

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月24日現在

機関番号：15401  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2010～2011  
課題番号：22659253  
研究課題名（和文） ビデオマススコープによる EGFR 遺伝子変異の単一細胞レベル超高感度検出法の開発  
研究課題名（英文） Development of an ultra-sensitive detection of EGFR gene mutations by single-cell level video-mass-scope  
研究代表者  
岡田 守人 (OKADA MORIHITO)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号：70446045

## 研究成果の概要（和文）：

肺癌 EGFR 遺伝子変異の超高感度検出法を開発すべく、ビデオマススコープによる低分子細胞成分パターンの模索、培養細胞集団から得た細胞内抽出液を用いて、液体クロマトグラフィー質量分析法による細胞内低分子パターンの高感度網羅的解析を行った。EGFR 変異を有する細胞株では glucose や脂肪酸の運搬に関わる carnitine 類や MFN 1、actin-related protein 2/3 complex subunit 3 が特異的に存在し、これらのアミノ酸や蛋白が EGFR 変異に関連する可能性が示唆された。ビデオマススコープを用いた測定が超高感度検出法として応用可能と考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

To develop an ultra-sensitive detection method for EGFR gene mutations in lung cancer, search for the patterns of low-molecular-weight cellular component by video-mass-scope was performed. Using the extract in the cells obtained from cultured cell populations, comprehensive analysis with liquid chromatography mass spectrometry was carried out for high sensitivity of low molecular patterns. In cell lines with EGFR mutations, carnitine, which is involved in the transport of fatty acids, glucose, MFN1 and actin-related protein 2/3 complex subunit 3 are present specifically. The proteins and amino acids can be related to EGFR mutations. Video-mass-scope is suggested to be applied as an ultra-sensitive detection method for EGFR mutations in lung cancer.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：腫瘍学，肺がん，がん悪性度診断，EGFR，肺腺癌

## 1. 研究開始当初の背景

Gefitinibなどの上皮増殖因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼ活性阻害剤は肺癌において著効を示す場合がある一方、致死的な副作用を発症することがある。EGFR遺伝子異常の存在と薬剤感受性が一致することから、EGFR 遺伝子異常検出により感受性を予測でき、効率的でかつ副作用の少ない肺癌治療が行うことができる。しかし、ここに大きな問題が存在する。現在その診断に使用している検体は、癌細胞以外に多量の正常細胞を含んでいる。さらに、EGFR 遺伝子は10 種類以上の異なった変異形式を取る。以上より、EGFR遺伝子異常を有する癌細胞を検索するには、多量の正常遺伝子存在下で多種の変異を検出できる高感度検査系の確立が必要である。

また、「質量分析 (分子の重さを量って、その分子が何であるかを特定する)」を用いた細胞分析において、我々は「Live Single-Cell Mass Spectrometry (ライブで生きたまま、1 個の細胞の動きと物質を同時に分析する手法)」を確立した (J Mass Spectrom. 2008;43:1692-700)。この新分析法によってわずか1 ピコリッター (10 のマイナス 12 乗リッター) にも満たない1 個の細胞の動きをビデオで観察し、変化の瞬間、その中にひそむ数千種類の分子を直接一斉に分析し、より速くより的確に特定することができる。

## 2. 研究の目的

肺癌においてEGFR 遺伝子変異の有無によ

り投与前に薬剤感受性を予測でき、効率的でかつ副作用の少ない治療が可能になってきた。しかし検体には少量の癌細胞しか存在しない場合が多く、既存のPCR法の感度では満足できない。本研究では単細胞内成分まで把握できる新開発の細胞ビデオ・マススコープ質量分析を用いて多種類のEGFR遺伝子異常を極めて高感度、しかも短時間で検出したい。循環癌細胞 (CTC) や血液・喀痰での検出を最終目標とする。既存法では100個に1個の変異を検出できるが、本法では細胞1個ごとの変異を検出でき、臨床的意義は大きいと考える。

## 3. 研究の方法

1) EGFR 変異型と野生型の肺癌細胞の調達と培養 細胞株をそれぞれの至適条件下で培養、継代し、実験に必要な量の細胞を維持し、実験に供する。

2) ビデオマススコープによる低分子細胞成分パターンの模索 培養細胞株それぞれからビデオマススコープ法により、1 細胞由来の細胞成分を抽出し、質量分析で低分子成分の網羅的な分析を行う。野生型のパターンと変異型のパターンを比較して、変異の有無、種類に特異的な成分を検出する。さらにEGFR 変異ペプチドやオリゴヌクレオチド由来の成分を同定する。ここでペプチドやオリゴヌクレオチド由来の成分の同定ができなかった場合、低分子成分全体のパターンの中から変異特異的な他の分子の存在を探索する。さらに培養上清成分においても質量分析によ

る EGFR 変異特異的分子パターンを検出を行う。

3) ひとつの細胞レベルでの EGFR 変異の検出 ビデオマススコープ質量分析法により 1 細胞由来の細胞成分を抽出し、その低分子パターンを取得する。

4) 組織検体における EGFR 変異の検出と個々の細胞内の成分分析

i) 検体に対する適切な前処理法の検討 得られる検体の種類や状態によってはそのままではビデオマススコープ法を行えない場合が予想される。その場合は模索的に薄切標本の作成や薬剤処理、染色など行う必要があり、それらの方法や手順についてルーチン化を行う。

ii) 肺癌患者から臨床検体の取得 患者からの気管支鏡による生検・細胞診、針生検の検体や手術材料の採取・保存、患者臨床情報の入手・管理につき、病理部や手術部など学内各機関との調整に当たり、倫理委員会の承認を得る。

iii) 組織検体による EGFR 変異の検出 同意を得て患者から提供された検体に関して従来の方法 (PCR) によって変異を調べる。次にビデオマススコープ法により、1 細胞由来の細胞成分を抽出し EGFR 変異に特異的な低分子パターンを取得する。さらに細胞内の成分の分布を解析し標本中での分布マッピングを行う。従来法とビデオマススコープ法の両者の感度と特異性を比較し、後者がより有用であることを立証する。

iv) ひとつの変異がん細胞内の分布の検討 検出法を確立するため異なる検体の間での変異の有無だけではなく、ひとつの細胞の成分を得られるという本方法の特徴を活かし、変異がん細胞内での分布について解析する。

#### 4. 研究成果

EGFR 変異を有さない細胞株ではアミノ酸として serine、glutamine、histidine、asparagine、hydroxyproline、N-acetylputrescine、threonine、tyrosine が、タンパク質として CCDC148、protein chloride intracellular channel protein 1 が、その他 adenine (プリン体) や pantothenate (ビタミン類) が特異的に存在する可能性が示唆された。一方、EGFR 変異を有する細胞株では glucose や脂肪酸の運搬に関わる carnitine 類や MFN 1、actin-related protein 2/3 complex subunit 3 が特異的に存在する可能性が示唆された。これら特定されたがアミノ酸や蛋白が EGFR 変異に関連するかは更なる検討を要するが、1 細胞成分からの分析でも再現性が得られれば、ビデオマススコープを用いた測定が超高感度検出法として応用可能と考えられる。EGFR 遺伝子変異の有無を表わす最も効率的な指標の選定及びそれを再現できる効果的な 1 細胞分析が必須であり、質量分析法の設定とともに進行中である。

#### 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 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 守人 (OKADA MORIHITO)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号：70446045

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし