

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6346557号
(P6346557)

(45) 発行日 平成30年6月20日(2018.6.20)

(24) 登録日 平成30年6月1日(2018.6.1)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z
C 1 2 Q	1/6876	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z
C 1 2 Q	1/6844	(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z N A
			C 1 2 Q	1/6844	Z

請求項の数 8 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2014-502349 (P2014-502349)	(73) 特許権者	503359821
(86) (22) 出願日	平成25年2月28日 (2013.2.28)		国立研究開発法人理化学研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/055285		埼玉県和光市広沢2番1号
(87) 国際公開番号	W02013/129542	(74) 代理人	100126505
(87) 国際公開日	平成25年9月6日 (2013.9.6)		弁理士 佐貫 伸一
審査請求日	平成28年2月29日 (2016.2.29)	(74) 代理人	100138357
(31) 優先権主張番号	特願2012-44752 (P2012-44752)		弁理士 矢澤 広伸
(32) 優先日	平成24年2月29日 (2012.2.29)	(74) 代理人	100131392
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 丹羽 武司
前置審査		(74) 代理人	100106622
			弁理士 和久田 純一
		(72) 発明者	青木 正幸
			日本国神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目
			7番22号 独立行政法人理化学研究所
			横浜研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H L A - A * 3 1 : 0 1 アレルの検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

日本人又は漢民族において、H L A - A * 3 1 : 0 1 を特徴づける1またはそれ以上の一塩基多型を分析し、該分析結果に基づいてH L A - A * 3 1 : 0 1 の存在の有無を判定することを特徴とする、H L A - A * 3 1 : 0 1 の検出方法であって、少なくともrs41541222 (配列番号3の61番目の塩基の一塩基多型)、rs1059471 (配列番号4の61番目の塩基の一塩基多型)、rs1059457 (配列番号5の61番目の塩基の一塩基多型)、およびrs41562315 (配列番号6の61番目の塩基の一塩基多型) から選択される1またはそれ以上の一塩基多型が分析され、そのうち、少なくともrs41562315が分析される、H L A - A * 3 1 : 0 1 の検出方法。

【請求項2】

配列特異的プライマーPCR法とインベータープラス法の組み合わせにより一塩基多型が分析される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

rs41562315、rs41541222、およびrs1059457の組み合わせ、またはrs41562315、rs1059457、およびrs1059471の組み合わせが分析される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

請求項1~3のいずれか1項に記載の方法によりH L A - A * 3 1 : 0 1 を検出し、該検出結果に基づいてカルバマゼピンによる薬疹リスクを検査することを特徴とする、カルバマゼピンによる薬疹リスクの判定方法。

【請求項 5】

下記 (A) および (B) を含む配列特異的プライマーセットであって、第 1 の一塩基多型が rs41541222 または rs1059457 であり、第 2 の一塩基多型が rs41562315 である、日本人又は漢民族における H L A - A * 3 1 : 0 1 検出用の配列特異的プライマーセット：

(A) 配列番号 1 に示す塩基配列またはその相補配列における H L A - A * 3 1 : 0 1 を特徴づける第 1 の一塩基多型を 3 ' 末端に有する 1 0 塩基以上の長さの配列を含み、且つ、該一塩基多型をプライマーの 3 ' 末端に有する第 1 のプライマー；

(B) 配列番号 1 に示す塩基配列またはその相補配列における H L A - A * 3 1 : 0 1 を特徴づける第 2 の一塩基多型を 3 ' 末端に有する 1 0 塩基以上の長さの配列を含み、且つ、該一塩基多型をプライマーの 3 ' 末端に有する第 2 のプライマーであって、前記第 1 のプライマーと対になって H L A - A * 3 1 : 0 1 の前記第 1 の一塩基多型から前記第 2 の一塩基多型までを含む領域を増幅するように設計された、プライマー。

10

【請求項 6】

前記第 1 のプライマーが配列番号 7 又は 8 の塩基配列を含み、前記第 2 のプライマーが配列番号 9 の塩基配列を含む、請求項 5 に記載のプライマーセット。

【請求項 7】

請求項 5 または 6 に記載のプライマーセットおよびプローブセットを含む、日本人又は漢民族における H L A - A * 3 1 : 0 1 の検出用試薬であって、

前記プローブセットが H L A - A * 3 1 : 0 1 を特徴づける rs1059471 または rs1059457 の一塩基多型をインベーターのターゲットとするインベータープローブおよびアレルプローブを含み、

20

前記インベーターのターゲットである一塩基多型は、前記第 1 の一塩基多型と前記第 2 の一塩基多型の間に存在する一塩基多型である、

日本人又は漢民族における H L A - A * 3 1 : 0 1 の検出用試薬。

【請求項 8】

前記インベータープローブが配列番号 1 0 の塩基配列を含み、前記アレルプローブが配列番号 1 1 の塩基配列を含む、または、前記インベータープローブが配列番号 1 2 の塩基配列を含み、前記アレルプローブが配列番号 1 3 の塩基配列を含む、請求項 7 に記載の日本人又は漢民族における H L A - A * 3 1 : 0 1 の検出用試薬。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は H L A - A * 3 1 : 0 1 アレルの検出方法、当該検出方法による検出結果を利用した抗てんかん薬による薬疹リスクの判定方法、および当該検出方法に用いられる試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

薬疹は、薬物による皮膚障害 (cutaneous adverse drug reactions ; cADRs) の代表的なものであり、薬物によって引き起こされる皮膚や粘膜の急性炎症反応として特徴付けられる。薬疹は、用量非依存性、予測不可能であり、且つ、しばしば命に関わる。薬疹は症状の軽微なものから重篤なものまで多岐にわたるが、重篤なものとしては、3 大重症薬疹として知られるスティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome ; S J S)、中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis ; T E N)、および薬剤性過敏症候群 (Drug-induced hypersensitivity syndrome ; D I H S) が挙げられる。

40

【0003】

ほぼ全ての薬物は薬疹を誘発するリスクを有することが報告されているが、中でも、抗てんかん薬であるカルバマゼピン (carbamazepine ; C B Z) は S J S 、 T E N 、および D I H S を含む種々の薬疹を誘発しうることが知られている。

【0004】

50

これまでの研究により、T細胞性アレルギー反応が薬疹の発症に関与していると考えられているが、詳細な発症機序は明らかとなっていない。また、ヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)の再活性化が発熱や肝炎等のDIHSの諸症状に関与することが示唆されているが、その発症機序は明らかとなっていない。

【0005】

CBZに関しては、台湾人被検者を用いた研究により、ヒト白血球抗原(human leukocyte antigen; HLA)-B*1502アレルがCBZにより誘発されるSJSやTENと極めて強く関連していることが証明されている(非特許文献1)。しかしながら、HLA遺伝子座のアレル頻度は人種によって顕著に異なり、例えば、HLA-B*1502アレルは東南アジア人では8.6%の頻度で存在するが(非特許文献1)、日本人や白人では0.1%の頻度でしか存在しない(<http://www.allelefrequencies.net>)。したがって、日本人や白人では、HLA-B*1502アレルはCBZにより誘発されるSJSやTENの予測に有用な遺伝的因子とは言えない。

10

【0006】

近年、日本人被検者において、HLA-A*31:01アレルとCBZにより誘発されるcADR(CBZ-induced cADR)との関連が見出された。すなわち、CBZにより誘発されるcADR患者の60.7%がHLA-A*31:01アレルを有していたのに対し、CBZ耐性被検者では12.5%のみがHLA-A*31:01アレルを有していた(オッズ比=10.8、 $P=3.64 \times 10^{-15}$)(非特許文献2)。また、ヨーロッパ人集団においても、HLA-A*31:01アレルとCBZにより誘発されるcADRとの

20

【0007】

HLAの遺伝型を同定する方法はいくつか報告されているが(非特許文献4~6)、それらの方法は多くの手間と時間を要するという点で改善の余地があった。また、近年、次世代シーケンサーを利用したHLAの遺伝型の同定が行われているが(非特許文献7~9)、反応時間が長くコストがかかるという点で改善の余地がある。

【0008】

また、PCR法とインベーター法とを組み合わせることによりHLA-A*31:01

30

アレルを検出することは知られていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】 Chung WH. et al. Nature. 2004 Apr 1;428(6982):486.

【非特許文献2】 Ozeki T. et al. Hum Mol Genet. 2011;20:1034-1041.

【非特許文献3】 McCormack M. et al. N Engl J Med. 2011;364:1134-1143.

【非特許文献4】 Adams SD. et al. Tumori. 2001;87:S40-43.

【非特許文献5】 Itoh Y. et al. Hum Immunol. 2006;67:374-385.

【非特許文献6】 Faner R. et al. Hum Immunol. 2006;67:374-385.

40

【非特許文献7】 Erlich RL. et al. BMC Genomics. 2011;12:42.

【非特許文献8】 Lind C. et al. Hum Immunol. 2010;71:1033-1042.

【非特許文献9】 Gabriel C. et al. Hum Immunol. 2009;70:960-964.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、HLA-A*31:01アレルを検出する方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

50

本発明者らは上記課題の解決のために鋭意検討した結果、HLA-A*31:01アレルを簡便、迅速、且つ正確に検出できる一塩基多型を見出した。また、本発明者らは、PCR法とインベーター法とを組み合わせることによりHLA-A*31:01アレルを簡便、迅速、且つ正確に検出できることを見出した。これらの知見に基づき、本発明者らは本発明を完成させた。

【0012】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1]

HLA-A*31:01を特徴づける1またはそれ以上の一塩基多型を分析し、該分析結果に基づいてHLA-A*31:01の存在の有無を判定することを特徴とする、HLA-A*31:01の検出方法。

10

[2]

配列特異的プライマーPCR法とインベータープラス法の組み合わせにより一塩基多型が分析される、前記方法。

[3]

少なくともrs1059449、rs41541222、rs1059471、rs1059457、およびrs41562315から選択される1またはそれ以上の一塩基多型が分析される、前記方法。

[4]

少なくともrs41562315が分析される、前記方法。

20

[5]

前記方法によりHLA-A*31:01を検出し、該検出結果に基づいて抗てんかん薬による薬疹リスクを検査することを特徴とする、抗てんかん薬による薬疹リスクの判定方法。

[6]

前記抗てんかん薬がカルバマゼピンである、前記方法。

[7]

下記(A)および(B)を含む配列特異的プライマーセット：

(A) 配列番号1に示す塩基配列またはその相補配列におけるHLA-A*31:01を特徴づける第1の一塩基多型を3'末端に有する10塩基以上の長さの配列を含み、且つ、該一塩基多型をプライマーの3'末端に有する第1のプライマー；

30

(B) 配列番号1に示す塩基配列またはその相補配列におけるHLA-A*31:01を特徴づける第2の一塩基多型を3'末端に有する10塩基以上の長さの配列を含み、且つ、該一塩基多型をプライマーの3'末端に有する第2のプライマーであって、前記第1のプライマーと対になってHLA-A*31:01の前記第1の一塩基多型から前記第2の一塩基多型までを含む領域を増幅するように設計された、プライマー。

[8]

前記第1の一塩基多型がrs41541222またはrs1059457であり、前記第2の一塩基多型がrs41562315である、前記プライマーセット。

[9]

HLA-A*31:01を特徴づける一塩基多型をインベーターのターゲットとするインベータープローブおよびアレルプローブを含むプローブセット。

40

[10]

前記一塩基多型がrs1059471またはrs1059457である、前記プローブセット。

[11]

前記プライマーセットおよび前記プローブセットを含む、HLA-A*31:01の検出用試薬であって、

前記インベーターのターゲットである一塩基多型は、前記第1の一塩基多型と前記第2の一塩基多型の間に存在する一塩基多型である、試薬。

【図面の簡単な説明】

【0013】

50

【図1】特異性スコアの算出結果を示す図。

【図2】日本人集団においてアレル頻度 > 0.001% で存在する42種のHLA-Aアレルのアラインメントを示す図。イントロン2領域の「*」は、配列が未決定であることを示す。「-」は、塩基の種類がHLA-A*31:01と同一であることを示す。

【図3】セット1およびセット2のプライマーおよびプローブの位置を示す図。

【図4】JCHサンプル(n=90)のHLA-A*31:01アッセイの結果を示す図および写真。

【図5】CEUサンプル(n=90)およびYRIサンプル(n=90)のHLA-A*31:01アッセイの結果を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0014】

<1>HLA-A*31:01の検出方法

本発明の検出方法は、HLA-A*31:01を特徴づける1またはそれ以上の塩基多型(SNP)を分析し、該分析結果に基づいてHLA-A*31:01の存在の有無を判定することを特徴とする、HLA-A*31:01の検出方法である。上記「1またはそれ以上」とは、1であってもよく、2であってもよく、3であってもよく、それ以上であってもよい。本発明において、「HLA-A*31:01の存在の有無の判定」には、被検者がHLA-A*31:01アレルを有するかどうかの判定、および被検者がHLA-A*31:01アレルを有する可能性が高いか低いかの判定が含まれる。すなわち、本発明の検出方法においては、例えば、被検者がHLA-A*31:01アレルを有するかどうか判定されてよい。また、本発明の検出方法においては、例えば、被検者がHLA-A*31:01を有する可能性の高低が判定されてよい。なお、本発明において、SNPの「分析」とSNPの「解析」は同義である。

【0015】

HLA-A遺伝子は、HLAクラスI分子の重鎖をコードする遺伝子である。HLA-A遺伝子として、具体的には、GenBank Accession No. NC_000006.11の29910309~29913661の領域が挙げられる。HLA-A遺伝子のアレルとしては1729種がIMGT/HLA Databaseに登録されており(2011年10月13日付;バージョン3.6.0)、HLA-A*31:01アレルはその1つである。HLA-A*31:01アレルの塩基配列を配列番号1に示す。

【0016】

分析されるSNPは、HLA-A*31:01を特徴づけるSNP(HLA-A*31:01-discriminating SNP)であれば特に制限されない。「HLA-A*31:01を特徴づけるSNP」とは、HLA-A*31:01と、他のHLA-Aアレルから選択される1またはそれ以上のアレルとを区別できるSNPをいう。

【0017】

以下、HLA-A*31:01を特徴づける程度を「特異性スコア(Specificity score)」という概念を導入して説明する。「特異性スコア」とは、既知の1729種のHLA-Aアレルについて、HLA-A*31:01と他のHLA-Aアレルとの差異を、翻訳開始点から始めて1塩基毎に得点化したものである。具体的には、まずレファレンスとなるHLA-A*31:01の翻訳開始点の塩基を、他のHLA-Aアレルの相当する塩基と各々比較して、塩基が違えば+1を加算する。翻訳開始点の塩基、すなわち開始コドンATGのAはいずれのHLA-Aアレルでも共通であるため翻訳開始点における特異性スコアはゼロである。この操作を順次1塩基ごとに全長3216bp(アレルごとに多少の差がある)の塩基に渡って繰り返していくと、HLA-A*31:01の塩基位置をパラメータとした特異性スコアが算出される。定義上、特異性スコアが高い程、その塩基位置がHLA-A*31:01に特異的である、すなわち、HLA-A*31:01と他の多くのHLA-Aアレルとを区別できることを示す。また、言い換えれば、ある塩基位置の特異性スコアがXである場合、その塩基位置のSNPは、HLA-A*31:01と、他のHLA-Aアレルの内、X種のアレルとを区別できるSNPである。

10

20

30

40

50

【0018】

H L A - A 遺伝子領域における特異性スコアの分布を図1に示す。特に、H L A - A 遺伝子のエクソン2の後半には特異性スコアの高いSNPsが存在する。例えば、エクソン2に存在するrs1059449、rs41541222、およびrs1059471は特異性スコアが1500以上であり、エクソン2に存在するrs1136659およびrs80321556は特異性スコアが1000以上である。これらのSNPsはいずれもH L A - A * 3 1 : 0 1の検出に特に好ましく用いることができる。ここで、rs番号はNational Center for Biotechnology InformationのdbSNPデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)の登録番号を示す。なお、SNPsの中には単一のSNPに複数のrs番号が割り当てられているものも存在する。本発明においてrs番号で特定されるSNPは、当該rs番号が割り当てられている限り、当該rs番号のみが割り当てられているものであってもよく、当該rs番号以外のrs番号が同時に割り当てられているものであってもよい。

10

【0019】

また、「H L A - A * 3 1 : 0 1を特徴づけるSNP」は、被検者が属する人種における各H L A - A アレルのアレル頻度を考慮して選択するのが好ましい。すなわち、「H L A - A * 3 1 : 0 1を特徴づけるSNP」は、H L A - A * 3 1 : 0 1と、被検者が属する人種においてアレル頻度が高い他のH L A - A アレルとを区別できるSNPであるのが好ましい。例えば、「H L A - A * 3 1 : 0 1を特徴づけるSNP」は、H L A - A * 3 1 : 0 1と、被検者が属する人種においてアレル頻度 > 0 . 0 0 1 % で存在するH L A - A * 3 1 : 0 1以外のH L A - A アレルとを区別できるSNPであるのが好ましい。

20

【0020】

例えば、既知の1729種のH L A - A アレルの内、日本人集団においてアレル頻度 > 0 . 0 0 1 % で存在するものとしては、H L A - A * 3 1 : 0 1 アレルを含む全部で42種が中央骨髄センターより報告されている(後述する図2に記載の42種)。よって、日本人被検者のH L A - A * 3 1 : 0 1を検出する場合、「H L A - A * 3 1 : 0 1を特徴づけるSNP」は、少なくとも、H L A - A * 3 1 : 0 1と、それ以外の41種のH L A - A アレルから選択される1またはそれ以上のアレルとを区別できるSNPであるのが好ましい。例えば、上記例示したrs1059449、rs41541222、rs1059471は、特に制限されないが、日本人被検者におけるH L A - A * 3 1 : 0 1の検出に好ましく用いることができる。

30

【0021】

本発明において、「H L A - A * 3 1 : 0 1を特徴づけるSNP」としては、特異性スコアが高いSNPが好ましい。特異性スコアが高いSNPとしては、例えば、特異性スコアで降順に並べた際の上位10のSNPsから選択されるものが好ましく、上位5のSNPsから選択されるものがより好ましい。特異性スコアが高いSNPとして、具体的には、例えば、rs41541222、rs1059449、rs1059471、rs1136659、rs1059506、rs1059536、rs1059517、rs80321556、rs9260156、rs1059509が挙げられる。本発明においては、少なくとも1つの特異性スコアが高いSNPが分析されるのが好ましく、少なくとも2つの特異性スコアが高いSNPが分析されるのがより好ましい。特異性スコアは、例えば、全H L A - A アレルについて算出されたものであってもよく、被検者が属する人種においてアレル頻度 > 0 . 0 0 1 % で存在するH L A - A アレルについて算出されたものであってもよい。

40

【0022】

また、本発明において、「H L A - A * 3 1 : 0 1を特徴づけるSNP」は、既知のH L A - A 遺伝子の配列情報に基づき、上述の特異性スコア、およびH L A - A * 3 1 : 0 1と他の各H L A - A アレルとの塩基配列の相同性を考慮して選択することができる。例えば、「H L A - A * 3 1 : 0 1を特徴づけるSNP」は、特異性スコアが高く、且つ、H L A - A * 3 1 : 0 1との相同性及び被検者の属する集団におけるアレル頻度がいずれも高いH L A - A アレルがH L A - A * 3 1 : 0 1とともに検出されないようなSNPであるのが好ましい。

50

【0023】

また、「HLA-A*31:01を特徴づけるSNP」を配列特異的プライマーPCRにより解析する場合、当該SNPとしては、PCRによる増幅産物のサイズがおよそ200bp以下、具体的には、例えば120～160bp程度となるものが好ましい。

【0024】

また、「HLA-A*31:01を特徴づけるSNP」としては、上記のSNPと連鎖不平衡にあるSNPが挙げられる。ここで「上記のSNPと連鎖不平衡にあるSNP」とは、上記のSNPと $r^2 > 0.5$ 、好ましくは $r^2 > 0.8$ 、さらに好ましくは $r^2 > 0.9$ 、特に好ましくは $r^2 = 1$ の関係を満たすSNPをいう。上記のSNPと連鎖不平衡にあるSNPは、例えば、HapMapデータベース(<http://www.hapmap.org/index.html.ja>)等を用いて同定することができる。また、上記のSNPと連鎖不平衡にあるSNPは、例えば、複数人(通常は20～40人程度)から採取したDNAをシーケンサーにて配列解析し、連鎖不平衡にあるSNPを探索することにより同定することもできる。例えば、rs1059471と連鎖不平衡にあるSNPとしてはrs41562315が挙げられる。

10

【0025】

本発明においては、例えば、少なくともrs1059449、rs41541222、rs1059471、rs1059457、およびrs41562315から選択される1またはそれ以上のSNPが分析されてよい。これら5つのSNPsについて、SNP塩基及びその前後60bpの領域を含む合計121bpの長さの配列を、それぞれ配列番号2～6に示した。61番目の塩基が多型を有する。

【0026】

また、本発明においては、例えば、少なくともrs41562315が分析されてよい。また、本発明においては、例えば、少なくともrs41562315、rs41541222、およびrs1059457が分析されてもよく、少なくともrs41562315、rs1059457、およびrs1059471が分析されてもよい。

20

【0027】

本発明において、上記SNPを解析することには、上記SNPに相当するSNPを解析することが含まれる。「上記SNPに相当するSNP」とは、HLA-A遺伝子領域における該当SNPを意味する。すなわち、「上記SNPに相当するSNPを解析する」ことには、仮に人種の違いなどによってHLA-A遺伝子配列がSNP以外の位置で若干変化したとしても、HLA-A遺伝子領域における該当SNPを解析することが含まれる。

30

【0028】

SNPの解析に用いる試料としては、染色体DNAを含む試料であれば特に制限されないが、例えば、血液や尿等の体液、口腔粘膜等の細胞、毛髪等の体毛が挙げられる。SNPの解析にはこれらの試料を直接使用することもできるが、これらの試料から染色体DNAを常法により単離し、これを用いて解析することが好ましい。

【0029】

SNPの解析は、通常の遺伝子多型解析方法によって行うことができる。例えば、シーケンズ解析、PCR、ハイブリダイゼーション、インベーター法などが挙げられるが、これらに限定されない。SNPの解析においては、例えば、解析対象のSNPがいずれの塩基であるかを決定してもよいし、解析対象のSNPがHLA-A*31:01と同一の種類か否かを決定してもよい。すなわち、例えば、あるSNPの塩基の種類がHLA-A*31:01においてAである場合に、当該SNPの解析においては、当該SNPがATGCのいずれの塩基であるかを決定してもよいし、当該SNPがAであるかを決定してもよい。また、SNPの解析においては、二本鎖DNAのいずれの鎖を分析してもよい。

40

【0030】

シーケンズ解析は通常の方法により行うことができる。具体的には、多型を示す塩基の5'側数十塩基の位置に設定したプライマーを使用してシーケンズ反応を行い、その解析結果から、該当する位置がどの種類の塩基であるかを決定することができる。なお、シーケンズ反応の前に、あらかじめSNP部位を含む断片をPCRなどによって増幅

50

しておくことが好ましい。

【0031】

また、SNPの解析は、PCRによる増幅の有無を調べることによって行うことができる。例えば、多型を示す塩基を含む領域に対応する配列を有し、かつ、3'末端が各多型に対応するプライマーをそれぞれ用意する。それぞれのプライマーを使用してPCRを行い、増幅産物の有無によってどのタイプの多型であるかを決定することができる。本発明において、このような、解析対象のSNPに対応する塩基を3'末端に有するプライマーを用いて、解析対象のSNPが特定の塩基である場合にのみDNA断片が増幅される手法を、「配列特異的プライマーPCR(sequence-specific primer PCR; SSP-PCR)法」という場合がある。また、LAMP法(特許第3313358号明細書)、NASBA法(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification; 特許2843586号明細書)、ICAN法(特開2002-233379号公報)などによって増幅の有無を調べることもできる。その他、単鎖増幅法を用いてもよい。

10

【0032】

また、SNP部位を含むDNA断片を増幅し、増幅産物の電気泳動における移動度の違いによってどのタイプの多型であるかを決定することもできる。このような方法としては、例えば、PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism)法(Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.)が挙げられる。具体的には、まず、目的のSNPを含むDNAを増幅し、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離し、分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度の違いによってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

20

【0033】

さらに、多型を示す塩基が制限酵素認識配列に含まれる場合は、制限酵素による切断の有無によって解析することもできる(RFLP法)。この場合、まず、DNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片を分離し、検出されたDNA断片の大きさによってどのタイプの多型であるかを決定することができる。

【0034】

また、ハイブリダイゼーションの有無を調べることによって多型の種類を解析することも可能である。すなわち、各塩基に対応するプローブを用意し、いずれのプローブにハイブリダイズするかを調べることによってSNPがいずれの塩基であるかを調べることもできる。

30

【0035】

また、本発明において、SNPの解析は、配列特異的プライマーPCR法とインベータープラス法とを組み合わせる行うのが好ましい。インベータープラス法は、Third Wave Technologies社が開発した、PCRとインベーター反応を単一の容器内で連続的に行う手法である。インベーター法は、開裂酵素(cleavage enzyme (Cleavaseともいう))と蛍光共鳴エネルギー移動(fluorescence resonance energy transfer; FRET)カセットを利用して特定のSNPを検出する手法であり、ハイスループットなSNPジェノタイピングに広く用いられている。インベーター法は、ハイブリダイゼーション法と比較してより特異的にターゲットのSNPを認識できる点で好ましい。

40

【0036】

この方法では、例えば、反応液中に、配列特異的プライマー(配列特異的フォワードプライマー及び配列特異的リバースプライマー)、インベータープローブ、アレルプローブ、蛍光ラベルされたFRETプローブ、Cleavase、dNTP、Taqポリメラーゼ、および解析対象のDNAを含めて配列特異的プライマーPCRを行い、続けて、インベーター反応を行う。各配列特異的プライマーは解析対象のSNPに対応する塩基を3'末端に有し、配列特異的プライマーPCR工程において解析対象のSNPが特定の塩基である場合にのみDNA断片の増幅が起こるように設計される。アレルプローブおよびインベータープローブは、増幅断片中のインベーターのターゲットとなるSNPの両側にそれぞれハイブリダイズするように設計される。アレルプローブは、前記ハイブリダイズする部分の5'側末端に

50

解析対象のSNPに対応する塩基を有し、そのさらに5'側にフラップ配列を有する。つまり、アレルプローブは、5'末端から順に、フラップ配列、インベーターのターゲットとなるSNP、解析対象のDNA特異的配列からなる配列を含むように設計される。インベータープローブは、インベーターのターゲットとなるSNP部位がプローブの3'末端に位置するように設計されるが、当該3'末端の塩基の種類は任意である。アレルプローブ中のインベーターのターゲットとなるSNPに対応する塩基は、増幅断片中の当該SNPが特定の塩基である場合にのみ当該SNP塩基とハイブリダイズし、さらにインベータープローブの3'末端の塩基(種類は任意)が当該ハイブリダイズ箇所に侵入することで、当該SNP部位において三重構造が形成される。次に、Cleavaseが三重構造を認識してアレルプローブをSNPに相当する塩基と前記ハイブリダイズする部分の5'側末端の間で切断し、3'側末端にSNP塩基が付加されたフラップ配列が遊離する。遊離したフラップ配列はFRETプローブとハイブリダイズして同様の三重構造を形成し、Cleavaseが三重構造を認識してFRETプローブから蛍光ラベルを遊離させることで、蛍光シグナルが得られる。すなわち、ターゲットとなる3つのSNPsがそれぞれ特定の塩基である場合に、DNA断片の増幅とインベーター反応が起こり、蛍光シグナルが得られる。PCRおよびそれに続くインベーター反応は、常法に従って行うことができる。また、Cleavaseとしては、例えば、Cleavase VIIIやCleavase 2.0を用いることができる。

10

【0037】

この方法では、例えば、配列特異的プライマーPCRのターゲットとなる2つのSNPsおよびインベーターのターゲットとなるSNPに基づいてHLA-A*31:01を検出することができる。これらのSNPは、例えば、各SNPの特異性スコア、増幅断片のサイズ、各SNP周辺のミスマッチの有無等の諸条件を考慮して適宜選択することができる。

20

【0038】

また、上記ではターゲットとなる3つのSNPsに基づいてHLA-A*31:01を検出する場合を例示したが、所望の検出精度を実現できる限り、ターゲットとなるSNPsの個数を増減してもよい。例えば、所望の検出精度を実現できる限り、配列特異的プライマーPCRは配列特異的プライマーと、多型の判定に関わらない汎用プライマーとの組み合わせで行ってもよい。

【0039】

なお、インベーター反応においては、複数種のFRETプローブと、それに対応するフラップ配列を有するアレルプローブを利用することで、あるSNP部位における複数種類の塩基を同時に検出し分けることや、複数のSNPs部位の塩基がそれぞれ特定の塩基であるか否かを同時に検出することもできる。

30

【0040】

このようにして解析対象のSNPがいずれの塩基であるか、または解析対象のSNPがHLA-A*31:01と同一の種類の塩基であるか否かを決定することで、被検者がHLA-A*31:01アレルを有するか否か、あるいは、被検者がHLA-A*31:01アレルを有する可能性の高低を決定できる。

【0041】

本発明の検出方法においては、解析対象のSNP(s)の全てがHLA-A*31:01と同一の種類の塩基である場合に、被検者がHLA-A*31:01アレルを有する、あるいは、被検者がHLA-A*31:01アレルを有する可能性があるとして決定できる。本発明の検出方法において、HLA-A*31:01アレルと共に、HLA-A*31:01アレル以外のHLA-Aアレルが検出される場合は、当該HLA-A*31:01アレル以外のHLA-Aアレルの数や被検者の属する人種におけるアレル頻度を考慮して、被検者がHLA-A*31:01アレルを有するか否か、あるいは、被検者がHLA-A*31:01アレルを有する可能性の高低を決定できる。なお、本発明の検出方法において、HLA-A*31:01アレルと共に、HLA-A*31:01アレル以外のHLA-Aアレルが検出される場合、必要に応じて、HLA-A*31:01アレルと、当該H

40

50

HLA-A*31:01 アレル以外のHLA-A アレルとを区別するための操作を行ってもよい。

【0042】

<2> 抗てんかん薬による薬疹リスクの判定方法

HLA-A*31:01 アレルは、カルバマゼピン(CBZ)により誘発されるcADR(CBZ-induced cADR)と関連することが知られている(非特許文献2、3)。よって、HLA-A*31:01 アレルの検出結果に基づき、CBZ等の抗てんかん薬による薬疹リスクを判定できる。すなわち、本発明は、本発明の検出方法によりHLA-A*31:01 アレルを検出し、該検出結果に基づいて抗てんかん薬による薬疹リスクを検査することを特徴とする、抗てんかん薬による薬疹リスクの判定方法(以下、本発明の判定方法ともいう)を提供する。なお、本発明において、「薬疹リスク」とは、抗てんかん薬の投与により薬疹が発生するかどうかを示すリスク、及び抗てんかん薬の投与により薬疹の程度が悪化するかどうかを示すリスクを含む。よって、本発明において、「検査」とは、抗てんかん薬の投与により薬疹が発生するかどうかを予測するための検査、及び抗てんかん薬の投与により薬疹の程度が悪化するかどうかを予測するための検査を含む。本発明の判定方法においては、被検者がHLA-A*31:01 アレルを有する場合に、抗てんかん薬による薬疹リスクが高いと判定される。また、本発明の判定方法においては、被検者がHLA-A*31:01 アレルを有さない場合に、抗てんかん薬による薬疹リスクが低いと判定される。

10

【0043】

薬疹としては、特に制限されず、スティーブンス・ジョンソン症候群(Stevens-Johnson syndrome; SJS)、中毒性表皮壊死症(toxic epidermal necrolysis; TEN)、薬剤性過敏症症候群(Drug-induced hypersensitivity syndrome; DIHS)、多型性紅斑(erythema multiforme; EM)、播種状紅斑丘疹(maculopapular eruption; MPE)、紅斑(erythema)、紅皮症(erythroderma)、および固定薬疹(fixed drug eruption)等が挙げられる。

20

【0044】

抗てんかん薬としては、特に制限されないが、イミノスチルベン系の薬剤であるのが好ましく、カルバマゼピン(CBZ)であるのがより好ましい。

【0045】

本発明の判定方法を適用できる人種としては、特に制限されないが、例えば、日本人や白人が挙げられる。

30

【0046】

本発明の判定方法においては、抗てんかん薬による薬疹リスクと関連する他のSNPsから選択される1またはそれ以上のSNPsを併せて解析してもよい。そのようなSNPsとしては、例えば、ヒトの第6染色体短腕21.33領域(6p21.33領域)に含まれるSNPsが挙げられる(特許文献2)。6p21.33領域に含まれるSNPsとして、具体的には、例えば、rs1633021、rs2571375、rs1116221、rs2844796、rs1736971、rs1611133、rs2074475、rs7760172、rs2517673、rs2524005、rs12665039、およびrs1362088、並びにそれらSNPsと連鎖不平衡にあるSNPsが挙げられる(特許文献2)。

40

【0047】

<3> 本発明の検出用試薬

本発明はまた、HLA-A*31:01 アレルを検出するためのプライマーやプローブなどの検出試薬を提供する。

【0048】

プライマーとしては、上記多型部位を増幅するためのPCRに用いることのできるプライマー、又は上記多型部位を配列解析(シーケンシング)するために用いることのできるプライマーが挙げられる。具体的には、配列番号1においてHLA-A*31:01を特徴づけるSNPを含む領域を増幅したりシーケンシングしたりすることのできるプライマーや、配列番号2~6のいずれかにおいて塩基配列の61番目の塩基を含む領域を増

50

幅したりシーケンシングしたりすることのできるプライマーが挙げられる。このようなプライマーの長さは10～50塩基が好ましく、15～35塩基がより好ましく、20～35塩基がさらに好ましい。

【0049】

上記多型部位を増幅するためのPCRに用いることのできるプライマー、又は上記多型部位をシーケンシングするために用いることのできるプライマーとしては、上記塩基の5'側領域、好ましくは30～100塩基上流の配列を有するプライマーや、上記塩基の3'側領域、好ましくは30～100塩基下流の領域に相補的な配列を有するプライマーが例示される。なお、増幅されたDNA断片中の多型の解析は、例えば、インベーター法等の上記例示した手法により実施できる。

10

【0050】

PCRによる増幅の有無で多型を判定するために用いるプライマー（配列特異的プライマーともいう）としては、上記塩基を含む配列を有し、上記塩基を3'側に含むプライマーや、上記塩基を含む配列の相補配列を有し、上記塩基の相補塩基を3'側に含むプライマーなどが例示される。配列特異的プライマーと対になって用いられるプライマーは、他の配列特異的プライマーであってもよいし、多型の判定に関わらない汎用プライマーであってもよい。配列特異的プライマーと他の配列特異的プライマーとを組み合わせる場合、より正しくHLA-A*31:01を検出できると期待される。

【0051】

HLA-A*31:01アレルが存在する場合にDNA断片が増幅される配列特異的プライマーとしては、例えば、配列番号1に示す塩基配列またはその相補配列におけるHLA-A*31:01を特徴づける一塩基多型を3'末端に有する10塩基以上の長さの配列を含み、且つ、該一塩基多型をプライマーの3'末端に有するプライマーが挙げられる。

20

【0052】

また、HLA-A*31:01アレルが存在する場合にDNA断片が増幅される配列特異的プライマーのセットとしては、例えば、下記(A)および(B)を含むセットが挙げられる。

(A) 配列番号1に示す塩基配列またはその相補配列におけるHLA-A*31:01を特徴づける第1の一塩基多型を3'末端に有する10塩基以上の長さの配列を含み、且つ、該一塩基多型をプライマーの3'末端に有する第1のプライマー；

30

(B) 配列番号1に示す塩基配列またはその相補配列におけるHLA-A*31:01を特徴づける第2の一塩基多型を3'末端に有する10塩基以上の長さの配列を含み、且つ、該一塩基多型をプライマーの3'末端に有する第2のプライマーであって、前記第1のプライマーと対になってHLA-A*31:01の前記第1の一塩基多型から前記第2の一塩基多型までを含む領域を増幅するように設計された、プライマー。

【0053】

上記「該一塩基多型をプライマーの3'末端に有する」とは、上記10塩基以上の長さの配列中の上記HLA-A*31:01を特徴づけるSNP部位が、プライマーの3'末端に位置していることを意味する。上記「10塩基以上の長さ」とは、例えば、10塩基以上の長さであってもよく、15塩基以上の長さであってもよく、20塩基以上の長さであってもよい。また、上記「10塩基以上の長さ」とは、例えば、50塩基以下の長さであってもよく、35塩基以下の長さであってもよい。

40

【0054】

上記各配列特異的プライマーは、5'側に任意の塩基配列を有していてもよい。具体的には、例えば、第1のプライマーについて、前記「10塩基以上の長さ」が15塩基で、プライマーの全長が20塩基である場合、プライマーの3'側15塩基は配列番号1の塩基配列またはその相補配列における第1のSNPを3'末端に有する15塩基の配列からなり、残りの部分、すなわち5'側5塩基は任意の配列であってよいことを意味する。

【0055】

50

第1および第2のHLA-A*31:01を特徴づけるSNPは、例えば、各SNPの特異性スコア、増幅断片のサイズ、各SNP周辺のミスマッチの有無等の諸条件を考慮して適宜選択することができる。具体的には、例えば、前記第1の一塩基多型はrs41541222またはrs1059457であってよく、前記第2の一塩基多型はrs41562315であってよい。rs41541222、rs1059457、およびrs41562315に対応する配列特異的プライマーとして、具体的には、例えば、プライマーF1(CCGTGGATAGAGCAGGAGAGGCCT; 配列番号7)、プライマーF2(GAGAGGCCTGAGTATTGGGACCAGGAG; 配列番号8)、プライマーR(TGACCTGCGCCCCGGCT; 配列番号9)がそれぞれ挙げられる。また、配列特異的プライマーは、例えば、これらのプライマーの3'側10塩基以上からなる塩基配列を有するプライマーであってよく、当該塩基配列の5'末端に任意の塩基配列が付加された塩基配列を有するプライマーであってよい。

10

【0056】

なお、上記各配列特異的プライマーにおいて、3'末端の塩基をHLA-A*31:01以外のアレルに対応する塩基に変更することで、HLA-A*31:01以外のアレルが存在する場合にDNA断片が増幅される配列特異的プライマーを設計することができる。

【0057】

また、プローブとしては、上記多型部位を含み、ハイブリダイズの有無によって多型部位の塩基の種類を判定できるプローブが挙げられる。具体的には、配列番号1におけるHLA-A*31:01を特徴づけるSNPを含む配列、又はその相補配列を有する10塩基以上の長さのプローブや、配列番号2~6のいずれかにおいて塩基配列の61番目の塩基を含む配列、又はその相補配列を有する10塩基以上の長さのプローブが挙げられる。プローブの長さは好ましくは、15~35塩基であり、より好ましくは20~35塩基である。

20

【0058】

また、インベーター法に用いられるプローブセットとしては、HLA-A*31:01を特徴づける一塩基多型をインベーターのターゲットとするインベータープローブおよびアレルプローブを含むセットが挙げられる。そのようなプローブは、例えば、Universal Invader Design Software等のソフトウェアを利用して設計することができる。インベーター/アレルプローブは、HLA-A*31:01が存在する場合にインベーター反応が進行するように設計することができる。

30

【0059】

そのようなインベーター/アレルプローブのセットとしては、例えば、下記(C)および(D)を含むセットが挙げられる。

(C) 配列番号1に示す塩基配列またはその相補配列におけるHLA-A*31:01を特徴づける一塩基多型を3'末端に有する10塩基以上の長さの配列を含み、該一塩基多型をプローブの3'末端に有し、且つ、該一塩基多型の塩基がA、T、G、Cから選択される塩基である、インベータープローブ;

(D) 5'から3'方向に向けて、フラップ配列、および配列番号1に示す塩基配列またはその相補配列におけるHLA-A*31:01を特徴づける一塩基多型を5'末端に有する10塩基以上の長さの配列を含むアレルプローブであって、前記インベータープローブと対になってHLA-A*31:01が存在する場合にインベーター反応が進行するように設計された、プローブ。

40

【0060】

上記「該一塩基多型をプローブの3'末端に有し、且つ、該一塩基多型の塩基がA、T、G、Cから選択される塩基である」とは、上記10塩基以上の長さの配列中の上記HLA-A*31:01を特徴づけるSNP部位が、プローブの3'末端に位置しているが、その塩基の種類は任意のものでよいことを意味する。上記「10塩基以上の長さ」とは、例えば、10塩基以上の長さであってよく、15塩基以上の長さであってよく、20塩基以上の長さであってよい。また、上記「10塩基以上の長さ」とは、例えば、50

50

塩基以下の長さであってもよく、35塩基以下の長さであってもよい。

【0061】

上記インベータープローブは5'側に任意の塩基配列を有していてもよい。また、上記アレルプローブは5'側および/または3'側に任意の塩基配列を有していてもよい。例えば、インベータープローブについて、前記「10塩基以上の長さ」が15塩基で、プローブの全長が20塩基である場合、プローブの3'側15塩基は配列番号1の塩基配列またはその相補配列における第1のSNPを3'末端に有する15塩基の配列からなり、残りの部分、すなわち5'側5塩基は任意の配列であってもよいことを意味する。

【0062】

インベーターのターゲットであるSNPは、例えば、SNPの特異性スコアやSNP周辺のミスマッチの有無等の諸条件を考慮して適宜選択することができる。具体的には、例えば、インベーターのターゲットであるSNPは、rs1059457またはrs1059471であってもよい。rs1059457をインベーターのターゲットとするインベータープローブおよびアレルプローブとして、具体的には、例えば、インベータープローブ1(CCTGAGTATTGGGACCAGGAT; 配列番号10)およびアレルプローブ1(FAM)(ATGACGTGGCAGACGACACGGAATGTGAAGG; 配列番号11)が挙げられる。また、rs1059471をインベーターのターゲットとするインベータープローブおよびアレルプローブとして、具体的には、例えば、インベータープローブ2(TGAAGGCCACTCACAGAA; 配列番号12)およびアレルプローブ2(FAM)(ATGACGTGGCAGACTTGACCGAGTGGACC; 配列番号13)が挙げられる。また、インベータープローブは、例えば、これらのインベータープローブの3'側10塩基以上からなる塩基配列を有するプローブであってもよく、当該塩基配列の5'末端に任意の塩基配列が付加された塩基配列を有するプローブであってもよい。また、アレルプローブは、例えば、これらのアレルプローブ塩基配列におけるフラップ配列とそれに続く10塩基以上の塩基配列を有するプローブであってもよく、当該塩基配列の5'末端および/または3'末端に任意の塩基配列が付加された塩基配列を有するプローブであってもよい。

【0063】

上記アレルプローブ1(FAM)およびアレルプローブ2(FAM)の5'側14塩基は、FAM用のフラップ配列である。よって、インベーター法にFAM以外のラベルを利用する場合は、当該フラップ配列をFAM以外のラベルに対応したものに変更することができる。

【0064】

本発明の検出用試薬は、配列特異的プライマーセットおよびインベーター法に用いるプローブセットを含むものであってもよい。これらプライマーセットおよびプローブセットを組み合わせる場合、インベーターのターゲットである一塩基多型は、前記第1の一塩基多型と前記第2の一塩基多型の間には存在する一塩基多型から選択すればよい。

【0065】

また、本発明の検出用試薬はこれらのプライマーおよび/またはプローブに加えて、PCR用のポリメラーゼやバッファー、ハイブリダイゼーション用試薬、インベーター反応用のFRETプローブやCleavase等から選択されるものを含むものであってもよい。

【実施例】

【0066】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に限定されない。なお、本実施例において、「HLA-A*31:01:02」と「HLA-A*31:01」は同じものである。

【0067】

本実施例では、配列特異的プライマーPCRとインベータープラス法とを組み合わせるHLA-A*31:01アレルの検出を行った。

【0068】

(1)ゲノムDNAサンプル

ゲノムDNAサンプルとしては、3グループのHapMapサンプル、すなわち、互い

10

20

30

40

50

に血縁関係のない90名の日本人および漢民族のサンプル(JCH); 90名の北欧系および西欧系のユタ州住民のサンプル(CEU); 90名のナイジェリアのイバダンのヨルバ人のサンプル(YRI)を用いた。全てのHapMapサンプルは、Coriell Institute for Genomic Researchから購入した。HapMapサンプルのHLA-A遺伝子型データは、非特許文献7(Erich RL. et al. BMC Genomics. 2011;12:42.)から取得した。JCHサンプル中13名(14.4%)およびCEUサンプル中4名(4.4%)がHLA-A*31:01アレルを有しており、YRIサンプルはいずれもHLA-A*31:01アレルを有していなかった。

【0069】

(2) プライマーおよびプローブの設計

プライマーおよびプローブの設計は、既報(Hosono N. et al. Pharmacogenet Genomics. 2010;20:630-633.)を参考に、以下の手順で行った。また、プローブの配列設計にはUniversal Invader Design Softwareを用いた。HLA-Aアレルの情報は、IMGT/HLA Database (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>)から取得した。

【0070】

既知の1729種のHLA-Aアレルの内、日本人集団においてアレル頻度>0.001%で存在するものとしては、HLA-A*31:01アレルを含む全部で42種が中央骨髄センターより報告されている(n=223589)。そこで、当該42種のHLA-Aアレルに限定して、HLA-A*31:01アレルを特徴づけるSNPs(HLA-A*31:01-discriminating SNPs)の探索を行った。その結果、HLA-A*31:01アレルを他のHLA-Aアレルから区別できるいくつかのSNPsがエクソン2において見出された。前記42種のHLA-AアレルのアラインメントとSNPsを図2に示す。

【0071】

dbMHC Sequence Alignment Viewerを用いて各HLA-Aアレルを比較したところ、塩基位置372のrs41541222が、最も区別的(discriminative)なSNPとして同定された。なお、「塩基位置」とは、HLA-A遺伝子の翻訳開始点(すなわち、開始コドンATGのA)を塩基番号1として、以下、同遺伝子の3'方向に順にカウントしたものである。また、2番目に区別的なSNPは塩基位置419のrs1059471、3番目に区別的なSNPは塩基位置367のrs1059449であった。

【0072】

これらSNPsの位置を考慮し、最も区別的なrs41541222に対応する塩基を3'末端に有するフォワードプライマーF1を設計した。

【0073】

次に、2番目に区別的なrs1059471に対応する塩基を3'末端に有するリバースプライマーの設計を試みた。しかしながら、当該リバースプライマーとF1を組み合わせた場合、おそらく増幅サイズが短いことが原因で、適切なインベーター/アレルプローブをUniversal Invader Design Softwareを用いて設計できなかった。そこで、HLA-A*31:01を特徴づける他の候補SNPの探索を行ったところ、エクソン2近傍のイントロン2内にrs41562315(塩基位置485)が見出された。イントロン領域の配列情報は不完全であったが、利用可能な110個のゲノム配列を比較したところ、rs41562315はrs1059471と完全連鎖不平衡にあることが示唆された。そこで、rs41562315に対応する塩基を3'末端に有するリバースプライマーRを設計した。

【0074】

次に、インベーターのターゲット部位周辺の塩基のミスマッチの個数を考慮して、塩基位置390のrs1059457をインベーターのターゲット部位として選択した。Universal Invader Design Softwareを用いて、rs1059457をインベーターのターゲット部位とするインベータープローブ1およびアレルプローブ1(FAM)を設計した。なお、以下、フォワードプライマーF1、リバースプライマーR、インベータープローブ1、およびアレルプローブ1(FAM)からなるプライマー/プローブセット(primers/probes set)をセット1と称する。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 5 】

さらに、セット1によるHLAタイピングの結果を補強するため、第2のプライマー/プローブセット(以下、セット2と称する)を設計した。リバースプライマーRはセット1とセット2で共通とした。セット2のフォワードプライマーF2は、セット1のインベーターのターゲット部位であるrs1059457に対応する塩基を3'末端に有するように設計した。また、2番目に区別的なSNPであるrs1059471をインベーターターゲット部位として選択し、インベータープローブ2およびアレルプローブ2(FAM)を設計した。

【 0 0 7 6 】

各セットのプライマーおよびプローブの位置を図3に、塩基配列を表1に示す。

【 0 0 7 7 】

【表1】

表1

プライマーおよびプローブ	配列(5'-3')
セット1(増幅サイズ:154bp)	
フォワードプライマーF1	CCGTGGATAGAGCAGGAGAGGCCT
リバースプライマーR ^a	TGACCTGCGCCCCGGGCT
インベータープローブ1	CCTGAGTATTGGGACCAGGAT
アレルプローブ1(FAM) ^b	<u>ATGACGTGGCAGACGACACGGAATGTGAAGG</u>
セット2(増幅サイズ:139bp)	
フォワードプライマーF2	GAGAGGCCTGAGTATTGGGACCAGGAG
リバースプライマーR ^a	TGACCTGCGCCCCGGGCT
インベータープローブ2	TGAAGGCCCACTCACAGAA
アレルプローブ2(FAM) ^b	<u>ATGACGTGGCAGACTTGACCGAGTGGACC</u>

a : リバースプライマーRはセット1とセット2で共通である。

b : 下線部はFAM用のフラップ配列を示す。

【 0 0 7 8 】

なお、セット1とセット2のいずれを用いた場合にも、日本人集団においてアレル頻度 > 0.001% で存在するSNPsの内、HLA-A*31:01以外にHLA-A*31:11が検出されると考えられる。しかしながら、日本人集団におけるHLA-A*31:11のアレル頻度は0.002%と極めてまれであり、HLA-A*31:01のアレル頻度は8.65%(すなわちHLA-A*31:11のアレル頻度の4325倍)であることから、上記設計した各プライマー/プローブセットはHLA-A*31:01選択的であると判断した。

【 0 0 7 9 】

(3) インベータープラスアッセイ

インベータープラスアッセイは、ABI 7500 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用い、96ウェルプレートで行った。反応液は、総反応液量10μl当たり、1x Signal Buffer、1x FRET Mix (FRET22/FRET7)、Cleavase VIII 60 ng(以上、いずれもThird Wave Technologies製)、10μM ROX (Sigma, MO, USA)、900 nM各フォワードプライマーおよびリバースプライマー、400 nMインベータープローブ、800 nMアレルプローブ、0.25 U Ex Taq HS DNA polymerase (Takara, Shiga, Japan)、400 μM dNTP mixture (Takara, Shiga, Japan)、およびゲノムDNA 5 ngからなる。PCRは、95℃ 20秒で開始し、35サイクル×(98℃ 3秒と68℃ 30秒)で行っ

10

20

30

40

50

た。PCR後、続けて、99 30秒と63 10分でインベーター反応を行った。総反応時間は約45分であった。インベーター反応中、蛍光シグナルを30秒毎に測定した。さらに、2%アガロースゲルを用いてインベータープラスアッセイ後のPCR産物の電気泳動を行い、各プライマーセットの効率と特異性を評価した。

【0080】

(4) 結果

JCHサンプル(n=90)を解析した結果を図4に示す。いずれのプライマー/プローブセットを用いた場合にも、偽陽性のシグナルは認められず、HLA-A*31:01陽性サンプル(n=13)をHLA-A*31:01陰性サンプル(n=77)と正しく区別することができた。また、アガロースゲル電気泳動の結果によれば、いずれのプライマーセットを用いた場合にも、SSP-PCR工程でターゲットのゲノム領域が選択的に増幅されていることが示唆された。

10

【0081】

また、CEUサンプル(n=90)およびYRIサンプル(n=90)を解析した結果を図5に示す。いずれのプライマー/プローブセットを用いた場合にも、CEUサンプル中のHLA-A*31:01陽性サンプル(n=4)を正しく検出できた。また、いずれのプライマー/プローブセットを用いた場合にも、HLA-A*31:01陽性サンプルの存在しないYRIサンプルでは陽性シグナルは現れず、HLA-A*31:01以外のHLA-Aアレルとの交差反応は認められなかった。

20

【0082】

以上より、セット1とセット2のいずれのプライマー/プローブセットを用いた場合にも、HLA-A*31:01アレルの有無を正しく検出できることが明らかとなった。

【0083】

なお、in silico解析によれば、セット1とセット2のいずれを用いた場合にも、既知の1729種のHLA-Aアレルの内、HLA-A*31:01に加えて52種のHLA-Aアレルが検出される可能性がある。52種の内、45種のHLA-Aアレルは、Allele frequency netの登録情報によればアレル頻度がゼロであり、HLA-A*31:01の検出に影響しないと考えられる。一方、残りの7種は、比較的低い頻度ではあるが種々の人種に分布している(0.006%~5.5%)(表2)。例えば、白人集団はHLA-A*3102アレルを1%以上の頻度で有している。よって、セット1またはセット2のプライマー/プローブセットで白人集団を解析すると、HLA-A*31:01に加えて、HLA-A*3102が1%以上の頻度で検出される可能性がある。このような誤検出を防ぐには、例えば、HLA-A*31:01とHLA-A*3102を区別できるSNPをターゲットとする他のプライマー/プローブセットを設計し、セット1またはセット2のプライマー/プローブセットと併用すればよい。セット1とセット2のいずれもFAMチャンネルのみを利用してHLA-A*31:01のシグナルを検出しているため、他のプライマー/プローブセットでVIC蛍光チャンネルを利用すれば同時に解析できる。HLA-A*31:01とHLA-A*3102を区別できるSNPとしては、例えば、rs1059460が挙げられる。

30

【0084】

40

【表 2】

表 2

	報告された集団	民族起源	アレル頻度	サンプルサイズ
A*31:02	アゾレス諸島 サンタマリアおよびサンミゲル	白人	0.013	43
	グルジア スヴァネティ地方 スヴァン人	白人	0.013	80
	アゾレス諸島 テルセイラ島	白人	0.004	130
	モンゴル プリヤート自治区	東洋人	0.004	141
	米国 ヒスパニック 集団2	ヒスパニック	0.002	2352
	米国 メキシコ系アメリカ人 メステゾ	メステゾ	0.002	553
	中国 北京 石家荘 台北 漢民族	東洋人	0.001	618
	ドイツ人 集団6	白人	0.00006	8862
A*31:03	ヨルダン アンマン	アラブ人	0.055	146
	ケニヤ ルオ	黒人	0.008	265
	ジンバブエ ハラエ ショナ族	黒人	0.007	230
	ケニヤ ナンディ	黒人	0.006	240
	中国 内蒙古自治区	東洋人	0.005	102
	スペイン アンダルシア	白人	0.005	99
	A*31:04	ケニヤ	黒人	0.024
スーダン(混血)		混血(南アフリカ)	0.01	200
ウガンダ カンパラ 集団2		黒人	0.009	175
ウガンダ カンパラ		黒人	0.003	161
サウジアラビア グライアト ハイル		アラブ人	0.002	213
中国 北京 石家荘 台北 漢民族		東洋人	0.001	618
米国 アフリカ系アメリカ人 集団4		黒人	0.00021	2411
A*31:05	モンゴル プリヤート自治区	東洋人	0.004	141
A*31:06	中国 北京 石家荘 台北 漢民族	東洋人	0.002	618
A*31:09	ペルー チチカカ湖 ウロ族	アメリカインディアン	0.005	105
	米国 メキシコ系アメリカ人 メステゾ	メステゾ	0.001	553
	米国 ヒスパニック 集団2	ヒスパニック	0.00025	1999
A*31:12	米国 アジア人 集団2	アジア人	0.00028	1772

10

20

30

【0085】

また、上述の通り、セット1とセット2のいずれを用いた場合にも、日本人集団においてまれに存在するHLA-A*31:11をHLA-A*31:01と区別できない。HLA-A*31:11と蕁麻疹リスクとの関連は未知であるが、上記と同様、他のプライマー/プローブセットを併用することでHLA-A*31:11をHLA-A*31:01と区別できる。HLA-A*31:01とHLA-A*31:11を区別できるSNPとしては、例えば、エクソン3における塩基位置936のSNP(rs番号なし)が挙げられる。

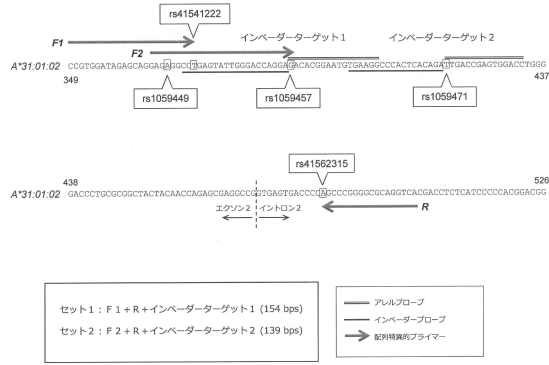
【0086】

さらに、HLAクラスIアレルは互いに相同性が高いことが知られていることから、ゲノム上の他のHLA領域から増幅が起こる可能性を以下の手順で検討した。UCSC Blat Search (<http://genome.ucsc.edu/index.html>)で検索したところ、セット1またはセット2のプライマーセットで増幅される領域と比較的高い相同性(最大で87.6%)を有する領域が、HLA-L、HLA-B、およびHLA-C領域に見出された。そこで、それらの領域がセット1またはセット2のプライマーセットで増幅されるかどうかを、IMGT/HLA Database version 3.6.0の登録データに基づきdbMHC Sequence Alignment Viewerを用いて検討した。なお、イントロン領域の配列情報は不完全であるためリバースプライマーRの3'末端のミスマッチの有無は無視した。その結果、2329種のHLA-Bアレル中の2つのアレル(HLA-B*40:22NおよびHLA-B*40:134)は増幅

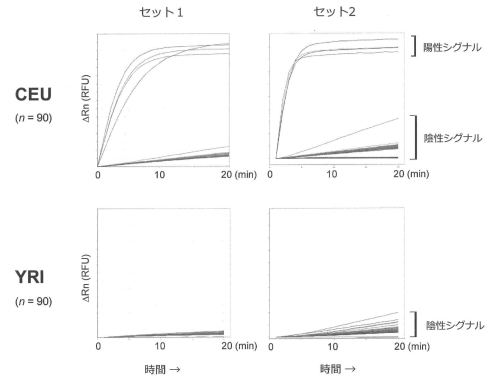
40

50

【 図 3 】

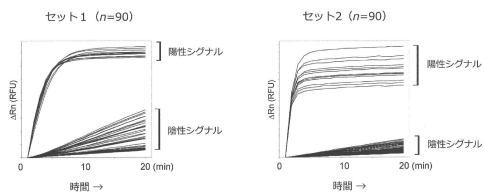


【 図 5 】

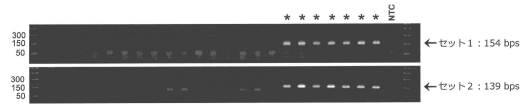


【 図 4 】

(A) 7500 Fast PCR systemによる HLA-A*31:01 のアッセイ



(B) インバーダープラス反応後のアガロースゲル電気泳動



【 配列表 】

0006346557000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 久保 充明

日本国神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

(72)発明者 細野 直哉

日本国神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 特開2010-104360(JP,A)

特開2009-261358(JP,A)

特開2012-187082(JP,A)

Human Molecular Genetics, 2011年, Vol.20, No.5, pp.1034-1041

N. Engl. J. Med., 2011年, Vol.364, pp.1134-1143

RIKEN NEWS, 2011年, No.361, pp.2-5

Pharmacogenetics and Genomics, 2010年, Vol.20, pp.630-633

Pharmacogenetics and Genomics, 2012年 3月, Vol.22, pp.441-446

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/00 - 3/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)