

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15299

研究課題名(和文) 癌組織中に含まれる遺伝子変異細胞の高感度検出法の構築

研究課題名(英文) Imaging analysis of gene mutated cancer cells using peptide nucleic acid (PNA) probes

研究代表者

重藤 元 (Shigeto, Hajime)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：60805662

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)：本研究はがん組織中に含まれるEGFR遺伝子に変異の持つ細胞の有無を高感度に検出する手法の開発を行った。まず標的認識能に優れたペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid; PNA)を用いた蛍光プローブの開発を行った。さらに開発したプローブと1細胞解析のための細胞チップ技術を組み合わせることで、単一細胞レベルで遺伝子変異細胞を検出する測定系を開発した。また組織切片上の変異細胞を解析可能であることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞はその発生の過程で様々な遺伝子変異を獲得する。これらの変異の有無が抗がん剤の奏効率に大きく影響することから、次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査が推奨されている。しかし解析を行う細胞の中に標的変異細胞が20%以上存在しなければ検出ができない、検査を行える施設に限られる等の問題を抱えている。本研究で開発した手法を用いることで、変異を持たない細胞の中から20%以下の遺伝子変異がん細胞を定量検出することが可能となる。さらに細胞チップ技術との融合による血中循環がん細胞の変異遺伝子解析や、血中循環がん細胞由来DNAの検出による低侵襲な超早期がん診断法への応用展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Lung-cancer cells harbor the various gene mutations in the mRNA sequence of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Therefore, the imaging analysis of EGFR mutations is required for the treatment planning for non-small cell lung-cancers. This study focused on the imaging analysis of a single nucleotide substitute in EGFR mutated cancer cells. We developed three novel peptide nucleic acid (PNA)-DNA probes for recognizing and detecting the following three gene mutations in EGFR gene mutations. The probes emitted fluorescent dose-dependent signals against three target DNA and RNA. Using the PNA probes, we succeeded in discriminating three kinds of lung-cancer cell lines which have different EGFR mutation distinguished using the by fluorescence in situ hybridize (FISH) method.

研究分野：分子生物学、分子認識プローブ開発

キーワード：がん 遺伝子変異 分子認識プローブ イメージング

研究開始当初の背景

現在、日本人の2人に1人が一生のうち何らかのがんを発症すると推定されており、効率的な治療法、診断法の開発は喫緊の課題となっている。非小細胞性肺がんの発症原因の一つに、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 遺伝子の変異による成長シグナルの暴走がある。EGFR 遺伝子のチロシンキナーゼドメイン部位に変異が生じることで、EGF が受容体に結合していないにも関わらずシグナルが活性化され、細胞の無制限の増殖が促される。そこで、肺がんに対する抗がん剤として Gefitinib (イレッサ®) が用いられている。Gefitinib は変異の発生した EGFR のチロシンキナーゼドメインに結合することで、シグナル伝達を阻害する。しかし近年、長期間の Gefitinib の投与は EGFR 遺伝子のさらなる変異を誘導し、Gefitinib に対する耐性を獲得した細胞が発生することが判明した。そのため、EGFR 遺伝子をはじめとする抗がん剤の感受性・耐性に関する遺伝子の変異の有無や箇所を早期に検出することは、薬剤の選択や治療方針の決定、すなわち治療の成否に関わる重要課題である。

がん細胞の遺伝子変異と抗がん剤の感受性・耐性の関連を解析するために、近年急速に進歩している次世代 DNA シーケンサーを用いたがん組織の全ゲノム解析が進められている。しかし次世代シーケンサーを用いた解析は正確性や解析速度に優れているが、がん発症直後の早期の診断には不向きである。これはがん発症初期の組織に含まれる大部分の細胞には遺伝子の変異は起こっていない、もしくは抗がん剤とは関連のない箇所の変異であると考えられているためである。一方で真に重要な、抗がん剤の耐性に関連する箇所に変異を持つ細胞を検出することは、その他の大多数の細胞のデータに埋もれてしまい、困難となる。そこでがん組織内に含まれるごく少量の細胞の遺伝子変異を検出するためには、これまでとは異なるアプローチの単一細胞レベルでの検出方法が必要となる。

研究の目的

本研究の目的はがん発症初期において抗がん剤耐性細胞の出現を解析するための、新しい診断デバイスを開発することである。摘出した組織に抗がん剤耐性に関連する遺伝子変異を持つ細胞が存在すれば、異なる標的の抗がん剤を用いる、あるいは抗がん剤以外の方法で治療を試みる等の選択が可能となる。さらに本研究で開発するプローブは細胞が生きたまま、遺伝子変異を検出することが可能なことから、検出した遺伝子変異のある細胞(もしくはない細胞)への、これから治療に用いる抗がん剤の有効性を、実際の患者由来細胞を用いてそのまま解析することも可能となる。本研究は我々が開発する独自の核酸プローブと細胞チップがあって初めて実現する、新しいアプローチの診断デバイスである。本研究で開発する診断デバイスを用いることで、がん患者から組織を採取した直後の早期の段階で抗がん剤の感受性・耐性細胞の診断が可能となることから、効率的かつ迅速な治療を実現できるという点で非常に有用である。また本診断デバイスにより耐性獲得というがん細胞の進化の要因や段階を解析することにも応用が可能であり、学術的な意義も大きい。さらにプローブの認識部位を変えることで、あらゆる核酸の検出が可能であり、その汎用性も非常に優れている。

研究の方法

3-1 EGFR mRNA 中の変異を検出する核酸プローブの設計と合成

ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid; PNA)を用いて EGFR 中の変異を検出するためにプローブの設計を行った。exon19 Δ E746-A750, L858R および T790M 部位と相補的な配列を有する PNA を設計した。合成した PNA に様々な長さを有するエチレンリンカーを介して蛍光色素(FAM)を修飾した。さらに消光基(Dabcyl)を修飾した DNA を合成し、PNA とハイブリダイゼーションさせることで PNA プローブを作製した。作製した PNA プローブの性能評価は、標的配列を有する DNA と 37°C で 2 時間反応させ、蛍光スペクトロメーター(島津製作所)を用いて蛍光スペクトルを測定することで行った。

3-2 プローブを用いた細胞内変異遺伝子の検出

EGFR に遺伝子変異を有する肺がん細胞株(H1975; +T790M, +L858R および PC9; +exon19ΔE746-A750)を用いて解析を行った。それぞれの細胞は 10%FBS を有する RPMI1640 培地に播種し、37°C、5% CO2 環境下で培養した。コンフルエントになった細胞を 96 ウェルプレートに播種後、ホルマリン固定を行い70%エタノールで細胞膜を破壊後、PNA プローブで染色を行った。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス)で観察した。

3-3 細胞チップ技術を用いた単一細胞レベルでの遺伝子変異細胞の検出

ポリスチレンを射出成形することで作製した細胞チップ(精工技研)を、プラズマ表面処理を行い親水化した。その後親水化した細胞チップに遺伝子変異を有する細胞(H1975)と変異のない細胞(A549)を各濃度比で混合し、播種した。その後 PNA プローブ、DAPI、およびがん細胞マーカーであるサイトケラチン抗体を用いて染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

3-4 組織切片上に含まれる遺伝子変異細胞の検出

H1975, PC9, A549 細胞株をそれぞれマウス皮下に移植することで作製したがん組織からホルマリン固定組織切片(FFPE)の作製を行った。作製した切片を用い、脱パラフィン処理後、PNA プローブで染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

4. 研究成果

がん組織中に含まれる EGFR 遺伝子に変異の持つ細胞の有無を高感度に検出する方法の開発を行った。患者から摘出したがん組織中の遺伝子変異細胞を検出するには、単一細胞レベルでの解析が必要となる。そこで本研究はまず、標的認識能に優れた PNA を用いた蛍光プローブの開発を行った。さらに 1 細胞解析のための細胞チップ技術と組み合わせることで、単一細胞レベルで遺伝子変異の有無を解析した。

4-1 EGFR mRNA 中の変異を検出する PNA プローブの開発

EGFR mRNA を標的とし、抗がん剤の感受性・耐性に関わる exon19ΔE746-A750, L858R および T790M の 3 箇所を標的とし、プローブの開発をした。本研究では 1 塩基置換の遺伝子変異を検出する必要があることから、DNA に代わりより塩基配列

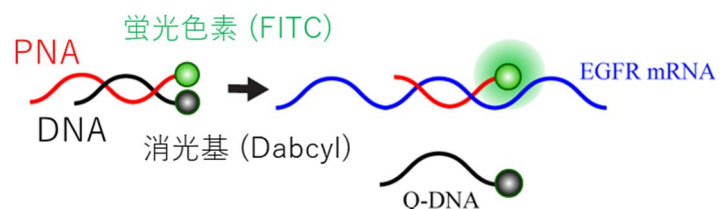


図1 本研究で開発したプローブと検出原理の概要

の認識特異性に優れた人工核酸であるペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid; PNA)を使用したプローブ開発を行った。開発したプローブは蛍光基を修飾した PNA と消光基を修飾した DNA で構成され、標的の変異配列と結合することで蛍光が増強される(図1)。まず作製したプローブを用いて標的配列の検出可能性を検討した。変異の存在する標的と反応させた際、標的濃度依存的に蛍光シグナルが上昇した。このことから開発した PNA プローブを用いることで、変異の存在する標的配列を特異的に検出可能であると結論した。次にさらなる検出感度、特異性向上のためにプローブの改良を行った。PNA 部位と蛍光色素をつなぐリンカーの長さを改良することで最適な消光基と蛍光基の位置関係を検討した。検討の結果、最適なリンカー配列を用いることで検出感度と特異性を数倍~数十倍に向上させることに成功した。

そこで次に、遺伝子変異を持つ細胞株をモデルとして細胞内の変異 mRNA を検出することが可能であるか検討した。開発した PNA プローブを用いて Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 解析を行った結果、変異を持つ細胞株を染色した際、変異を持たない細胞株と比較して高いシグナルを発することが分かった(図 2)。これらの結果から、本研究で開発した PNA プローブを用いることで、EGFR 遺伝子に変異を持つ遺伝子変異細胞の検出可能性が示された。

3種PNAプローブを用いたFISH解析による
遺伝子変異抗癌剤耐性癌細胞の検出
(肺癌細胞H1975株; - exon19del, +T790M, +L858R)

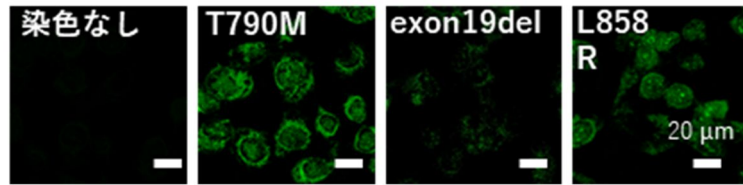


図 2 開発したプローブを用いた遺伝子変異細胞株の FISH 解析結果

4-2 細胞チップと核酸プローブの組み合わせによる単一細胞レベルでの遺伝子変異細胞の検出法の確立

次に開発したプローブを用い、細胞チップ技術と組み合わせることで単一細胞レベルでの遺伝子変異細胞の検出に挑戦した。血中に存在する血中循環がん細胞(Circulating Tumor Cells ; CTC)を本研究で開発した PNA プローブで解析するために、細胞チップ技術と組み合わせることで少数の変異細胞の検出に挑戦した。多数の細胞の中に、様々な濃度比の遺伝子変異細胞を混合し細胞チップ上に播種した。その後 PNA プローブを用いて標的細胞の検出を試みた(図 3)。解析を行った結果、播種した変異細胞数に対応した割合の陽性細胞が検出され、最小で 5% 以下の変異細胞を検出することに成功した(図 4)。以上の結果から、細胞チップ技術とプローブ技術を組み合わせることで次世代シーケンサーを超える感度で単一細胞レベルでの遺伝子変異細胞の検出に成功したと結論した。

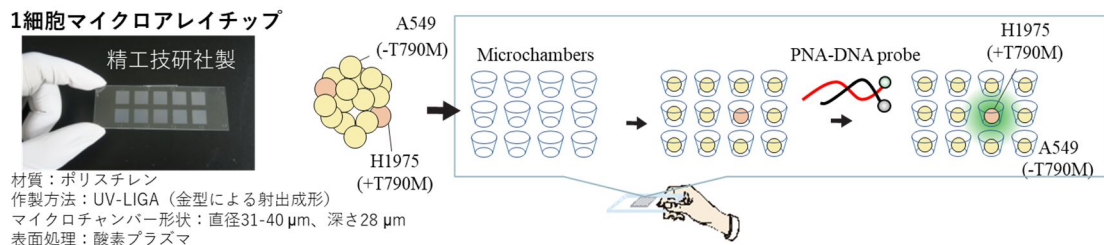
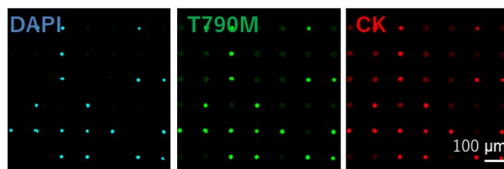


図 3 本研究で用いた細胞チップとプローブ技術の融合による変異細胞検出法の概要

100% H1975 (+T790M) 変異肺癌細胞



100% A549 (-T790M)

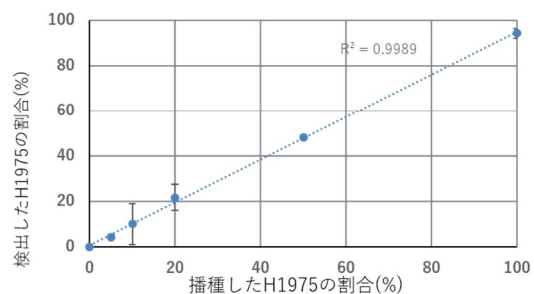
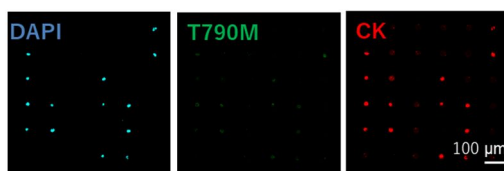


図 4 細胞チップとプローブ技術を用いた変異細胞の染色画像と解析結果

4-3 PNA プローブを用いた組織切片上の遺伝子変異細胞の検出法の確立

最後にごん患者から摘出した検体の組織切片上の遺伝子変異細胞を検出する診断法へ応用するために、マウス皮下に移植した細胞株から作製したがん組織の組織切片を用い解析を行った。変異を持つ細胞から作製した組織切片を本研究で開発したプローブを用いて解析を行った結果、一部検出が困難な標的も存在したが、移植した細胞が存在する箇所に強い蛍光が検出されたことから、組織切片上からでも遺伝子変異細胞の解析が可能であると結論した。

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 1件）

1. 著者名 Shigeto Hajime, Ohtsuki Takashi, Iizuka Akira, Akiyama Yasuto, Yamamura Shohei	4. 巻 144
2. 論文標題 Imaging analysis of EGFR mutated cancer cells using peptide nucleic acid (PNA)-DNA probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 4613 ~ 4621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9AN00725C	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 -

1. 著者名 Shigeto Hajime, Yamada Eriko, Kitamatsu Mizuki, Ohtsuki Takashi, Iizuka Akira, Akiyama Yasuto, Yamamura Shohei	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of Single Nucleotide-Mutated Single-Cancer Cells Using the Combined Technologies of Single-Cell Microarray Chips and Peptide Nucleic Acid-DNA Probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 628 ~ 628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi11070628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 重藤 元、大槻高史、飯塚明、秋山靖人、山村 昌平
2. 発表標題 PNAプローブを用いたEGFR遺伝子変異癌細胞のイメージング検出法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山村 昌平、山田 恵理子、木村 蒔子、宮島 久美子、重藤 元
2. 発表標題 1細胞マイクロアレイチップを用いた各種細胞の特性評価
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第37回研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重藤 元、大槻高史、秋山靖人、山村 昌平
2. 発表標題 ペプチド核酸を用いた抗癌剤耐性癌細胞の検出プローブの開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳井宏太、渡邊和則、重藤 元、山村 昌平、大槻高史
2. 発表標題 RNA上の二つの変異を同時に検出する新規プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重藤 元、大槻高史、秋山靖人、山村 昌平
2. 発表標題 ペプチド核酸プローブを用いたEGFR変異癌細胞検出法の検討
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重藤 元、大槻 高史、飯塚 明、秋山 靖人、山村 昌平
2. 発表標題 PNAプローブを用いたEGFR遺伝子変異癌細胞のイメージング検出法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 路子、山田 恵理子、重藤 元、山村 昌平
2. 発表標題 高集積型細胞チップを用いた乳がん細胞の検出
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山村 昌平、木村 路子、山田 恵理子、重藤 元
2. 発表標題 高集積型細胞マイクロアレイチップを用いた乳がん細胞の検出
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020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

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