

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：83901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23000

研究課題名（和文）60分でできる脳腫瘍患者の尿のナノワイヤ捕捉ゲノムバイオプシー

研究課題名（英文）Nanowire capture genomic biopsy of urine in patients with brain tumors in 60 minutes

研究代表者

Adilijiang Alimu (Adilijiang, Alimu)

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学分野・リサーチレジデント

研究者番号：30880348

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳腫瘍は治療が難しく、いくつかの遺伝子変異が予後に関連する。本研究では遺伝子の一塩基多型（SNP）に焦点を当て、術中迅速診断及び患者尿から短時間で術前非侵襲的遺伝子診断を目指した。SNPs解析装置は遺伝子変異部位に特異的プローブを結合させ、加熱で結合変性し発光することで変異を検出する。所要時間は60分と短く、術中迅速診断を可能にする。ナノワイヤデバイスは尿中に存在する微量な腫瘍由来核酸を捕捉できる。本研究ではIDH2、EGFR、BRAF、H3F3A遺伝子変異に対するプローブ開発を行なった。また、IDH1遺伝子R132H変異に対する高感度測定系を構築し、0.01%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

近年脳腫瘍の予後予測や組織分類に有用な遺伝子変異が示唆された。脳腫瘍手術中の迅速遺伝子診断はより正確な術式設定、早期最適術後治療を可能にする。本研究では脳腫瘍で見られるいくつかの遺伝子変異の迅速診断技術を確認した。

名古屋大学工学部が開発したナノワイヤデバイスは脳腫瘍患者尿中の腫瘍由来核酸を捕捉できる。その中の微量な変異遺伝子を検出するためには、高感度測定が必須である。本研究では99.99%の感度でIDH1遺伝子R132H変異を正確に検出できる測定系を構築した。今後この技術がSNPs解析装置と合わせて臨床に応用し、正確な術前診断、術中迅速診断により個々の患者に最適な層別化医療の提供が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Brain tumors are difficult to treat, and there are some genetic mutations which associated with prognosis. In this study, we focused on single nucleotide polymorphism (SNP) and aimed at rapid intraoperative genetic diagnosis of brain tumors, and preoperative non-invasive genetic diagnosis in a short time from patient's urine. The SNPs analysis system detects mutations by binding a specific probe to the gene mutation site, denatures the binding by heating and emits light. It takes only 60 minutes to rapid intraoperative diagnosis. Nanowire device can capture trace tumor-derived nucleic acids in urine. In this study, we developed probes for IDH2, EGFR, BRAF, H3F3A gene mutations. We also constructed a highly sensitive measurement system for the IDH1 R132H mutation and succeeded in detecting 0.01% mutation.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍 ゲノム バイオプシー

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の次世代ゲノム解析が精力的に行われてきた結果、予後予測や病型分類に有用な遺伝子変異が同定された。名古屋大学の鈴木・夏目らによる研究では、757 例の WHO グレード 2~3 の神経膠腫における網羅的遺伝子解析の結果、*IDH1/2* 遺伝子変異と 1p/19q 染色体共欠失を用いた予後と治療効果を反映する分類が提唱され、遺伝子診断の重要性が明らかになった (Suzuki, Natsume, et al. Nature Genetics, 2015)。これにより、新しい WHO 脳腫瘍病理診断にこれら遺伝子異常が診断に盛り込まれた。そこで研究代表者の研究室では直接腫瘍組織から一塩基多型(SNP)を 60 分以内という短時間で検出する術中迅速 SNPs 解析装置を用いて実験を行い、5%以上の腫瘍細胞または 1ng の

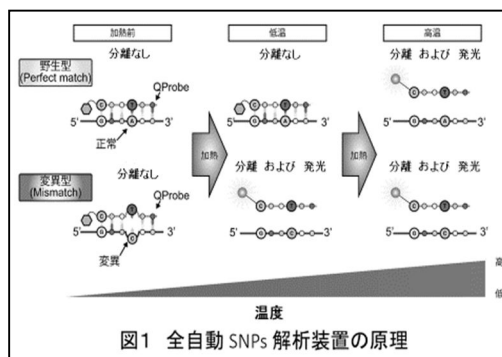


図1 全自動 SNPs 解析装置の原理

変異 DNA が含まれていれば *IDH1* 遺伝子 R132H 変異を高精度に検出できる (図 1) ことを報告した (Kurimoto, Natsume, et al. Cancer Invest., 2016)。さらに髄液中に含まれる cell-free DNA 中の *IDH1* 遺伝子 R132H 変異も検出できた (Ohka, Kurimoto et al. Brain Tumor Pathol., 2017)。このリキッドバイオプシーは他の多くの脳腫瘍の遺伝子変異検出にも応用できる。例えば、低悪性度神経膠腫における *TERT* 遺伝子プロモーター、pilocytic astrocytoma における *BRAF* 遺伝子

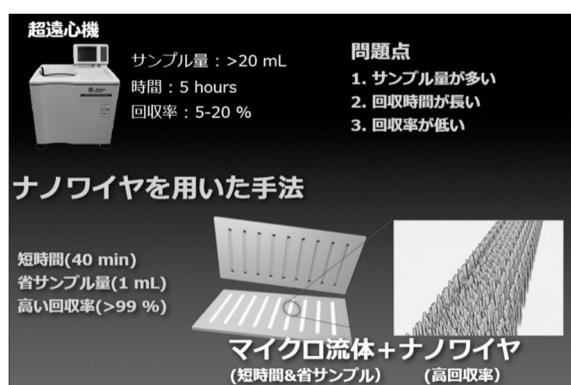


図2 正電荷ナノワイヤを用いた核酸の捕捉

子、小児神経膠腫における *H3F3A* 遺伝子、神経膠芽腫における *EGFR, PIK3CA, PDGFRA* 遺伝子や髄芽腫と頭蓋咽頭腫における *CTNNB1* 遺伝子など、遺伝子変異から疾患を同定することが可能である。一方、髄液から十分な DNA を採取するには、20mL の髄液を 5 時間以上超遠心し、それでも回収率はせいぜい 20% である。名古屋大学工学部の馬場研究室では、正電荷ナノワイヤを開発し、わずか 1mL の液体を用いて 40 分で 99%以上の核酸を捕捉するデバイスチップを開発した (図 2)。ナノワイヤと SNPs 解析装置を組み合わせることで少量の髄液もしくは尿でリキッドバイオプシーが実現できる可能性がある。

2. 研究の目的

世界的に脳腫瘍の次世代ゲノム解析が進められ、予後予測や組織分類に有用な遺伝子変異が示唆された。今後の課題は個々の腫瘍での迅速解析とそれに基づく層別化医療である。研究代表者の研究室では一塩基多型(SNP)を 60 分で検出できる装置を用いて、腫瘍組織から *IDH1* 遺伝子 R132H 変異が高精度で検出できることを実証した。また、髄液中に浮遊する *IDH1* 遺伝子 R132H 変異も検出できることを見出した。この研究では検出感度をもっとあげ、サンプル中の微量な遺伝子変異も正確に検出できることを目指した。この SNP 検出装置と、本学工学部が開発したナノワイヤデバイスを組み合わせたシステムで、髄液もしくは尿中の腫瘍タイプ別遺伝子変異を短時間で検出することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 遺伝子異常に基づく神経膠腫の病型分類に必要な遺伝子のホットスポット変異に対してプローブ設計・作成。
- (2) 作成したプローブを対象 DNA に水素結合させ、加熱してある一定温度になると結合が変性され発光する仕組みを用いて、腫瘍検体遺伝子変異を解析。

(3) 同一検体をサンガーシーケンス法で解析し結果の正確性を確認。

(4) プラスミド検体を用いて、野生型遺伝子と変異型遺伝子を混ぜ合わせたサンプルを作成し、より高感度に遺伝子変異を検出できるような高感度測定系の構築。

4. 研究成果

まず当研究では、遺伝子の一塩基多型に焦点を当て、脳腫瘍の術中迅速遺伝子診断及び術前の非侵襲的遺伝子診断を目指した。脳腫瘍には *IDH1* 遺伝子 R132H 変異を初め、*IDH2*, *TERT*, *PIC3CA*, *EGFR*, *BRAF*, *PDGFRA*, *CTNNB1*, *H3F3A* などの遺伝子に変異が見られる。これら遺伝子変異による分類はより正確な予後予測を可能にし、早期の治療開始及び術式の術中調整によって個々の患者に対する最適な個別化医療を可能にする(図3)。

当研究室では既に腫瘍検体を用いて *IDH1* 遺伝子 R132H 変異に対して迅速診断技術を確立しており、本研究では *IDH2*, *EGFR*, *BRAF*, *H3F3A* 遺伝子らのホットスポット変異に対するプローブの設計・作成を行なった。これらプローブを用いて腫瘍組織検体を解析した。具体的には、作成したプローブを対象 DNA に水素結合させ、加熱してある一定温度で結合が変性され発光を確認した。対象 DNA に一塩基の変異がある場合、プローブと結合している状態からの変性発光温度は野生型と比べて異なる。この性質を用いて発光温度差から遺伝子変異を検出した。また、上記解析の対象となった同一脳腫瘍組織検体から腫瘍 DNA を抽出し、サンガーシーケンス法で遺伝子変異を再確認した。

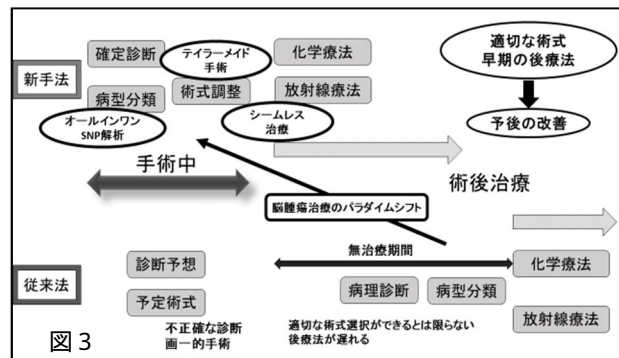


図3

これらプローブを用いて腫瘍組織検体を解析した。具体的には、作成したプローブを対象 DNA に水素結合させ、加熱してある一定温度で結合が変性され発光を確認した。対象 DNA に一塩基の変異がある場合、プローブと結合している状態からの変性発光温度は野生型と比べて異なる。この性質を用いて発光温度差から遺伝子変異を検出した。また、上記解析の対象となった同一脳腫瘍組織検体から腫瘍 DNA を抽出し、サンガーシーケンス法で遺伝子変異を再確認した。

続いて、遺伝子変異に対する高感度測定系構築を行なった。脳腫瘍患者の尿中には細胞外小胞体に内包される腫瘍由来微小核酸が存在する(尿中濃度<0.01vol%)。当研究室では、名古屋大学工学部が開発したナノワイワイデバイスを用いて、既に尿 1mL から 1300 種類の microRNA を発見した (Science Adv., 3, e1701133, 2017)。このデバイスを用いて脳腫瘍由来の核酸も発見できることが期待できる。しかし、尿中の腫瘍由来 DNA 濃度は非常に低いのに加え、その中で存在する変異遺伝子濃度はさらに微量である。この微量な変異遺伝子を正確に検出するためには、測定感度を高めなければならない。そこで本研究では、プラスミドを使って模擬検体を作成し、*IDH1* 遺伝子 R132H 変異に対する高感度測定系を構築した。具体的には、プラスミドを使った *IDH1* 遺伝子 R132H 変異検体と *IDH1* 遺伝子野生型検体を作成し、それらに対する高感度プローブを設計・作成した。野生型検体と変異型検体を混ぜ、最終的に 0.01% の変異を正確に検出することに成功した。また偽陽性がないことも確認した。この技術とナノワイワイデバイスを組み合わせることで、患者の尿から腫瘍由来の微量 DNA 変異が検出できることが期待される。実臨床現場で尿を用いて非侵襲的に変異遺伝子を検出できれば、脳腫瘍の早期診断、早期治療が可能となり、患者に最適な医療を早期に提供できる。今後実際の臨床腫瘍検体及び患者尿検体を用いて、上記高感度測定系の有効性を検証していく。また *IDH1* 遺伝子以外の脳腫瘍で見られる遺伝子変異に対しても同様の高感度測定系構築に取り込んでいく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------