生遺伝子のみを引き継いだ状態を野生型 (wild)、変異遺伝子のみを引き継いだ状態を変異型 (variant)、また両方の遺伝子を引き継いだ状態をヘテロ型 (hetero) と呼ぶ。

2.2 実験内容

2.2.1 ハイブリダイズ条件の検討

遺伝子型の判別には、ハイブリダイズ後の野生プローブと変異プローブから検出できる蛍光強度を用いる。判別の精度を向上させるためには、プローブが相補的なターゲットDNAと特異的に反応する必要性があり、プローブの特異性はハイブリダイズ温度の上昇に伴い増加する (Fig.2 の実線)。しかしながら、プローブには2本鎖DNAを維持できる上限温度が存在しており、上限温度へ接近するにつ

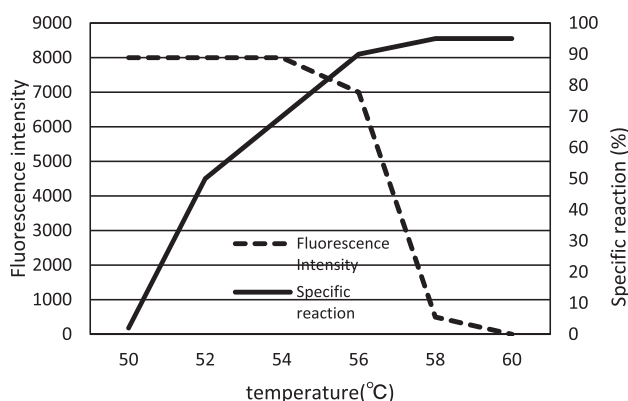


Fig.2 The relationship between Fluorescence intensity and Specific reaction

Table 6 probes of secondary examination

Polymorphisms	Allele type	probe name	Number of bases	Tm (°C)
SNP3	wild	SNP3W-25	25	48.2
		SNP3W-26	26	53.6
		SNP3W-27	27	58.2
	variant	SNP3V-25	25	51.4
		SNP3V-26	26	56.4
		SNP3V-27	27	60.8
SNP4	wild	SNP4W-27	27	49.0
	variant	SNP4V-23	23	41.8
		SNP4V-24	24	47.6
		SNP4V-25	25	50.2
		SNP4V-26	26	52.1
		SNP4V-27	27	54.3

れて反応量は減少するため蛍光強度が低下する (Fig.2の破線)。このことから、遺伝子型の正確な判別には、プローブが高い特異性を以てターゲットDNAと反応し、かつ2本鎖DNAを保持することが可能なハイブリダイズ温度を決定しなければならない。

そこで、初期設計したプローブに最適なハイブリダイズの温度域を決定するため条件検討を行った。検討試験では増幅産物とDNAチップを、ハイブリダイズインキュベーターを用いて50, 52, 54, 56または58°Cで1時間反応させ、判定値を算出することでハイブリダイズ温度を評価した。

2.2.2 プローブの塩基数の最適化

2.2.1で決定した最適なハイブリダイズ条件において特異性の高い反応を実現するため、プローブの最適な塩基数を評価した。検討したプローブをTable 6に示す。プローブをシリコン基板に固定化し、遺伝子型が既知の検体を用いて反応させることで、算出した判定値の分離と 3σ ($3\times$ 標準偏差)からプローブの最適な塩基数を評価した。

2.2.3 遺伝子型判定の閾値設定

試作したDNAチップの精度を検証するため、遺伝子型が未知の検体171例に対して遺伝子型の判別試験を実施した。また、判別の結果が合致した試験データを用いて、判定値の平均 $\pm 3\sigma$ により閾値を設定した。

3. 結果と考察

3.1 ハイブリダイズ条件の検討

ハイブリダイズ温度を50, 52, 54, 56または58°Cとし、それぞれ1時間ハイブリダイズを行い、算出した判定値から評価を行った。Table 2に示したSNP1～4について得

られた判定値をFig.3～6に示す。

SNP1 (Fig.3) は、52, 54, および56°Cにおいてヘテロ型の判定値は0.8程度であったが、58°Cでは0.5程度に低下した。これはSNP1W-25よりSNP1V-25のTm値⁴⁾が低いことから、ハイブリダイズが可能な上限温度にSNP1V-25の方が先に達すると想定されるため、58°CではSNP1V-25の蛍光強度の大幅な減少に伴い判定値が低下したと考えられる。また、ヘテロ型の判定値は1.0付近が理想的であることから、ハイブリダイズ温度は50, 52, 54, および56°Cにおいて遺伝子型を判別することが可能であると考えられる。

SNP2 (Fig.4) は、ハイブリダイズ温度の上昇に伴いヘテロ型の判定値が緩やかに増加した。これはSNP2V-29よりSNP2W-29のTm値⁴⁾が低いことから、ハイブリダイズが可能な上限温度にSNP2W-29の方が先に達すると想定されるため、SNP2W-29の蛍光強度の減少に伴い判定値が上昇したと考えられる。このことから、ハイブリダイズ温度は50, 52, および54°Cにおいて遺伝子型を判別することが可能であると考えられる。

SNP3 (Fig.5) は、野生型とヘテロ型の判定値が56および58°Cの条件で分離したが、一方でヘテロ型と変異型はいずれの温度においても近接していた。これは用いたプローブのTm値が高かったため、50～58°Cのハイブリダイズ温度では十分な特異性を得られなかったと推測される。そのため、SNP3においてはプローブの塩基数の短縮が必要であると考えられる。

SNP4 (Fig.6) は、ヘテロ型と変異型の判定値が56°Cおよび58°Cの条件で近接したが、54°C以下では判定値は分離しており、特に50°Cで良好な分離を確認した。

以上の結果から、4種類のSNPにおいて同時に判定値を分離することが可能なハイブリダイズ温度を確認すること

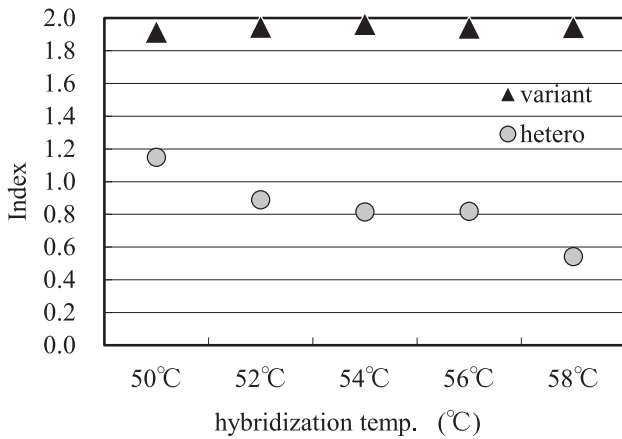


Fig. 3 The relationship between hybridization temperature and SNP1 index

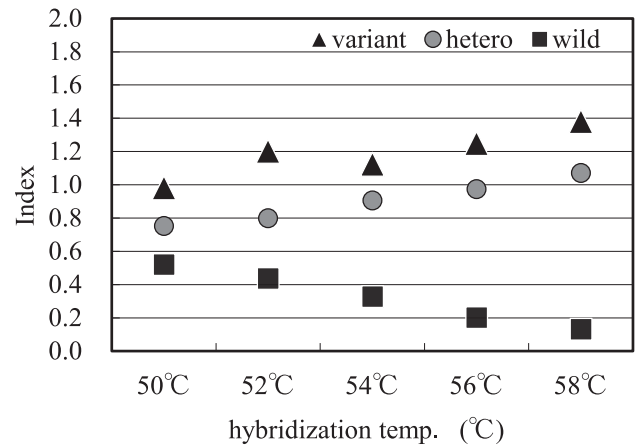


Fig. 5 The relationship between hybridization temperature and SNP3 index

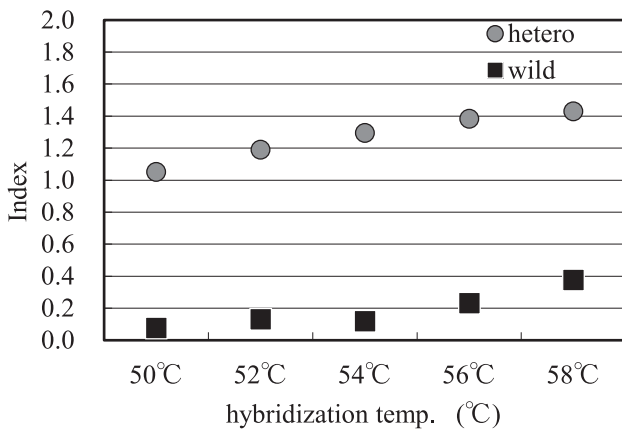


Fig. 4 The relationship between hybridization temperature and SNP2 index

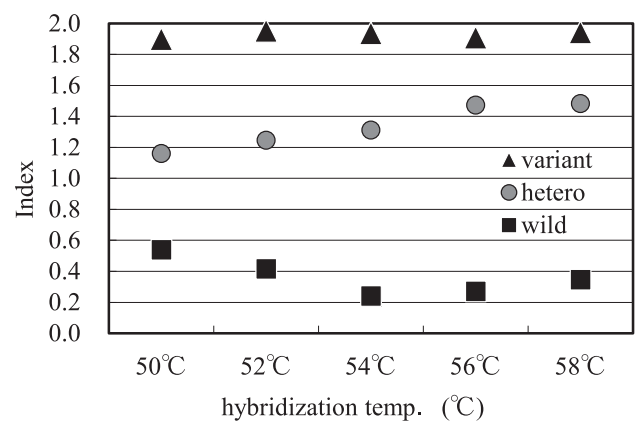


Fig. 6 The relationship between hybridization temperature and SNP4 index

はできなかったが、高いハイブリダイズ温度では一般的に蛍光強度のばらつきが大きくなるため、安定した結果を得るためには52および54°Cでの反応が適していると考えられる。

また、ハイブリダイズ後にDNAチップ上の反応液を除去する洗浄作業までに、DNAチップ表面の温度が低下することでプローブの非特異的な反応が進行して判定値が変動する恐れがある。そこで、今回は遺伝子型の判別ができるハイブリダイズ温度範囲52～54°Cのうち、DNAチップ表面の温度低下による影響を軽減するために54°Cを採用することにした。

3.2 プローブの最適化に向けた検討

前節の結果より、SNP3における各遺伝子型の判定値は近接し、またSNP4は野生型とヘテロ型の分離と比較して、ヘテロ型と変異型が近接しており、判定値の分離に改善の余地がある。そこで、SNP3とSNP4に対して最適なプローブの塩基数の検討を行った。判定値の平均の導出には3試行の試験データを用いた。SNP3とSNP4の結果をFig. 7お

よびFig. 8にそれぞれ示す。なお、図中の「W」と「V」は、それぞれ野生プローブと変異プローブを表し、ハイフン以降の数字は塩基数を示す。

SNP3 (Fig. 7) の判定値の分離を初期条件 (initial condition) と比較したところ、W-26とV-26の組み合わせから得られる判定値の分離が最も良好であり、3種類の遺伝子型はヘテロ型を中心に均等に分離した。これは、プローブの塩基数を短くすることで、特異性が向上したと考えられる。

SNP4 (Fig. 8) では、W-27とV-26の組み合わせから得られる判定値の分離が最も良好であり、判定値の平均はそれぞれヘテロ型を中心に均等に分離した。また、変異プローブの塩基数の減少に伴いヘテロ型と変異型の判定値が低下した。

以上の結果から、SNP3とSNP4において判定値の分離を改善できるプローブをそれぞれで確認することができた。最適化したプローブの塩基数をTable 7に示す。

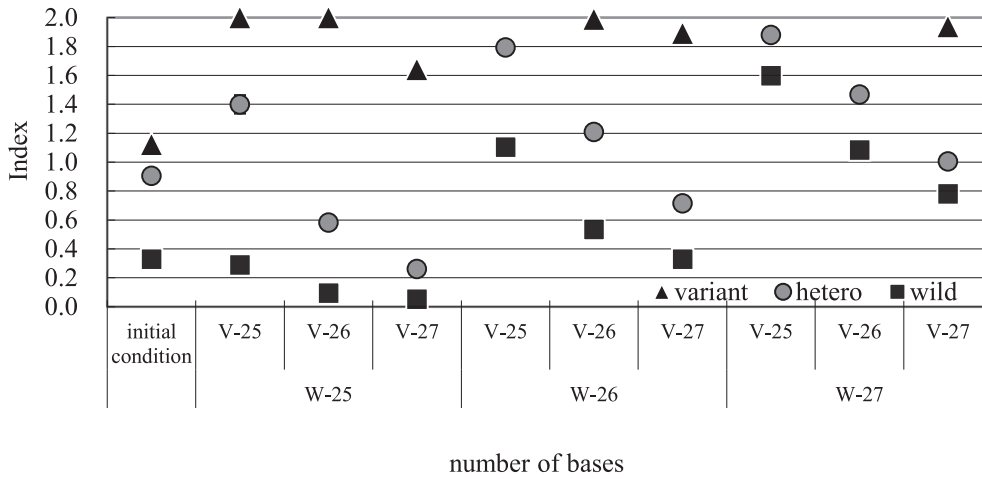


Fig.7 The relationship between number of bases and SNP3 index

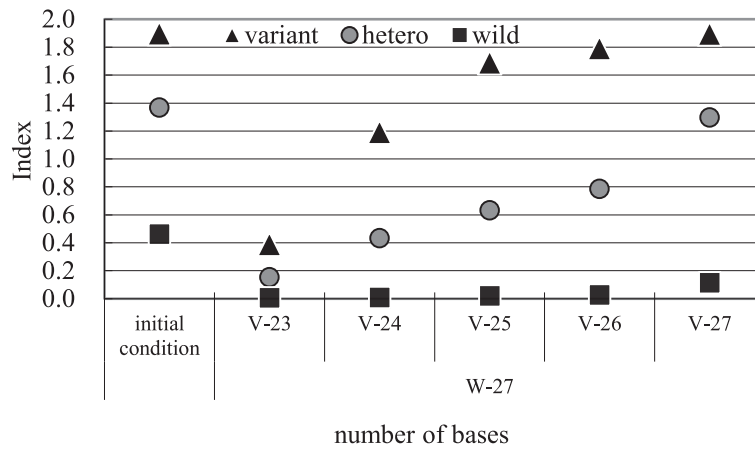


Fig.8 The relationship between number of bases and SNP4 index

Table 7 Optimized probe

Polymorphisms	Allele type	Probe name	Number of bases
SNP1	wild	SNP1W-25	25
	variant	SNP1V-25	25
SNP2	wild	SNP2W-29	29
	variant	SNP2V-29	29
SNP3	wild	SNP3W-26	26
	variant	SNP3V-26	26
SNP4	wild	SNP4W-27	27
	variant	SNP4V-26	26

Table 8 The number of genotyped sample

genotype	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4
Variant type	71	4	20	58
Hetero type	79	61	83	88
Wild type	21	106	68	25

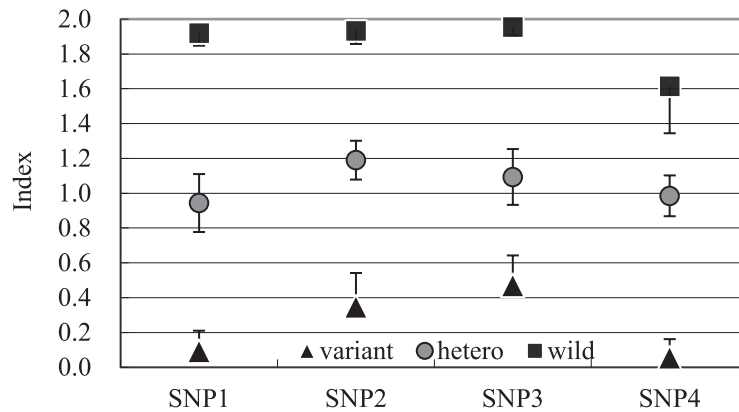


Fig.9 The determined thresholds of 4SNPs index

3.3 遺伝子型判定の閾値設定

遺伝子型が未知の検体171例における遺伝子型の例数をTable 8に示す。また、得られた各遺伝子型の判定値から算出した平均値および閾値をFig.9に示す。

検体171例に対してDNAチップ法を用いた試験を実施したところ、得られた判定値は3群に分離した。また、異なる遺伝子解析方法であるインバーダー法により得られた遺伝子型と比較したところ、全ての検体において遺伝子型が一致した。このことから、試作したDNAチップキットは既存の遺伝子型判定法と同等の性能を有することを確認できた。

4. 結言

試作したDNAチップキットにおいてDNAチップとのハイブリダイズの反応条件とプローブの塩基数の検討を行い、最適な条件を得ることができた。また未知の171例の検体を用いて試験したところ、判定値は3群に分離した。既存の遺伝子型判定キットと判定結果を比較したところ、遺伝子型が全て一致したため、この試験データを用いて遺伝子型の判定を決定するための閾値を設定した。

対象SNPの選定とDNAサンプルの提供においては、国立がん研究センター研究所遺伝医学研究分野（現がん研究会がんプレジジョン医療研究センターリキッドバイオプシー診断開発プロジェクト部長）の前佛均先生にご協力頂きました。感謝とともに御礼申し上げます。

引用文献

- 1) K. Kiyotani, S. Uno, T. Mushiroda, A. Takahashi, M. Kubo, N. Mitsuhashi, S. Ina, C. Kihara, Y. Kimura, H. Yamaue, K. Hirata, Y. Nakamura and H. Zembutsu : *Pharmacogenetics and Genomics.*, 22-4 (2012) : 229.
- 2) 岡村 浩, 山野 博文 : *New Diamond*, 29-2 (2013), 17.
- 3) W. Rychlik, RyChlik, W. J. Spencer and R. E. Rhoads : *Nucleic Acids Res.*, 18-21 (1990), 6409.
- 4) J. Meinkoth and G. wahl : *Anal Biochem.*, 38-2 (1984), 267.