

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792011

研究課題名(和文) 唾液腺癌・口腔癌における新規遺伝子変異の検査法開発と治療戦略の検討

研究課題名(英文) Development of detection system of gene mutation and treatment strategy for salivary and oral cancer

研究代表者

迎 章太郎 (MUKAE, Syotaro)

日本大学・歯学部・研究員

研究者番号：70553105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではEGFR-1からのシグナル伝達に關与するKRAS遺伝子変異の状況を検討するために、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を応用し、KRAS codon 12, 13の変異を迅速に検出できるシステムを開発した。本システムはLAMPプライマーとlock primerを設定し、変異型KRASを検出する方法である。同部位の遺伝子変異を生じている細胞株(NCI-H1573、T84)から抽出されたgDNAをコントロールとしたところ、12分程度で検出できた。さらに培養細胞を反応液に加えたところ20分程度でKRAS変異の検出が可能であった。

研究成果の概要(英文)：We develop a rapid detection system for KRAS gene mutation, which is based on modified Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system. The mutation are involved with downstream signaling of EGFR-1. The system is consisted of 5 LAMP primers and a lock primer. gDNA was extracted from cancer cell lines (NCI-H1573 and T84), which have point mutation in KRAS codon 12 and 13. The system detects mutation within 12 minutes. Moreover, incubation with boiled cells results amplification of mutated KRAS gene within 20 minutes.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：がん 遺伝子変異 KRAS スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

口腔に発生する悪性腫瘍の大部分は上皮性悪性腫瘍(癌)である。特に唾液腺癌に対する制癌剤の治療効果は低く、リンパ節転移や遠隔臓器転移の生じた症例の予後は極めて不良であり、新規制癌剤の開発や適用が期待されている。近年、受容体型チロシンキナーゼの一つであるepidermal growth factor receptor (EGFR)-1を標的とした分子標的薬、cetuximab (Erbix®)やpanitumumab (Vectibix®)が開発され切除不能な大腸癌症例へ保険適用され良好な成績を収めている。これらの分子標的薬はEGFR-1に対する特異抗体であり、腫瘍細胞が発現しているEGFR-1のリガンド結合部位に結合することにより、epidermal growth factorなどの結合、EGFRのダイマー形成や、EGFRのリン酸化を阻害し、下流へのシグナル伝達を遮断する。またオプソニンとしての作用も期待されている。

しかしながら、EGFR-1の細胞外ドメインが欠損し、恒常的に細胞内に存在するチロシンキナーゼドメインが活性化している症例が種々の癌で報告されている。さらにEGFR-1に入力されたシグナルを下流に伝達するKRASに突然変異、特に一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)を持つ症例は、cetuximabの治療効果が低いことが知られている。KRASが常に活性化され下流にシグナルを送る結果、細胞増殖、アポトーシス抑制、血管新生、浸潤・転移などがおこることが原因と考えられている。

KRAS遺伝子の変異は大腸癌の50%、膵臓癌の90%および肺腺癌の30%に検出され、その多くはcodon 12および13番目のpoint mutationである。

現在、cetuximab投与の指標としてEGFR-1の免疫組織学的評価が利用されているが、本手法ではRASの突然変異は検索が不可能であり、医療費増加に繋がると考えられる。またRAS突然変異の検討にはダイレクトシーケン

ス法などが応用されているが、未だにコストと時間がかかり、検索は容易でない。

2. 研究の目的

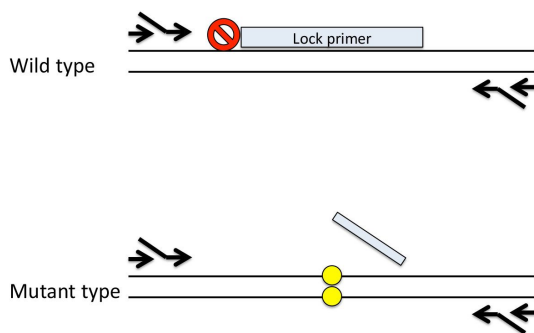
本研究の目的は、EGFR-1とその入力を下流に伝達するKRAS遺伝子のSNPを認識する迅速で簡便な検査法を開発することにある。さらに本手法を用いて、EGFR-1からのシグナルを下流に伝達する経路の遺伝子変異の状況を各種癌細胞で検討する。

3. 研究の方法

等温度によるDNA増幅技術(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)によるEGFR-1シグナルを構成する遺伝子群、特にKRAS遺伝子の突然変異検出システムを確立する。細胞株のそれぞれからDNAを抽出し、LAMPを利用した一塩基多型特異的プライマーを設計し、至適条件を設定した後に、遺伝子変異が報告されている細胞株から得られたgDNAをテンプレートとして、EGFR-1と下流のシグナル伝達経路を構成する遺伝子の突然変異を検索する。

KRAS codon12, 13の変異が知られている肺癌細胞株(NCI-H1573: 35G>C, G12A)および大腸癌細胞株(T84: 38G>A, G13D)をATCCから購入した。細胞株を10%ウシ血清添加RPMI1640で培養し、Qiagen社のDNeasy Mini kitを用いてgDNAを抽出した。分光光度計でgDNAの濃度及び純度を測定し、実験に供した。

KRAS codon12, 13を含む領域を挟むように、exon 2領域内にLAMPの基本プライマー(F3/ B3, FIP / BIP)と、上流域ループプライマーを設計した。またcodon12, 13に相当する部位にlock primerを設計した。このlock primerは塩基配列がフルマッチの場合は核酸に強固に結合し、LAMP反応を阻害する。一方、一部にミスマッチがある場合はTm値が著しく低下するために核酸から遊離し、LAMP反応を阻害しない。

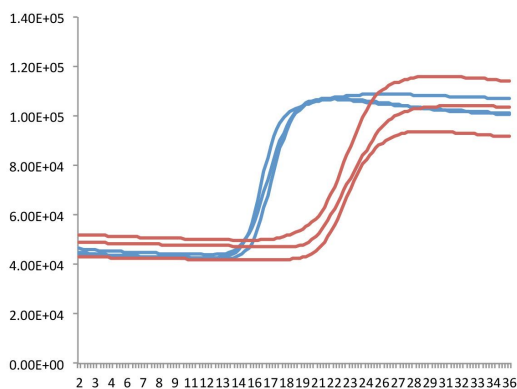


4. 研究成果

本研究ではKRAS codon12, 13の変異を迅速に検出できるシステムを開発した。本システムはKRASのexon 2領域内に設定したLAMPプライマー一式とlock primerを組み合わせることにより変異型KRASを検出する方法である。

細胞株より抽出されたgDNAをコントロールとして改変形LAMP法を行ったところ、変異型KRASは12分程度で検出可能であった。

一方、野生型KRASは20分で増幅反応が検出され、閾値を18分に設定することで変異型と野生型の弁別が可能であった。

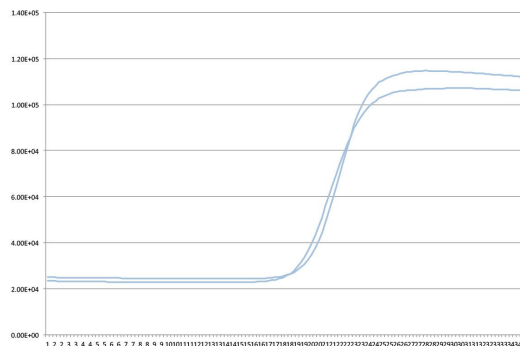


本システムによるKRAS遺伝子変異の検出例

KRAS遺伝子変異型（青色）は反応後12分より遺伝子の増幅が見られるが、野生型（赤色）は反応の抑制により20分から増幅が見られる。

大腸内視鏡生検組織、唾液や気管支肺胞洗浄液からgDNAを抽出する操作は比較的煩雑であり、熟練を要す。そのためgDNA抽出を省略するために、未処理材料を検体とすることを想定し、以下の実験系を施行した。培養細胞をPBSで洗浄した。細胞をPBSに懸濁し、98℃で1分間、加熱して検体とした。その結果、細

胞株より抽出したgDNAを検体とした場合より反応速度は遅くなるものの、約20分程度で変異が検出可能であった。



腫瘍細胞加熱検体によるKRAS遺伝子変異の検出例

腫瘍細胞をPBSに懸濁し加熱したものを検体とした。LAMP反応開始後、約20分から遺伝子の増幅が見られる。

また細胞診検体の余剰細胞を検体とすることを想定し、培養細胞を95%エタノールで固定し、PBSで洗浄した。細胞をPBSに懸濁し、98℃で1分間、加熱して検体とした。その結果、細胞株より抽出したgDNAを検体とした場合より反応速度は遅くなるものの、40分程度で変異が検出可能であった（data not shown）。

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）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

none

6. 研究組織

(1)研究代表者

迎 章太郎 (MUKAE, Syotaro)

日本大学・歯学部・研究員

研究者番号 : 70553105

(2)研究分担者

none

(3)連携研究者

none

(4)研究協力者

小宮山 一雄 (KOMIYAMA, Kazuo)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号 : 00120452

関 みつ子 (SEKI, Mitsuko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号 : 20226640

松本 直行 (MATSUMOTO, Naoyuki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号 : 20386080