

平成 28 年 4 月 13 日現在

機関番号：32665
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25462934
研究課題名(和文) 新規遺伝子増幅法を用いた発がん関連遺伝子検出システムの構築

研究課題名(英文) Development of detection system of oncogene expression

研究代表者
松本 直行 (MATSUMOTO, Naoyuki)
日本大学・歯学部・助教

研究者番号：20386080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR-1及びKRAS遺伝子の変異検出システムを構築し、口腔細胞診検体を用いてこれら遺伝子変異の検出を試みた。

それぞれの遺伝子変異に対してプライマーを設計し、数種の細胞株を用いて遺伝子変異の検出を行った。その結果、約20分で遺伝子変異の検出が可能であった。口腔細胞診検体を用いたところ、明らかな変異は検出できなかった。細胞株の数や条件を調整して同様に実験したところ、少量の細胞(10-100個)から上記遺伝子変異が検出された。以上から口腔細胞診検体にはこれらの遺伝子の変異陽性症例が少ないか、あるいは角化細胞からの検出が困難と推測された。

研究成果の概要(英文)：We developed detection systems for EGFR-1 and KRAS gene mutation. In addition, we attempted detection of these gene mutations from oral swab specimen.

We designed primer sets for each gene mutations, and investigate several cell lines. The result showed that the system detected gene mutations within 20 minutes. However, oral swab failed detection of these gene mutations. We simulate the number and preparation conditions in cell line, which resulted lower detection limit (10-100 cells). These data indicate that there are very few mutation positive cases or it is difficult to detect from keratinized cells.

研究分野：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：遺伝子変異 新規遺伝子増幅法 EGFR KRAS がん スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

成長因子は細胞の増殖や機能獲得に重要な役割を果たす。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) は様々な成長因子と結合し、RAS 経路を介して細胞の増殖を引き起こす。がん細胞も正常な細胞と同様に EGFR により細胞の機能が調節され、がん細胞の増殖、アポトーシス抑制、血管新生や浸潤・転移など、生体に不利な現象が生じる。

EGFR は近年注目されている分子標的薬のターゲットである。EGFR チロシンリン酸化阻害薬や EGFR 抗体薬は EGFR の機能を阻害し、がん細胞の増殖などを抑制する。

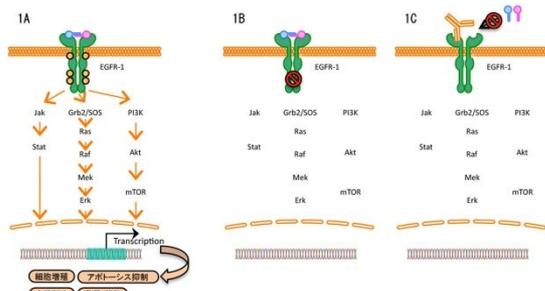


図1 EGFR の役割と、分子標的薬の作用機序

(A)EGFR に成長因子が結合すると、そのシグナルが核内に伝えられ、腫瘍細胞の増殖、アポトーシス抑制、血管像性や、浸潤・増殖が引き起こされる。(B) EGFR チロシンリン酸化阻害薬は EGFR の細胞内領域のリン酸化を阻害し、その機能を低下させる。(C) EGFR 抗体薬は EGFR の細胞外領域に結合し、成長因子の結合を阻害して、その機能を低下させる

肺癌をはじめとする様々な癌に、EGFR 遺伝子変異が生じる。EGFR 遺伝子の変異が高頻度に見られる部位は、EGFR タンパクの細胞内領域に存在するチロシンリン酸化領域に相当する、exon 19, codon 746 - 753 である。同部位に変異が生じている場合、EGFR チロシンリン酸化阻害薬の奏効率が高まることが知られており、肺がん診療ガイドライン (日本肺癌学会 2014 年) や、National Comprehensive Cancer Network の非小細胞肺癌治療ガイドライン (NCCN 2013 年) では、EGFR チロシンリン酸化阻害薬を投与するにあたり、EGFR 遺伝子の変異を検査するよう推奨されている。

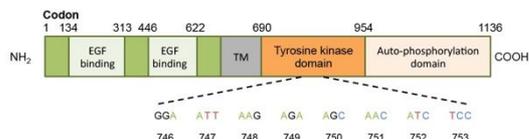


図2 EGFR タンパクの構造

肺癌における EGFR 遺伝子変異は、チロシンリン酸化領域に相当する codon 746 - 753 に集中する。

一方で、EGFR の下流に存在する KRAS 遺伝子に変異がある場合、KRAS が恒常的に

活性化された状態となり、抗 EGFR 抗体薬や、EGFR チロシンリン酸化阻害剤の奏効率が低下することが知られている。KRAS 遺伝子変異は、EGFR 抗体薬を投与する基準となっている。

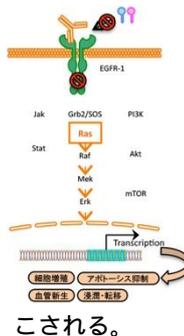


図3 KRAS 遺伝子変異と抗 EGFR 抗体薬

EGFR のシグナルを伝達する KRAS に遺伝子変異がある場合、EGFR がリン酸化されなくても核内へシグナルが伝えられ、腫瘍細胞の増殖、アポトーシス抑制、血管像性や、浸潤・増殖が引き起こされる。

従来、EGFR 遺伝子をはじめとする遺伝子変異の検出は、がん組織からゲノム DNA を抽出・精製し、直接塩基決定法や polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)法などによりおこなわれていた。がん組織からのゲノム DNA の抽出は約 1~2 日を要する上に、手技の習熟を要していた。直接塩基決定法は解析結果を得るまでに約 1 週間を要し、PCR-SSCP 法は約 3 日間の期間を要していた。両遺伝子変異検出法は、解析に手技の習熟が必要であるほか、試薬や機材が高額である。上記の理由により、遺伝子変異の検出を希望する場合は、外部機関へ解析を依頼するのが常であった。

2. 研究の目的

本研究では、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を応用した、迅速で簡便な EGFR 遺伝子や KRAS 遺伝子の変異検出システムを構築・ブラッシュアップすることである。さらにこの方法を用いて、口腔細胞診検体を試料としてこれら遺伝子変異の検出を試みることにある。

LAMP 法は PCR 法と同じ遺伝子増幅技術である。LAMP 法は特定のターゲット領域に 4~6 種のプライマーを設計し、鎖置換型 DNA ポリメラーゼを用いることから、PCR 法に比べて、感度・特異度が高く、反応時間が短い性質がある。LAMP 法を元にして、正常な遺伝子の塩基配列を認識し、遺伝子増幅を阻害するロックプライマーを加えた、変異特異的 LAMP 法を確立する。

3. 研究の方法

細胞診検体から核酸 (DNA および RNA) を抽出し、遺伝子増幅に用いるまでそれぞれを保存した。蛍光による LAMP 法の検出システムをチェックするために、EGFR 遺伝子の exon 19, codon 746 - 753 に存在する突然

変異ホットスポットに対してプライマーを試作し、最終的に基本プライマー4種に加えループプライマー1種を設計した。さらにEGFR遺伝子の exon 19, codon 746 – 753 に結合し、LAMP 反応を阻害するロックプライマーを設計した。同部位に遺伝子変異が生じている培養細胞から得られた DNA を元に Isothermal Master Mix (ニッポンジーン社) を用いて LAMP 反応溶液を調整した。LAMP 法及び遺伝子変異特異的 LAMP 法では、遺伝子が増幅するに伴い、反応液に蛍光が生じる。これらの反応液の蛍光強度を Genie II (等温増幅蛍光測定装置、OptiGene 社) により経時的に計測し、遺伝子の増幅量とその速度を測定した。遺伝子の増幅速度の比較をするため、蛍光強度が立ち上がる時間を増幅時間 (Tp) と定義し、測定した。

遺伝子変異特異的 LAMP 法では、ロックプライマーが野生型遺伝子の増幅を阻害するため、Tp の遅延が見られる。一方、通常の LAMP 法では野生型遺伝子であっても遺伝子増幅反応が阻害されないため、両者の Tp 間に差が生じる。

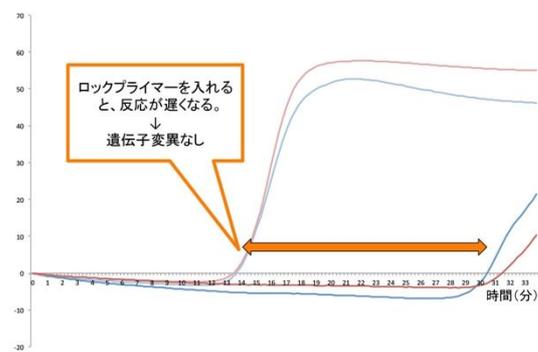


図4 遺伝子変異特異的 LAMP 法と通常の LAMP 法
野生型遺伝子を対象に、遺伝子変異特異的 LAMP 法と、通常の LAMP 法を行った。通常の LAMP 法では Tp は 13 分であるが、遺伝子変異特異的 LAMP 法では Tp が 29 分と、反応の抑制が生じている。

4. 研究成果

(1) EGFR 遺伝子変異特異的 LAMP 法の構築

EGFR 遺伝子の codon 746 – 753 に遺伝子変異の生じている細胞株 (変異型) と、遺伝子変異の起きていない細胞株 (野生型) のそれぞれから抽出した核酸をもとに遺伝子変異 LAMP 増幅反応の検出を行ったところ、約 20 分で遺伝子変異の検出が可能であった。

EGFR 遺伝子変異特異的 LAMP 法で検討した細胞株の結果を表 1 に示す。

従来から用いている等温増幅濁度測定装置では検出までに約 40 分を要しており、本システムによる遺伝子変異の検出が感度に優れていると考えられた。

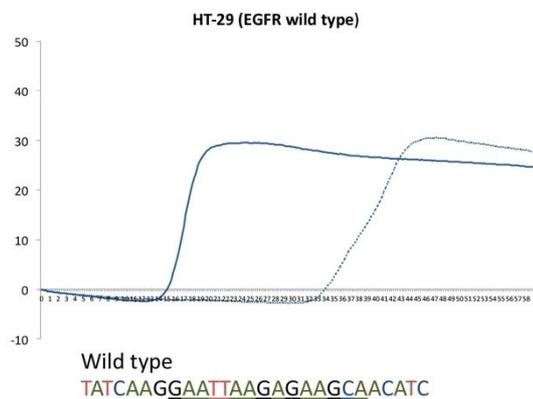


図5 EGFR 遺伝子 (変異型) の検出例
EGFR 遺伝子変異型の細胞株である HCC-827 (肺癌) では、通常の LAMP 法 (実線) と、遺伝子変異特異的 LAMP 法 (破線) の Tp に有意な差は見られない。

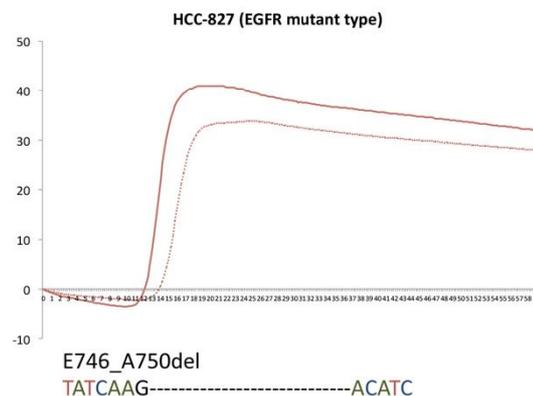


図6 EGFR 遺伝子 (野生型) の検出例
EGFR 遺伝子野生型の細胞株である HT-29 (大腸癌) では、通常の LAMP 法 (実線) と、遺伝子変異特異的 LAMP 法 (破線) の Tp に有意な差が見られた。

表 1 EGFR 遺伝子変異特異的 LAMP 法の結果

細胞株	種類	変異	結果
HCC-827	肺癌	+	NP
NCI-H1650	肺癌	+	NP
NCI-H1975	肺癌	+	NP
RPMI8228	骨髄腫	+	NP
SK-MEL-28	悪性黒色腫	+	NP
NCI-H1573	肺癌	-	遅延
HT-29	大腸癌	-	遅延
Ca9-22	口腔癌	-	遅延
HSC-3	口腔癌	-	遅延

+ : EGFR 遺伝子 codon 746-753 に変異を持つ細胞株。- : EGFR 遺伝子 codon 746-753 に変異の無い細胞株。NP : LAMP 法と EGFR 遺伝子変異特異的 LAMP 法の Tp に差が見られない (遺伝子変異あり)。遅延 : LAMP 法に比べて EGFR 遺伝子変異特異的 LAMP 法で、Tp の遅延が見られる (遺伝子変異なし)。

(2) 遺伝子変異特異的 LAMP 法を用いた口腔粘膜細胞診検体からの遺伝子変異検出

口腔細胞診検体を用いた EGFR 遺伝子と KRAS 遺伝子の変異検出を試みたが、明らかな変異は検出できなかった。細胞診検体と同じ条件で、培養細胞で実験したところ、はるかに少量の細胞 (10-100 個) から上記遺伝子変異が検出された。以上から、口腔細胞診検体には EGFR 遺伝子と KRAS 遺伝子の変異陽性症例は少ないと推測された。

この遺伝子検出システムでは蛍光検出遺伝子増幅装置を使用する。従来の機器と比べると小型で安価であるため、小規模診療施設においても遺伝子変異の検査を導入することが出来る。そのため、効率的に EGFR チロシンリン酸化阻害薬の奏功しやすい患者、すなわち、EGFR 遺伝子のコドン 746-753 に遺伝子変異を生じている患者を選別し、治療に結びつけることが可能となる。またその検出に要す時間ならびに費用が大幅に低減できる。

さらに従来では効果の期待できない薬剤を処方する事例がみられたが、これを回避することにより、医療費を削減する効果が見込まれる。

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 1 件)

- (1) Akira Kumasaka, Naoyuki Matsumoto, Shotaro Mukae, Taiichi Kitano, Hiroyasu Noguchi, Hidero Ohki, Kazuo Komiyama, Tomohiro Ando. Rapid and specific screening assay for KRAS oncogene mutation by a novel gene amplification method. Anticancer Research 2016; 36: 1571-1580. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Matsumoto N, Kumasaka A, Okudera M, Matsue Y, Nishikawa Y, Komiyama K. Rapid and specific screening assay for KRAS oncogene mutation by novel gene amplification method. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine. 25-30 May 2014, Istanbul, Turkey.
- (2) 熊坂 士、松本直行、安藤智博、小宮山一雄 .LAMP 法を応用した KRAS 遺伝子変異解析 .第 59 回日本口腔外科学会学術大会、2014 年 10 月 17 日～19 日、幕張メッセ (千葉県、千葉市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: EGFR 遺伝子の変異検出方法及びキット

発明者: 小宮山一雄、松本直行

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-98876

出願年月日: 2015 年 05 月 14 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 直行 (MATSUMOTO, Naoyuki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 20386080