

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08387

研究課題名(和文) In situ LAMP法を用いたFGFR3変異陽性膀胱癌細胞の可視化法の開発

研究課題名(英文) Detection of FGFR3 gene point mutation in bladder carcinomas using in situ loop-mediated isothermal amplification

研究代表者

山崎 一人 (Yamazaki, Kazuto)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60302519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膀胱尿路上皮癌において線維芽細胞増殖因子受容体3遺伝子、テロメア逆転酵素の点突前変異の頻度はそれぞれ54.1%、71.1%と高く、これらのを同定することは尿検体や微小生検検体において腫瘍の存在を証明するのに有用であることが示された。次いで、野生型遺伝子の増幅をブロックし、変異遺伝子のシグナルを増幅し得るBNAクランピングの手法を応用した変異特異的組織内PCRを行い、パラフィン包埋切片上でこれらの変異遺伝子を特異的に可視化することに成功した。今後の改良の余地を残すものの、本手法は今後の発展が見込まれる生検組織・細胞診検体を用いた多様な遺伝子診断の精度向上に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that point mutations of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) gene and Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) gene were prevalent in bladder urothelial carcinomas (54.1% and 71.1%, respectively). These results indicate that point mutations of FGFR3 and TERT gene can be useful markers to detect the presence of tumor cells even in urine samples or small biopsy specimens. Next, we performed modified in situ AS-PCR using BNA clamping method to block amplification of wild-type templates and to increase detection of mutant-type allele, and could detect mutation signals specifically in the paraffin-embedded sections. Although there is still room for improvement, this approach also allows an efficient work flow when a number of mutation assays need to be developed simultaneously.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膀胱尿路上皮癌 点突然変異

1. 研究開始当初の背景

膀胱癌は男性において4番目、女性において9番目に多い悪性腫瘍であり、治療後も再発を繰り返すことが多い。従って、患者1人当たり、および、発生率の観点からも社会的に費用のかかる腫瘍である。膀胱癌に特異的な血中・尿中マーカーは存在しないため、そのスクリーニングにおいて尿細胞診は重要な位置を占める。尿細胞診において高異型度の CIS や筋層浸潤癌の腫瘍細胞を見落とす事は少ないが、低異型度の腫瘍細胞の同定は容易ではなく、その感度は30-40%とされている。尿細胞診の正診率が低いこともあって、現行のガイドラインでは膀胱癌の治療後は定期的な膀胱鏡検査が必要とされているが、逆に細胞診断の劇的な精度向上が見込まれれば、非侵襲性の尿細胞診が膀胱鏡検査を代替することが可能となり、不必要な侵襲性検査の回数を減らせることも期待される。

近年、尿路上皮癌は主に2つの分子的機序から発生することが証明されており、低異型度の乳頭状非筋層浸潤癌においては Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) 遺伝子の変異が70%程度の症例に見られることが明らかとなっている。FGFR3 変異のうち、exon 7 における R248C, S249C の変異が全体の80%以上を占めており (*S249C TCC>TGC 75%, *R248C CGC>TGC 5-10%), exon 10 における G372C, S373C, Y375C の変異を加えると、変異のほぼ100%がこの5つのコドンに局限する。これとは別に、尿路上皮癌においてはテロメア合成酵素(テロメラーゼ)の触媒ユニットであるテロメア逆転酵素(Telomerase Reverse Transcriptase: TERT)のプロモーター領域の遺伝子変異がおよそ70%の症例に見られることが明らかとなっており、C228T の変異が全体の90%程度、C250T の変異が10%程度を占め、変異のほぼ100%がこの2塩基に局限する。これらの変異を確実に同定し得るアッセイが構築できれば、尿細胞診における尿路上皮癌の診断精度の劇的な向上が見込まれる。

2. 研究の目的

本研究では、組織診・細胞診切片上で変異 FGFR3 遺伝子、および、変異 TERT 遺伝子を in situ PCR 法にて増幅し、変異陽性細胞を顕微鏡下に同定可能とするアッセイを構築することを目的とする。そして、本システムの構築によって、尿細胞診における尿路上皮癌の診断精度を向上させることを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) これまでに当施設にて採取された膀胱癌 TUR 検体のパラフィン包埋標本を用い、Sanger 法にて FGFR3 遺伝子変異 (R248C,

S249C), TERT 遺伝子変異 (C228T, C250T) の有無を検索する。

(2) 上記の尿路上皮癌 TUR 検体のパラフィン包埋標本を用い、FGFR3 遺伝子 exon 7, および、TERT 遺伝子プロモーター領域の変異部位を含んだ塩基配列を増幅し得るプライマーペアを設計し、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法 (図1), サーマルサイクラーとして Perkin-Elmer in situ PCR system 1000 を用いた変異特異的 (allele-specific in situ PCR, AS-PCR) (図2), および、AS-PCR に FISH の手法を取り入れて塩基変異とコピー数変化を同時に検出することを可能とする Star-FISH (Nature Genetics. 47;1212-1219:2015) (図3) の3種の in situ PCR を実施する。LAMP 法においては FIP プライマー, AS-PCR においては Forward プライマーを FITC で標識し、増幅された PCR 産物が蛍光顕微鏡下に検出可能となるようにする。Star-FISH は野生型 DNA と変異 DNA にそれぞれ特異的な in situ PCR を実施し、増幅された各遺伝子に相補的な蛍光オリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせて野生型遺伝子と変異遺伝子のシグナルを可視化する手法であり、野生型遺伝子に相補するプローブは Texas Red, 変異遺伝子に相補するプローブは FITC で標識する。

(3) 遺伝子変異の有無にかかわらず、FGFR3 遺伝子, TERT 遺伝子のシグナルが検出可能となった条件を基に、変異遺伝子のみを特異的に増幅し得るアッセイを構築する。LAMP 法においては B1 プライマー, AS-PCR 法においては Forward プライマーの 3' 端の塩基を変異 DNA に相補的な Bridged Nucleic Acid (BNA) で置換し、加えて、BNA で構成された野生型 DNA に相補的な 3' リン酸基修飾オリゴヌクレオチドブロックを加えることによって野生型 DNA の増幅を阻害するべく in situ BNA クランピング PCR を実施する。Star-FISH 法においては BNA クランピングを行わない。Sanger 法にて確認した各遺伝子変異と組織切片上で観察した野生型遺伝子と変異遺伝子のシグナルを照合し、それぞれのアッセイの整合性を検討する。

図1: 変異遺伝子・野生型特異的 LAMP 法

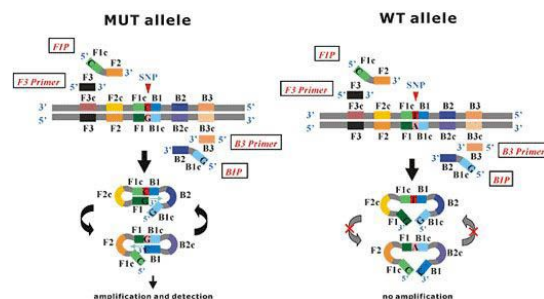


図 2: 変異遺伝子特異的 BNA クランピング PCR

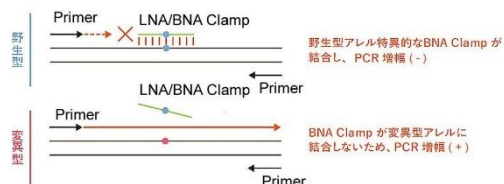
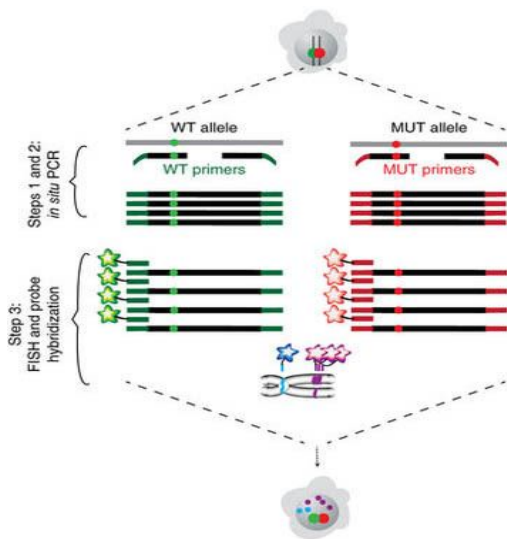


図 3: 変異遺伝子・野生型特異的 Star-FISH 法

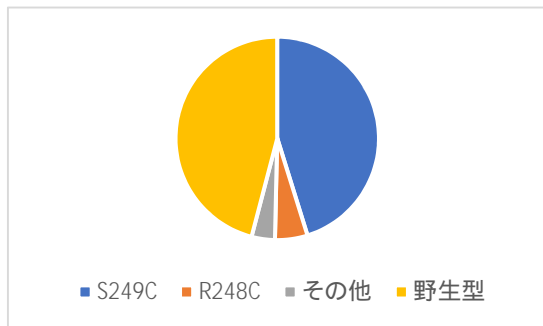


4. 研究成果

・研究の主な成果

(1) まず, 2003 年から 2015 年に TURB によって採取された 135 例の膀胱尿路上皮癌のホルマリン固定・パラフィン包埋検体から腫瘍 DNA を抽出し, FGFR3 遺伝子, TERT 遺伝子変異の有無を Sanger 法にて検索した. FGFR3 遺伝子変異は 73 例(54.1%)に見られ, このうち exon 7 における R248C, S249C の変異が 93.2% を占めた(図 1: S249C: 83.6% ,R248C: 9.6%).

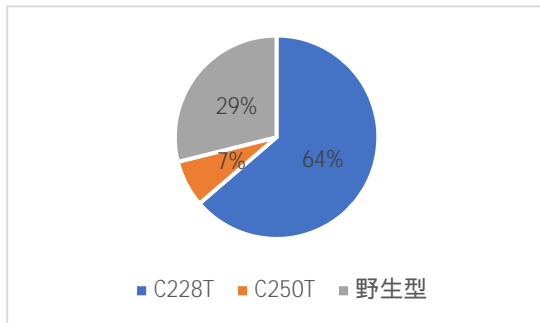
図 3: 膀胱癌 135 例の FGFR3 遺伝子変異



TERT 遺伝子プロモーター領域の変異は 96 例 (71.1%) の症例に見られ, すべて C228T, C250 の変異であった(図 2: C228T: 89.6%, C250T: 10.4%). 全体として FGFR3 遺伝子, TERT 遺伝

子のいずれかに変異を有するものが 116 例 (85.9%), 変異をもたないものが 19 例 (14.1%) であった.

図 4: 膀胱癌 135 例の TERT 遺伝子変異



(3) 次に, LAMP 法, AS-PCR 法, Star-FISH 法にて組織切片上での FGFR3 遺伝子 (exon 7) と TERT 遺伝子(プロモーター領域)の in situ PCR を試みた. 組織切片上では AS-PCR 法のみで FGFR3 遺伝子, TERT 遺伝子のシグナルが蛍光顕微鏡下に確認された(写真 1, 2). 残念ながら, LAMP 法ではバックグラウンドが強く, いずれの遺伝子のシグナルも明瞭には確認し得なかった. また, Star-FISH 法においては観察されるシグナルが微弱で, いずれの標本においても明瞭な所見を得ることができなかった.

写真 1: FGFR3 遺伝子のシグナル(AS-PCR 法)

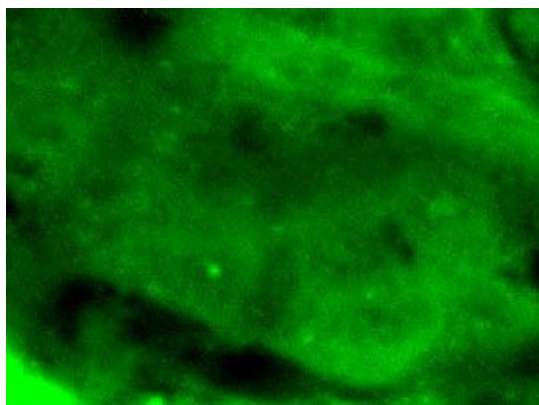
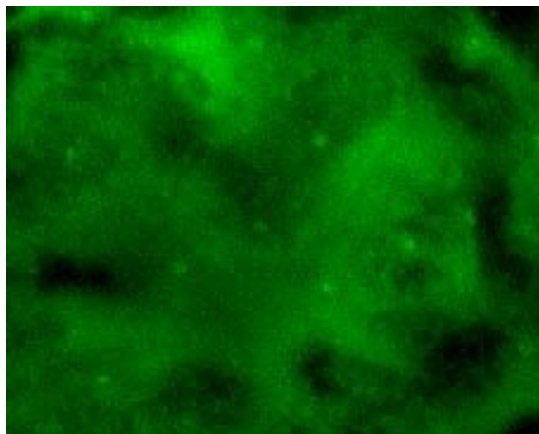


写真 2: TERT 遺伝子のシグナル(AS-PCR 法)



いずれにおいても腫瘍細胞 1 個あたり，2 個のシグナルが確認される．

(4)以上の結果より，LAMP 法・Star-FISH 法による組織切片上での増幅 DNA の検出は困難と考え，以降は AS-PCR 法にて変異遺伝子の検出を試みた．まず，組織から抽出した DNA を用いて，変異遺伝子特異的な BNA プライマーと野生型遺伝子に特異的に結合して DNA の増幅を阻害する BNA クランピング PCR を実施した．最も適性と考えられたプライマー，ブロッカーの塩基配列を以下に示す．

(太字は BNA)

FGFR3 exon 7 (S249C, R248C)

Forward: GCGTCGTGGAGAACAAGTTT

Reverse: CACTGTACACCTTGCACTGG

Blocker: **CACAGAGCGCTCC**-PO₄

TERT C228T

Forward: GTCCCCGGCCAGCCCTT

Reverse: CCCACGTGCGCAGCAGGAC

Blocker: GTCCCCGGCCAGCCCC**C**-PO₄

TERT C250T

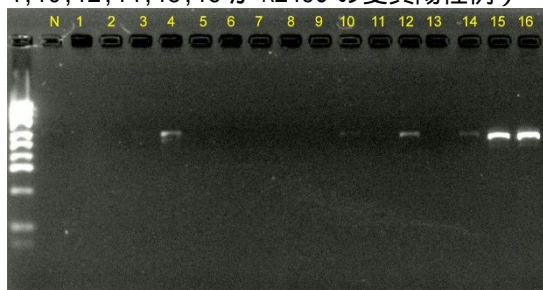
Forward: GCCCGTCCCGACCCCTT

Reverse: CCCACGTGCGCAGCAGGAC

Blocker: GCCCGTCCCGACCCCT**C**-PO₄

結果としては *FGFR3*/R249C, *TERT*/C228T, C250T のいずれにおいても変異陽性症例のみで遺伝子増幅が得られた (写真 3)．

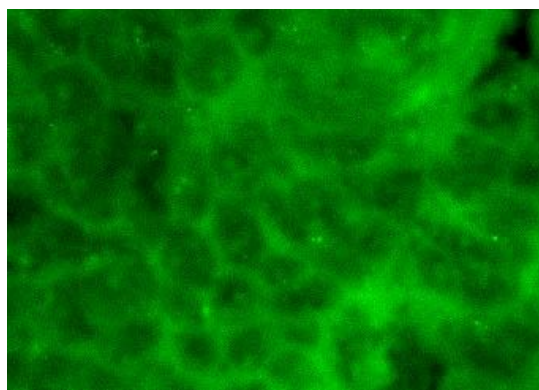
写真 3: BNA クランピング PCR による *FGFR3* 変異遺伝子の増幅 (増幅バンドが検出される 4, 10, 12, 14, 15, 16 が R249C の変異陽性例)



(5)以上の結果を基にして，組織切片上での *FGFR* 変異遺伝子 (S249C, R248C) と *TERT* 変異遺伝子 (プロモーター領域 C228T, C250T) を特異的に増幅し，野生型遺伝子の増幅が抑制される *in situ* BNA クランピング PCR を試みた．プライマーと BNA ブロッカーは上記のものを用いた．結果として，いずれの変異遺伝子においても変異を有する腫瘍細胞には 1 個のシグナルを有するものとシグナルを認めないものが見られ，全体としてはシグナルの見られない細胞が過半数を占めた (写真 4)．また，中には 2 個のシグナルを有するものがわずかながら認められた．非腫瘍細胞においては，シグナルはほとんど検出されなかった．いずれの変異遺伝子の *in situ* PCR においてもシグナルが検出されなかった腫瘍細胞が多く見られた理由は，おそらくは BNA ブロッカーが変異遺伝子にもハイブリダイズされ

て，プライマーからの塩基の伸長が不十分であったものと推察される．また，2 個のシグナルを有するものが少数見られたが，これが腫瘍細胞の aneuploidy によるものか，もしくは，野生型 DNA の非特異的な増幅が生じたのかは確認できていない．いずれにしても，現段階では本アッセイが標的となる変異遺伝子を検出する能力は感度，特異度共に十分とは言えず，臨床病理学的な応用にはプライマー，ブロッカーの濃度を含めた PCR 条件の改良の余地があるものとする．

写真 4: *FGFR3*/R249C 変異遺伝子のシグナル (AS-PCR 法)



・得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

(1)従来 of PCR 法による評価が困難であった非腫瘍細胞混入の多い細胞診検体においても，遺伝子変異を有する細胞の同定が可能となる可能性が示唆された．病理診断・細胞診断において標本上で腫瘍細胞における遺伝子変異の有無が確認可能であれば，病理組織における形態変化と遺伝子変異の関連が可能となり，また，診断精度の向上にも大きく寄与することが考えられる．完成されたアッセイの構築には至らなかったものの，*in situ* PCR を用いた変異遺伝子陽性細胞の検索が今後の膀胱癌のスクリーニング精度の向上に寄与する可能性を示したものとする．

(2)本研究の原理は他の多様な腫瘍における特異的な点突然変異の可視化にも十分応用可能なもので，今後の改良によって多様な腫瘍の生検組織診断・細胞診断の精度の向上に寄与するものと考えられる．

・今後の展望

- (1) PCR 条件の改良を図り，臨床応用可能な膀胱尿路上皮癌における *FGFR3* 遺伝子，*TERT* 遺伝子変異陽性細胞の可視化アッセイの確立を目指す．
- (2) 同様の遺伝子変異スペクトラムを有する腎盂・尿管癌についても，本アッセイの適応を図る．
- (3) *TERT* 遺伝子変異を有する多様な悪性腫瘍

(膠芽腫，悪性黒色腫，肝細胞癌など) の
組
織・細胞診断への応用を図る。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

山崎一人、木全淳一郎、山田正俊、
石田康生

TERT 遺伝子プロモーターの活性化変異は非
筋層浸潤膀胱癌の再発に關与する
第 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 13 日
仙台

山崎一人、木全淳一郎、山田正俊、
石田康生

in situ PCR 法を用いた変異 FGFR3 遺伝子の
同定
第 106 回日本病理学会総会 2017 年 4 月 29
日 新宿

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.teikyo-.ac.jp/
~chiba/02_bumon/0209_byori/](http://www.med.teikyo-.ac.jp/~chiba/02_bumon/0209_byori/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 一人 (YAMAZAKI, Kazuto)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：6 0 3 0 2 5 1 9

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

豊永 安洋 (TOYONAGA, Yasuhiro)

木全 淳一郎 (KIMATA, Junichiro)