

迅速・全自動・高感度な点突然変異検出法の開発

(文責 輸血細胞治療部 木村晋也)

がん治療において、点突然変異検出が非常に重要になってきました。輸血細胞治療部では、慢性骨髄性白血病 (CML) や慢性骨髄増殖性疾患 (CMPD) 患者血液細胞の点突然変異検出を、グアニン消光性プローブを用いて迅速 (90分)・全自動 (全血をアプライし、スタートボタンを押すだけ)・高感度 (3%以下) で測定する Quenching Probe System (QPS) を開発し、現在臨床応用に向け検討を続けています。

キメラ蛋白 BCR-ABL は、CML の発症原因と考えられています。ABL 特異的阻害剤メシル酸イマチニブ (グリベック®) は、わずか数年で CML 治療の第1選択薬となりました。イマチニブは優れた効果を示すが、一部の症例で比較的早期に耐性をきたすことも明らかとなってきました。そしてイマチニブの結合部位である ABL キナーゼドメイン内 ATP 結合領域の変異が最も重要な耐性原因であることが分かってきています。イマチニブ耐性克服を目的に、ダサチニブ、ニロチニブ、ボスチニブ、そして我々が開発し現在臨床試験中の INNO-406 などの新規 ABL 阻害剤が続々と臨床に用いられるようになってきました。これら新規薬剤は T315I (ABL キナーゼドメイン 315 番目のスレオニン; T がイソロイシン; I に変異) 以外のほとんどの変異に有効と報告されています。また、それぞれの新規薬剤で T315I 以外でも効果が乏しい異なった変異も徐々に報告されるようになってきたため、イマチニブを含め ABL 阻害剤の使用時には、BCR-ABL の変異の有無だけでなく、変異の種類も考慮する必要がでてきました。また従来、多血症 (PV)、特発性血小板血症 (ET)、骨髄線維症 (MF) などの CMPD では診断に苦慮する症例が多くあります。最近、PV のほぼ全例、ET の約半数の症例で JAK2V617F という変異が検出されることが明らかとなってきました。

このように CML の治療や CMPD の診断において、今後ますます点突然変異検出が重要な意味を持つてくることは間違いありません。しかし従来の変異検出法であるダイレクトシーケンスでは、時間もかかり、また感度も 20%程度と検査法として十分とは思えません。現在多くの新たな検出方が開発中であり、以下に現在行われている点突然変異検出法を紹介します。

ダイレクトシーケンス法 (DS) : DS 法では、目的部位を含む DNA 断片を検体から抽出・増幅し、塩基配列を決定する最も古典的な検出法です。DNA 配列を 1塩基ずつ決定するため、既知のみならず未知の変異も検出可能ですが、手技が煩雑で時間・コストがかかり、検出感度は 10~30%程度とあまり高くありません。

Denaturing high-performance liquid chromatography 法 (D-HPLC) : D-HPLC 法は、温度調節ヘテロ二本鎖分析で、変異を含む PCR 産物と野生型 DNA を混在させ、加熱再重合させてヘテロ二本鎖分子とホモ二本鎖分子とを HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で分離します。移動相の温度の上昇に伴い、ヘテロ二本鎖分子はホモ二本鎖分子よりも保持時間が短くなるため、変異型 DNA を含む場合には、2 種のホモ二本鎖分子と 2 種のヘテロ二本鎖分子がそれぞれ異なる時間で溶出され、2 つ以上のピークを示すこととなります。一度に比較的広範な領域 (数百 bp) における既知および未知の変異の有無についてスクリーニングが可能である反面、本法のみでは変異の種類を同定することは出来ず、その確定には DS 法などで追加解析が必要です。

パイロシーケンス法 (pyrosequence : PS) : DNA 合成過程を監視することで一塩基ずつ決定するため、既知のみならず未知の変異も検出でき、検出感度は 5%程度である。10%以上変異クローンが存在する場合は、良好な定量性が得られます。4 種類の dNTP を順に各検体に加え、DNA ポリメラーゼによる伸長反応が起きた際に生じるピロリン酸をサルファリナーゼによって ATP に変換し、この ATP をエネルギー源としたルシフェラーゼによる発光を CCD カメラで計測することで変異を検出します。

アレル特異的 PCR 法 (allele-specific oligonucleotide-PCR : ASO-PCR) : 既知の変異塩基配列に相補的なプライマーを用いて変異アレルを特異的に増幅する PCR 反応であり、0.001~1.0%ときわめて高い検出感度を有します。ASO-PCR 法によって、イマチニブ治療前にも変異クローンが存在することが明らかとなったことは特筆すべきことです。しかし高感度過ぎるため、臨床的意義の少ない変異まで検出する可能性も指摘されています。また、本法は変異毎にプライマー設計が必要で手技が煩雑であり、しかも未知の変異が検出しえず、日常臨床にはあまり用いられていません。

グアニン消光性プローブ法 (QPS) : 我々は、迅速・全自動・高感度に点突然変異検出を可能とする QPS の開発を行っています (アークレイ社との共同研究)。QPS によって、全血 10~100ml をアプライシスタートボタンを押すだけで、12 種類の変異 BCR-ABL が 90 分以内、感度 3%で検出が可能となりました。QPS の測定は、以下の過程で行われます。1) PCR で *abl* キナーゼドメイン (KD) 点突然変異含有領域を増幅、2) 増幅した *abl* KD に対する相補的な蛍光標識グアニン消光プローブ (Q-probe) を結合させる (変異 *abl* に完全マッチするようにプローブを設計)、3) 反応チューブの温度を上昇していくと、まず野生型 *abl* に結合していた Q-probe が乖離し発光、4) さらに温度を上昇させると変異型 *abl* から Q-probe 乖離し発光、5) 蛍光発色の際の温度の相違を測定し *abl* KD 内の点突然変異を検出します。QPS は、専用の機器が必要ではありますが、プローブを特異的に設計することでたった 90 分で臨床的意義の有るほとんどの既知の

変異の検出が可能であり魅力的な方法です。また CMPD において、QPS は DS 法に比して高感度に JAK2V617F を検出することを明らかにしてきました。

今後 QPS と新規分子標的薬を用いて、CML や CMPD のテーラーメイド医療の実現を図ろうと努力を続けています。他の点突然変異にも QPS 法は応用可能ですので、興味のある方は輸血細胞治療部（木村；内線 3630、PHS 2505）までお問い合わせください。