

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³⁾, 角光一郎³⁾, 相澤 信⁴⁾, 浅野正岳⁵⁾,
久山佳代⁶⁾, 末光正昌⁶⁾, 藤田博仁²⁾, 山田清香¹⁾, 右田 卓¹⁾, 八木千裕³⁾

Development of new technology for intra-operative rapid pathological diagnosis

Hiroyuki HAO¹⁾, Shinya HASHIMOTO²⁾, Atsuo YOSHINO³⁾, Koichiro SUMI³⁾, Shin AIZAWA⁴⁾,
Masatake ASANO⁵⁾, Kayo KUYAMA⁶⁾, Masaaki SUEMITSU⁶⁾, Hiroto FUJITA²⁾,
Sayaka YAMADA¹⁾, Suguru MIGITA¹⁾, Chihiro YAGI³⁾

要旨

腫瘍におけるゲノム解析は急速に進歩し、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

1) 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野
2) 日本大学文理学部
3) 日本大学医学部神経外科学系神経外科学分野
4) 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野
5) 日本大学歯学部
6) 日本大学松戸歯学部
羽尾裕之: hao.hiroyuki@nihon-u.ac.jp

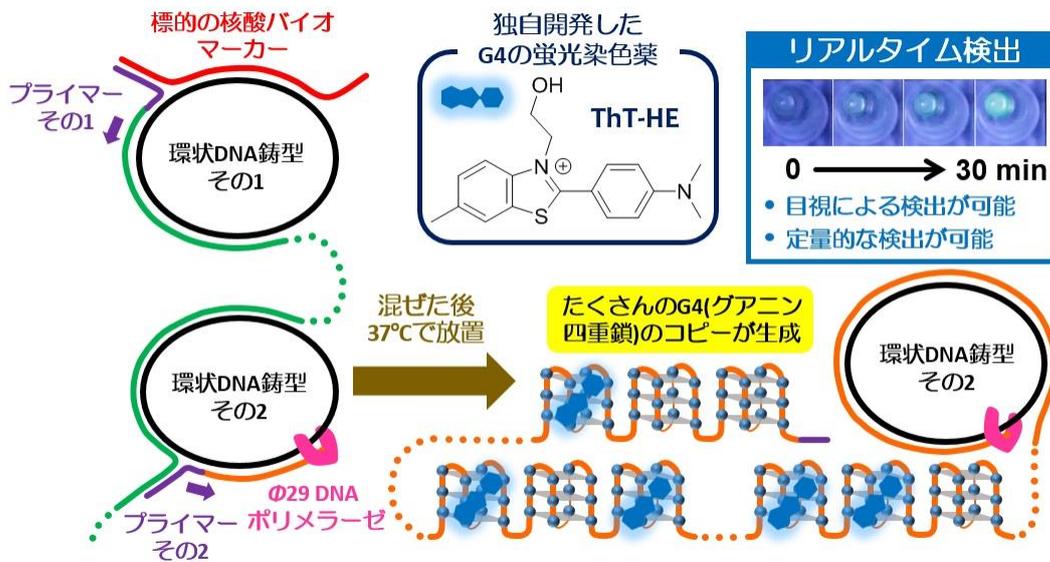


図1 Signal Amplification by Ternary Initiation Complexes (SATIC) 法

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(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。

細胞診は、直接塗抹法や捺印法等種々の方法があるが、簡便に短時間で標本作製可能である。従って、SATIC法を細胞診に応用することができれば、病理診断の精度向上に期待できるものと考えられる。我々は細胞診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. 対象及び方法

・サンプル採取と固定

本学松戸歯学部教職員にて、研究同意を得られた本研究分担者がオーセレックス® ブラシ RT (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて口腔粘膜(歯肉)の擦過を行い研究用サンプルの採取を行った。採取検体は、直接塗抹法用とRNA抽出用の2回行った。直接塗抹法では、検体採取後速やかにスライドガラスに塗抹を行い細胞診固定液(95%アルコール)にて浸漬固定した。RNA抽出用の検体は、採取後速やかに細胞診固定液(95%アルコール) 5 mLにて24時間固定した。直接塗抹法用の検体は、固定後に通法に従いPapanicolaou染色を施行した。

・RNAの抽出

固定後は、10,000rpmで30秒遠心を行い、上清を取り除き50度で乾燥させた。その後、RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher) を用いて通法に従いRNAの抽出を行った。抽出したRNA水溶液はQubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher) を使用し、Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher) にて濃度の測定、Qubit™ RNA IQ Assay Kits

(Thermo Fisher) にてIQ値の測定を行った。

・cDNA作製

抽出したRNAを鋳型として用いてPrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix (タカラバイオ) を使用して、cDNAを作製した。

・qPCR

作製したcDNAをTaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher) を用いてprobeとしてGAPDH用の2種類のprobe primer (Hs02786624_g1, amplicon length 157, Hs02758991_g1 amplicon length 93) を用いてQantStudio 7 Flex リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher) を使用してCt値を求めた。

尚、本研究は本学松戸歯学部倫理委員会の承認も得て行っている (EC20-027 : SATIC法の細胞診への応用を目指した研究)。

3. 結果および考察

細胞診へのSATC法応用の可能性を明らかにする目的で、細胞診固定液にて固定した細胞診検体におけるRNA保存状態を明らかにした。

採取されたサンプルから作製された直接塗抹法の細胞診スライドガラス標本には、細菌集塊を混在し好中球が主体の炎症性背景にオレンジG好性表層型角化細胞及びライトグリーン好性非角化型表層細胞が観察された (図2)。

抽出されたRNAは濃度 (全量) が99 ng/μL (total 60 μL), IQ値は9.0であった。リアルタイムPCRの結果ΔCT値は、GAPDH93 : 28.394, GAPDH157 : 30.921となった。

短時間・低コスト・簡便なSATC法の特徴を最大限に利用し、細胞診断、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。本技術で細胞診検体や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部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法は、様々な生体分子をターゲットとし検出することが可能になる技術である。現在は、in vitroでのDNAやRNAといった核酸の検出が可能である。検出には、核酸の伸長反応と共に取り込まれる物質が蛍光を示すことを利用しており、検出限界

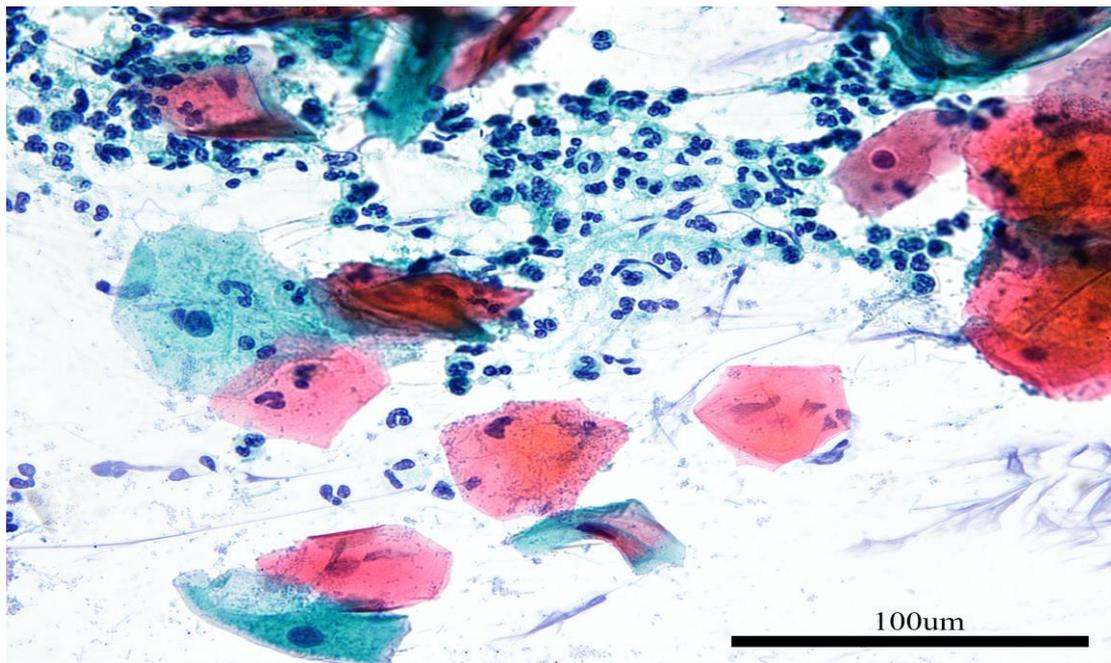


図2 直接塗抹法の細胞診

は1反応液あたり約 10^8 コピーとされている。故に、理論上は細胞診において任意のRNA配列を検出できる可能性がある。日本臨床細胞学会では、がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針を公開し細胞診検体由来DNAの取扱いに関する種々のデータが明らかになっているが、細胞診検体由来のRNAについては不明な点が多い。

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の検出を行った。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100 fMまでの検出を確認した。

細胞診固定液を用いた固定処理を行った後において、オーセレックスブラシ1本分から計5,940 ng (99 ug \times 60 uL) のtotal RNAが抽出された。これらのtotal RNAは、図2で示した細胞像に鑑み、口腔粘膜上皮細胞、好中球を主体とした炎症細胞、細菌に由来するtotal RNAであると考えられる。また、検体採取後は核酸の変性等が生じる可能性があるが、Qubit 4 Fluorometerによって算出可能なsmall RNAとlarge and/or structural RNAとの比率 (IQ値、最大10、最小0) は9.0であり、固定による明らかな品質の低下は認められなかった。また、GAPDHのアンプリコンサイズ2種 (93bp, 147bp) で比較すると、アンプリコンサイズに依存してCt値が変化していた。GAPDHはハウスキーピング遺伝子であり、常に一定量の発現を認める遺伝子である。従って、翻訳後に分解代謝されている途中のmRNAが常に存在するため、アンプリコンサイズによるCt値の差が生じたものと考えられる。

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 ~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100 fMの検出が可能であ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。

今後は種々の液状化検体細胞診固定液にてRNAの保存状態に加え、核酸の分解度を示す標準的値であるRNA integrity number値 (RIN値) についても明らかにする必要がある。

4. 今後の展望

細胞診検体にて遺伝子検索を実施する場合、スプリットサンプル法や液状化検体細胞診を利用することが予想される。従って、一般的な液状化検体細胞診固定液におけるRNA保存状況の検討も望まれる (図3)。

組織中からの遺伝子変異やマーカー分子の検出には、本学文理学部で研究・開発が進められているSATIC法を応用することにより、特定が可能と考えている。SATIC法は、分析対象物と検出試薬を混じて、等温下で放置するのみで、標的となる分析対象物の蛍光発色による検出が可能な測定系である (図4)。

迅速で簡便な手法であるため、新規バイオマーカーの検出に応用することができれば、腫瘍性疾患以外の非腫瘍性疾患のマーカー特定などに拡張でき、さらなる臨床での適用が可能となることが予測される。

将来的には発見したバイオマーカーを実臨床において簡便に用い、スクリーニング検査として使用できるようにになれば、多くの患者からバイオマーカーを採取し、前向きにイベントの解析を行い、バイオマーカーの予測能をより詳細に評価でき、先駆的研究となりうると考えている。一方、結合組織病のように、身体所見や家族歴から難病疾患を予測できる患者以外にも、若年、かつ既往なく難病疾患を発症する患者が一定数存在する。このような患者を拾い上げるために、将来的には高校、大学の学校検診や会社健診などにバイオマーカー検査を導入し、ハイリスク患者を特定できるようにしたいと考えている。これらの研究に今後の研究成果を波及させ、研

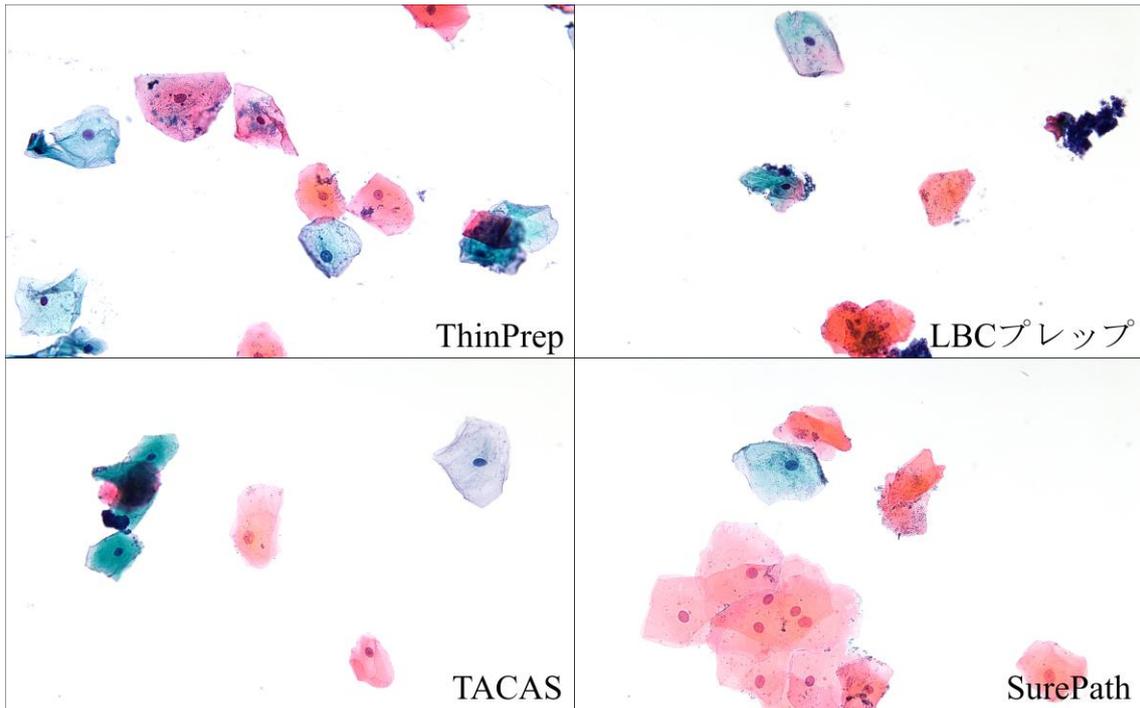


図 3 液状化検体細胞診

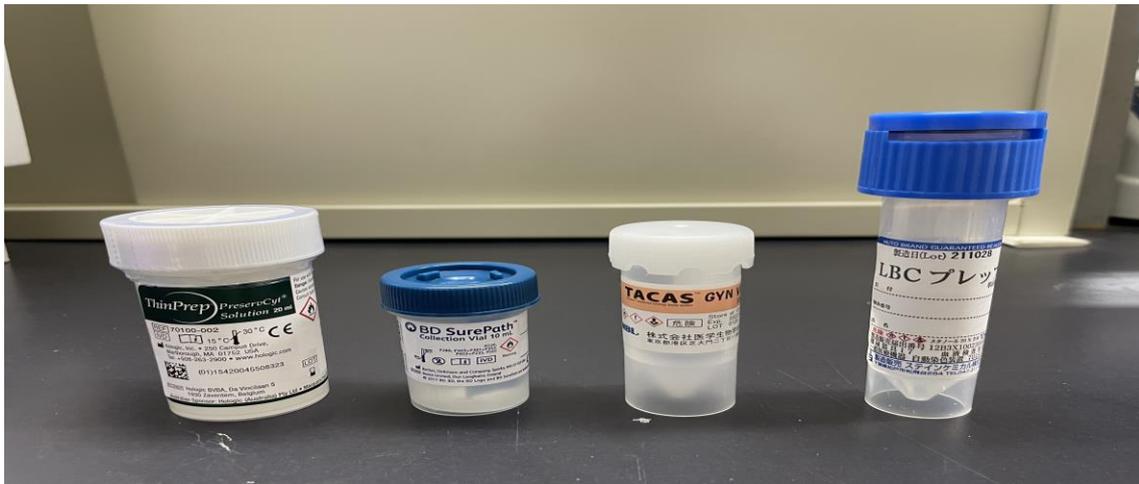


図 4 検出試薬

究成果の創出につなげていくことを切に希望している。

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.* 2016; 88:7137-7144, doi:10.1021/acs.analchem.6b01192
- 2) Fujita H et al. Specific light-up system for protein and metabolite targets triggered by initiation complex formation. *Sci Rep.* 2017; 7:15191, doi:10.1038/s41598-017-15697-8