

ワークショップ：ゲノム医療の時代を迎えて；臨床検査技師の未来予想図を描く

## 研究と臨床をつなぐ遺伝子検査： 新規検査法の構築と既存検査法の改良

平 千明\*<sup>§</sup> 松田和之\*

**要旨** 本稿では、遺伝子検査の臨床応用に向けた研究と技術改良の取り組みを紹介する。著者らは、急性白血病に対する塩基特異的定量 PCR (AS-qPCR) による微小残存病変 (MRD) 検出法の構築、同種造血幹細胞移植におけるキメリズム検査の改良、企業との共同研究による高速 PCR 技術の開発など、臨床ニーズに即した検査法の実装を進めてきた。さらに教育面では、PCR 実習や検査結果の解釈指導を通じて、次世代の臨床検査技師育成にも注力している。AI 技術や遠隔診断の進展により、臨床検査技師は新たな検査手法の導入やデータ解釈支援を通じて、研究と臨床の橋渡し役としての役割が一層求められている。

**キーワード** 微小残存病変 (MRD)、塩基特異的 PCR (AS-qPCR)、キメリズム解析、高速 PCR 技術、遺伝子検査教育、臨床検査技師の役割

### はじめに

臨床検査の中で遺伝子検査は、自施設内で独自に開発・実施されるインハウス検査の割合が高く、特定の疾患や研究目的に応じて柔軟に臨床応用がなされてきた分野である。著者らも信州大学医学部附属病院臨床検査部遺伝子・染色体検査室に在職中、臨床各科からの要望に応えるために新規検査法の構築や、効率化・コスト削減を目的とした既存の検査法の改良を行ってきた。本稿では、これまでに臨床応用を目指して実施してきた研究内容について紹介する。

#### I. 造血器腫瘍における微小残存病変の検出

急性骨髄性白血病をはじめとする造血器腫瘍では、ゲノム変異研究が進展しており、2017 年版以降の WHO 分類では遺伝子異常や染色体異常が

病型定義に組み込まれている。特に、Fms-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*)・CCAAT/enhancer-binding protein alpha (*CEBPA*)・KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (*KIT*)・Tumor protein p53 (*TP53*)・Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (*NRAS*) などの遺伝子において点変異が高頻度で認められる。

化学療法後の治療反応性の確認や同種造血幹細胞移植後の再発予測や予後判定のために、遺伝子レベルでの微小残存病変 (Minimal Residual Disease, MRD) の追跡は非常に重要である。そこで著者らは、一塩基変異を指標とした定量 PCR 法である塩基特異的定量 PCR (allele specific-quantitative polymerase chain reaction, AS-qPCR) を構築し、MRD 検出系の検討を行った。

AS-qPCR 構築にあたっては、プライマーの 3' 末端に mismatches 塩基を導入したり、LNA

\* 信州大学学術研究院保健学系 <sup>§</sup> tairacha@shinshu-u.ac.jp

(Locked nucleic acid) で修飾することで特異性を高めつつ、感度低下を最低限におさえる設計を行った。その結果、キメラ遺伝子検出と同等、あるいはそれ以上に早期の再発兆候を捉えることが可能な、定量性の高い AS-qPCR の構築に至り、変異塩基特異的かつ高感度な MRD 検出を実現した (図 1)<sup>12)</sup>。

また、従来の免疫関連遺伝子再構成 PCR は感度が約 10% と低く、定量性も乏しかったが、B 細胞系と骨髄系の両方の特徴を持つ小児の急性二系統性白血病症例においてモノクローナル遺伝子配列を同定し、特異的配列に基づくプライマーを設計することで、単独の定量 PCR 検査法を構築し、MRD の定量評価を可能にした<sup>3)</sup>。

いずれの手法も、染色体異常以外の遺伝子異常をターゲットとした MRD 検出方法として臨床に貢献した。

## II. 同種造血幹細胞移植のための キメリズム検査の改良

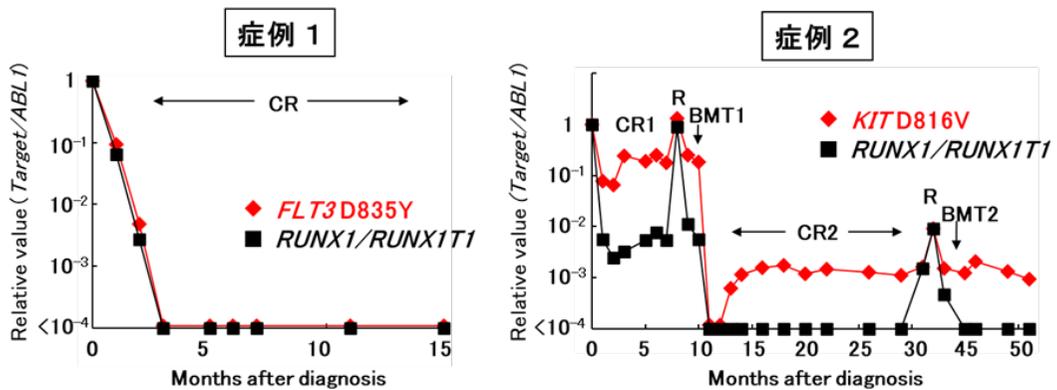
キメリズム解析は同種造血幹細胞移植においてドナー/レシピエント比率を数値定量化する手法であり、生着確認や再発予測に重要な役割を果たす。一般的には、ゲノム DNA 上の多型領域、特に short tandem repeat (STR) 領域を用いた STR-PCR 法が、簡便かつ高感度な方法として広く用

いられている。しかし、STR-PCR は非特異的増幅産物や、STR 領域の長さに依存した増幅効率のばらつきといった課題があり、改良の余地があった。

移植前検査では、ドナー/レシピエント識別のための複数領域のスクリーニングを従来の single-PCR から multiplex-PCR 法に改良し、検査時間の短縮と試薬コスト削減に貢献した<sup>4)</sup>。移植後検査では、一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNP) を指標とし、AS-qPCR によるレシピエント由来 DNA の定量解析法の開発を行い、従来の STR-PCR 法よりも高感度であることを証明した<sup>5)</sup>。改良した移植前スクリーニング検査法は院内検査として導入されている。

## III. 企業との共同研究における PCR 技術の開発

セイコーエプソン株式会社が開発した液滴型 PCR 装置を用い、臨床応用を目指した産官学連携による共同研究を実施した。本装置は、反応液入りチューブを低温・高温間で回転させることで遺伝子を増幅する原理を採用しており、高い熱伝導性に加え、リアルタイム定量評価が可能な蛍光測定機能を備えている。インフルエンザウイルスの検出では 30 分以内<sup>6)</sup>、SNP 検出は 10 分以内という迅速な検出を実現した<sup>7)</sup>。この SNP を指標



CR; complete response, R; relapse, BMT; bone marrow transplantation, *FLT3*; Fms-like tyrosine kinase 3, *KIT*; *KIT* proto-oncogene, receptor tyrosine kinase, *ABL1*; *ABL* proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase.

図 1 塩基特異的定量 PCR とキメラ遺伝子定量 PCR による MRD 検出の比較

	現行法	改良法①	改良法②
<b>移植前スクリーニング</b>			
• 検査法	Single STR-PCR +フラグメント解析	Multiplex STR-PCR +フラグメント解析	Droplet AS-qPCR
• 識別率	68.3%	92.7%	95%
• 検査時間	約7時間+ $\alpha$ (310 Genetic Analyzer使用時) $\alpha$ ; 識別不良の場合は別領域で 再試行	約5時間 (310 Genetic Analyzer使用時) 約4時間 (3500 Genetic Analyzer使用時)	10分以内
<b>移植後定量評価</b>			
• 検査法	Single STR-PCR +フラグメント解析	Single STR-PCR +フラグメント解析	AS-qPCR
• 定量性	$\Delta$ (半定量)	$\Delta$ (半定量)	○
• 検査時間	約4時間	約4時間	約1.5時間

STR-PCR; short tandem repeat polymerase chain reaction, AS-qPCR; allele specific quantitative polymerase chain reaction.

図2 キメリズム検査の改良

とした迅速検出法は、移植前キメリズム検査のドナー/レシピエント識別や ABO ジェノタイプニングにも展開可能であった<sup>5)8)</sup>。

臨床導入には至らなかったが、SNP を用いた検出系は移植後キメリズム検査への導入可能性を有しており、STR-PCR よりも定量性に優れ、検査工程の大幅な短縮が期待される(図2)。

#### IV. 遺伝子検査の現状

信州大学医学部附属病院臨床検査部遺伝子・染色体検査室では、染色体検査を中心に遺伝子検査をルーチン検査として早期に導入・実施してきた。近年、ゲノム解析技術の進展に伴い一般病院での染色体検査は縮小傾向にあるが、現在も G-banding を継続しており、保険収載により拡充された遺伝子検査とともに、がんゲノムエキスパートパネル関連業務にも従事し、幅広く臨床に貢献している。

次世代シーケンスによるハイスループット検査が診断・治療選択に不可欠となり、膨大なデータの解釈や検査説明が求められる一方で、臨床現場で必要とされる遺伝子検査技術は、サーマルサイクラーによる PCR、ゲル電気泳動、リアルタイム PCR、キャピラリーシーケンスなどが主流であり、今後も大きな変化はないと考えられる。

そのため、著者らは信州大学医学部保健学科検



図3 学内での手動 PCR 実習の風景

査技術科学専攻において、3年次の遺伝子検査技術学実習で核酸抽出および PCR などの基礎技術を重視し、各種データベースの活用法、偽陽性・偽陰性・コンタミネーションの回避など、検査結果の解釈に関する教育を行っている。恒温槽を用いた手動 PCR 実習では、PCR の原理を体験的に学ぶ機会を提供している(図3)。

#### おわりに

ゲノム医療によって疾患の診断が確定した後は、治療効果の判定や再発予測を目的とした個別化医療へと移行する。その過程において、これまで著者らが実施してきたルーチン検査に関連する研究は、臨床応用に直結する機会が多く、極めて

有用な取り組みである。今後も、臨床検査技師が研究と臨床をつなぐ橋渡し役を担うことは間違いなく、その役割はますます重要になると考えられる。さらに、AIの活用、ウェアラブルデバイスの導入、遠隔診断の拡充といった次世代技術と融合した検査環境の中で、最新技術を柔軟に取り入れながら研究を推進し、臨床検査技師としての付加価値を高めていくことが、臨床現場におけるさらなる活躍につながると期待される。

#### 文 献

- 1) Taira C, Matsuda K, Saito S, Sakashita K, Sugano M, Okumura N, et al. Application of allele-specific quantitative PCR using genomic DNA to monitor minimal residual disease based on mutant gene levels following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies: comparison of mutant levels with autologous DNA percentage by short tandem repeat-PCR. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 516-9.
- 2) Taira C, Matsuda K, Kamijyo Y, Sakashita K, Ishida F, Kumagai T, et al. Quantitative monitoring of single nucleotide mutations by allele-specific quantitative PCR can be used for the assessment of minimal residual disease in patients with hematological malignancies throughout their clinical course. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 53-8.
- 3) Saito S, Taira C, Matsuda K, Yanagisawa R, Morita D, Shigemura T, et al. Complete measurable residual disease response after combination chemotherapy with AML-type and ALL-type regimens in pediatric B/myeloid acute bilineal leukemia. *Leuk Lymphoma* 2020; 61: 967-70.
- 4) 平 千明, 松田和之, 竹澤由夏, 伊藤俊朗, 石田文宏, 日高恵似子, その他. キメリズム解析における multiplex short tandem repeat (STR)-PCR法の検討と検査材料の評価. *臨床病理* 2011; 59: 24-30.
- 5) Taira C, Matsuda K, Yamaguchi A, Uehara M, Sugano M, Okumura N, et al. Rapid single nucleotide polymorphism based method for hematopoietic chimerism analysis and monitoring using high-speed droplet allele-specific PCR and allele-specific quantitative PCR. *Clin Chim Acta* 2015; 445: 101-6.
- 6) Matsuda K, Yamaguchi A, Taira C, Sueki A, Koeda H, Takagi F, et al. A novel high-speed droplet-polymerase chain reaction can detect human influenza virus in less than 30 min. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1742-5.
- 7) Taira C, Matsuda K, Yamaguchi A, Sueki A, Koeda H, Takagi F, et al. Novel high-speed droplet-allele specific-polymerase chain reaction: application in the rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Clin Chim Acta* 2013; 424: 39-46.
- 8) Taira C, Matsuda K, Takeichi N, Furukawa S, Sugano M, Uehara T, et al. Rapid ABO genotyping by high-speed droplet allele-specific PCR using crude samples. *J Clin Lab Anal* 2018; 32: e22196.