

ワークショップ2

次世代シークエンサーと検査の進歩

東 史啓(日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター)

【DNAシークエンサーとは】

DNA配列決定法である「シークエンシング」の基礎原理は1970年代に発明された。1983年にはPCRによる遺伝子增幅法が発明、さらに1986年に最初の自動配列決定装置(DNAシークエンサー)が発売され、世界中の研究室に普及した。2003年にはヒト個人が持つすべての遺伝子情報(ゲノム)を解読する「ヒトゲノムプロジェクト」が実現したが、当時は30億ドルとも言われるコストと10年以上の期間を費やした。莫大な時間とコストによりこのヒトゲノムシークエンスが実現できたが、現在はより高速に大量の塩基配列解読を可能とする「次世代シークエンサー(NGS)」が開発されたことで、1,000ドルかつ10日ほどで実施できるようになった。

【次世代シークエンサー(NGS)とは】

NGSは、第一世代と呼ばれるSanger法と比較して①大腸菌によるクローニングやPCRを必要としない②電気泳動を行わず、超精密・微細構造デバイス内で高速な配列決定を行う③大量同時並列処理によって膨大なデータを短時間で取得するといった特徴を有し、1回の稼働で3兆(3×10^{12})文字分(広辞苑約20万冊分)ものDNA配列を決定できる装置も存在する(2018年時点)。一方、最新型の第四世代(Oxford Nanopore社MinION)では手掌に載る程度のデバイスの小型化と、ノートパソコンで塩基配列決定を可能とする程、進化している。ベッドサイドでのシークエンスなど、医療現場で活躍する日も近いと期待される。

【血液事業研究とNGSの関わり】

①骨髄登録者HLA型タイピング検査へのNGS導入の検討

日本赤十字社は造血幹細胞提供支援機関として、骨髄提供希望者の登録業務およびHLA型検査(タイピング)を行っている。HLA型には個々人で著

しい多型が存在し、移植成績の向上のためには正確なタイピングが必須であるが、現在の一次検査(蛍光ビーズ法)および二次検査(第一世代シークエンス法)ではHLA遺伝子内でとくに多型性に富んだ一部の領域のみを確認しているため、型決定の最終候補が複数存在するという曖昧さ(アンビギュイティ)が生じるという課題が残る。NGSでは対象としているHLA遺伝子領域の全長の配列を決定することで、このアンビギュイティ問題を大幅に解消できることに加え、これまで未確認だったイントロンなど発現調節領域の配列も決定できることから、より高い移植適合者の検索に有用となるデータが得られる。しかし現時点では、型判定時にリファレンス参照するHLA全長の配列情報が不足しているという問題があるため、中央血液研究所研究開発部によって日本人HLA配列データベースの充実と、骨髄登録検査に求められる性能をもつNGS-HLAタイピングシステムの開発に関する研究が2012年より続けられてきた。また、関東甲信越ブロックセンター検査部では、臍帯血移植症例においてNGSを用いた広範囲な組織適合性遺伝子群の適合性を追加解析することにより、現在の移植ドナー適合検査に含まれていない遺伝子群が成績に影響している可能性を検証している。

②CD36遺伝子の変異解析および抗Nak^a抗体産生との関連調査

CD36分子は血管内皮細胞や心筋、単球/マクロファージ、血小板など多くの細胞に発現している抗原だが、まれに欠損者が存在し、この抗原に対する抗Nak^a抗体を産生することがある。抗Nak^a抗体は血小板輸血不応(PTR)や輸血後肺障害(TRALI)、新生児血小板減少症(NAIT)の原因となるなど、輸血臨床で重要な因子であるが、欠損および抗体産生の機序はまだ不明な点がある。中央血液研究所研究開発部ではこのCD36遺伝子の解析にNGSを利用し、重篤な輸血副作用の原因

となり得る高力価の抗体産生者に共通する遺伝子変異を見出した。現在、非翻訳領域を含む遺伝子全長まで対象を広げて解析を続けている。

③ハプトグロビン低発現者にみられた新たな遺伝子変異の発見

血漿タンパクの一つであるハプトグロビン(Hp)はまれに欠損者が存在し、輸血副作用の原因となり得る。日本人集団では欠損者は通常、Hp遺伝子に大規模な配列欠失を生じているが、抗原発現がないか低い献血者の中にこの欠失を持たない例があり、Hp欠損の原因には未確認の変異が存在することが示唆された。中央血液研究所研究開発部では正常型 Hp 遺伝子を持ちながら抗原量低値を示した献血者の Hp 遺伝子と周辺領域を NGS を用いて網羅的に解析し、欠損あるいは低発現の原因とみられる 2 つの遺伝子変異を見出した。今後、Hp 欠損献血者を確実に選択するために、こうした原因変異の同定は重要である。

④HBV 多検体同時全ゲノムシークエンシング、Subgenotype の同定法の開発

HBV Genotype/Subgenotype の差による臨床経過の違いがあることから、その正確な検出と型判定は臨床上重要である。また、輸血後感染が疑われる症例において、感染経路を同定するために被疑製剤中のウイルスの有無ならびに Genotype/Subgenotype の同定が必要である。中央血液研究所感染症解析部では NGS を用いた多検体同時ゲノムシークエンシングと Subgenotype 法を開発し、本大会の口演(O-051)にて報告した。多検体をそれぞれバーコード標識後に pooling して解析することで、時間やコストの削減ができたことに加え、従来の第一世代シークエンサーでは検出できなかった、混合感染試料からの微量 Subgenotype の同定に成功している。

【今後の血液事業への展望】

NGS では従来型検査のような特定領域の配列解析だけでなく、インtron や非翻訳領域を含む遺伝子全長、さらに複数遺伝子の同時解析が可能であることから、骨髄登録者 HLA 検査への導入により、より詳細なドナー／患者間の適合性の確認が可能となり、移植成績の向上に寄与すると期待される。2019 年度中には NGS が登録者二次検査の HLA シークエンスタイピングに導入される予定で

ある。

その高度な網羅性から、NGS で一括解析した献血者の抗原情報のデータベース化への応用も考えられる。抗原検査は血清学的手法による解析が主流だが、血清学検査だけでは判断が難しい抗原についてでは遺伝子検査が適する場合がある。現在はコスト・スピード共に血清学的検査が優れているが、今後さらに技術革新が進めば、赤血球型・血小板型・HLA 型・血漿タンパクなど、輸血医療上有用な献血者抗原情報を 1 回の検査で迅速かつ低成本で網羅的に得ることが可能となり得る。献血者抗原情報をデータベース化しておくことで、まれな血液型の候補者検索や輸血副作用発生時の原因探索の一助となることが期待される。

加えて、抗体発現細胞や iPS 細胞などの遺伝子改変技術によって作製した細胞株についても、継代培養中の変異や分化異常の確認のため、導入した遺伝子の挿入部位や目的形質の発現遺伝子領域のシークエンシングによる品質管理への利用も考えられる。

また、土壤中や腸内細菌叢などに含まれる、複雑かつ多様な生物を網羅的に解析するメタゲノム解析も、NGS では可能である。製剤中の汚染原因となる細菌類は主に培養により同定されるが、培養や遺伝子増幅工程を行わず NGS で網羅的な解析を行うことで、バイアスのない含有微生物の同定が可能となる。ウイルスの検出でも遺伝子増幅が実施されているが、NGS を用いることにより増幅工程を必要としない微量含有ウイルスの同定や、混合感染試料からの高感度検出などが可能となる。これにより、製剤中に存在する病原体の高感度検出や感染経路の特定など、血液製剤の品質向上に寄与することが期待される。

【まとめ】

遺伝子検査技術の進歩は目覚ましく、次世代シークエンサーの登場と改良によりヒトの全ゲノム配列が数日で得られる時代が到来した。血液事業においても、主に中央血液研究所で研究ツールとして利用され、新規知見が得られている。検査時間やコスト、精度面での改善がさらに進めば、献血者抗原型の網羅的解析による情報一元登録や、輸血感染症／副作用の原因究明、製剤の品質管理など、強力な技術として血液事業に貢献することが期待される。