

令和元年5月24日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06742

研究課題名（和文）正電荷ナノワイヤと高感度SNP検出装置による脳腫瘍リキッドバイオプシー遺伝子診断

研究課題名（英文）Liquid biopsy genetic diagnosis in brain tumor with positive charged nanowires and high-sensitive SNPs analysis

研究代表者

栗本 路弘（KURIMOTO, MICHIMIRO）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：40806501

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：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解析とそれに基づく層別化医療である。そこでsingle nucleotide polymorphism (SNP)を90分で検出できる装置を用いて、IDH1R132Hが高精度で検出できることを実証した。極めて鋭敏であるため、髄液中に浮遊するIDH1R132Hも検出できることを見出した。最終的には本学工学部が開発したナノワイヤで微量のcell-free DNAを捕捉し、血清もしくは尿中診断にまた本手法は他のバイオマーカー遺伝子変異にも応用できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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解析とそれに基づく層別化医療である。そこでsingle nucleotide polymorphism (SNP)を90分で検出できる装置を用いて、IDH1R132Hが高精度で検出できることを実証した。極めて鋭敏であるため、髄液中に浮遊するIDH1R132Hも検出できることを見出した。最終的には本学工学部が開発したナノワイヤで微量のcell-free DNAを捕捉し、血清もしくは尿中診断にまた本手法は他のバイオマーカー遺伝子変異にも応用できることを確認した。

研究成果の概要（英文）：The next generation genome analysis of brain tumor is advanced worldwide, and gene mutation useful for prognosis prediction and tissue classification was suggested. Future tasks are analysis of individual tumors and stratified medicine based on them. Therefore, we have demonstrated that IDH1R132H can be detected with high accuracy using a device that can detect single nucleotide polymorphism (SNP) in 90 minutes. It was found that IDH1R132H suspended in cerebrospinal fluid can also be detected because it is extremely sensitive. Finally, we captured trace amounts of cell-free DNA with nanowires developed by the Faculty of Engineering, and confirmed that this method can be applied to serum or urine diagnosis and also to other biomarker gene mutations.

研究分野：小児脳腫瘍

キーワード：SNPs IDH

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

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* 変異と 1p/19q co-deletion 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 H, Natsume A, Wakabayashi T, 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るのは不可避となった。

神経膠腫において重要な遺伝子異常は *IDH1/2* 遺伝子変異と 1p/19q LOH 有無である。そこで我々は直接腫瘍組織から SNP を 90 分以内という短時間で検出する術中迅速 SNPs 解析装置 (図 2) を用いて実験を行い、5%以上の腫瘍細胞が含まれていれば *IDH1* R132H 変異を高精度に検出できる(図 1)ことを確立した(Kurimoto M, Kondo G, Natsume A, et al. Cancer Investigation, 2015)。

脳腫瘍における *IDH1/2* 遺伝子変異は hotspot 変異であり *IDH1* R132 と *IDH2* R172 の 2 か所のみに生じるため、これら該当箇所のみを調べれば変異有無の判断は可能である。またわれわれが提唱した遺伝子異常に基づく神経膠腫の分類において *IDH1/2* 遺伝子変異解析に次いで予後予測に有用な遺伝子マーカーは 1p/19q LOH である。染色体異常の同定

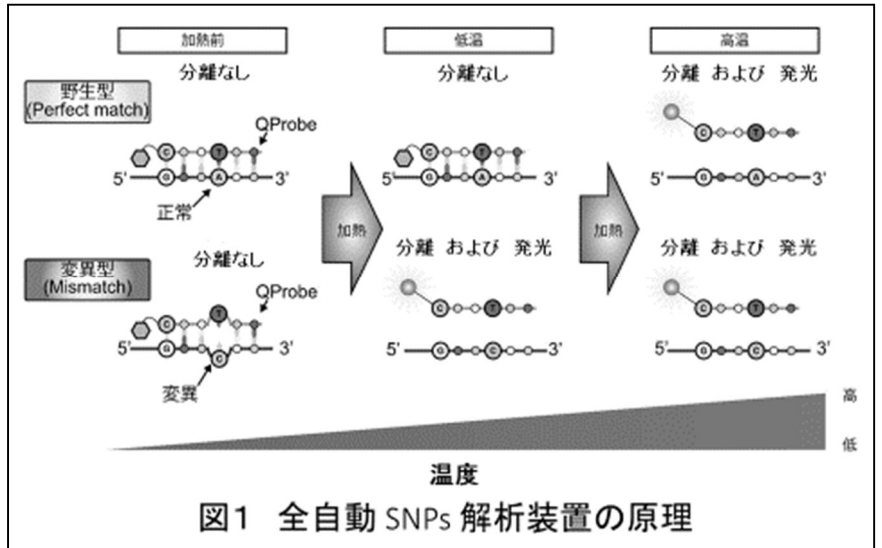


図1 全自動 SNPs 解析装置の原理

定についても、次の方法で全自動 SNPs 解析装置で使用可能である。まず術前に血液検体からの DNA に対し、サンガーシーケンスを行うことにより、染色体 1p,19q の各領域における、germline hetero SNP を確認する。その hetero SNP に対するプローブを用いて解析し、hetero SNP における不均衡の有無を確認することで各染色体の異常を同定する。

本装置は Q プローブの発光輝度を測定することで半定量的に変異を同定できるため、hetero SNP の輝度の差を用いて染色体コピー数異常の同定が可能である。

さらに多くの脳腫瘍において、様々なドライバー遺伝子の hotspot 変異が報告されている。低悪性度神経膠腫における *TERT* プロモーター、pilocytic astrocytoma における *BRAF*、小児神経膠腫における *H3F3A*、神経膠芽腫における *EGFR, PIK3CA, PDGFRA* や髄芽腫と頭蓋咽頭腫における *CTNNB1* など、遺伝子変異から疾患を同定することが可能である。術中迅速 SNPs 装置による術中脳腫瘍の診断を確立することにより、ほとんどの悪性脳腫瘍に対し術中診断が可能になる。

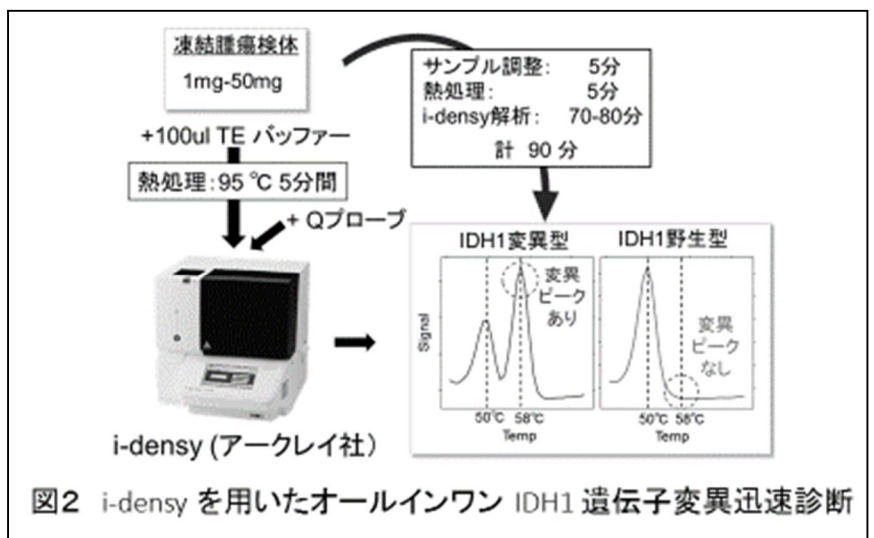


図2 i-densy を用いたオールインワン *IDH1* 遺伝子変異迅速診断

そして我々の検証の結果、脳腫瘍組織における遺伝子変異の迅速診断技術が確立されたため、関心領域の適切なプローブ設計によりさまざまな脳腫瘍における術中迅速遺伝子診断の可能性が提示された。

2. 研究の目的

脳腫瘍組織における遺伝子変異の迅速診断技術を確立し、関心領域の適切なプローブ設計によりさまざまな脳腫瘍における術中迅速遺伝子診断を行う。

3. 研究の方法

IDH2 R172 に対するプローブを設計し *IDH1/2* 遺伝子の迅速診断技術を完成させる。次いで血液検体由来の DNA に対するサンガーシーケンスを併用することで、同装置における 1p/19q LOH の迅速診断技術を開発し、神経膠腫の病型診断に必要な情報を網羅する。これらすべてに同じ腫瘍組織における通常シーケンスの結果を照合、また実際に術中解析を施行し、病理診断と合わせて検証する。さらに診断的価値の高い *TERT*、*H3F3A*、*BRAF* などの遺伝子変異に対して強制発現細胞株を樹立し、条件検討を行った後に迅速診断技術を開発する。以上の解析を組み合わせて脳腫瘍における超短時間オールインワン術中遺伝子変異診断技術の完成とする。

4. 研究成果

臨床腫瘍検体、血液検体を用いた *IDH2* 遺伝子変異、1p/19q LOH の迅速診断技術を確立。その後、検体解析を進め従来法であるサンガーシーケンスや Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法や FISH 法等の解析を行い、結果を照合した。また術中に腫瘍検体を用いて腫瘍中心部や辺縁部等のマルチサンプリングを行い、解析する検体の部位と解析感度を照合し、その後は *H3F3A*、*TERT*、*BRAF* 遺伝子等の解析をすすめるため、利用可能な細胞株を検索し、必要であれば過剰発現細胞株を作成するための強制発現プラスミドベクターを作成した。

(1) i-Densy を用いた *IDH1/2*、1p/19q LOH の迅速診断技術確立 (図3)

本研究では蛍光プローブである Q プローブを用いて、全自動 SNPs 解析装置 i-Densy で解析する。Q プローブは目的遺伝子に水素結合するように設計されており、まずは対象 DNA に Q プローブを水素結合させる。その後徐々に加熱することによって、Q プローブが denature された際、発光する。対象 DNA に遺伝子変異を認める場合、1 塩基の変化により denature の温度が変化するため、シグナルの温度差を用いて遺伝子変異の有無を解析することができる。本アッセイを用いて *IDH1/2*、1p/19q LOH の診断法を樹立する。

IDH1/2 変異解析：*IDH1* R132 についてはプローブ作成が終わっており、DNA で *IDH2* R172 に対するプローブ設計を行うとともに、両プローブとも腫瘍組織検体を用いた全自動 SNPs 解析を行い実証する。

1p/19q LOH 迅速診断：術前に神経膠腫患者の血液検体を使用し DNA を採取した後、サンガーシーケンスを行うことにより、染色体 1p、19q の各領域における、germline hetero SNP を確認する。その hetero SNP に対するプローブで解析し、腫瘍検体における hetero SNP の不均衡を確認して各染色体の異常を同定する。全自動 SNPs 解析装置は Q プローブの発光輝度を測定、半定量的に変異を同定するため、hetero SNP の輝度の差から染色体コピー数異常の同定が可能である。日本人で hetero SNP 頻度が高い SNP はすでにこれまでの研究で確認しており、プライマー設計と PCR 条件は確定されているため、プローブ選択は容易である。これまでに樹立した *IDH1/2* 変異、1p/19q LOH 迅速診断技術の術中使用症例を重ねて、病理診断の結果と併せて前向きに結果の妥当性について評価した。前臨床研究の準備を行っている。

(2) 通常のシーケンス手法を用いて遺伝子異常の確認 (図4)

上記解析の対象となった同一腫瘍組織の残検体を用いて、同定された異常があることを確認する。実際にはアンプリコンシーケンスにて、変異を同定し比較対象とする。QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して腫瘍から DNA を採取する。*IDH1/2* 遺伝子および各染色体の hetero SNP に対して作成した NotI 配列付きプライマーを用いた PCR を行い対象領域のアンプリコンを作成する。アンプリコンを NotI にて digestion した後、

T4 ligase にて ligation を行うことにより

長鎖 DNA を作製する。これを超音波破砕でランダムに切断したあと、次世代シーケンサ

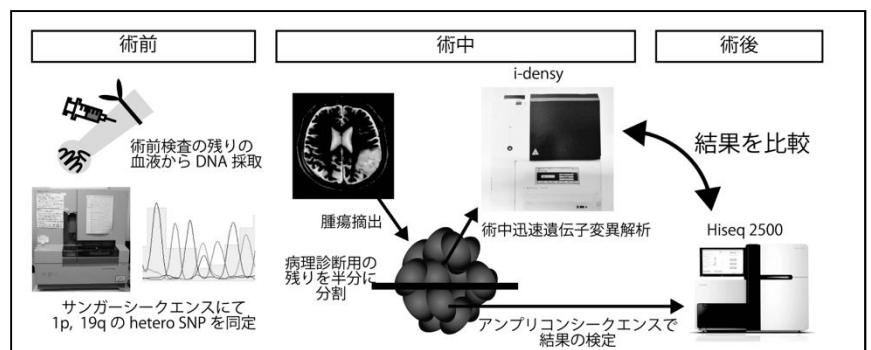


図3

一用のアダプター配列を ligation し Hiseq 2500 でシーケンスを行う。この手法を用いることにより 1%までの低アレル頻度の変異を高い正確性をもって判断することができる。

で解析した染色体コピー数異常についてはさらに正確性を高めるため MLPA 法を用いて再解析し、アンプリコンシーケンスの結果を合わせて評価を行う。

(3) 腫瘍検体を用いた手術中の迅速診断評価

神経腫瘍が疑われる患者に対し、上記の確立した技術を用いて摘出検体に対する *IDH1/2* 変異と 1p/19 LOH の術中迅速診断を行う。ここで全症例に対して検体を一部残し上述の手法で遺伝子変異や染色体異常を検証する。加えて最終的には、術中迅速病理診断と術後確定病理診断とも比較し迅速遺伝子診断の有用性を評価する。

(4) *H3F3A*, *TERT*, *BRAF* 等他遺伝子解析のための細胞株、強制発現細胞株の準備

他遺伝子変異解析の予備実験を行うため、遺伝子変異細胞株を準備する。比較的頻度の低い遺伝子変異もあるため、利用可能な細胞株が存在しない可能性もあり、強制発現細胞株を準備する。高効率遺伝子導入用レトロウイルスベクターである pDON-AI-2 DNA を使用して、標的遺伝子変異の強制発現ベクターを作成する。レトロウイルスゲノムからパッケージングシグナルと両端の LTR 配列を残し、それぞれの shRNA が挿入された組換えレトロウイルスベクターは、標的細胞の染色体に確実に目的遺伝子を挿入できるため、長期安定遺伝子発現が期待できる(図4)。また pDON-AI DNA は従来のベクターとは異なり、5'側 LTR の U3 領域に LTR よりもプロモーター活性の強い HCMV の IE プロモーターを有するため、ベクター RNA ゲノムの転写効率が高く、そのため高力価の組換えレトロウイルスを得ることが期待できる。当研究室では *BRAF* や *TERT* については遺伝子変異コンストラクトを既に入手しており、これらを適切な制限酵素で切り出し、本ベクターに組換える。このベクターを用いて安定発現細胞株を作成し、タンパク質を回収しウエスタンブロッティング法にて発現を確認する。

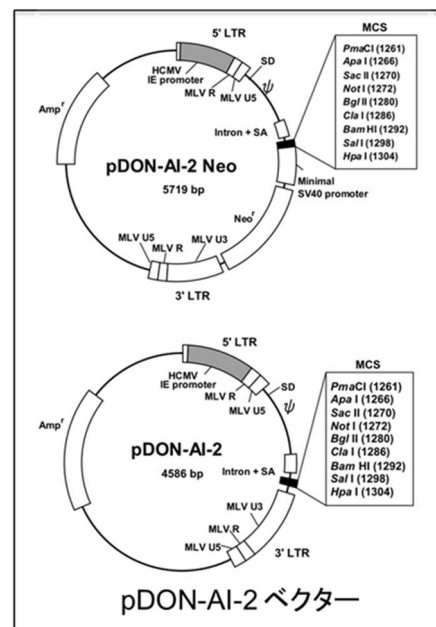


図4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

①Rapid sensitive analysis of *IDH1* mutation in lower grade gliomas by automated genetic typing involving a quenching probe. *Cancer Invest.* 2017;34(1):12-5. [Kurimoto M.](#) et al doi: 10.3109/07357907.2015.1084001. 査読あり。

〔学会発表〕(計 1 件)

①Rapid sensitive analysis of *IDH1* mutation. [Kurimoto Michihiro](#) 2017年 日本小児神経外科学会

〔図書〕(計 0 件)

〔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 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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

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。