

術中迅速病理診断における 遺伝子変異・マーカー分子簡易検出技術の実用化に向けた研究

羽尾裕之¹⁾, 橋本伸哉²⁾, 吉野篤緒¹⁾, 角光一郎¹⁾, 相澤 信¹⁾, 浅野正岳³⁾,
久山佳代⁴⁾, 末光正昌⁴⁾, 藤田博仁²⁾, 山田清香¹⁾, 右田 卓¹⁾, 八木千裕¹⁾

Development of new technology for intra-operative rapid pathological diagnosis

Hiroyuki HAO¹⁾, Shinya HASHIMOTO²⁾, Atsuo YOSHINO¹⁾, Koichiro SUMI¹⁾,
Shin AIZAWA¹⁾, Masatake ASANO³⁾, Kayo KUYAMA⁴⁾, Masaaki SUEMITSU⁴⁾,
Hiroto FUJITA²⁾, Sayaka YAMADA¹⁾, Suguru MIGITA¹⁾, Chihiro YAGI¹⁾

要旨

腫瘍におけるゲノム解析は急速に進展し、病理診断においてもゲノム情報の重要性は日増しに高まっている。このような背景から病理診断において、遺伝子変異やマーカー分子などの分子情報が短時間で得られれば、診断の精度向上や個別化医療・精密医療と言われている患者ごとに最も適切な治療が直ちに開始できることとなる。このことで患者が得られる利益は大きく、社会的にも重要な意義がある。現在の技術では採取した検体から手術中に短時間で遺伝子情報やマーカー分子の発現を検索することは基本的に不可能である。特に遺伝子変異の検索にはコストやスペースの問題から、一般的な普及は困難である。専用の計測機器や高度な専門技術を必要としない簡易検出技術は、病理検体処理を担当する病理検査室という様々な制約がある環境下でも実施が可能であり、診断における応用・普及の可能性が見込まれる。本学文理学部で開発が進められている Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes 法は標的分子の迅速な検出技術であり、本研究ではこの技術の病理診断への応用を検討している。

1. 緒言

2003年にヒトゲノム計画が完了し、その後個人ゲノムの解読がなされた。さらには次世代型シーケンサーの登場によって全ゲノム解析が容易に行われるようになり、多くの腫瘍のゲノム情報が公開されている。ゲノム情報から、発癌のドライバー遺伝子変異に対する分子標的治療薬の適応を決める個別化医療の時代から、さらには一人の患者の変異遺伝子を網羅的に検出し、より適切な治療を選択する精密医療の時代へと突入しつつある。精密医療による治療を睨んだ病理検体からの情報解析が、今後さらに発展し盛んに行われることは間違いなく、さらに従来からの顕微鏡を用いたスライドガラスの観察によって得られる形態学的な情報と合わせて、分子生

物学的な解析結果により、より精度の高い病理診断が可能となった。しかし、現在の技術をもってしても、この遺伝子情報の解析には一定のコストと時間が必要である。

従来の検出法では標的の核酸鎖を認識し、何らかの方法でシグナルとして検出する過程を等温で 1 tube, 1 step で行える方法は存在しなかった。Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SAT-IC) 法は1本のチューブ内で検体と環状DNA、プライマー、蛍光試薬を37℃で混入するとポリメラーゼによる複製反応が起こり、立体構造を持ったグアニン四重鎖が多数生成される反応を応用している。検体中に標的分子が存在していると蛍光試薬はグアニン四重鎖と反応し約20-30分で発色反応が起こる

1) 日本大学医学部
2) 日本大学文理学部
3) 日本大学歯学部
4) 日本大学松戸歯学部
羽尾裕之: hao.hiroyuki@nihon-u.ac.jp

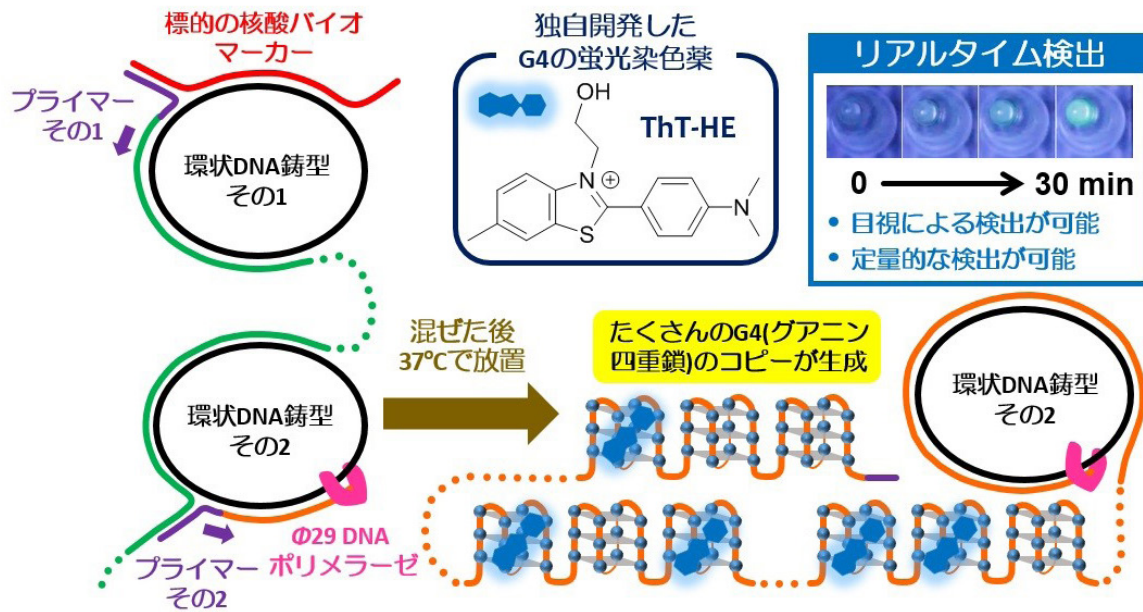


図 1

(図1)¹⁾。この技術を用いることで、ゲノムDNA、mRNAなどの様々なバイオマーカーの検出が可能である。mRNAの検出感度の検討では1-5000 pMの濃度範囲で定量測定が可能である。さらに、miRNAなどの短いRNA鎖やその変異、タンパク質やメタボライトなどの検出が可能である²⁾。

SATIC法は5件の特許があり、うち3件はJSTの外国出願支援制度の審査を経て、出願支援が採択されPCT出願を行った。さらにそのうち1件は、指定国移行についてもJSTの支援審査を通過し米国に出願中である。PCT出願をした2件については順次支援申請を行う予定である。このことから本技術は独創的、先進的技術であることが分かる。SATIC法の病理診断への応用はこれまで試みられたことがなく、本研究で得られる成果が大いに期待される。今回我々は病理組織検体を用いて短時間・低コスト・簡便に遺伝子変異やマーカー分子の発現を検出する技術を開発し、病理診断においてより正確な診断や治療に直結するゲノム情報の提供を可能とする新技術の開発の検証を行っている。

2. 研究進捗状況

昨年はSATIC法の検出感度の向上のための改良を行った。知的財産権や論文公表前の新規技術であるため現時点での詳細な公表は避ける。口腔内悪性

腫瘍において約半数で認められるp53遺伝子変異について、SATIC法での遺伝子変異の検出が可能かどうか、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株SAS、Ca9-22、HSC4を用いて変異の検出感度について検討している。今後は日本大学歯学部および松戸歯学部において、病理組織検体を用いてSATIC法による変異検出の検討を行う。また、脳腫瘍において生じる遺伝子変異の検出の可能性について検討するため、ヒト由来脳腫瘍細胞株T98G (p53変異型)、A172 (p53野生型)を用いて、遺伝子シーケンスによる変異を確認している。脳腫瘍細胞株においてもSATIC法で遺伝子変異の検出が可能かを検討する。今後は手術で得られた脳腫瘍組織検体からSATIC法での変異検出の可能性を検討する。さらに、骨軟部腫瘍の遺伝子変異の検出として、骨巨細胞腫で高率に認められる遺伝子変異H3F3AのSATIC法による変異検出の可能性を検討する目的で、手術症例の選別とこれらの腫瘍の変異の有無について検討している。本腫瘍についてもSATIC法での病理組織切片上での変異の検出の可能性について検討を行う。

本年は口腔細胞診におけるSATIC法での特定遺伝子配列の検出を目的として、はじめに口腔細胞診検体上でのGAPDH mRNAの検出を予定している。本検出に用いる環状DNAと特異的primerの設計及び合成が終了しており、現在は試薬類の至適濃度の

検討を行っておりターゲット濃度 100fM までの検出を確認している。

3. 考 察

短時間・低コスト・簡便な SATIC 法の特徴を最大限に利用し、術中迅速病理組織診断に応用した検討はこれまで世界的にも全く行われていない。本技術の病理組織検体を用いた遺伝子変異の検出や標的分子の同定が可能となれば、遺伝子検査における新たなブレイクスルーとなりえる。さらに、本検出方法の装置化によって、低コストでゲノム・遺伝子変異・蛋白質やメタボライトなどの非核酸標的の検出が可能となる。本研究は医療診断分野において広く使われている、抗体を用いた免疫組織化学やポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) などの技術に匹敵する革新的診断技術開発の基礎となると考える。本学のスケールメリットを活かし、医学部、歯学部、松戸歯学部の医歯系の部科校および文理学部における先進的な分析化学の技術の応用によって、全く新しい診断技術の開発を行っている。

SATIC 法には、検出を試薬の反応によって生じた凝集物確認する方法と反応によって生じた蛍光物質を確認する方法とがある。tube 内で行う場合には、いずれの方法も可能である。しかし、凝集物を確認する方法は検出ターゲットが空間を自由に移動可能な検出環境しか適用できず、細胞診や組織診等のスライドガラス上での検出には不向きである。従って、スライドガラス上での検出を念頭に置いてある迅速病理診断への応用は、現段階では反応によって生じた蛍光物質を確認する方法が最適であると考えられる。

また、SATIC 法の検出感度については、前述の如く 1pM へとされている。しかし、スライドガラス上における検出の如くターゲット分子が自由に移動できない環境では、想定通りターゲット分子を検出できない可能性があった。そこで、検出感度を上げる目的で GAPDH mRNA 検出の為の特異的環状 DNA 及び primer の至適濃度の検討を行い現時点で前述の 1pM を上回る 100fM の検出が可能なることを確認しており、スライドガラス上でのターゲット分子検出の期待が高まった状態となっている。

今後は、実際にスライドガラス上での検出を目指し、同試薬を用いた SATIC 法にて tube 内での GAPDH オリゴ DNA (40 塩基) の検出、細胞診検体から抽出された totalRNA における GAPDH mRNA の tube 内での検出、そして細胞診検体においてスライドガラス上での GAPDH mRNA の検出を予定している。

謝辞

本研究は日本大学学術研究助成 [総合研究] を受けて行われたものであり、謝意を表します。

文 献

- 1) Fujita H et al. Novel one-tube-one-step real-time methodology for rapid transcriptomic biomarker detection: signal amplification by ternary initiation complexes. *Anal Chem.* 88,7137-7144, doi:10.1021/acs.analchem.6b01192 (2016).
- 2) Fujita H et al. Specific light-up system for protein and metabolite targets triggered by initiation complex formation. *Sci Rep.* 7:15191, doi: 10.1038/s41598-017-15697-8 (2017).