

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390359  
 研究課題名（和文）新規遺伝子変異検索技術 SMAP 法を用いた肺癌に対する網羅的診断治療体系の確立  
 研究課題名（英文）Clinical diagnosis and therapeutics for lung cancer by SMart Amplification Process (SMAP)  
 研究代表者  
 清水 公裕 (SHIMIZU KIMIHIRO)  
 群馬大学・医学部・助教  
 研究者番号：90375535

研究成果の概要：新規遺伝子変異検索技術 SMAP 法を用い、臨床検体を用いた EGFR 及び K-ras 変異検出の検証、パラフィン切片からの検出、摘出組織をそのまま鋳型とした検出系を検討した。また EGFR 変異検出システムの改良を行った。結果、検出限界は 1%未満であり、パラフィン切片からの診断もほぼ全例で可能であった。摘出組織をそのまま鋳型とした検出では、摘出から約 1 時間という超迅速診断の開発に成功した。EGFR exon19 変異検出においては PNA を応用することでほぼ全ての変異型を検出可能にした。以上のことより、SMAP 法は臨床現場での遺伝子診断に有用であることが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	4,200,000	1,260,000	5,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：癌、遺伝子、SMAP 法

## 1. 研究開始当初の背景

癌関連遺伝子に関する多くの基礎的研究を背景に、癌治療の現場も標準化から個別化へと移行してきている。特に肺癌においては上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子の変異と EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の効果が相関し、さらに K-ras 遺伝子の変異が存在する患者には EGFR-TKI が無効であるという報告がなされ EGFR 遺伝子や K-ras 遺伝子の変異解析は保険適応にまでなっている。また 2008 年の ASCO では大腸癌に対するセツキシマブ (抗 EGFR 抗体) の有効性

を検証した CRYSTAL 試験の結果が発表され、K-ras 遺伝子が正常型の大腸癌でのみ、セツキシマブが有効であることが証明された。日本人の肺腺癌においては約 40%-50% に EGFR の変異が認められ、EGFR-TKI の恩恵にあずかる可能性がある一方で、約 5%程度に重篤な副作用として間質性肺炎が発症したために、その保険適応の是非におよぶ訴訟も起きている。また、分子生物薬剤を用いた治療には EGFR-TKI にして月に約 20 万円、セツキシマブにして月に約 60 万円の費用がかかり、人によっては効果が期待できず、重篤な副作用

が発症する恐れがあるこれらの薬剤をやみくもに投与することは倫理的にも問題があり、医療経済にも大きな負担を与える。このような背景から、今後これらの投与を受ける場合は EGFR や K-ras の遺伝子変異解析を行うことが必要不可欠になる可能性が高い。したがって、現時点で最も重要な癌分野における研究は、これらの遺伝子変異を簡便、迅速、正確に解析できるシステムを開発し、送球に実地臨床に導入することである。これまでに EGFR の変異解析においては sequence 法、PNA-LNA PCR clamp 法、SARMS 法などの変異解析技術が開発され、臨床応用されている。しかし、いまだに K-ras に対する安定した変異解析法は確立されていない。さらに、上記の解析法は PCR 法の原理の応用であり、多くの時間、特別な装置や試薬を必要とする上、検査をすればするほど PCR や蛍光試薬、測定機器の特許料が外国に流れ国益にはならない。そこで近年、PCR に代わり得る新規技術 SMart Amplification Process (SMAP) 法が理化学研究所らのグループにより開発された。これは極めて高い精度と感度を持つことに加え、PCR 法とは異なり、60 度の等温条件下で解析できることから特別な装置を必要とせず、また解析操作も簡便なため、遺伝子診療の均填化にも貢献できる。また、本邦発の遺伝子解析技術でもあることから、早急な実地臨床応用が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究にて新規迅速遺伝子診断技術 SMAP 法の臨床現場での有用性の検証、実地臨床応用に向けた既存キットの改良を行い、実地臨床への応用を進める。また、主として摘出組織はパラフィンを用いて固定し、保管されることが多いが、一方でパラフィン固定処理の過程にてサンプル中 DNA が断片化されるため、PCR 法を用いた既存の技術ではこれらのサンプルから遺伝子診断を行うことが難しく、臨床現場での問題点とされていた。そこで、SMAP 法を用いたパラフィン切片からの遺伝子診断系を確立することを目的とした。さらに、PCR 法を用いた技術を用いるにはサンプルから DNA を抽出・精製する必要があったが、今後の術中遺伝子診断等への応用や更なる簡便化を考慮し、摘出組織から DNA の抽出を介さず、組織摘出から 1 時間程度で遺伝子診断を可能にするシステムを構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

SMAP 法の有用性を検証し、実地臨床応用のための問題点を抽出するため、群馬大学病院で切除した肺癌組織から、患者の同意を得た後に DNA を抽出し、以下の検討をおこなった。EGFR 遺伝子診断の評価として、SMAP 法で変

異を診断し、同様に標準的な既存技術として PCR-based direct sequencing、交換検出法として PNA-enriched sequencing で変異を検出し、これらの結果を比較した。また K-ras 遺伝子診断の評価として、SMAP 法、標準的な既存技術としての PCR-based direct sequencing、高感度検出技術として Enzyme-enriched sequencing を用いて K-ras 遺伝子変異を解析し、それぞれの結果を比較した。

次に EGFR 遺伝子変異のうち、exon19 の変異には多くの種類が存在するが、既存技術ではそのうちの 1 種類しか検出できず、これは EGFR exon19 の遺伝子変異のうちの約 40% 程度を占める程度であることが確認できたため、既存の EGFR 変異検出システムに peptide nucleic acid (PNA) を clamp probe として応用することで、EGFR exon19 変異のうち報告されているほぼ全ての変異型を 1 回の測定で検出できるシステムを構築した。改良したキットについても切除症例から抽出した DNA を解析し、既存技術での結果と比較した。また、PCR 法の原理を応用した既存の技術では難しく、臨床現場での問題点とされてきたパラフィン切片からの遺伝子解析法の確立として、肺癌患者から得たパラフィン包埋切片 43 例を対象に、SMAP 法及び PCR-based direct sequencing で遺伝子診断を行い、その結果を比較した。PCR-based direct sequencing については増幅産物の塩基長と増幅の可否を考慮し、増幅塩基長が異なるように 3 種類のプライマーセットを用いて検討した。

摘出組織や胸水サンプルをそのまま鋳型とした、DNA 抽出を介さない遺伝子診断システムの確立としては、前処理として短時間の加熱や遠心分離のみを必要とする系を検討し、この診断系を用いて実際の摘出組織及び胸水 58 例を対象に遺伝子診断を行い、これらの摘出組織から抽出した DNA を用いた診断結果と比較した。

## 4. 研究成果

検出感度について細胞株から定法により抽出した DNA を用いて行った検討では SMAP 法は検体 DNA 中に 1% の変異型 DNA を含む場合明確に変異の存在を確認できたが、mutant-enriched assays ではそれぞれ 5% 程度が検出限界であり、PCR-based direct sequencing では 10%-20% 程度の変異がなければ検出できないことが確認された。

実際の肺腺癌患者から摘出した組織より抽出した DNA を対象にした検討では、SMAP 法を用いた場合、172 例中 EGFR exon19, exon21, K-ras codon12 の変異をそれぞれ 40 例、36 例、31 例に認めた。一方 PCR-based direct sequencing ではそれぞれ 30 例、22 例、16 例

であり、mutant-enriched assays では 38 例、37 例、28 例であった。

SmartAmp法	PCR-シーケンス法	PNA-Enriched法
EGFR exon19 変異 40例	変異あり 30例 変異なし 10例	変異あり 8例
EGFR exon21 変異 36例	変異あり 22例 変異なし 14例	変異あり 15例
Kras exon2 変異 31例	変異あり 16例 変異なし 15例	変異あり 12例
変異なし 64例	変異なし 64例	

SMAP 法では他の検出方法に比較して変異型が多い結果となったが、これは SMAP 法が非常に高感度であるため、既存技術では検出できなかった微量な変異も変異型として検出したためと考えられる。なお、診断に要した時間は SMAP 法で約 1 時間、PCR-based direct sequencing で約 10 時間、mutant-enriched assay で 10-24 時間であった。また、既存の EGFR exon19 変異検出システムでは本研究で認められた 41 例の EGFR exon19 変異のうち 12 例のみの検出が可能であった。PNA を応用したところ、41 例中 40 例の変異を検出可能であり、検出できなかった 1 例については非常に稀なタイプの変異であった。次にパラフィン切片からの遺伝子解析では 43 例中 37 例に変異を認め、これらについて対応する冷凍保存検体から抽出した DNA を用いた結果と比較したところ、すべて一致した。

また 43 例中 1 例のみ抽出 DNA からの解析では変異が認められたもののパラフィン切片からの解析では変異が検出できなかった症例があり、現在検討中である。

摘出組織や胸水サンプルから DNA の抽出精製を介さない遺伝子診断システムの構築として摘出組織 55 例、胸水 3 例を用いた検討を行ったところ、34 例で変異を確認し、これらはすべて抽出 DNA を用いた結果と一致した。また、抽出 DNA を用いた検討で変異が認められたが摘出組織をそのまま鋳型とした場合に変異が認められなかった症例が 2 例存在したが、こちらについては現在検討中である。以上の結果より、SMAP 法は迅速かつ高感度であるうえ、パラフィン切片からの診断が可能であり、さらに摘出組織や胸水から DNA の抽出を介さずに遺伝子診断ができる上、60 度等温条件での反応系であるため、特別な装置を必要としないなど、既存技術に比べて実地臨床応用に適していることが確認された。

検体種類	Crude sample	組織抽出DNA
生検体	EGFR exon19又は21変異 21例	変異あり 21例
	Kras exon2 変異 10例	変異あり 10例
	変異なし 24例	変異なし 22例 EGFR変異あり 1例 Kras変異あり 1例
胸水	EGFR exon21 変異 1例	変異あり 1例
	Kras exon2 変異 2例	変異あり 2例

本邦を早急に実地臨床に導入することで、個別化医療の早期実現、癌治療の発展、遺伝子診断結果に基づく治療の全国均填化は勿論、本邦が国産技術であることから大きな国益につながる事が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 三谷康正、宮前洋平、石田尾武文、新規遺伝子診断技術SmartAmp法、日本薬理学雑誌、査読無、133 巻 2009 年、117-118
- ② 三谷康正、新規遺伝子診断技術 SMAP法、生物物理化学、査読無、52 巻、2008 年、183-187
- ③ 三谷康正、荒木拓也、太田郁子、臨床応用のための S N P 診断技術、日本臨床検査自動化学会誌、査読無、33 巻、2008 年、791-796

[学会発表] (計 10 件)

- ① 三谷康正、個別化医療のためのSMAP法を用いたEGFR、K-ras遺伝子変異検出、第7回日本臨床腫瘍学会、2009. 3. 21、愛知
- ② 三谷康正、SMAP法を用いた臨床検体からのがん関連遺伝子変異検出(EGFR、K-ras)、第19回生物試料分析科学大会、2009. 2. 22、愛知
- ③ Alexander Lezhava、Rapid screening of clinical samples for codon-specific mutations by the Smart Amplification Process (SMAP 2)、第31回日本分子生物学会、2008. 12. 12、兵庫
- ④ 三谷康正、SMAP法を用いたガン遺伝子変異検出 (EGFR、K-ras)、第55回臨床検査医学会、2008. 11. 30、愛知
- ⑤ 清水公裕、超高感度・高速遺伝子変異検索システムSMAP法を用いた肺癌における迅速遺伝子診断、第49回日本肺癌学会総会、2008. 11. 13、福岡
- ⑥ 三谷康正、SMAP法を用いた遺伝子変異検出(EGFR、K-ras)、第18回日本医療薬学会、2008. 9. 20、北海道
- ⑦ 三谷康正、SMAP法を用いた遺伝子変異検出(EGFR、K-ras)、第48回日本臨床化学会、2008. 8. 30、静岡
- ⑧ 向後康司、SMAP法を用いた個別化医療のための遺伝子診断、第15回日本遺伝子診療学会大会、2008. 8. 2、宮城
- ⑨ 清水公裕、超高感度・高速遺伝子変異検索システムSMAP法の呼吸器外科領域への臨床応用、第25回日本呼吸器外科学会、2008. 5. 29、栃木

- ⑩ 清水公裕、新規遺伝子変異検索技術SMAP法を用いた肺腺癌に対する術中迅速診断法の開発、第108回日本外科学会、2008.5.10、長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 公裕 (SHIMIZU KIMIHIRO)  
群馬大学・医学部・助教  
研究者番号：90375535

(2) 研究分担者

アレキサンダー レジヤバ (ALEXANDER LEZHAVA)  
独立行政法人理化学研究所・研究員  
研究者番号：40443048

懸川 誠一 (SEIICHI KAKEGAWA)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：70447275

砂長 則明 (SUNAGA NORIAKI)  
群馬大学・医学部・医員  
研究者番号：70400778

柳谷 典子 (YANAGITANI NORIKO)  
群馬大学・医学部・医員  
研究者番号：60400785

(3) 連携研究者

三谷 康正 (MITANI YASUMASA)  
理化学研究所・研究員  
研究者番号：50435682

向後 康司 (KOUGO YASUJI)  
理化学研究所・研究員  
研究者番号：20462682