

令和元年6月17日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10038

研究課題名(和文) 微量検体からの遺伝子変異診断による消化管間質腫瘍の新規治療戦略

研究課題名(英文) New strategies for treatment of the gastrointestinal stromal tumor by the high sensitivity DNA mutation diagnostic assay

研究代表者

萩原 信敏 (HAGIWARA, NOBUTOSHI)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：00328824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：消化管の粘膜下に発生する消化管間質腫瘍は、癌の診断と異なり臨床診断が非常に困難である。

正常細胞が混じったサンプル中に存在する消化管間質腫瘍が有する特定のDNA変異遺伝子変異を同定できる新たな手法を開発することを本研究の目的とした。

基礎実験にて様々な条件を検討した結果、特定の遺伝子変異を同定可能となる高感度の手法を開発できた。最終的に臨床検体から得られた微量な試料に、本手法を応用し消化管間質腫瘍の特定のDNA遺伝子変異の検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で微量な試料から抽出したDNAを用いて消化管間質腫瘍の特定の遺伝子変異をとらえることが可能となる高感度な変異遺伝子同定法を開発した。臨床診断困難な消化管間質腫瘍を旧来から行われていた顕微鏡検査による病理診断ではなく、DNA変異をとらえることで遺伝子による診断が可能となると考える。

本手法の臨床応用により消化管間質腫瘍の診断能向上が期待され、新たな消化管間質腫瘍の治療戦略に結びつけることが可能になると考える。

研究成果の概要(英文)：The gastrointestinal stromal tumor (GIST) arising under the mucosa has difficulty in clinical diagnosis unlike the diagnosis of the cancer. Aim of the research is to develop the new assay that can identify the specific DNA mutant of GIST in the mixed sample of tumor and normal cells.

After various condition tests by basic experiment, we developed high sensitivity assay that became able to identify specific mutation.

The assay was finally applied to a very small amount of samples obtained from the clinical specimen, and the specific DNA mutation in the gene of GIST was successfully detected by the assay.

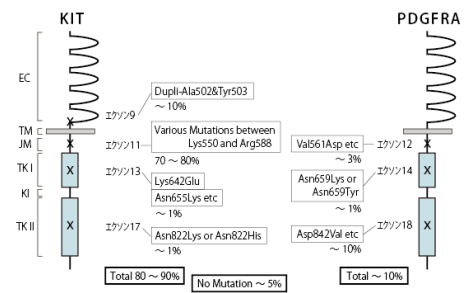
研究分野：消化器外科

キーワード：消化管間質腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor: GIST) は体細胞遺伝子変異が原因で発生する腫瘍であり、c-kit, PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor alpha) 遺伝子の機能獲得性突然変異が原因とされている (Hirota et al, Science 1998). GIST の 80 ~ 90% は c-kit 遺伝子, 残りの 10 ~ 20% には PDGFRA 遺伝子の突然変異が認められる. GIST は単一遺伝子変化のみで生じる腫瘍であり, ある特定領域のみに高頻度に突然変異が生じることが知られている (右図). 過去の GIST の遺伝子変異研究の成果から, 変異部位の違いにより悪性度や分子標的薬感受性が異なることが明らかになっている.



KIT 遺伝子 Exon11 は重要な変異遺伝部位であり, 特に codon557-558 変異は最も多く, 消化管のどこにでも見られ, 悪性度が非常に高いといった特徴を有していることが分かっている. 実臨床において従来腫瘍摘出前は GIST の確定診断が困難であったが, 近年の超音波内視鏡下穿刺吸引術による針生検 (EUS-FNA) の普及により, 粘膜下からの組織採取が可能となり治療前の GIST 診断能が向上した. しかし, EUS-FNA においても得られる試料が少なくまた正常細胞と混在するため, いまだに確定診断に難渋することが多い. また GIST の診断方法としては, 依然旧来から行われている顕微鏡検査での病理学的手法が主な方法である.

2. 研究の目的

本研究は GIST の特異的な変異遺伝子に注目して, 腫瘍特異的な変異遺伝子を分子生物学的手法にて検出することで, 新たな GIST の診断方法を開発することを目的とした.

消化管間質腫瘍 (GIST) は c-kit 遺伝子, PDGFRA 遺伝子の機能獲得性突然変異が原因とされ, その変異部位の違いにより臨床学的特徴が異なる. 特に c-kit 遺伝子 codon557-558 変異を有する GIST は非常に悪性度が高いことが知られている. 近年, 超音波内視鏡下穿刺吸引術 (EUS-FNA) の普及により GIST の診断率が向上したが, 得られる組織が少量で正常細胞も混在しているため腫瘍切除前に腫瘍由来の遺伝子変異検索を行うことは従来の分子生物学的手法を用いた塩基配列解析法では困難である.

経過観察可能とされている 2cm 未満の GIST でも半数以上に遺伝子変異を認めること, 急速増大をきたす可能性があることから, EUS-FNA などて採取した微量な生体組織を用いて遺伝子変異を初期に同定可能であれば予後予測や治療方針の決定に有用である.

高感度に変異 DNA を検出可能な手法を GIST の原因遺伝子変異である c-kit 遺伝子に応用して, 試料中にごくわずかに含まれるエクソン 11 の codon557-558 変異を同定できる手法を開発することで, 悪性度が高い遺伝子変異を有する GIST の早期診断や, 病理組織検査に頼らない様々な試料から得られた DNA からの遺伝子診断が可能となる.

本研究では高感度な変異遺伝子同定法を開発し, 微量な試料から抽出した DNA を用いて GIST の c-kit 遺伝子 codon557-558 変異をとらえ, GIST の予後診断や治療方針決定を初期治療前に判定することで, 新たな GIST の治療戦略に結びつける.

3. 研究の方法

KIT 遺伝子 codon557-558 領域の正常および変異配列を含んだコントロール DNA を別々に作製して, コピー数が分かる標準コントロールを作った.

作製したコントロール DNA を用いて変異の比率が分かっている検体を準備して, 既存の変異遺伝子解析法による codon557-558 変異の検出感度や精度の検討を行った.

新たな高感度変異遺伝子検出法の開発のため, 複数の手法による PCR 実験を行い最適な手法を検討した.

基礎実験の結果, PNA-LNA PCR clamp 法が高感度かつ特異的な検出系で, 臨床応用可能であることを確認した.

上記の手法を臨床検体に応用した. 当院で得られた GIST 検体組織を用いて PNA-LNA PCR clamp 法を行った.

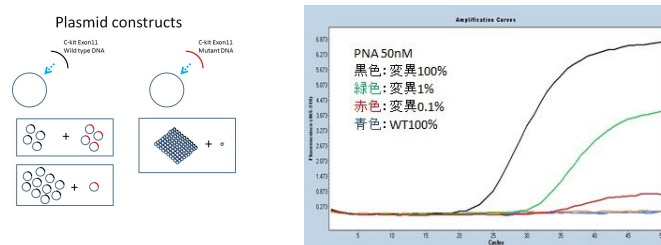
4. 研究成果

研究背景にも述べたように, 消化管の粘膜下に発生する消化管間質腫瘍は, 癌の診断と異なり臨床診断が非常に困難である.

正常細胞が混じったサンプル中に存在する消化管間質腫瘍が有する特定の DNA 変異遺伝子変異を同定できる新たな手法を開発することを本研究の目的として, DNA を増幅することで微量な検体からでも変異 DNA を同定可能である手法を研究した結果, 高感度かつ特異的である PNA-LNA PCR clamp 法を確立した.

基礎実験にて最適な条件を検討した後に、コピー数が分かる標準コントロールを用いて感度を検討したところ 0.1～0.05%の高感度の検出法であることが確認できた(下図)。最終的に臨床検体から得られた微量な試料に、本手法を応用したところ消化管間質腫瘍の特定の DNA 遺伝子変異の検出に成功した。

現在、当研究で得られた成果をまとめており、論文執筆中である。



5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

1. 萩原 信敏, 松谷 毅, 野村 務, 藤田 逸郎, 金沢 義一, 柿沼 大輔, 菅野 仁士, 新井 洋紀, 松野 邦彦, 寺崎 浩司, 太田 恵一郎, 内田 英二: 微量な消化管間質腫瘍検体からの高感度な特定変異遺伝子の検出 第15回日本消化器外科学会大会(第25回日本消化器関連学会週間JDDW)2017年11月

2 萩原 信敏, 松谷 毅, 野村 務, 藤田 逸郎, 金沢 義一, 柿沼 大輔, 菅野 仁士, 山下 直行, 寺崎 浩司, 太田 恵一郎, 内田 英二: Development of highly sensitive detection assay for the specific mutation of c-kit gene 第89回 日本胃癌学会 2017年3月

3 萩原 信敏, 松谷 毅, 野村 務, 藤田 逸郎, 金沢 義一, 柿沼 大輔, 菅野 仁士, 新井 洋紀, 牧野 浩司, 山下 直行, 寺崎 浩司, 太田 恵一郎, 内田 英二: 消化管間質腫瘍の特定遺伝子変異を標的とした高感度検出法の開発 第60回 日本消化器病学会大会(第24回日本消化器関連学会週間JDDW)2016年11月

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松谷 毅

ローマ字氏名：MATSUTANI Takeshi

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 50366712

研究分担者氏名：藤田 逸郎

ローマ字氏名：FUJITA Itsuo

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 10287740

(2)研究協力者：無し

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。