

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16650

研究課題名（和文）筋肉内粘液腫における最適なGNAS遺伝子スクリーニング法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for detecting GNAS gene variants in intramuscular myxoma

研究代表者

鬼頭 宗久（Kito, Munehisa）

信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教

研究者番号：60624707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：精度の高い検索方法を行うことでGNAS遺伝子変異検索が、筋肉内粘液腫と低悪性度粘液線維肉腫との鑑別に有用であることを本研究で明らかにすることが出来た。様々なバリエーションを網羅的に検索することを目的とした場合は、次世代シーケンシング法が優れているが、ホットスポット変異のみにターゲットを絞れば、PCRベースの解析方法（PNA clamp法を併用したPCR-制限酵素処理フラグメントシグナル解析、PNA clamp法を併用したPCRダイレクトシーケンシング法）で、変異を同定することは十分に可能であり、有用な方法であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、次世代シーケンシング法による遺伝子解析は、飛躍的進歩を遂げている。超低頻度のバリエーションを高感度に検出し、様々なバリエーションを網羅的に解析できる。そのため次世代シーケンシング法の有用性を疑う余地はないが、時間や費用の観点からすべての症例で行うことは難しい。本研究で採用したPCRベースの解析方法は、ホットスポット変異のみにターゲットを絞った場合に限っては簡便・高精度に変異の同定が可能である。本方法を行うことで、多くの施設で筋肉内粘液腫のGNAS変異を同定できるため、臨床医の治療方針決定の大きな手助けになり、過剰治療もしくは過少治療を減少させ患者の大きな利益につながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we were able to demonstrate that GNAS gene variant search is useful for differentiating intramuscular myxomas from low-grade myxofibrosarcomas by performing a highly accurate search method. Although next-generation sequencing is superior when the aim is to comprehensively search for various variants, if only hotspot variants are targeted, PCR-based analysis methods (fragment signal analysis using restriction digestion and capillary electrophoresis after PCR combined with PNA clamping/PCR-direct sequencing combined with PNA clamping) was sufficient to identify the variants and was a useful method.

研究分野：整形外科学

キーワード：筋肉内粘液腫 GNAS遺伝子変異 PNA 制限酵素 フラグメントシグナル解析 次世代シーケンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋肉内粘液腫は、GNAS 遺伝子ミスセンス変異 (エクソン 8 コドン 201) を持つ良性腫瘍である。悪性腫瘍である低悪性度粘液線維肉腫とは画像・組織学的所見が似通っており鑑別に苦慮する。2つの腫瘍の治療方針が大きく異なるため、鑑別をつけられない場合、過剰治療もしくは過小治療どちらも生じうるため患者にとって大きな不利益となる可能性がある。

(2) GNAS 遺伝子変異検索は両腫瘍の鑑別に有用と報告されているが、DNA を抽出できる組織内腫瘍細胞数が少ないため、変異同定のためには高精度の検出方法が必要である。次世代シーケンサーによる遺伝子解析は、高精度に変異を検出できる反面、実施可能な施設に限られるため実臨床においてすべての症例で行うことは難しい。そのため、従来の遺伝子解析法で GNAS 遺伝子変異の同定が可能かどうかを検証し、次世代シーケンサーを含めた各種方法の中で総合的に最適な検索方法を探ることは臨床上重要な課題である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、GNAS 遺伝子のミスセンス突然変異の検出が最も効率的である遺伝子解析法を明らかにする。そして筋肉内粘液腫と低悪性度粘液線維肉腫の鑑別に有用であるかを検討し、実臨床に応用することが最終的な目的である。

3. 研究の方法

(1) 信州大学医学部附属病院にて腫瘍摘出術を行い、ホルマリン固定パラフィン包埋標本より DNA 抽出が可能であった筋肉内粘液腫 10 例・低悪性度粘液線維肉腫 9 例を研究対象とした。

(2) GNAS エクソン 8 コドン 201 の塩基配列を解析対象とした。配列情報は NCBI Reference Sequence Database より取得し、Accession ID:NM_000516.5 を参照した。

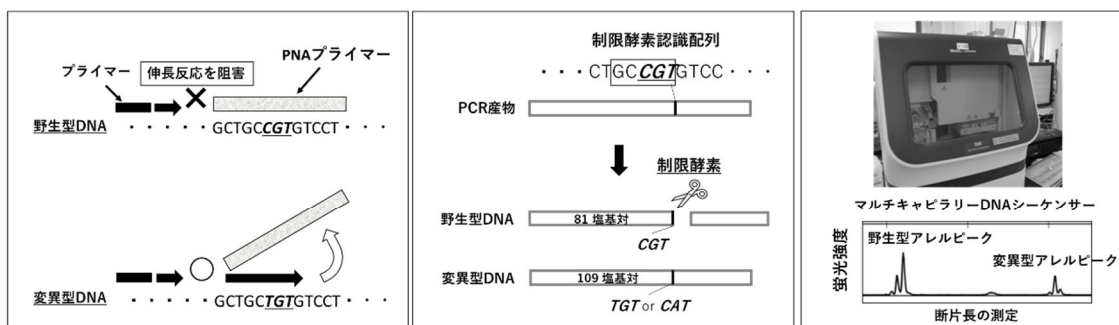
(3) GNAS 遺伝子ミスセンス変異解析は以下の 4 つの方法を行った。

PCR ダイレクトシーケンス法

GNAS エクソン 8 を標的としたシーケンス用タグ付加プライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動にて増幅産物の確認を行い、抽出した。次にシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。

PNA クランプ法を併用した PCR- 制限酵素処理- キャピラリー電気泳動によるフラグメントシグナル解析 (下図: 解析方法シェーマ)

PNA クランプ法を用いた PCR 反応は、GNAS エクソン 8 を標的としたシーケンス用タグ付加プライマーに 6-FAM 蛍光標識したプライマー、およびクランプ PNA を用いた。その後、PCR 産物の制限酵素処理を行い、キャピラリー電気泳動を行った。81 塩基対に認められるピークを野生型アレレルピーク、109 塩基対に認められたピークを変異型アレレルピークとし、アレレル相対値を変異型アレレルピークの高さ/野生型アレレルピークの高さとして算出した。



① PNA クランプ法を併用した PCR 反応による野生型 DNA 増幅阻害

② 制限酵素処理

③ キャピラリー電気泳動によるフラグメント解析

PNA クランプ法を併用した PCR ダイレクトシーケンス法

PNA クランプ法を用いた PCR 反応は、GNAS エクソン 8 を標的としたシーケンス用タグ付加プライマーに 6-FAM 蛍光標識したプライマー、およびクランプ PNA を用いた。PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動にて増幅産物の確認を行い、抽出した。次にシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。

次世代シーケンス法

ホルマリン固定パラフィン包埋標本用に最適化された GNAS 用 NGS パネルをデザインした。ライブラリー調製を行ったあと、シーケンスを行った。シーケンスデータは、Torrent Suite software 5.8 (Thermo Fisher Scientific) を使用してヒトゲノム hg19 にマッピングした。バリエーションは Torrent Variant Caller プラグインを使用し、検出した。検出されたバリエーションは、ClinVar、dbNSFP3.4c、dbSNV1.1 の処理済みファイルを用いて、SnPEff および SnpSift によりアノテーションされた。

(4) 感度の検討

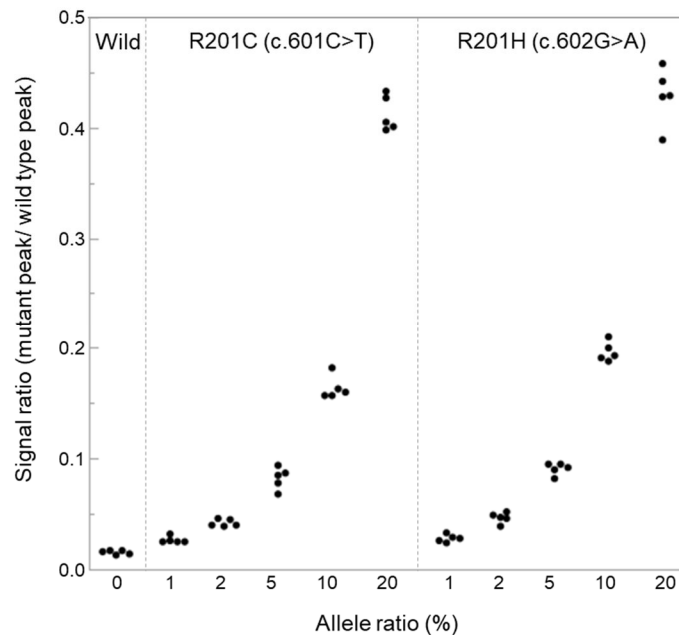
変異検出感度を検討するため、GNAS エクソン 8 の野生型配列を TA Cloning Kit with pCR2.1 Vector を用いてクローニングし、プラスミドを作製した。組換え体を用いて One Shot™ INV F' Chemically Competent E. coli を形質転換し培養した後、プラスミド DNA を抽出した。また、抽出した野生型配列プラスミド DNA に、変異導入を行い、変異型配列プラスミド (c.601C>T p.R201C, c.602G>Ap.R201H) を作製した。作製したプラスミドは DNA 量よりコピー数を決定した。野生型配列プラスミドを用いて変異型配列プラスミドを希釈し、20, 10, 5, 2, 1% の希釈系列を作製した。作製した各濃度の変異型配列プラスミドを用いて PNA クランプ法を併用した PCR-制限酵素処理- キャピラリー電気泳動によるフラグメントシグナル解析を実施した。

(5) 各解析法の感度・特異度を評価した。

4. 研究成果

(1) 解析法の変異検出感度

フラグメントシグナル解析による変異型配列プラスミド測定結果を下図に示す。両変異ともに変異アレル頻度 5%以上のプラスミドサンプルでは、野生型配列プラスミドサンプル (変異アレル頻度 0%) と識別された (20%: $p>0.01$, 10%: $p>0.01$, 5%: $p=0.04$)。一方、2%においては、有意差がなかった ($p=0.39$) ため、本法の変異検出感度は 2~5%の間と考えられた。変異アレル頻度 5% プラスミドサンプルのアレル平均相対値は c.601C>T で 0.082、c.602G>A で 0.091 であったため、陽性カットオフ値を 0.08 とすることで変異アレル頻度 5%以上のサンプルの変異を検出することが可能であると考えられた。



(2) GNAS エクソン 8 コドン 201 変異解析

PCR ダイレクトシーケンス法では、筋肉内粘液腫で 4 例に変異を認めた (R201C 3 例・R201H 1 例)。PNA クランプ法を併用した PCR-制限酵素処理- キャピラリー電気泳動によるフラグメントシグナル解析では、筋肉内粘液腫で 8 例、低悪性度粘液線維肉腫で 1 例が陽性判定となった。PNA クランプ法を併用した PCR ダイレクトシーケンス法では、筋肉内粘液腫で 8 例に変異を認めた (R201C 4 例・R201H 4 例)。次世代シーケンス法では、解析対象のうち、ターゲット領域全体がカバーできており、どの領域も 1000 reads を超えているものを評価対象として採用した。結果として筋肉内粘液腫 9 例・低悪性度粘液線維肉腫は 6 例が評価対象となり、筋肉内粘液腫で 7 例に変異を認めた (R201C 3 例・R201H 4 例)。各解析法の感度/特異度は、PCR ダイレクトシーケンス法で 0.4/1・PNA クランプ法を併用した PCR-制限酵素処理- キャピラリー電気泳動によるフラグメントシグナル解析で 0.8/0.89・PNA クランプ法を併用した PCR ダイレクトシーケンス法で 0.8/1・次世代シーケンス法で 0.78/1 であった。

(3) 解析時間・コスト (本研究期間における当院でのデータ: 参考値)

DNA 抽出後の解析時間概算は、次世代シーケンス法と比較して PCR ダイレクトシーケンス法で 1/6 (460 分/2760 分)・PNA クランプ法を併用した PCR-制限酵素処理- キャピラリー電気泳動によるフラグメントシグナル解析で 1/10 (270 分/2760 分)・PNA クランプ法を併用した PCR ダイレクトシーケンス法で 1/6 (460 分/2760 分) であった。初期コスト・人件費を除く解析ランニングコストは、次世代シーケンス法と比較して PCR ダイレクトシーケンス法で 1/16・PNA クランプ法を併用した PCR-制限酵素処理- キャピラリー電気泳動によるフラグメントシグナル

解析で 1/16・PNA クランプ法を併用した PCR ダイレクトシーケンス法で 1/12 であった。

本研究の結果、精度の高い検索方法を行うことで GNAS 遺伝子変異検索が、筋肉内粘液腫と低悪性度粘液線維肉腫との鑑別に有用であることが明らかになった。様々なバリエーションを網羅的に検索することを目的とした場合は、次世代シーケンス法が優れていることは周知の事実であるが、ホットスポット変異のみにターゲットを絞れば PCR ベースの解析方法（PNA クランプ法を併用した PCR- 制限酵素処理- キャピラリー電気泳動によるフラグメントシグナル解析、PNA クランプ法を併用した PCR ダイレクトシーケンス法）で、変異を同定することは十分に可能である。短時間・安価に多くの施設で実施できる高精度の検索方法を開発できたことは、実臨床への応用が可能であり大きな意義がある。今後の課題は、より小さな生検検体においての本法の有用性を検証することと同様の GNAS 変異を有する疾患（線維性骨異形成・腓管内乳頭粘液性腫瘍・低悪性度虫垂粘液性腫瘍・大腸絨毛性腺腫・McCune-Albright 症候群）においても本法が有用であるか検討することである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鬼頭宗久, 岩谷舞, 重藤翔平, 山口智美, 岡本正則, 青木薫, 田中厚誌, 小松幸子, 出田宏和, 古庄知己, 高橋淳
2. 発表標題 筋肉内粘液腫におけるGNAS遺伝子変異検出法の開発 : PNA clamp法を併用したPCR-制限酵素処理フラグメント解析
3. 学会等名 第96回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Munehisa Kito, Mai Iwaya, Shohei Shigeto, Tomomi Yamaguchi, Tomoki Kosho
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETECTING GNAS GENE MUTATIONS IN INTRAMUSCULAR MYXOMA: COMBINED PNA CLAMPING WITH PCR-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS
3. 学会等名 The 14th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鬼頭宗久, 岩谷舞, 重藤翔平, 山口智美, 岡本正則, 青木薫, 田中厚誌, 出田宏和, 古庄知己, 高橋淳
2. 発表標題 筋肉内粘液腫における最適なGNAS遺伝子変異検出法の開発
3. 学会等名 第57回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 遺伝子疾患の検出方法	発明者 鬼頭宗久 重藤翔平 岡本正則 山口智美 高橋淳 古庄知己	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-056588	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------