

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790797

研究課題名(和文)PCRクランプ法を用いたNOTCH1遺伝子変異の高感度迅速検出システムの開発

研究課題名(英文)Detection of Notch1 mutation using PCR-Clamp method

研究代表者

朝比奈 肇(Hajime, Asahina)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90374298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：PNA-LNA PCR clamp法による Notch1遺伝子変異の高感度検出システムの開発を試みた。点突然変異を有する変異Notch 1遺伝子のみを特異的に増幅するために、PCR clamp法を利用することとした。変異部位の正常DNAに対応する相補的な配列のPNAを用いたclamp primerを設計し、また続いて変異型を検出するために、変異に対応するfluorogenic probeとして、mutant probeを設計(Mutant probeでは野生型と変異型を厳密に区別するために、変異部位に対応する場所にLNAを用いる)することを検討したが、いずれも成功しなかった。

研究成果の概要(英文)：I tried to develop a highly specific detection system of Notch 1 mutation. To amplify the point mutation of Notch 1, I used the PCR clamp method. First, I tried to a clamp primer which covers the normal DNA of the mutation site. Second, I tried to design a mutant probe which covers the mutation sequence. But we cannot get the adequate primer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、呼吸器内科学

キーワード：肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年の NSCLC に対する治療開発は、個々の症例毎に治療法を個別化することで治療成績の向上を図る (個別化治療) 方向で進んでいる。そのさきがけが、ゲフィチニブ (商品名: イレッサ) である。ゲフィチニブは 2002 年に承認された、世界初の上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤であるが、NSCLC 全体を対象とした臨床試験では、劇的な抗腫瘍効果を有する症例と、全く効果が見られず、逆に間質性肺炎など致死的な合併症を来す症例が混在し、適切な薬物治療が困難であった。2004 年 5 月に肺癌組織における EGFR 遺伝子変異がゲフィチニブの効果予測因子である可能性が示唆され (Lynch TJ et al. N Engl J Med 2004)、本研究代表者の朝比奈は、北海道内関連施設との共同研究で、各症例の肺癌組織から Genomic DNA を抽出し、EGFR 遺伝子変異の有無を測定し、変異を有する症例のみにゲフィチニブを投与するという第 II 相臨床試験を実施し、奏効率 75%、無増悪生存期間中央値 8.9 か月という良好な結果を得た (Asahina H et al. Br J Cancer 2006)。その後、実地臨床の現場でより簡便に測定でき、高感度の EGFR 遺伝子変異の測定法として、PNA-LNA PCR clamp 法が開発された (Nagai Y et al. Cancer Res 2005)。我々はこの方法を用いて EGFR 遺伝子変異陽性の症例に対して、従来の標準療法とのランダム化比較第 III 相試験を東北大学、埼玉医科大学などと共同で実施し、無増悪生存期間の有意な延長 (10.8 カ月 vs 5.4 カ月) を示し、固形がんにおける初めての個別化治療の可能性、すなわち、「分子標的薬剤は、その標的となる適切な対象を選択することで初めてその有効性を期待できる」ことを示した (Maemondo M et al. N Engl J Med 2010)。

NSCLC におけるこのような「Driver mutation」は、近年次々に明らかにされている (Pao W et al. Lancet Oncol 2011)。その中の 1 つに Notch pathway がある。Notch pathway は神経、造血、血管などの分化において重要な役割を果たし、4 つの細胞膜蛋白である Notch 受容体 (1~4) と 5 つのリガンドの存在が知られており、受容体の異常活性と癌化との関連が報告されている。

Notch の活性化の機序は、リガンドが Notch 受容体に一端結合すると  $\gamma$ -secretase と呼

ばれるプロテアーゼにより Notch 受容体が分解され活性型である Notch 細胞内ドメイン (NICD) が細胞膜より核内へ移行する。その後 NICD が転写因子である CSL (CBF1, Sel, Lag-1) と結合することで標的遺伝子 (Hes, Hey) の転写活性が行われる。 $\gamma$ -secretase 阻害剤は  $\gamma$ -secretase の活性化を抑えることで Notch pathway を抑制することが報告されている。

NSCLC における Notch pathway の関与について、共同研究者の小西は、2007 年に  $\gamma$ -secretase 阻害剤により NSCLC 細胞株の Notch 3 発現を抑制することで in vivo と in vitro で肺癌細胞の増殖が抑制されることを報告している (Konishi J et al. Cancer Res 2007)。一方、2009 年に NSCLC の手術検体 49 例の解析で、先に同定されていた T-ALL (急性リンパ性白血病) と同様に、約 10% の症例に Notch 1 受容体の driver mutation が存在すること、ならびに樹立された肺癌細胞株の  $\gamma$ -secretase 阻害剤による in vitro での増殖抑制効果が報告された (Westhoff B et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2009)。

$\gamma$ -secretase 阻害剤については、既に海外において、第 I 相試験が開始されており、従来通りの、遺伝子変異を考慮しない、癌種別の治療開発が始まっている。しかしながら、EGFR 阻害剤の例、あるいは最近も EML4-ALK の発見からわずか 4 年で阻害剤の FDA 承認が得られた事実で示されたように、あらかじめ Driver mutation を有する症例を同定し、そのような症例にのみ特異的な阻害剤を投与することにより、早期の臨床試験での高い奏効率 (= 確実な抗腫瘍効果) が証明可能であり、さらに結果的に、より早い後期臨床開発試験 (第 III 相試験) への移行、ならびに日常臨床への導入につながると考えられる。NSCLC の診断は主に気管支鏡などの微小検体を用いて行われるが、そのような検体では、変異型の腫瘍細胞のバックグラウンドに炎症細胞などの野生型の細胞が多数混在していることが問題となり、高感度な検査法が必要となる。そこで、EGFR 遺伝子変異の高感度な検査法として有用であった PNA-LNA clamp 法の原理を用いて Notch 1 の遺伝子変異を高感度に測定する検査法の開発を行うこと、および、日本人における Notch 1 の遺伝子変異の頻度を、これまでの既知の遺伝子変異

(EGFR、EML4-ALK、KRAS 等) と合わせて評価することを目的として、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) PNA-LNA PCR clamp 法による Notch1 遺伝子変異の高感度検出システムを開発する。

(2) 多数の進行非小細胞肺癌の生検検体および細胞診検体を用いて、日本人における既知の遺伝子変異 (EGFR、KRAS、EML4-ALK) と合わせて Notch 1 遺伝子変異の頻度を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) PNA-LNA PCR clamp 法による Smart Cycler II System®を用いた Notch 1 遺伝子変異の高感度迅速検出システムの開発

患者由来の、喀痰や気管支鏡生検検体などの臨床検体は、癌細胞以外に多量の正常細胞を含んでいる。また NSCLC における Notch 1 遺伝子の活性型変異は少なくとも 4 種類が報告されている。以上より、臨床検体中の Notch 1 遺伝子異常を有する癌細胞を検索するには、多量の正常 (野生型) Notch 1 遺伝子存在下で、多種の少量である変異を検出できる、高感度で高特異性の検査系の確立が必要である。

### ①PNA clamp primer と LNA mutant probe の設計

点突然変異を有する変異 Notch 1 遺伝子のみを特異的に増幅するために、長井らの論文を参考に PCR clamp 法を利用する。まず Clamp primer には、野生型と変異型を効率的に判別するために PNA を使用する。PNA は Taq DNA polymerase の 5' → 3' エキソヌクレアーゼに耐性で、PNA の相補鎖と強く結合でき、さらに 1 塩基のミスマッチで  $T_m$  が大きく減少するため、clamp primer としての使用に適している。この PNA を正常 DNA と相補的に作成することで、PCR の際に正常 DNA の増幅を阻害できる。まず 4 か所の変異部位の正常 DNA に対応する相補的な配列の PNA を用いた clamp primer を設計する。続いて変異型を検出するために、4 種類の変異に対応する fluorogenic probe として、mutant probe を設計する。Mutant probe では野生型と変異型を厳密に区別するために、変異部位に対応する場所に LNA を用いる。LNA は通常の核酸塩

基と比較して 1 塩基のミスマッチで  $T_m$  が大きく減少するため、このような使用に適している。また、野生型と変異型の双方の増幅を検出する Internal control として、変異領域外に total probe を作成する。

蛍光色素の種類は今回利用する Real Time PCR 検査機器である、Smart Cycler II System® の 4 波長同時検出能力を利用して、各 Probe を FAMTM、Texas Red®または CyTM5 のいずれかの色素でラベルし、一反応あたり最大 4 種類の probe を同時に使用できるように設計する。

### ②PNA-LNA PCR clamp 法による Notch 1 遺伝子変異の検出

4 か所の点突然変異を挟む各部分に通常の PCR プライマーを設計する。また、内側にもプライマーを設計し、必要ならば nested PCR を行えるようにする。Real Time PCR 反応は、変異型および野生型が混在するサンプルの場合、増幅時には野生型 allele は clamp primer により増幅が阻害される。一方、変異型 allele には clamp primer が結合することができないため、増幅阻害がおこらない。よって、変異型が優先して増幅されることになる。検出時には、mutant probe は変異型 allele と結合できるが、野生型 allele とはミスマッチの存在および clamp primer との拮抗により結合を阻害される。DNA が PCR に適したものであり、当該部位が適切に増幅されているかは、total probe (CyTM5 標識) によって確認する。結果は、いずれかの mutant probe でシグナルが存在するかを見て、シグナルが認められれば変異型ありと判定する。Mutant probe で変異型が認められない場合、total probe のシグナルを見る。Total probe に強いシグナルがある場合、本システムが検出できる 4 種類の変異以外の変異が存在する可能性を考慮し、PNA-LNA PCR clamp の増幅断片を直接シーケンシングする。Total probe のシグナルが遅いサイクル数で出現してくる場合は、野生型のみと判定する。

### ③本システムを用いた Notch 1 遺伝子変異の検出感度の検討

Site directed mutagenesis 法にて 4 か所の点突然変異を作成し、plasmid にクローニング後、塩基配列を確認する。この Notch 1 陽性コントロールを、ヒト染色体 DNA (健常

人血液由来) 2 コピーあたり 1、0.1、0.01、0.001 コピーとなるように正常ヒト染色体 DNA と混合し、テンプレートとする。これは正常細胞 1、10、100、1000 個あたり 1 つの癌細胞が存在する状態のモデルである。本システムを用いて、このテンプレート中に含まれる変異 plasmid の検出感度を測定し、実際の臨床検体を用いた検査で必要となる、100～1000 倍程度の感度で検出可能かどうかを確認する。

(2) 実際の臨床検体を用いた Notch 1 遺伝子変異の頻度および種類の検討

当院での倫理委員会承認後、文書での同意が得られた患者からの臨床検体を用いて、Notch 1 遺伝子変異の頻度および種類の検討、ならびに臨床病理学的背景との関連につき、検討する。Virtual bronchoscopy と超音波内視鏡を併用した当院の経気管支生検システムでは、非侵襲的に多数の生検検体を採取することが可能であり(通常、最低 5 個の生検検体と細胞診検体を採取している)、このようなトランスレーショナル研究に適している。既知の遺伝子変異(EGFR、KRAS 等)と染色体転座(EML4-ALK)の有無についても、Notch 1 遺伝子変異を解析したのと同じ検体を用いて PCR 法、FISH 法にて評価し、本遺伝子変異との関係(共存するのか、排他的な関係であるのか等)につき検討する。

#### 4. 研究成果

Notch1 遺伝子変異の高感度検出システムを樹立することはできなかった。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

朝比奈 肇 (ASAHINA HAJIME)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：90374298

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし