

ミニ・レビュー —小西賞受賞者—

新規DNAマイクロアレイを用いた迅速かつ
高感度なUGT1A1遺伝子多型の検出

恒富亮一

山口大学大学院医学系研究科消化器・腫瘍外科学(外科学第二) 宇部市南小串1丁目1-1(〒755-8505)

Key words : DNAマイクロアレイ, 体外診断用医薬品, イリノテカン, 多型, 精密医療

和文抄録

近年のヒトゲノム解析における発展は、精密で個別化された医療の可能性を大いに高めてきた。我々は精密医療実現のために、体外診断用医薬品の遺伝子解析技術として、DNAマイクロアレイを新規に開発した。本技術は、PCR法と核酸ハイブリダイゼーション法を組み合わせた方法であり、目的塩基配列のPCR法による増幅・蛍光標識と3mm角のDNAチップ上に固定化されたDNAプローブとの特異的ハイブリダイゼーション反応とを組み合わせた方法を採用している。また、チップ表面をdiamond-like carbon層にて処理することでシグナル/ノイズ比を向上させた。性能評価として、抗がん剤イリノテカンの重篤な毒性と有意に関連し、検査対象となっているUGT1A1*28及びUGT1A1*6遺伝子多型をヒト臨床検体を用いて測定した。比較として既存法の直接シーケンシングとインベーターアッセイを併せて実施した。本技術と既存法との測定一致率は100%であった。一塩基置換であるUGT1A1*6、TAリピートであるUGT1A1*28に加えて、一塩基挿入/欠失を含む他のUGT1A多型も同時に精確な判定が可能であった。処理時間(1.5倍以上の短縮)や必要検体量(20分の1以下)はインベーター法と比べて優れていた。本技術によって、遺伝子多型や変異を複数同時に迅速かつ正確に測定でき、臨床現場での省力・効率や信頼性の向上が期待される。

令和2年10月15日受理

はじめに

UDPグルクロン酸転移酵素(UDP-glucuronosyltransferase; 以下UGT)は肝臓にて発現するグルクロン酸抱合を担う代謝酵素であり、抗がん剤として世界で幅広く投与されているイリノテカン塩酸塩水和物の代謝酵素としても知られている¹⁾。イリノテカン塩酸塩水和物はプロドラッグであり、生体内で発現するカルボキシエステラーゼによって加水分解され、強い抗がん作用を有する活性代謝物(SN-38)を生じる¹⁻¹⁰⁾。このSN-38は肝臓に発現するUGTによってグルクロン酸抱合を受け、抗がん作用のない非活性代謝物(SN-38G)となり体外へ排出される¹⁾。SN-38の抗がん作用は副作用として白血球減少、好中球減少や下痢などを引き起こすため¹¹⁾、イリノテカンの薬物動態を事前に予測することはその投与量の決定において非常に重要である。

UGTをコードするUGT遺伝子群には、UGT活性や発現量に影響する遺伝子多型が多く存在する¹²⁾。特に、2箇所の遺伝子多型(UGT1A1*28, UGT1A1*6)については、いずれかがホモ接合型(UGT1A1*28(TA7/TA7)またはUGT1A1*6(A/A))またはこれらの複合ヘテロ接合型(UGT1A1*28(TA6/TA7)かつUGT1A1*6(G/A))である患者の場合、SN-38からSN-38Gへの変換の遅延により、上記のような重篤な副作用を引き起こす事が知られている^{2-9, 13-16)}。従って、イリノテカン塩酸塩水和物の投与を予定する患者には、

予めUGT1A1*28ならびにUGT1A1*6の遺伝子多型測定により、イリノテカン塩酸塩水和物の投与量を決定することが、臨床において推奨されている。

今回、微量のDNA試料からDNAマイクロアレイ法を用いて、UGT1A1*28(2塩基の繰り返し多型)ならびにUGT1A1*6遺伝子多型(一塩基多型; SNP)を同時に検出する新規検査システムの有用性について報告する。

方 法

1. 対 象

山口大学医学部附属病院にて同意を得た健常人ボランティア3名(sample A-C)及び大腸がん患者111名を対象とし、EDTA加全血検体を採取した。QIAamp DNA Blood Mini Kit(sample A-C; キアゲン株式会社, 東京, 日本)及びヨウ化ナトリウム法(大腸がん患者251名)によって、ゲノムDNAを抽出・精製し、DNA試料溶液を得た^{17, 18)}。

2. 遺伝子多型検査

2-1. DNAマイクロアレイ法

DNAマイクロアレイ法として、ジーンシリコンDNAチップキットUGT1A1(東洋鋼板株式会社, 東京, 日本)を使用した¹⁷⁾。蛍光標識プライマーを用いてDNA試料のUGT1A1*28対象領域及びUGT1A1*6対象領域を増幅した¹⁷⁾。標識反応で得た反応液をハイブリダイゼーション緩衝液と共にDNAチップへの1時間のハイブリダイゼーション反応に供した後、未反応DNAを洗浄除去した。遺伝子検査システムBIOSHOT(東洋鋼板株式会社)を用いて、DNAチップ上の各スポットにおける蛍光強度を測定した(励起光; 640nm, フィルター; 660nm)。各検出スポットにおける蛍光強度値から、BIOSHOT組込ソフトウェアにより、UGT1A1*28ならびにUGT1A1*6の遺伝子多型判定を行った¹⁷⁾。

2-2. 対照試験

UGT1A1プロモーター領域のTAリピートの数(UGT1A1*28)は、フラグメントサイズ分析とそれに続くダイレクトシーケンシングによって決定された^{19, 20)}。加水分解プローブを使用したTaqMan手法を使用して、UGT1A1*6遺伝子多型を決定した

²¹⁾。同様に、加水分解プローブを使用してUGT1A1*60遺伝子多型を決定した。UGT1A7(387T>Gおよび622T>C)、およびUGT1A9*1b遺伝子多型を決定するために、直接シーケンシング法が使用された。上記に加えて、インバーダーUGT1A1分子アッセイ(積水メディカル, 東京, 日本)を実施した²²⁾。

3. 評価項目

DNAマイクロアレイ法と他法との遺伝子多型検査結果の相関性、所要時間、DNAマイクロアレイ法における測定試料の保存、凍結融解による影響を検討した。凍結融解操作は-20°Cでの凍結と室温での融解を繰り返して行った。

結 果

1. 所要時間

我々のDNAマイクロアレイ法では、蛍光標識PCR反応に約90分、蛍光標識PCR産物のハイブリダイゼーションに約60分を要した(表1)。ハイブリダイゼーション後、遺伝子型の測定に約15分を要し、抽出されたゲノムDNAから遺伝子型情報を取得するまでの合計所要時間は合計で約165分であった。一方、インバーダー法では、添付文書に従って抽出されたゲノムDNAから遺伝子型情報を取得するのに約250分を要した。

2. 相関性

末梢血検体(EDTA加全血試料; N=111)を用いて、DNAマイクロアレイ法とインバーダー法との相関性試験を行った。インバーダーUGT1A1アッ

表1 検査所要時間の比較

Our focused DNA microarray		the Invader assay	
Process	time (min)	Process	time (min)
PCR	90	Pre-heating at 95 °C	5
Hybridization at 56 °C	60	Incubation at 63 °C	240
Wash & Detection	15	Cooling & Detection	5
Total	165 [†]	Total	250 [†]

†我々のDNAマイクロアレイは、インバーダー法よりも約1.5倍速く結果を得ることができた。本表は引用文献17からの引用である。

セイ法での検出結果との一致率は、*UGT1A1*28* ならびに *UGT1A1*6* 遺伝子多型それぞれ 111/111 (100.0%) と 110/111 (99.1%) であった (図 1)。*UGT1A1*6* における 1 例の相違においては、DNA マクロアレイ法での結果はサンガーシーケンス法と一致 (G/A) していた一方、インバーダー法では判定不能であった。インバーダー法において判定不能であったサンプルは、DNA マイクロアレイでは 0.2ng/アッセイが使用され、インバーダー法では 85ng/アッセイが使用された。残りの 110 サンプルにおける使用 DNA 量は、DNA マイクロアレイの場合は 5.3–60.8ng/アッセイ (平均 12.4ng/アッセイ)、インバーダー法の場合は 420–4870ng/アッセイ (平均 994ng/アッセイ) であった。

3. 測定試料の状態が及ぼす影響

3-1. 採取血液試料の保管期間

健常人ボランティア 3 名から採取した EDTA 加全血試料について、一部を採血直後にゲノム DNA 試料を調製し、また、 -20°C で 22 日間、 12°C で 15 日間、および 32°C で 8 日間保管した後もゲノム DNA 試料を調製した。これらのゲノム DNA 試料を

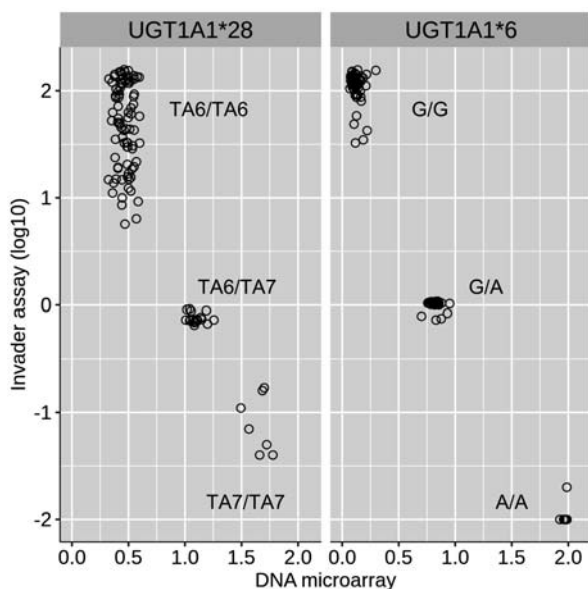


図 1 DNA マイクロアレイ法とインバーダー法との相関性試験

X 軸に示される DNA マイクロアレイからの判別値は、引用文献 17 に従って計算された。Y 軸はインバーダー法から得られた判別の \log_{10} を示す。111 症例についての相関がプロットされた。*UGT1A1*6* において、インバーダー法では 1 例が判別不能を示した。

用いて DNA マイクロアレイ法による *UGT1A1*28* 及び *UGT1A1*6* 遺伝子多型を測定した。試験した全ての条件において、対照試験であるサンガーシーケンス法と同一の遺伝子多型が示された (表 2)。

3-2. DNA 試料の凍結融解

凍結融解操作 0 回と 20 回のゲノム DNA 試料 (3 名の健常人ボランティア由来) を用いて、DNA マイクロアレイ法により *UGT1A1*28* 及び *UGT1A1*6* 遺伝子多型を測定した結果、全ての試料において凍結融解にかかわらず対照試験であるサンガーシーケンス法と一致した遺伝子多型判定結果が得られた (表 3)。

表 2 採取血液試料の保管期間の影響

	Storage condition		Results of Genotype [†]	
	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Period (days)	<i>UGT1A1*28</i>	<i>UGT1A1*6</i>
Sample A	RT	0	TA ₆ /TA ₇	G/G
	32	8	TA ₆ /TA ₇	G/G
	12	15	TA ₆ /TA ₇	G/G
	-20	22	TA ₆ /TA ₇	G/G
Sample B	RT	0	TA ₆ /TA ₇	G/G
	32	8	TA ₆ /TA ₇	G/G
	12	15	TA ₆ /TA ₇	G/G
	-20	22	TA ₆ /TA ₇	G/G
Sample C	RT	0	TA ₆ /TA ₆	G/G
	32	8	TA ₆ /TA ₆	G/G
	12	15	TA ₆ /TA ₆	G/G
	-20	22	TA ₆ /TA ₆	G/G

†サンガーシーケンスによって得られた遺伝子多型とすべて一致していた。

表 3 DNA 試料の凍結融解の影響

	Freeze-thaw cycles	Results of Genotype [†]	
		<i>UGT1A1*28</i>	<i>UGT1A1*6</i>
Sample A	0	TA ₆ /TA ₇	G/G
	20	TA ₆ /TA ₇	G/G
Sample B	0	TA ₆ /TA ₇	G/G
	20	TA ₆ /TA ₇	G/G
Sample C	0	TA ₆ /TA ₆	G/G
	20	TA ₆ /TA ₆	G/G

†サンガーシーケンスによって得られた遺伝子多型とすべて一致していた。

3-3. 蛍光標識DNA試料の凍結融解

凍結融解操作0回と5回の蛍光標識PCR産物を用いて、DNAマイクロアレイ法により *UGT1A1**28及

び *UGT1A1**6遺伝子多型を測定した結果、凍結融解回数にかかわらず対照試験であるサンガーシーケンス法と一致した遺伝子多型判定結果を得た(表4)。

表4 蛍光標識DNA試料の凍結融解の影響

	Freeze-thaw cycles	Results of Genotype [†]	
		<i>UGT1A1</i> *28	<i>UGT1A1</i> *6
Sample A	0	TA ₆ /TA ₇	G/G
	5	TA ₆ /TA ₇	G/G
Sample B	0	TA ₆ /TA ₇	G/G
	5	TA ₆ /TA ₇	G/G
Sample C	0	TA ₆ /TA ₆	G/G
	5	TA ₆ /TA ₆	G/G

†サンガーシーケンスによって得られた遺伝子多型とすべて一致していた。

4. 一塩基挿入/欠失を含む7つの*UGT1A*遺伝子多型の同時検出

我々はさらに、*UGT1A*遺伝子におけるその他の多型も同時に検出するDNAマイクロアレイも開発した。一塩基置換、TA反復配列に加えて、一塩基挿入/欠失を含む7カ所の遺伝子多型 [*UGT1A1**6 (211G>A, rs4148323), *UGT1A1**27 (686C>A, rs35350960), *UGT1A1**28(TA6>TA7, rs8175347), *UGT1A1**60 (-3279T>G, rs4124874), *UGT1A7* (-57T>G, rs7586110), *UGT1A9**1*b* (-118T9>T10, rs3832043, also called *UGT1A9**22)]を対象とし、140症例を用いて検証した。DNAマイクロアレイからの識別値は、全ての遺伝子多型を明瞭に判別した(図2)。

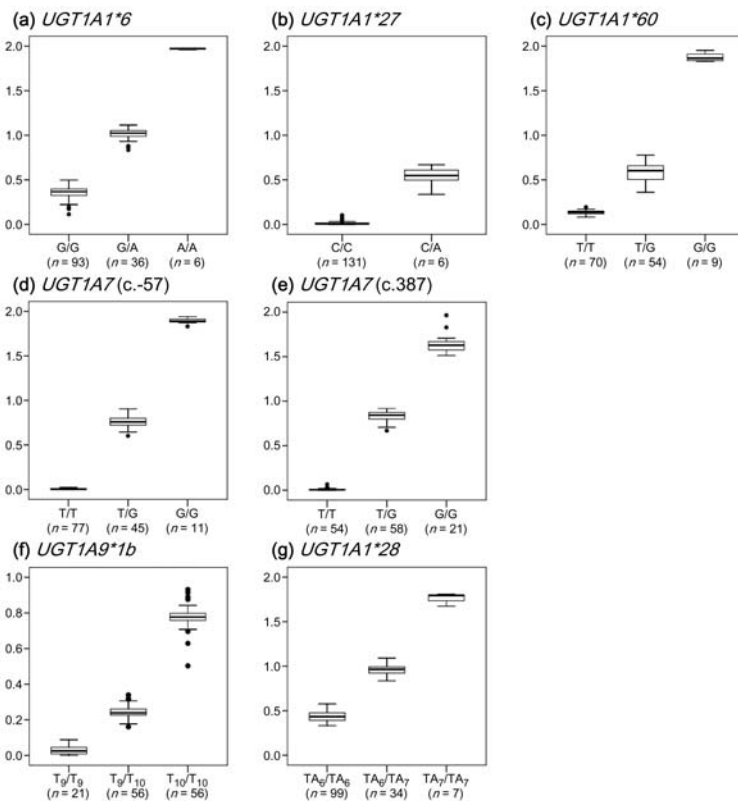


図2 7つの*UGT1A*遺伝子多型に対するDNAマイクロアレイの分離能

一塩基置換 (a~e)、一塩基挿入/削除 (f)、およびTAリピート (g) について、開発したDNAマイクロアレイを用いて解析した。X軸に示される判別値は、引用文献17に従って計算された。各*UGT1A*遺伝子多型の完全な分離が示された。この分析では133人からの試料が用いられ、*UGT1A1**6、*UGT1A1**28、*UGT1A1**27についてはそれぞれ2人、7人、4人からの試料が追加された。*UGT1A1**27のホモ接合体を示す資料は得られなかった。本図は引用文献17からの引用である。

考 察

UGT1A1遺伝子多型の検出法には、本邦では先発品としてインベーター法やサンガーシーケンス法が用いられている²³⁾。サンガーシーケンス法は塩基配列を読むスタンダードな検出法である。しかしながら、操作が比較的煩雑である点や多検体解析に不向きである点が欠点として挙げられる。インベーター法はPCR増幅を必要としない検出法であり、スループットに優れている。しかしながら、インベーター法は比較的大量のDNA試料が必要である。本検討のDNAマイクロアレイ法は、10ngのDNA試料からUGT1A1*28ならびにUGT1A1*6遺伝子多型を同時に精度よく検出できた。また、本検討の限りでは測定試料の保管条件や凍結融解の影響を受けないことが確認された。DNAマイクロアレイ法の試料として用いる末梢血検体は、32°C条件下（室温30°C+2°C）であれば8日間、12°C条件下（冷蔵10°C+2°C）であれば15日間、-20°C条件下（冷凍）であれば22日間の保管が可能であることが認められた。ゲノムDNA試料は18回の凍結融解操作により分解が見られた事例がある²⁴⁾。そこで、ゲノムDNA試料に対して凍結融解操作を20回繰り返して試験を行ったが、DNAマイクロアレイ法による検出結果に影響を及ぼさなかった。同様に蛍光標識産物における5回の凍結融解もマイクロアレイ法による検出結果には影響を及ぼさなかった。さらに、インベーター法でUGT1A1*6多型が1件「判定不能」であった試料においても、DNAマイクロアレイ法ではサンガーシーケンス法と同一の遺伝子多型が検出可能された。

現在、患者の治療方針決定において、生理学的状態や疾患の状態等に加えて、患者自身のゲノム情報やがん等の疾患部位に変異情報をも考慮したいいわゆる個別化医療（precision medicine）が進められている。個別化医療は、ファーマコゲノミクス（ゲノム薬理学）に基づいた分子標的薬の開発が中心となっている。がん治療における分子標的薬は、ある特定の分子（レセプター、シグナル伝達系等）を標的とした抗がん剤であり、既存抗がん剤（アルキル化剤、代謝拮抗剤等）と比較して、標的が明確であり、がん細胞特異的に作用する。しかしながら、分子標的薬の標的となる分子が存在しない場合には治療効

果は期待出来ない。従って、分子標的薬の投与においては、その標的分子の存在の有無を確認するためのコンパニオン診断薬による検査が重要である²⁵⁻²⁷⁾。遺伝子多型を検査対象としたコンパニオン検査薬は、大きく「効果予測」と「副作用予測」の2つに分けられる。UGT1A1遺伝子検査薬は、「副作用予測」に用いられており、その結果によって投与前の段階で抗がん剤イリノテカンの減量投与が推奨される。一方、「効果予測」を目的とした検査薬としては、大腸がん患者に実施されるRAS遺伝子検査薬や肺がん患者に実施されるEGFR遺伝子検査薬等が挙げられる。それぞれの検査結果に基づいて治療効果が期待されない場合に、治療前に他治療の検討が可能である。

本開発品は、PCR法と核酸ハイブリダイゼーション法を組み合わせた方法であり、目的塩基配列のPCR法による増幅・蛍光標識とDNAチップ上に固定化されたDNAプローブとの特異的ハイブリダイゼーション反応とを組み合わせた方法を採用している。また、チップ表面をdiamond-like carbon層にて処理することでシグナル/ノイズ比を向上させた²⁸⁾。そのため、インベーター法と比べ、1/140~1/40倍の微量なDNA量で遺伝子多型を測定できる。さらに、UGT1A1*28とUGT1A1*6以外の複数のUGT1A1遺伝子多型もイリノテカンの毒性と関連することが知られており、それらのイリノテカン治療前の測定は臨床的に有用である^{6, 9, 13, 14, 21)}。そこで、我々はUGT1A1*28及びUGT1A1*6を含めた7つの遺伝子多型に対するDNAプローブが1枚のチップに固定化され、それら全てを同時に測定することができるDNAマイクロアレイも開発した。本開発品において特筆すべきは、一塩基置換だけでなく、マイクロサテライトや一塩基の挿入/欠失も同時に正確に測定できる世界初のDNAチップである。上述のように、DNAマイクロアレイ法の特長は、同時に多種の遺伝子変異を解析できるところにある。RAS遺伝子には50種類以上^{29, 30)}、EGFR遺伝子には40種類以上の遺伝子変異が知られている³¹⁻³³⁾。このような多種の遺伝子変異の検査においては、DNAマイクロアレイ法やカスタムパネルと次世代型シーケンサーによるNGS法が有用である。

個別化医療は患者メリット（治療効果・副作用予測）だけでなく、社会的メリット（医療費削減）も

ある。今後、コンパニオン診断薬に加えてコンプリメンタリー診断薬の拡充において、簡便で正確度の高い遺伝子検査手法の開発が望まれる。DNAマイクロアレイ法は他法と比較して簡便で正確度も高い測定法であることから、遺伝子検査において有用と考えられる。

結 論

本検討により、抗がん剤イリノテカン投与に先立つ *UGT1A1* 遺伝子多型検査において、DNAマイクロアレイ法は現行法であるインベーター法およびサンガーシーケンス法と同等の性能が示された。また、現行法よりもより少ない試料で同時に複数の遺伝子多型を正確に測定出来ることから、検査時間の短縮化による臨床現場での省力・効率や信頼性を向上し、個別化医療に寄与すると期待される。

謝 辞

本研究開発は、東洋鋼鈹株式会社及び山口県の支援を受けたものである。東洋鋼鈹株式会社にて、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（薬機法）」に基づく認可（22800AMX00718000, 2016年12月12日）を受けて、体外診断用医薬品「UDPグルクロン酸転移酵素（*UGT1A1*）遺伝子多型キット（販売名：ジーンシリコンDNAチップキット*UGT1A1*）」として上市されましたこと感謝申し上げます。

長年にわたり、ご指導・ご鞭撻をいただいた岡正朗先生（山口大学学長）に深謝いたします。また、永野浩昭先生（山口大学大学院医学系研究科消化器・腫瘍外科学教授）、裕 彰一先生（山口大学医学部先端がん治療開発学教授）、岡山直子先生（山口大学医学部附属病院検査部）から多大なるご協力をいただきましたことに、心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 2001 ; 7 : 2182-94.
- 2) Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer : a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000 ; 355 : 1041-7.
- 3) Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000 ; 343 : 905-14.
- 4) Tournigand C, André T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer : a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 229-237.
- 5) Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors : camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* 2006 ; 6 : 789-802.
- 6) Han JY, Lim HS, Shin ES, et al. Comprehensive analysis of *UGT1A1* polymorphisms predictive for pharmacokinetics and treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer treated with irinotecan and cisplatin. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2006 ; 24 : 2237-44.
- 7) Boku N, Yamamoto S, Fukuda H, et al. Fluorouracil versus combination of irinotecan plus cisplatin versus S-1 in metastatic gastric cancer : a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol* 2009 ; 10 : 1063-9.
- 8) Hazama S, Nagashima A, Kondo H, et al. Phase I study of irinotecan and doxifluridine for metastatic colorectal cancer focusing on the *UGT1A1**28 polymorphism. *Cancer Sci* 2010 ; 101 : 722-7.
- 9) Hazama S, Mishima H, Tsunedomi R, et al. *UGT1A1**6, *1A7**3, and *1A9**22 genotypes predict severe neutropenia in FOLFIRI-treated mCRC in two prospective studies in Japan. *Cancer Sci* 2013 ; 104 : 1662-9.
- 10) Kanekiyo S, Hazama S, Kondo H, et al. UDP-glucuronosyltransferase (*UGT*) *1A1**28

- polymorphism-directed phase II study of irinotecan with 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) for metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2013 ; **33** : 3423-30.
- 11) 佐井君江, 澤田純一, 南 博信. 日本人がん患者のイリノテカン個別化治療実現に向けて: *UGT1A1*遺伝子多型 (*28及び*6) の意義について. *薬学雑誌* 2008 ; **128** : 575-84.
 - 12) Maruo Y, Iwai M, Mori A, et al. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2005 ; **6** : 91-9.
 - 13) Ando Y, Saka H, Ando M, et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity : a pharmacogenetics Analysis. *Cancer Res* 2000 ; **60** : 6921-6.
 - 14) Tsunedomi R, Hazama S, Fujita Y, et al. A novel system for predicting the toxicity irinotecan based on statistical pattern recognition with *UGT1A1* genotypes. *Int J Oncol* 2014 ; **45** : 1381-90.
 - 15) Okuyama Y, Hazama S, Nozawa H, et al. Prospective phase II study of FOLFIRI for mCRC in Japan, including the analysis of *UGT1A1**28/6 polymorphisms. *Jpn J Clin Oncol* 2011 ; **41** : 477-82.
 - 16) Hirata K, Nagata N, Kato T, et al. Prospective phase II trial of second-line FOLFIRI in patients with advanced colorectal cancer including analysis of *UGT1A1* polymorphisms : FLIGHT 2 study. *Anticancer Res* 2014 ; **34** : 195-201.
 - 17) Tsunedomi R, Hazama S, Okayama N, et al. Rapid and sensitive detection of *UGT1A1* polymorphisms associated with irinotecan toxicity by a novel DNA microarray. *Cancer Sci* 2017 ; **108** : 1504-9.
 - 18) Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, et al. Purification of genomic DNA From human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res* 1994 ; **22** : 1774-5.
 - 19) Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell* 2013 ; **153** : 17-37.
 - 20) Garraway LA. Genomics-driven oncology : framework for an emerging paradigm. *J Clin Oncol* 2013 ; **31** : 1806-14.
 - 21) Okayama N, Hamanaka Y, Suehiro Y, et al. Association of interleukin-10 promoter single nucleotide polymorphisms -819 T/C and -592 A/C with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005 ; **60** : 1525-9.
 - 22) Hasegawa Y, Sarashima T, Ando M, et al. Rapid Detection of *UGT1A1* gene polymorphisms by newly developed Invader assay. *Clin Chem* 2004 ; **50** : 1479-80.
 - 23) 中谷 中, 登 勉. ファーマコゲノミクス検査によるオーダーメイド医療の動向. *臨床検査* 2010 ; **54** : 1607-13.
 - 24) Shao W, Khin S, Kopp WC. Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreserv Biobank* 2012 ; **10** : 4-11.
 - 25) Olsen D, Jørgensen JT. Companion diagnostics for targeted cancer drugs - clinical and regulatory aspects. *Front oncol* 2014 ; **4** : 105.
 - 26) Myers MB. Targeted therapies with companion diagnostics in the management of breast cancer : current perspectives. *Pharmgenomics Pers Med* 2016 ; **9** : 7-16.
 - 27) Yoo C, Park YS. Companion diagnostics for the targeted therapy of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2015 ; **21** : 10948-55.
 - 28) Takahashi K, Tange M, Takai O, et al. DNA preservation using diamond chips. *Diam Relat Mater* 2003 ; **12** : 572-6.
 - 29) Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011 ; **2** : 344-58.
 - 30) Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012 ; **72** : 2457-67.
 - 31) Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR

mutations in lung cancer : Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004 ; 304 : 1497-500.

- 32) Frega S, Lorenzi M, Fassan M, et al. Clinical features and treatment outcome of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with uncommon or complex epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 32626-38.
- 33) O'Kane GM, Bradbury PA, Feld R, et al. Uncommon EGFR mutations in advanced non-small cell lungcancer. *Lung Cancer* 2017 ; 109 : 137-44.

Rapid and Sensitive Detection of *UGT1A1* Polymorphisms Associated with Irinotecan Toxicity by a Novel DNA Microarray

Ryouichi TSUNEDOMI

Department of Gastroenterological, Breast and Endocrine Surgery (Surgery II.), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Recent developments in the field of human genomics have greatly enhanced the potential for

precision and personalized medicine. We have developed a novel DNA microarray, using a 3-mm square chip coated with diamond-like carbon to enhance the signal-to-background ratio, for use as an in vitro diagnostic tool in precision medicine. To verify the genotyping effectiveness of this newly developed DNA microarray we examined UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (*UGT1A1*) polymorphisms in DNA extracted from patients with metastatic colorectal cancer. It is established that the polymorphisms of *UGT1A1*28* and *UGT1A1*6* are significantly associated with severe toxicity induced by the anti-cancer drug irinotecan. For each sample, the results obtained with the novel microarray platform were compared with those obtained using other, more established, methods, including direct sequencing and the Invader assay. The polymorphisms tested included a single nucleotide substitution (*UGT1A1*6*) and a TA-repeat polymorphism (*UGT1A1*28*), both of which were detected simultaneously and accurately using our method. Moreover, our method required 1.5-fold less time to assay and 20-fold less sample than those required by the Invader assay. In summary, our newly developed DNA microarray is more practical than established methods, and is at least as accurate ; this will increase the efficiency of polymorphism detection prior to diagnosis and the commencement of treatment, and can feasibly be applied in precision medicine.