

令和 2 年 8 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15649

研究課題名(和文)細胞診検体から診断に有用な遺伝子点変異を検出・視覚化する

研究課題名(英文)Detection of point mutations in cytology samples.

研究代表者

松崎 生笛(Matsuzaki, Ibu)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60647428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞診材料を用いてin vitroとin situの両面からがん細胞の遺伝子点変異を解析する方法を開発することを目指した。まず、遺伝子変異検出の一環として、融合遺伝子の検出を検討した。その結果、培養細胞を用いたin vitroにて、人工核酸やRCA法は使用せず、LAMP法のみでEML4-ALK、SYT-SSX、IgH/BCL2の融合遺伝子検出に成功し、論文発表した(Acta Histochem Cytochem. 2017)。比較的安価で簡便なLAMP法単独での遺伝子変異の検出の成功は、今後は細胞診材料を用いた遺伝子変異の解析の可能性をより広げ、診断や治療に貢献できると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養細胞を用いたin vitroにて、人工核酸やRCA法は使用せず、LAMP法のみでEML4-ALK、SYT-SSX、IgH/BCL2の融合遺伝子検出に成功し、論文発表した。LAMP法は比較的安価で特別な機械を使用することなく、一定温度で反応させ、検出までの工程を1ステップで行うことができる高感度遺伝子増幅法である。また目視検出薬をあらかじめ加えて反応させることで、特別な機器を必要とせず、目視で増幅を確認できる。今後、この方法を細胞診材料に応用できれば、簡便に遺伝子解析を行うことができ、細胞診断の正診率の向上のみならず、治療戦略を立案するためのコンパニオン診断に寄与できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a method for analyzing gene point mutations both in vitro and in situ using cytodiagnostic materials. I examined the detection of the fusion gene, firstly. As a result, we succeeded in detecting the fusion gene of EML4-ALK, SYT-SSX, and IgH / BCL2 in vitro by the LAMP method without using the RCA method using artificial cells or cultured cells. The paper was accepted (Acta Histochem Cytochem. 2017). Since artificial nucleic acids are expensive, successful detection of gene mutations using the LAMP method alone, which is relatively inexpensive and convenient, can broaden the possibility of analyzing gene mutations using cytology samples and contribute to diagnosis and treatment.

研究分野：細胞診断学

キーワード：細胞 遺伝子変異 細胞診

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞診は検体を比較的容易に採取でき、病変の良悪性鑑別や組織型の診断ができる検査法として、近年、臨床的意義がますます高くなっている。この細胞診検体を用いて、30分程度で簡便に遺伝子解析をすることができ、細胞上での遺伝子異常を視覚化することが可能になれば、より正確な細胞診断が可能になるばかりでなく、治療選択を立案する上で重要なコンパニオン診断に迅速に対応することができる。我々は遺伝子異常の中でも、悪性腫瘍に頻繁にみられる遺伝子点変異の検出に着目し、in vitro と in situ の両面から解析する手法の開発を目指している。in vitro の手法としては、Loop mediated isothermal amplification (LAMP)法の原理と人工核酸の特性を合わせて、液状化した細胞診検体から30分程度で遺伝子点変異を検出することを目指している。一方、in situ の手法としては、Rolling Circle Amplification (RCA)法の原理を応用したもので、細胞診検体の個々のがん細胞上で遺伝子点突然変異を視覚化できれば、細胞診断の正診率の向上に大きく、寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、細胞診検体に人工核酸を加えた Loop mediated isothermal amplification (LAMP)法や Rolling Circle Amplification (RCA)法の原理を応用して、in vitro と in situ の両面からがん細胞の遺伝子点突然変異を解析する方法を開発することを目指していたが、点変異のみならず様々な変異の検出の可能性を探るため、融合遺伝子検出を検討した。

3. 研究の方法

融合遺伝子の検出は以下の方法を用いた。検討した融合遺伝子は、EML4-ALK 融合遺伝子、滑膜肉腫の SYT-SSX 融合遺伝子、および濾胞性リンパ腫の IgH/BCL2 融合遺伝子である。

LAMP法で用いる基本的な primer セットは6つの領域を対象とした4種類であり、それぞれの融合遺伝子の検出を可能とする primer を設計した。

Fluorescence in situ hybridization 法および polymerase chain reaction (PCR)法を用いて、培養細胞 (H2228、HS-SY- および TK) が目的の融合遺伝子 (EML4-ALK 融合遺伝子、SYT-SSX 融合遺伝子、および IgH/BCL2 融合遺伝子) を有しているかを確認した。

それぞれの培養細胞から抽出した RNA から cDNA を合成し、設計した primer を用いて LAMP法を施行した。

増幅された DNA を、real time PCR 装置、電気泳動後のゲル撮影および目視検出薬を用いた検出を行った。

培養細胞由来の cDNA を 10、100 および 1000 倍希釈し、LAMP法によって、融合遺伝子が検出できるか検討した。

4. 研究成果

使用した H2228、HS-SY- および TK 細胞はそれぞれ EML4-ALK 融合遺伝子、SYT-SSX 融合遺伝子、および IgH/BCL2 融合遺伝子を有していた。(図 1A-C)

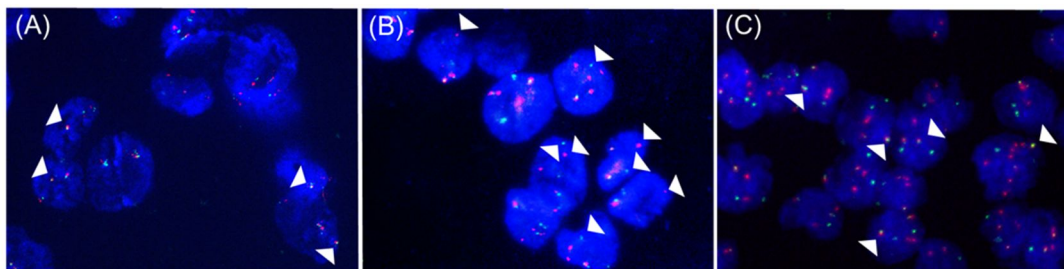


図1 FISH法による融合遺伝子の検出

A: H2228細胞を用いた EML4-ALK 融合遺伝子の検出(融合法) B: HS-SY-II細胞を用いた SYT-SSX 融合遺伝子の検出(スプリット法) C: TK細胞を用いた IgH/BCL2 融合遺伝子の検出(融合法)

EML4-ALK 融合遺伝子、SYT-SSX 融合遺伝子、および IgH/BCL2 融合遺伝子について、それぞれいくつかの primer セットを検討し、最適な primer セットの設計に成功した。検出方法については、real time PCR 装置、電気泳動後のゲル撮影および目視検出薬のいずれでも検出が可能であった。(図 2A-I)

LAMP 法を用いるといずれの融合遺伝子も 1000 倍希釈までは検出可能であった。(図 2J-L)

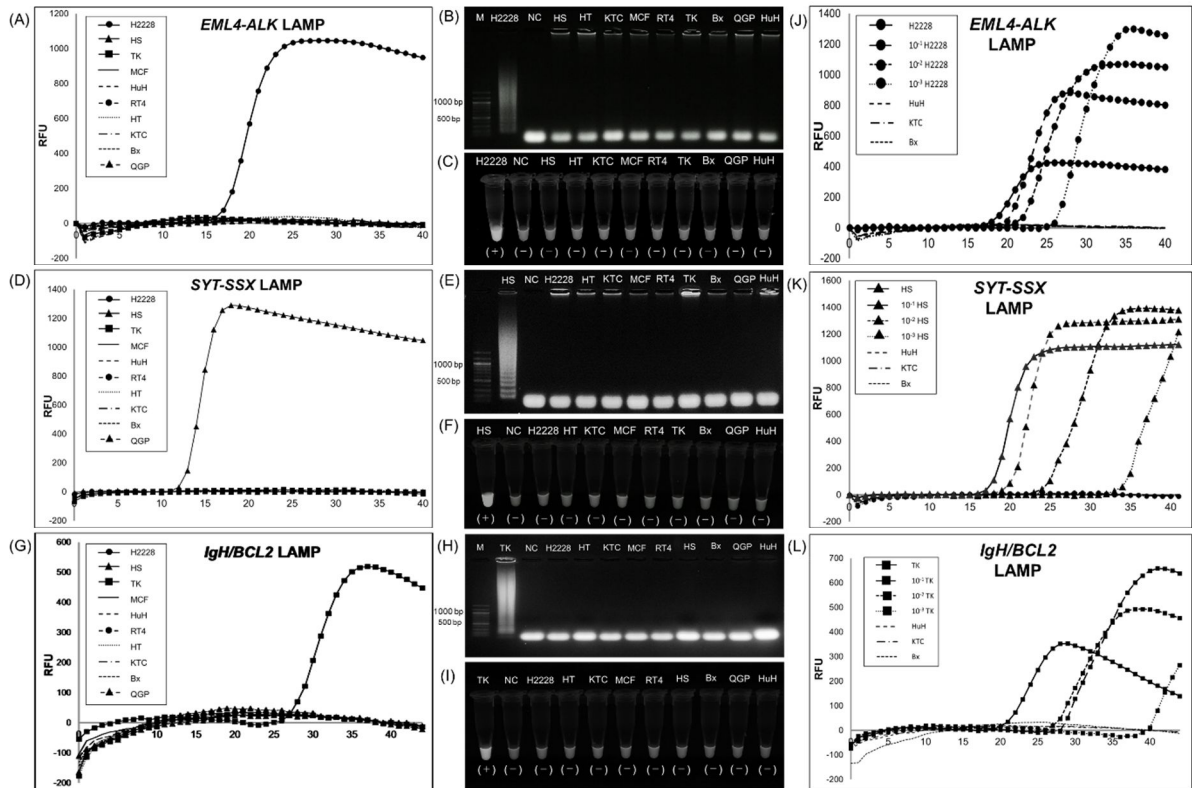


図 2 LAMP 法による融合遺伝子の検出

A-C: EML4-ALK 融合遺伝子の検出、D-F: SYT-SSX 融合遺伝子の検出、G-I: IgH/BCL2 融合遺伝子の検出、J-L: 10 倍、100 倍、1000 倍希釈した cDNA を用いた、LAMP 法によるそれぞれの融合遺伝子の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ibu Matsuzaki, Hideto Iguchi, Yurina Mikasa, Hiromu Morishita, Katsuya Okuda, Keita Nakaguchi, Yuki Mori, Yoshifumi Iwahashi, Kenji Warigaya, Masakazu Fujimoto, Fumiyo Kojima, Shin-ichi Murata	4. 巻 50
2. 論文標題 Novel Application of Loop-mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Gene Translocation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 169,176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.17024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松崎生笛
2. 発表標題 LAMP法を応用した遺伝子転座を迅速簡便に検出する手法の検討
3. 学会等名 第58回日本組織細胞化学会総会
4. 発表年 2017年

〔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
---------------------------	-----------------------	----