

# がん遺伝子検査法としてのFRET-PHFA法の開発及び全自動遺伝子解析に向けた基礎評価

北野, 史朗

<https://doi.org/10.15017/1500672>

---

出版情報：九州大学, 2014, 博士（工学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

平成 26 年度 学位論文

がん遺伝子検査法としての FRET-PHFA 法の開発及び

全自動遺伝子解析に向けた基礎評価

九州大学 大学院工学府 物質創造工学専攻

3TE10108N 北野史朗

指導教官 丸山厚 教授

## 目次

第1章	序論	3
1.1	緒言	3
1.2	抗がん剤治療における遺伝子検査の必要性	7
1.3	既存の遺伝子変異検出技術	14
1.4	FRET-PHFA (FRET based preferential homo-duplex formation assay) の着想	17
1.5	カチオン性櫛型共重合体 (Cationic comb-type copolymers, CCCs) の応用可能性	19
1.6	がん遺伝子検査のための全自動遺伝子解析システム	21
1.7	本研究の目的	22
1.8	参考文献	23
第2章	FRET-PHFA 法の開発	27
2.1	緒言	27
2.2	材料と方法	31
2.3	結果	35
2.4	考察	43
2.5	参考文献	47
第3章	FRET-PHFA 法の臨床性能評価	50
3.1	緒言	50
3.2	材料と方法	51
3.3	結果	55
3.4	考察	66
3.5	参考文献	68
第4章	FRET-PHFA 法の超高速化	69
4.1	緒言	69
4.2	材料と方法	70
4.3	結果	74
4.4	考察	84
4.5	参考文献	88
第5章	新規全自動遺伝子解析システムによる大腸がん遺伝子変異検出	89
5.1	緒言	89
5.2	材料と方法	93

5.3	結果	102
5.4	考察	111
5.5	参考文献	113
第6章	結論	116
業績		118
論文リスト		118
学会発表リスト(海外)		118
学会発表リスト(国内)		119
特許リスト		119
謝辞		120

## 第1章 序論

### 1.1 緒言

ヒトゲノムの全貌が明らかになり[1]、世界中で病気の原因遺伝子の同定やライブラリー化、また、それらをもとにした遺伝子診断や遺伝子治療に向けての技術開発がさかんに行われている。このポストゲノム時代において、膨大な DNA 塩基配列の中から特定の遺伝子を対象にした検出技術開発は、非常に重要である。また、疾患遺伝子の同定や遺伝子診断においてバイオマーカーとなる遺伝子変異を正確に検出することは必須であると考えられる。特に、近年、分子標的薬の抗がん剤の治療効果を遺伝子変異の型から予測できることが臨床的にも明らかになりつつあり、個人の体質に合ったオーダーメイド医療化の点においても、遺伝子診断技術の開発は非常に意義のある研究テーマである。

ここで、個人の遺伝子レベルでの違いを把握するためには、各個人の遺伝子型を調べる必要が生じてくる。たとえば、ある生殖細胞変異である SNP(一塩基多型)では、その遺伝子型は AA、AG、GG の3種類であることが分かっているとす。A はアデニン、G はグアニン塩基を示し、この SNP は、ゲノムのその位置がアデニンの場合とグアニンの場合がある一例である。従って、SNP の遺伝子型を識別するための検査は、この3種類の遺伝子型のいずれであるかを決定することになる。すなわち、A について 0 と 100 のいずれであるか、G について 0 と 100 のいずれであるか、又は、A と G が 50 と 50 であるかどうかを見ればよい。このように、SNP 等の生殖細胞変異の検出は、ほぼ定性的な検出といってよく、その方法は比較的容易で簡便な各種方法が実用化されている。

一方、がん細胞においては、体細胞のレベルで変異が生じ、その変異ががんの引き金となって異常な増殖につながると考えられている。従って、ある特定の種類のがん細胞では、特定の遺伝子の変異が観察されることがあり、この変異を指標にがん細胞の検出を行うことも可能である。但し、がん細胞は多様性に富み、一種類の変異でがん細胞を特定することは必ずしも容易ではない。また、最近の薬物療法においては、生体内の特定の分子(タンパク質等)を標的とした薬剤が開発され、副作用が少なく、効果が高いものが見出されてきている。これらは分子標的薬と呼ばれ、主に

がん治療の領域で活発に開発されている。ごく最近、これら分子標的薬では、標的としている分子のシグナル伝達の下流のタンパク質に変異が生じている場合には、薬剤の効果が発揮できないこと等が明らかになってきている。この場合、変異を生じているタンパク質をコードする遺伝子の変異を調べることにより、これら薬剤の効果を予測することが可能となっており、SNP 検出とは異なる新たなオーダーメイド医療の領域が開けつつある[2]。

ここで述べた、がん細胞に特徴的な変異又は分子標的薬に抵抗性を示す変異は、そのほとんどが体細胞変異である。先に述べた生殖細胞変異の場合、どの細胞でも共通の変異が見られるのに対し、体細胞変異では、がん化した細胞でのみ変異が見られ、がん化していない細胞(通常は正常細胞)では変異は見られない。従って、通常、検体(検査の対象となる試料)中では、変異した細胞と正常細胞が混在する状況となっており、これらの細胞の存在比に応じて、変異した遺伝子と正常の遺伝子が存在することになる。つまり、試料の大部分が正常細胞であって一部変異細胞が含まれる場合、多くの正常な遺伝子中に存在するわずかな変異遺伝子を検出しなければならず、この点が生殖細胞における変異検出と異なる点で、且つ、体細胞の遺伝子変異検出をより困難にしている点である[3]。最近では、血漿、血清中の循環 DNA 中の変異を検出する、患者にとって低侵襲な遺伝子検査を目的とした超高感度検出に研究の流行が意向しつつある[4-6]。

近年、癌患者の末梢血中の体細胞変異を検出するリキッドバイオプシ(液体生検)[7]が、にわかには注目集めている。大腸癌等の固形癌では腫瘍標本などの反復採取は困難であり、治療中の体細胞変異の追跡は難しいとされてきた。しかし、近年の変異解析技術の進歩は目覚しく、デジタルPCR[8]、BEAMing (Beads, Emulsification, Amplification, and Magnetics)法[9-11]や次世代シーケンサー[12-15]などを用いた高感度変異検出技術が成熟しつつあり、末梢血に遊離している cell free DNA (ccfDNA)[16]中の極わずかな体細胞変異を捉えることが可能になってきた[9, 17-20]。このようなリキッドバイオプシが、がん医療に適応されることで、以下の効果が期待される。

1. 癌治療効果の向上:治療期間中に繰り返し検査し、耐性化を追跡できる。治療開始時

から経時的に行える個別化治療として大腸癌治療に革新的進歩をもたらす。

2. 医療費の削減:分子標的薬治療は非常に高額であり、治療効果が望めない症例を治療前のみならず治療中にもモニタリングし、適切な治療法を選択することで、医療経済健全化に寄与する。
3. 難治性癌腫治療への応用:ccfDNA は膀胱癌や肺癌などでも存在が確認されているため、本検査の応用が可能であり、早期診断技術(主に耐性化や再発)の向上における波及効果は大きく、これらの技術を応用することで新たな治療戦略を開発できる可能性がある。
4. 組織生検に代わる高感度新規分子生物学的診断法を開発できる可能性がある。

先に挙げた高感度変異検出方法であるデジタル PCR や次世代シーケンサーは、大変有望な解析技術であるが、操作が煩雑で、専門の技術者は必須であり、解析に時間がかかることから、まだ診断薬として臨床で使えるレベルではないと考えられる。特に次世代シーケンサーは、典型的なエラーがあり[21-23]、そのノイズを差し引かないと高感度検出は困難であり、それらのノイズを差し引くには、インフォマティクスの知見を駆使する必要がある、検査結果を伝えるまでの時間と労働費用が増える。

上述の状況を鑑み、次世代のがんの遺伝子検査に求められることとして、「高感度」、「迅速性」、「簡便性」、「頑健性」、さらに、エンドユーザーが使いやすい最終形として、それらをシステム化した「全自動性」であると考えられる。そして、それらの検査において、検査する遺伝子の臨床的意義を確認することは、遺伝子検査の中核を成す最も重要な因子であり、薬事承認を受ける際にも必ず必要になる事項である。以上から、がん患者が個別に、最適な治療を受けるために、上記の要件を満たす、新規遺伝子検査技術の開発を志し、本研究に着手した。

本小論では、第一に、臨床有用性を確保したがんの遺伝子検査の在り方について熟考し、第 2 章において、新規方法論(FRET-PHFA 法)を開発し、第 3 章において、国内薬事承認を視野にい

れた方法論の臨床性能評価を行い、第 4 章では、さらに、厳密な温度制御を必要としない FRET-PHFA 法の超高速化に関する検証を行った。

第 5 章では、FRET-PHFA 法の全自動化を目指し、実現可能性を探索するためにインバーダー法をモデルとした全自動遺伝子解析システムに関する臨床性能評価をシカゴ大学と共同で行った。

## 1.2 抗がん剤治療における遺伝子変異検査の必要性

近年、大腸がんの抗 EGFR 抗体薬であるセツキシマブ[24]、パニツムマブ[25]の治療効果予測因子として、*KRAS* 遺伝子変異、肺がんの分子標的薬であるゲフィチニブ[26, 27]の治療効果予測因子として EGFR 遺伝子変異が注目を集めている。特に、*KRAS* は、1st-line(OPUS[28], CRYSTAL[29]、PRIME[30]、COIN)、2nd-line(EPIC[31]、20050181[32])における臨床試験において、*KRAS* 遺伝子変異は抗 EGFR 抗体薬に対するノンレスポンドー探索因子であることが報告されている。ESMO(欧州臨床腫瘍学会)[33]、ASCO(アメリカ臨床腫瘍学会)[34]は、切除不能大腸がん患者に関して、*KRAS* 遺伝子検査を行うことを強くガイドラインの中で推奨している。日本では、大腸がん研究会の下、ガイドラインが作成され(<http://jsmo.umin.jp/pdf/20090128Daichogan.pdf>)、欧米同様に *KRAS* 遺伝子検査を強く推奨している。

大腸がんは、その患者人口がアメリカでは、第4位(図1-1)、日本では第2位と非常に市場としても大きく、各製薬会社が分子標的薬を開発してきている。それら分子標的薬の治療効果を事前に予測可能な *KRAS* 遺伝子検査がもたらす、経済効果は約6億ドルと試算できる[35]。

*KRAS* は 21KD の GTP 結合タンパク質であり、その遺伝子に変異(特にコドン 12、13、61; GDP バインディングサイト)が生じたタンパク質は、恒常的に活性型となり、シグナルを核に伝達し続けることで、がん化を促進させると考えられている(図1-2)。コドン 12、13 の変異とアミノ酸置換の関係を図1-3に示す。したがって、抗 EGFR 抗体薬が、TGF や EGF と拮抗して、EGFR の二量体化を防いでも、さらに下流の *KRAS* 遺伝子変異が生じている場合、RAS タンパクは絶えず下流にシグナルを伝達し続けることになる(図1-4)。そのため、抗 EGFR 抗体薬の奏功性予測因子として *KRAS* 遺伝子変異が着目されている。さらに、*KRAS* の下流にあるシグナル伝達系の遺伝子(例えば、*BRAF*、*PIK3CA* など)も分子標的治療予測因子となり得るとして注目されており、関連した研究報告も多数ある[36]。

また、近年、がん患者中の末梢血中に腫瘍由来のバイオマーカー(CTC:末梢血循環腫瘍細胞、エクソソーム、ccfDNAなど)が循環しており(図1-5)[16]、例えば ccfDNA 中の *KRAS* 遺伝子変異を

検出することにより、早期再発予測や早期薬剤耐性予測が可能になる可能性を示唆する研究報告も出てきている[7, 9, 17]。Misaleらは、大腸がん患者の末梢血中の KRAS 遺伝子変異を追跡することにより、CTで撮像できるレベルのがんの再燃をおおよそ1年前に予測可能であるとしている。一般的なタンパクの腫瘍マーカーが、全く応答していないレベルから、血液中の KRAS アリルに変化があることも分ってきている。そこでの、KRAS遺伝子変異の割合は、約0.1%を下限とし、そこから徐々に変異アリルの割合が上昇していくことがモニタリングで確認されている。つまり、将来的には、末梢血中の KRAS 遺伝子変異を追跡することにより、薬剤耐性を予測することができ、医者には、患者に対して早期に治療の選択を出来る可能性があり、分子標的薬の適切な治療につながる(図 1-6)。こういった検査が臨床的に実現できれば、医療費削減や患者の無駄な肉体的負担を減らすことにも繋がり、厚生労働省のがんの10ヵ年計画に盛り込まれている施策とも合致するものである。

末梢血中の遺伝子検査、すなわちリキドバイオプシは、従来の組織生検と比較して、低侵襲であるため、再生検も可能になり、よって、モニタリングが可能になる。しかし、血液中に存在する ccfDNA の DNA コピー数は、非常に少なく、さらに、その中の KRAS 遺伝子変異の割合は極微量である。したがって、これからの遺伝子解析技術には高感度検出が求められることになる。

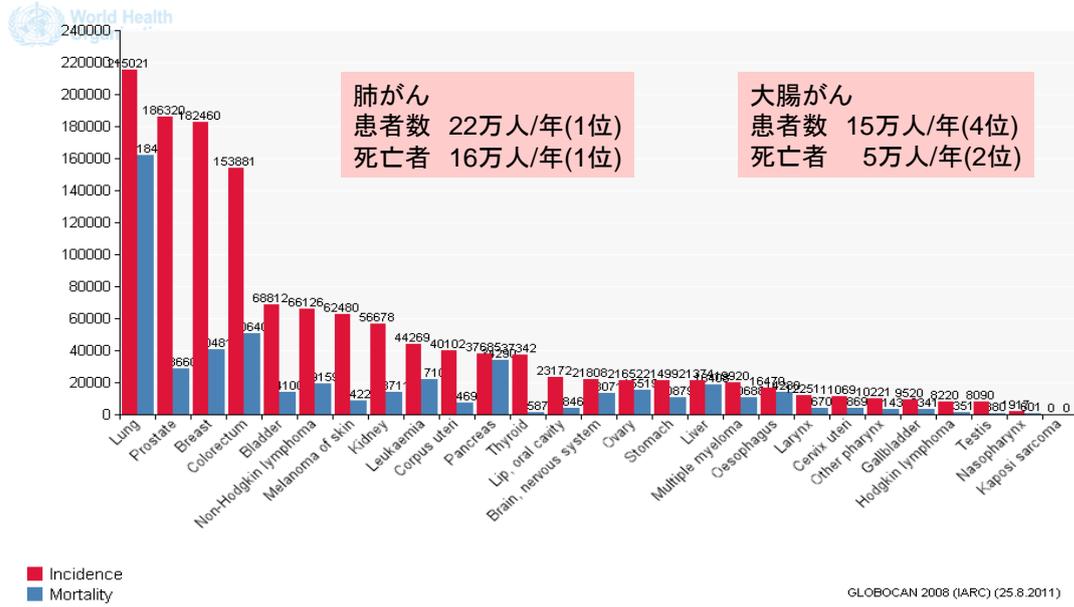


図 1-1 米国におけるがん患者数及び死亡数

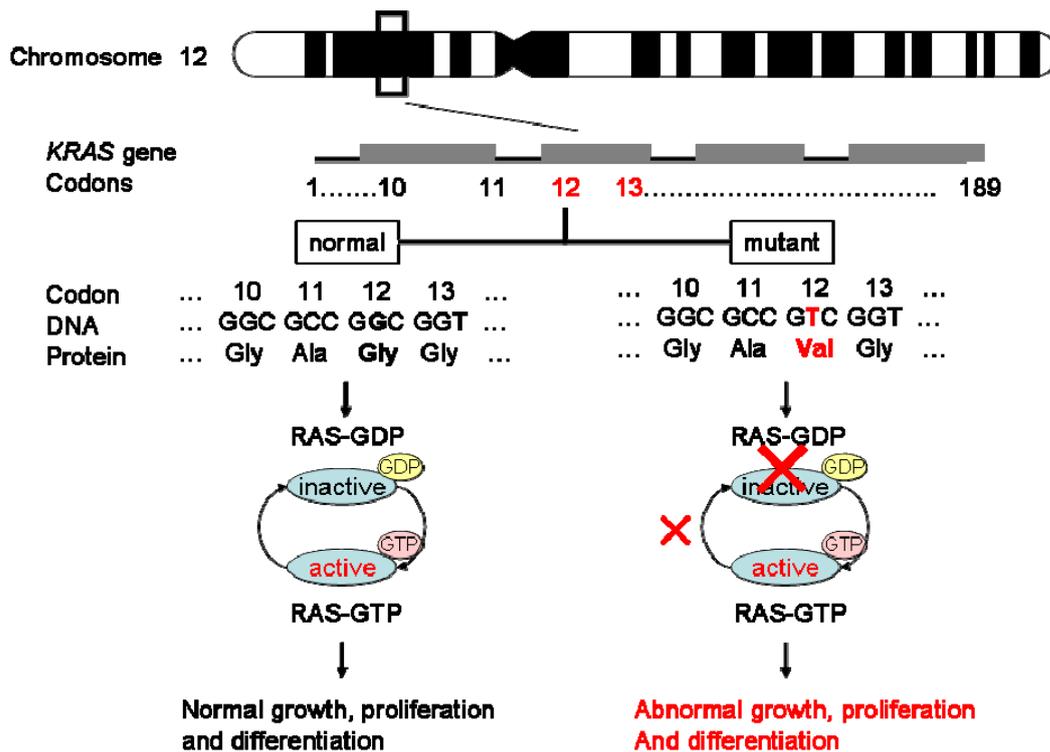


図 1-2 *KRAS* 遺伝子変異の癌化シグナルの役割

ヒトの *KRAS* 遺伝子は 12 番染色体に位置し、EGFR から下流に誘発される G タンパク質である。G タンパク質は、RAS ファミリーに属し、細胞の発達と機能を制御している。RAS タンパク質は、通常のサイクルとして、GTP と結合すると活性化状態になり、GDP と結合することで不活性化状態になっている。 *KRAS* 遺伝子に点突然変異がコドン 12 や 13 に存在していると、RAS タンパク質は、常に GTP と結合した活性化状態となる。

野生型	-GGTGGC-	変異型(G12A)	-GCTGGC-	変異型(G13D)	-GGTGAC-
変異型(G12S)	-AGTGGC-	変異型(G12V)	-GTTGGC-	変異型(G13A)	-GGTGCC-
変異型(G12R)	-CGTGGC-	変異型(G13S)	-GGTAGC-	変異型(G13V)	-GGTGTC-
変異型(G12C)	-TGTGGC-	変異型(G13R)	-GGTCGC-	変異型(G12S2)	-TCTGGC-
変異型(G12D)	-GATGGC-	変異型(G13C)	-GGTTGC-		

図 1-3 *KRAS* 遺伝子変異とアミノ酸置換の関係

図中の配列は、*KRAS* 遺伝子のコドン 12、13 を示す。赤字は、変異箇所を示している。

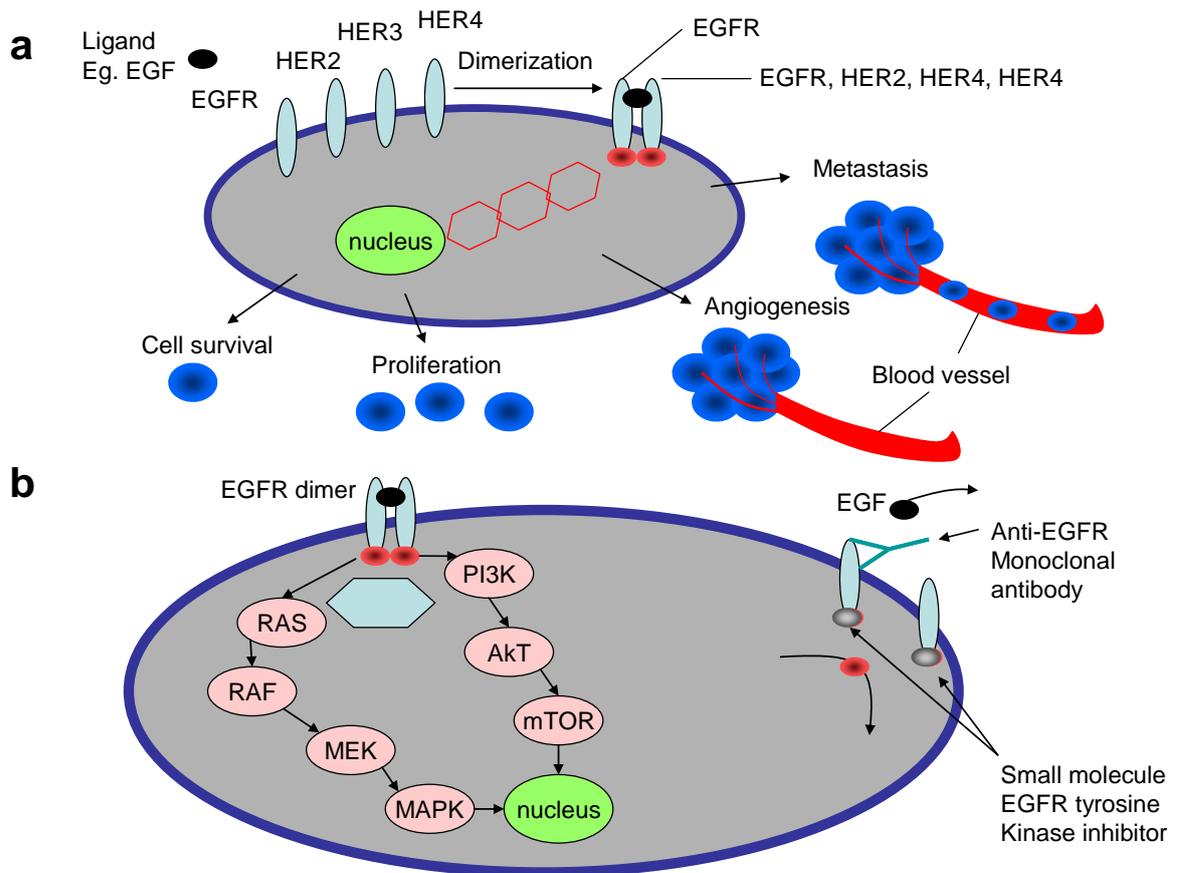


図 1-4 (a) EGFR に依存した細胞内シグナルによって制御されている細胞の応答。

EGFR の細胞外ドメインが特定のリガンドと結合することにより、EGFR 同士あるいは、EGFR に代わる HER2、HER3、HER4 などと機能的に活性化状態である二量体を形成する。レセプターの二量体化は、細胞内ドメインのチロシンキナーゼの ATP 依存的なリン酸化を引き起こす。このチロシンのリン酸化は、下流へのシグナル伝達のトリガーとなり、細胞の機能や成長、促進を制御している。EGFR に依存した細胞内シグナルの摂動は、悪質な側面、例えば、がん細胞の増殖やがんの血管新生を促進に参与する。

(b) EGFR の活性化及び二つの EGFR 阻害剤治療によって制御されるシグナル伝達経路

EGFR 活性化により誘発されるシグナルカスケードとしては、RAS-MAPK、PI3K-Akt、そして STAT 経路がある。これらの経路は、細胞の増殖や接着作用の増加、血管新生、そして細胞遊走などに関わる遺伝子を制御している。EGFR に依存したシグナル伝達を阻害するために、二つのアンタゴニストが開発されている。一つは、細胞外ドメインをブロックする抗 EGFR モノクローナル抗体薬、二つは、細胞内ドメインのチロシンキナーゼの触媒部分をブロックする小分子化合物による阻害である。

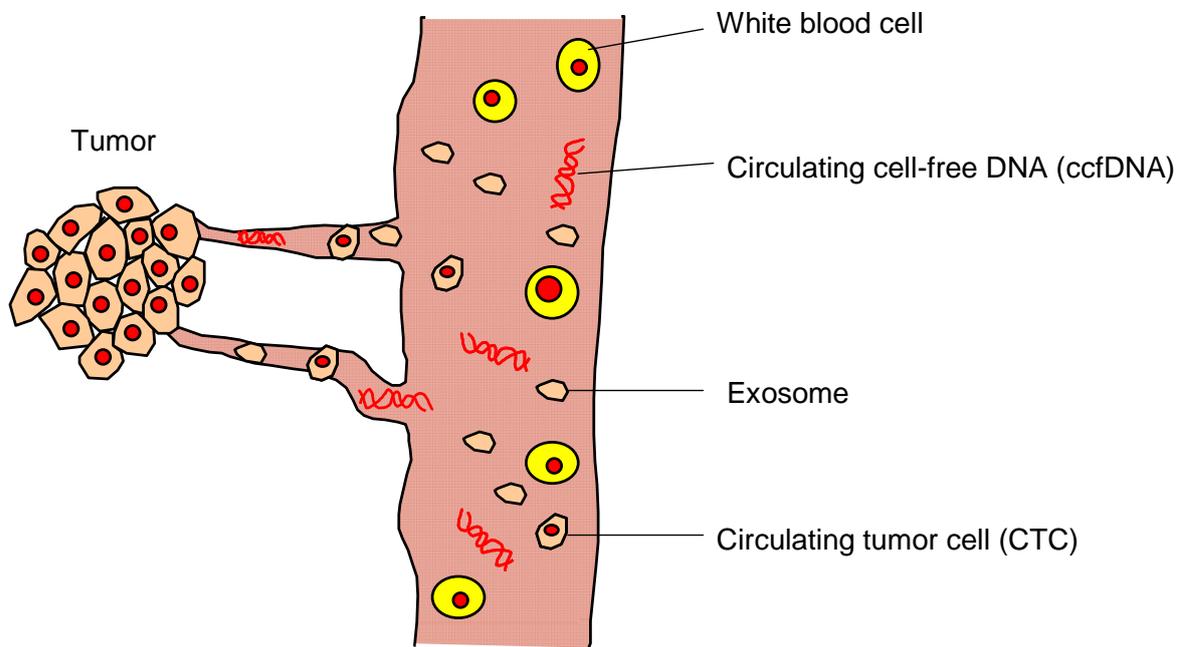
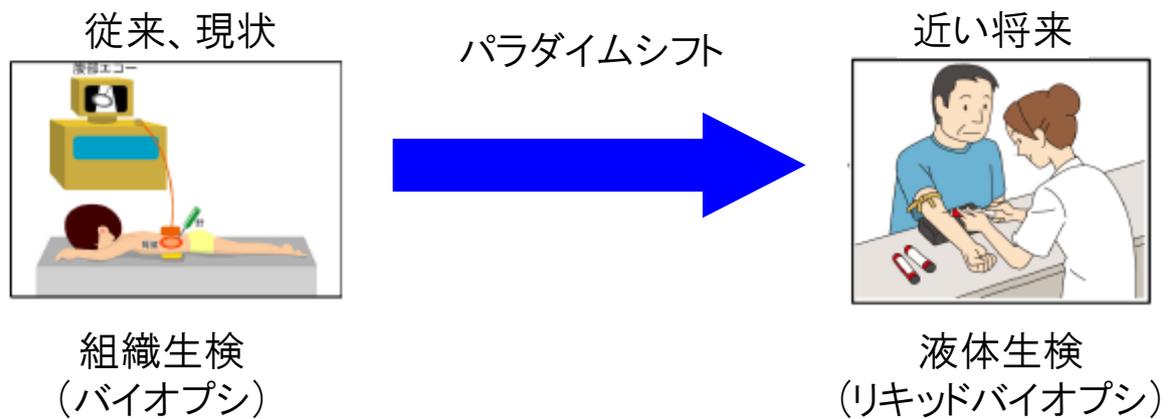


図 1-5 がんの遺伝子検査における新条件としてのリキッドバイオプシと対象となる末梢血中のバイオマーカー

ccfDNA：免疫細胞による貪食作用などによるネクロシスにより細胞が破壊され核内のDNAが遊離したものと考えられている。ccfDNA自体の生理学的意義は、未だ解明されていない。

CTC(circulating tumor cell)：腫瘍細胞の接着因子の発現が低下し(EMT)、遊走性が出た状態になって末梢血中に存在する腫瘍細胞、あるいは、腫瘍が血管に浸潤し、接着因子があっても腫瘍塊から剥がれ落ち、末梢血中存在している腫瘍細胞のこと。転移や癌幹細胞であることを示唆する研究報告もある。

エクソソーム：30~100nmの小型膜小胞であり、マクロファージや樹状細胞などの免疫細胞や癌細胞をはじめ、多くの細胞がエクソソームを分泌することで遠く離れた細胞まで情報を伝達していると推測されている。エクソソームは脂質二重膜で囲まれた膜小胞で、分泌細胞由来の膜蛋白質と細胞質成分で構成されている。腫瘍細胞の転移環境を整備する役割を示唆するなどの研究報告もある[37]。

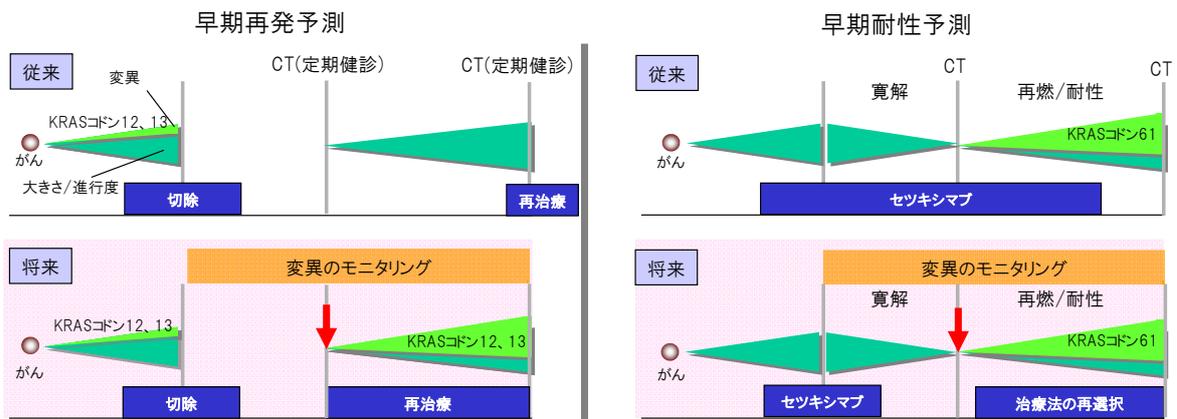


図 1-6 リキッドバイオプシによる将来のがんの遺伝子変異モニタリング検査

セツキシマブは、大腸がんの分子標的薬で抗 EGFR 抗体薬を指す。高感度検出が可能になることで、抹消血中のがん遺伝子変異を追跡可能になる。がん遺伝子変異を追跡することで、従来よりも確度の高い再発予測や薬剤耐性予測が可能になる。

### 1.3 既存の遺伝子変異検出技術

体細胞の遺伝子変異検出法には大きく分けて二つの方法がある。一つは、遺伝子増幅の段階で正常な遺伝子と変異遺伝子を区別する方法であり、具体的には、変異遺伝子のみを特異的に増幅する方法である。例えば、感度が良いとされている方法は、正常な遺伝子のみを制限酵素を用いて切断し、切断されていない変異遺伝子のみを増幅する“mutant-enriched PCR”と呼ばれている方法である[38]。この方法では、変異遺伝子を増幅する反応を繰り返すことにより、正常遺伝子  $10^6$  分子中の1分子の変異遺伝子を検出できるとされている[39]。この方法は、高感度という点において優れているが、操作は非常に煩雑で一般の診断適用できる方法ではない。また、PCR等のプライマーの伸張反応において、一塩基の違いを区別して増幅する方法が開発されている。この方法は、“ARMS (amplification refractory mutation system) [40]”、“ASPCR (allele specific PCR)”[41]等と呼ばれている方法である。この方法は、比較的高感度であり、さらに一般的な PCR の増幅反応以外の操作を必要とせず、反応のすべてを閉鎖系で行うことができ、かつ非常に簡便であり、PCR 産物の持ち込み汚染のない優れた方法である。しかしながら、一度でも一塩基識別を誤って正常遺伝子を増幅した場合、以後の増幅反応において、変異遺伝子の増幅と同じように正常遺伝子も増幅されてしまうため、擬陽性の危険が高い方法とも言える。この方法を用いる場合、反応条件、すなわち反応温度や塩濃度等を厳密に制御する必要や、鋳型量も厳密に同じにする必要があり[42]、高い精度と簡便性を求められる遺伝子診断方法には不向きである。

体細胞の遺伝子変異を検出するもう一つの方法は、変異遺伝子と正常遺伝子を同時に増幅し、その後変異遺伝子と正常遺伝子を区別して検出する方法である。増幅された変異遺伝子と正常遺伝子を区別して検出する方法としては、電気泳動を利用する方法、ハイブリダイゼーションを利用する各種方法等がある[42]。しかしながら、ほとんどの方法において、多量の正常遺伝子に含まれる少量の変異遺伝子を精度よく検出することは困難である。例えば、変異遺伝子検出のゴールドスタンダードといわれている方法として、ジデオキシシーケンシング(DS)法がある。DS法は、変異遺伝子を比較的高感度で検出することが可能であるものの、変異遺伝子と正常遺伝子が混在する場合に、変異遺伝子の検出感度は 10%程度であり、それほど高感度の検出はできない。その

他、ピロシークエンシング法では、5%程度まで検出感度を高めることができ、ジデオキシシークエンシング法より優れていることが報告されている[43]。近年、次世代シーケンス法 (NGS) による体細胞変異検出の報告[44, 45]もあるが、典型的なエラーレートが 0.5~1%程度あるとされており、NGS による高感度検出には更なる改善が必要であると考えられる。また、変異を含む配列を PCR により増幅し、その生成物の二本鎖 DNA の融解曲線を求め、変異遺伝子の割合を求める方法が開発されている。この方法でも、正常遺伝子に含まれる変異遺伝子を 5%程度まで検出できるとされている[46]。上記のほとんどの方法が複雑なプロトコルで、実験者や検査技術者にとってやさしい技術ではなく、コストも高いという課題がある。現状の *KRAS* 変異検出技術一覧[36](表 1)を示す。唯一臨床用として CE-マークを取得しているのは、ARMS-SCORPION 法を用いる TheraScreen®とプローブ法の *KRAS* Light mix®だけで、他の技術はほとんど研究室レベルの技術である[36]。また、ほとんどの手法は、方法論の構築に、臨床検体を用いておらず、臨床性能評価を行っていない。真の臨床検査法を開発するためには、方法論の構築のみならず、臨床性能評価も非常に重要な要素である。大規模な臨床性能評価を実施し、国内の薬事承認を受けている *KRAS* 遺伝子変異技術は、キアゲン社の ARMS-SCORPION キットと MBL 社の MEBGEN キットの二つである。これらの検査は、現在、保険点数 2,100 点で臨床現場において実施されている。我々は、本研究を展開するに当たり、第3の *KRAS* 変異検出技術の国内薬事承認を大目標とした。

表 1-1 既存の *KRAS* 遺伝子変異検出方法

Method	Intended use
<i>Gel electrophoresis assay</i>	
Temporal temperature gradient electrophoresis	LBM
Denaturing gradient gel electrophoresis	LBM
Constant denature capilali electrophoresis	LBM
SSCP assay	LBM
<i>Sequencing</i>	
Dideoxy sequencing	LBM, RUO kit
Pyrosequencing	RUO kit
Next generation sequencing	LBM, RUO kit
<i>Allele specific PCR assays</i>	
<i>Allele discrimination based on primer design</i>	
ARMS-PCR	LBM
Qiagen ARMS-SCORPION (TheraScreen®) kit	CE-mark
KRAS lightMix®	CE-mark
MEBGEN kit	CE-mark
REMS-PCR	LBM
FLAG assay	LBM
Enriched PCR- RFLP	LBM
<i>Allele discrimination based allele specific ligation detection reaction</i>	
PCR-LDR	LBM
PCR-LDR spFRET assay	LBM
<i>Allele discrimination based on discriminating amplification efficiencies at low melting temperature</i>	
COLD-PCR	LBM, RUO kit
<i>Other method</i>	
Digital PCR	LBM, RUO kit
BEAMING assay	LBM, RUO kit

LBM: laboratory-based method, not commercially available, RUO: research use only, not validated for clinical application

[36]

#### 1.4 FRET-PHFA の着想

上記に述べたように、がん組織の体細胞変異を高感度に検出することの重要性が増してきており、様々な遺伝子検出方法が開発されている。しかしながら、SNP や多型などの生殖細胞系列変異検出とは異なり、体細胞変異では過剰に野生型が存在する中、微量な変異を検出する必要があり、その点が、体細胞変異検出を困難にしている一つの点である。ゴールドスタンダードされる DS は、30%以下の体細胞変異を検出できないことが報告されており、より簡便で、低コスト且つ高感度なノンシーケンシングな手法の開発が急務である。我々は、変異遺伝子を検出する機構として、競合ハイブリダイゼーションに着目した。標識 DNA の一方の鎖の 5' 末端付近に蛍光物質(例えば FAM)を結合させて標識し、他方の鎖の 3' 末端付近を別の蛍光物質(例えば Alexa594)、あるいは消光物質(例えば Dabcyl)で標識する。鎖組み換え反応が起こらず標識 DNA が元の二本鎖の場合には、二つの異なる蛍光物質の間での蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が観察される。これに対して、サンプルの標識 DNA との間での鎖組み換え反応が起こると、FRET は観察されなくなる。従って、この FRET の程度を測定することで鎖の組換えの程度を測定できると仮定した。但し、組み換え効率を上げるためには、遺伝子増幅産物と標識 DNA の  $T_m$  値を揃える必要があるので、標識された二本鎖の DNA は、増幅産物と同じ配列、同じ長さに設定する必要がある。

具体的には、例えば、ある核酸配列のある位置(識別対象とする変異部位)がアデニンである場合とグアニンである場合とを区別する場合、この位置を含み、かつこの位置の塩基がアデニン(相補鎖ではチミン)である標識 DNA を準備する。さらに、その標識 DNA を、一方の鎖は蛍光物質 X で、他方の鎖は蛍光物質 X と互いにエネルギー移動可能な蛍光物質 Y で、それぞれ標識する。したがって、標識 DNA では、二つの蛍光物質が近接しているために、そのままでは蛍光共鳴エネルギー移動が生じる状態にある。一方で、サンプル由来の DNA を DNA 増幅反応により、標識 DNA とまったく同じ長さとなるように増幅して調製する。得られたサンプル由来二本鎖 DNA と標識 DNA を混合し、熱を加えて二本鎖を変性させた後、徐々に温度を低下させて再び二本鎖を形成させる。このとき、サンプル由来二本鎖 DNA の変異部位が、すべて標識 DNA と同じアデニンであった場合、

サンプル由来二本鎖核酸と標識 DNA との間では鎖の組み換え反応が生じる。理論上は、サンプル由来二本鎖 DNA と標識 DNA の分子数の比が 1:1 であった場合、組み換わる確率は 1/2 であり、また元の二本鎖にもどる確率も 1/2 であり、FRET の程度も 1/2 となる。サンプル由来二本鎖 DNA の変異部位が、すべて標識 DNA とは異なるグアニンであった場合、鎖組み換え反応は起こらず、従って FRET の程度は変化しない。これをもって、サンプル中の検出(識別)したい目的の塩基がアデニンであるかグアニンであるかを検出することが可能となる。サンプル由来二本鎖 DNA と標識 DNA との比を増大させることにより、組換えの程度を大きくすることができる。たとえば、サンプル由来二本鎖 DNA と標識 DNA の比が 20:1 である場合、組換えの割合は 20/21、すなわち標識 DNA が元の二本鎖に戻る確率は 1/21 となる。さらにヘテロな変異型、つまり 50%の変異型や 5%の変異型の増幅産物との競合ハイブリダイゼーションにより、標識 DNA が元の二本鎖に戻る確率は、それぞれ、1/11 と 1/2 となる。

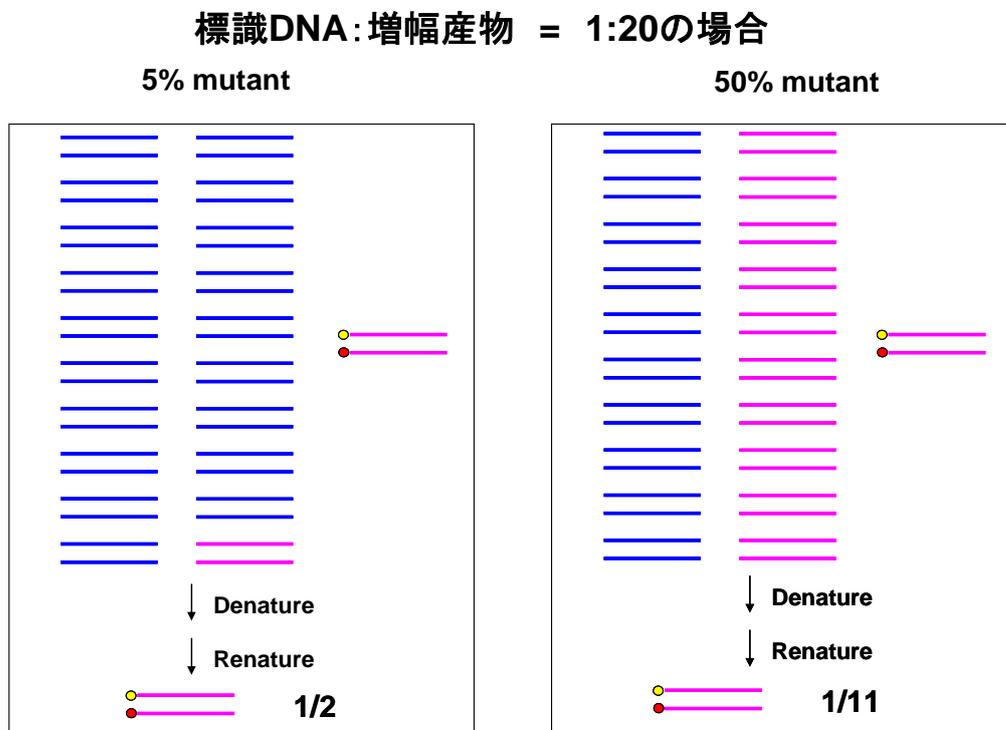


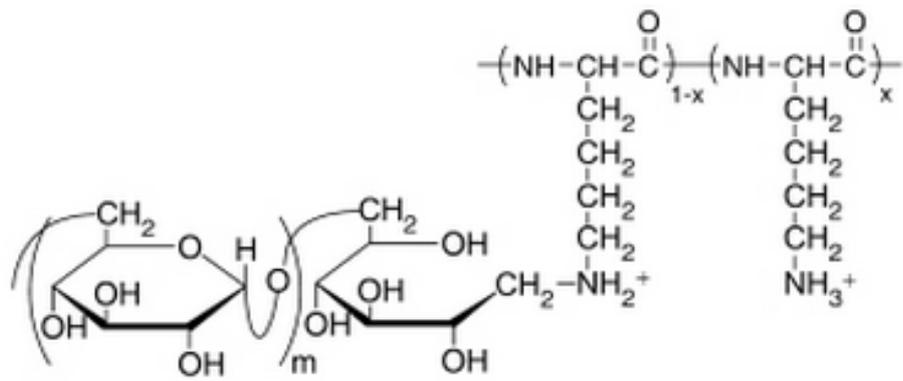
図 1-7 変異の割合と FRET が起きる割合の関係

赤色は変異型、青色は野生型を表す。末端の丸印は、FRET を起こす蛍光物質を表す。

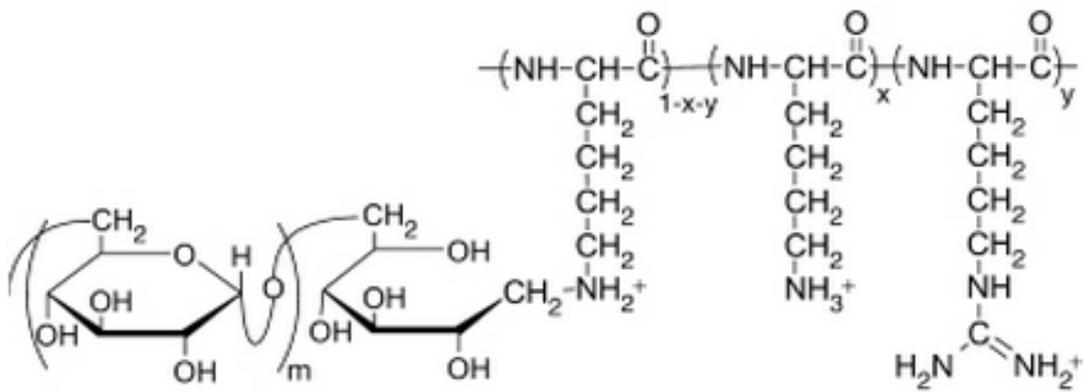
### 1.5 カチオン性櫛型共重合体 (Cationic comb-type copolymers, CCCs)

丸山らが人工核酸シャペロンとして設計した CCC、PLL-*g*-Dex を図 1-8 に示す。核酸シャペロンの役割は、前述したように核酸塩基対の解離・再形成を促すことで、準安定なミスハイブリッドから熱力学的にもっとも安定な状態に落とし込むことである。従って、シャペロン活性は二重鎖核酸とその相補的単鎖間の核酸鎖交換反応に対する共重合体の加速効果を指標に評価することができる。PLL-*g*-Dex は、この核酸鎖交換反応を一万倍以上加速し、同一条件下では天然の核酸シャペロンを凌ぐ活性を持つことが既に報告されている[47-49]。二本鎖の蛍光プローブと一本鎖の鎖交換反応は、ブランチマイグレーションが起きて、二本鎖と一本鎖が置き換わるが、丸山らは、ブランチマイグレーションの前の中間構造体の核形成を促進、安定化させると推測している。ポリカチオンの主鎖であるリシンは、核酸の静電気反発を安定化させ、側鎖のデキストランは、核酸とポリカチオンを可溶化し、構造を安定化させると考えられている。

FRET-PHFA の課題として、競合ハイブリダイゼーションによる配列的に正しい二本鎖 (Homoduplex) を形成させるために非常に緩やかな温度勾配が必要であり、それを実現可能な厳密な温度制御が必要となる。そのため、専用の装置が必要となり、測定時間も1時間程度必要になる。したがって、それらの課題を解決するために、PLL-*g*-Dex を組み合わせることで、迅速に、且つ、厳密な温度制御を必要としない遺伝子検査を目指して研究を行った。また、二本鎖 DNA 同士の組み換え反応に PLL-*g*-DEX がどのような影響を及ぼすかは未だ検証されておらず、研究的新規性も有すると考えた。



PLL-g-Dex



GPLL-g-Dex

図 1-8 PLL-g-Dex とグアニジノ化 PLL-g-Dex の構造[47-49]

## 1.6 がん遺伝子検査のための全自動遺伝子解析システム

上述した *KRAS* 遺伝子変異検出技術は、あくまで試薬キット化されているだけで、一定の手技を持ったクリニシャンやテクニシャンによる実験操作が必要である。遺伝子変異検出を行うためには、まず、最初に FFPE(ホルマリン固定パラフィン包埋)や凍結組織などの病理切片から核酸抽出・精製操作を行い、その後、試薬キットを使って手動操作にて遺伝子変異検出を行う。その後の結果解析についても、自ら行う必要があり、1検体の解析をおこなうためのレイバーコストやレイバータイムは増えてしまうと言う課題がある[50]。一般的な検査センターでの解析業務に関わる日数は、およそ2週間と言われている。そのため患者への検査結果の報告も迅速には行えていない。そこで、上記課題を解決すべく、本研究の応用研究とし、エンドユーザーが使いやすい形の最終形である、全自動遺伝子解析装置による大腸がん遺伝子変異検出の実現可能性検証をシカゴ大学医学部と共同で行った。

## 1.7 本研究の目的

上述した背景から、本研究の目的は、実用的な臨床検査に資する新規遺伝子診断方法の開発と臨床性能評価とし、特に「高感度検出」、「迅速検出」、「臨床性能評価」、「全自動遺伝子解析システムの開発と評価」の研究項目に沿って研究を展開した。

## 1.8 参考文献

1. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
2. Ikediobi, O.N., et al., *Addressing the challenges of the clinical application of pharmacogenetic testing*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **86**(1): p. 28-31.
3. Nagai, Y., et al., *Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7276-82.
4. Kuang, Y., et al., *Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer*. Clin. Cancer Res., 2009. **15**(8): p. 2630-6.
5. Wang, S., et al., *Potential clinical significance of a plasma-based KRAS mutation analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res. **16**(4): p. 1324-30. Epub 2010 Feb 9.
6. Diehl, F., et al., *Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics*. Nat Med, 2008. **14**(9): p. 985-90. Epub 2007 Jul 31.
7. Diaz, L.A., Jr. and A. Bardelli, *Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA*. J Clin Oncol, 2014. **32**(6): p. 579-86.
8. Huggett, J.F., S. Cowen, and C.A. Foy, *Considerations for Digital PCR as an Accurate Molecular Diagnostic Tool*. Clin Chem, 2015. **61**(1): p. 79-88.
9. Diaz, L., et al., *The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 537-40.
10. Li, M., et al., *BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants*. Nat Methods, 2006. **3**(2): p. 95-7.
11. Diehl, F., et al., *BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions*. Nat Methods, 2006. **3**(7): p. 551-9.
12. Newman, A.M., et al., *An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage*. Nat Med, 2014. **20**(5): p. 548-54.
13. Rothe, F., et al., *Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer*. Ann Oncol, 2014. **25**(10): p. 1959-65.
14. Marchetti, A., et al., *Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e103883.
15. Couraud, S., et al., *Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a*

- proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(17): p. 4613-24.
16. Schwarzenbach, H., D.S. Hoon, and K. Pantel, *Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(6): p. 426-37.
  17. Misale, S., et al., *Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 532-6.
  18. Thierry, A.R., et al., *Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA*. Nat Med, 2014. **20**(4): p. 430-5.
  19. Ulivi, P. and R. Silvestrini, *Role of quantitative and qualitative characteristics of free circulating DNA in the management of patients with non-small cell lung cancer*. Cell Oncol (Dordr), 2013. **36**(6): p. 439-48.
  20. Paci, M., et al., *Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2009. **64**(1): p. 92-7.
  21. Kukita, Y., et al., *Quantitative identification of mutant alleles derived from lung cancer in plasma cell-free DNA via anomaly detection using deep sequencing data*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81468.
  22. He, Z., et al., *Estimating DNA polymorphism from next generation sequencing data with high error rate by dual sequencing applications*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 535.
  23. Zagordi, O., et al., *Error correction of next-generation sequencing data and reliable estimation of HIV quasispecies*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(21): p. 7400-9.
  24. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
  25. Amado, R.G., et al., *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. J. Clin. Oncol., 2008. **26**(10): p. 1626-34.
  26. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39. Epub 2004 Apr 29.
  27. Riely, G.J., et al., *Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(24): p. 7232-41.
  28. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(14): p. 1408-17.
  29. Garattini, S., V. Torri, and I. Floriani, *Cetuximab for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(1): p. 96; author reply 96-7.
  30. Douillard, J.Y., et al., *Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as*

- first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study.* J. **28**(31): p. 4697-705. Epub 2010 Oct 4.
31. Sobrero, A.F., et al., *EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2008. **26**(14): p. 2311-9. Epub 2008 Apr 7.
  32. Hecht, J.R., et al., *A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2009. **27**(5): p. 672-80. Epub 2008 Dec 29.
  33. Van Cutsem, E., B. Nordlinger, and A. Cervantes, *Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment.* Ann. **21**(Suppl 5): p. v93-7.
  34. Allegra, C.J., et al., *American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy.* J Clin Oncol, 2009. **27**(12): p. 2091-6. Epub 2009 Feb 2.
  35. Mittmann, N., et al., *Prospective cost-effectiveness analysis of cetuximab in metastatic colorectal cancer: evaluation of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group CO.17 trial.* J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(17): p. 1182-92. Epub 2009 Aug 7.
  36. van Krieken, J.H., et al., *KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program.* Virchows Arch., 2008. **453**(5): p. 417-31. .
  37. Peinado, H., et al., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET.* Nat Med, 2012. **18**(6): p. 883-91.
  38. Chen, J. and M.V. Viola, *A method to detect ras point mutations in small subpopulations of cells.* Anal Biochem, 1991. **195**(1): p. 51-6.
  39. Jacobson, D.R. and N.E. Mills, *A highly sensitive assay for mutant ras genes and its application to the study of presentation and relapse genotypes in acute leukemia.* Oncogene, 1994. **9**(2): p. 553-63.
  40. Newton, C.R., et al., *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS).* Nucleic Acids Res., 1989. **17**(7): p. 2503-16.
  41. Wu, D.Y., et al., *Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2757-60.
  42. Nollau, P. and C. Wagener, *Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment.* IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. Clin Chem, 1997. **43**(7): p. 1114-28.
  43. Ogino, S., et al., *Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by*

- Pyrosequencing*. J. Mol. Diagn., 2005. **7**(3): p. 413-21.
44. Tiacci, E., et al., *BRAF mutations in hairy-cell leukemia*. N. **364**(24): p. 2305-15. Epub 2011 Jun 11.
  45. Pleasance, E.D., et al., *A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome*. Nature. **463**(7278): p. 191-6. Epub 2009 Dec 16.
  46. Do, H., et al., *High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 142.
  47. Kim, W.J., T. Akaike, and A. Maruyama, *DNA strand exchange stimulated by spontaneous complex formation with cationic comb-type copolymer*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(43): p. 12676-7.
  48. Kim, W.J., et al., *Cationic comb-type copolymers for DNA analysis*. Nat Mater, 2003. **2**(12): p. 815-20.
  49. Choi, S.W., A. Kano, and A. Maruyama, *Activation of DNA strand exchange by cationic comb-type copolymers: effect of cationic moieties of the copolymers*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(1): p. 342-51.
  50. Whitehall, V., et al., *A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting*. J. Mol. Diagn., 2009. **11**(6): p. 543-52.

## 第2章 FRET-PHFA 法の開発

### 2.1 緒言

近年、分子標的薬の治療効果予測因子であるがん遺伝子変異検査がにわかに注目を集めている。例えば大腸結腸がん患者の治療薬であるセツキシマブは *KRAS* 遺伝子に変異が存在すると分子標的薬が奏効しないことが明らかになっている。このように分子標的薬と遺伝子検査がセットになったコンパニオンドラッグが将来的には増加していくと考えられている。そこで、我々はこのような状況を鑑みて簡便、安価ながん遺伝子変異検出法として、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）を用いた FRET-PHFA (preferentially homo-duplex formation assay) を開発した。本法は PCR-PHFA を改良した技術であり、蛍光標識された DNA を用いることにより従来の PHFA よりも操作が簡便になり、PCR 産物の持込汚染も回避でき、また、測定時間（15min）についても大幅に短縮することができる。本報告では人工合成 DNA、株化がん細胞由来 DNA を用いて実験系を構築し、高頻度に観察されるコドン 12、13 の計 7 種のマルチアレリックな *KRAS* 遺伝子変異を検出対象として FRET-PHFA の基礎的評価を行った。さらに、臨床診断用に CE マークを取得している TheraScreen®との比較検証では FRET-PHFA は 1.25%~50%に調製した株化がん細胞由来 DNA 混合試料 (n=13) 全ての *KRAS* 遺伝子変異を検出（検出率 99.9%）できた。

がん遺伝子検査にとって重要なことは組織片あるいは生検中の多くの正常細胞中の異常細胞に存在する特定の遺伝子変異を正確、且つ高感度に検出することである。業界標準の塩基配列解析方法であるダイレクトシーケンス(DS)[1-3]は、約 30%以下の変異は検出が困難であるとされている[4]。このような状況下、昨今、様々な体細胞変異検出法が報告されており、PCR-RFLP 法[5]、アレル特異的プローブ法[6, 7]、アレル特異的PCR[8, 9]、SmartAmp 法[10]、Cycleave PCR 法[11, 12]、HRM(高解像度融解曲線解析)[13-16]、pyrosequencing[4]などがあり、1%~5%の変異でも検出できるとしている。また、過剰な野生型中の変異を検出できる技術としては、制限酵素を用いて野生型のみを切断する方法[17-19]、FLAG 法[20]、PNA クランプ[21-23]を利用する方法などがあり、非常に少ない割合(0.01%~0.1%)の変異であっても検出できるとしている。これらの手法は

どれも体細胞変異検出向きの技術であるが、まだ臨床現場におけるゴールドスタンダードとして確立されていない[2]。その理由としては操作が煩雑で研究室レベルであるもの、また試薬組成が複雑であるもの、また試薬が非常に高価であるもの、また配列によっては検出が困難なもの、厳密な温度管理、専用装置が必要なものがあり臨床に応用するためには未だ課題がある。ノンシーケンシングな手法の中で唯一臨床用に CE マークを取得している英 DxS 社の TheraScreen® (ARMES-SCORPION 法) は 1% の *KRAS*、*EGFR* 遺伝子変異を検出可能で、多くの臨床試験に使用されており、血清中のがん遺伝子も検出できる非常に高感度な手法である[24-27]。しかし、正確に ARMES-SCORPION 法にて体細胞変異を検出するためには試料 DNA 量の厳密なコントロールやコントロール DNA による前検討などユーザーが行う操作が幾分煩雑であり、試薬自体も非常に高価である。また、リアルタイム PCR 中に変異を検出する技術であるためアレル識別プライマーが一度誤ってしまうと擬陽性を出す可能性がある。それを防止するためには識別プライマーの精度は非常に高いものが要求され、さまざまな遺伝子変異への対応は容易ではない。

一方、PCR-PHFA (Preferential Homo-duplex Formation Assay) は、競合ハイブリダイゼーションを利用した遺伝子変異検出法であり、Terouanne ら[28]、Oka ら[29]によって既に報告されている。また Tada ら[30]はすい臓がんの *KRAS* 遺伝子変異を PHFA により検出している。PHFA は少ない割合の変異も検出可能である優れた方法であるが、遺伝子変異を酵素反応により検出するために操作が煩雑となり、さらには汚染の危険性が高くなるという大きな課題があった。加えて厳密な温度コントロールが必要と考えられており検出時間だけでもその測定に 4 時間以上かかる[29]。以上から PHFA は研究室レベル、専門検査機関向きの技術であった。一方で、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer、蛍光共鳴エネルギー移動) は、分子診断技術に広く応用されている[31, 32]。そこで、我々は上述した PHFA の課題を解決するために、FRET を利用する FRET-PHFA を開発した。FRET-PHFA は競合ハイブリダイゼーションを利用した新規な非酵素的遺伝子検出方法である (図 2-1)。FRET-PHFA で用いる化学合成 2 本鎖標識 DNA は、3' 末端を FAM などのドナー色素、その相補鎖の 5' 末端をアクセプター (例えば Alexa594 など) あるいは消

光剤(例えば DABCYL) で修飾されており、これらがハイブリダイズしたときに FRET を観察できるように設計している。通常の PCR により調製された増幅産物と二本鎖標識 DNA の競合ハイブリダイゼーション後に、二本鎖標識 DNA が元の二本鎖を形成しているか、していないかを FRET により観察することができる。特徴的な点はこれらの標識 DNA の長さは PCR 産物と全く同じ長さに設計している点である。短鎖の二本鎖標識 DNA の場合にはまず長鎖の増幅産物同士が二本鎖を形成するため、二本鎖標識 DNA との鎖交換効率が低下し、変異検出感度が低下すると予測される。しかし、FRET-PHFA では二本鎖標識 DNA と増幅産物が配列、長さがまったく同一の関係にあるため、二本鎖標識と増幅産物の配列が同一の場合に双方の間で鎖交換反応が熱力学的に容易に平衡に達すると考えられる。増幅産物中に複数の配列があった場合は二本鎖標識 DNA と完全に同一なものから優先的に鎖交換しながら二本鎖を形成していく。一方、増幅産物中の配列に二本鎖標識 DNA と一致するものがない場合、二本鎖標識 DNA は他の増幅産物とは鎖交換を行わず、もとの二本鎖に戻る。このように FRET-PHFA では競合ハイブリダイゼーションに伴う二本鎖標識 DNA の形成率を FRET により検出する。これが FRET-PHFA による遺伝子変異検出の反応原理である。本稿では FRET-PHFA の基礎的評価及び *KRAS* 遺伝子変異検出感度と識別特異性を評価するために既に臨床用に CE マークを取得している TheraScreen® と比較検証を行った結果について報告する。

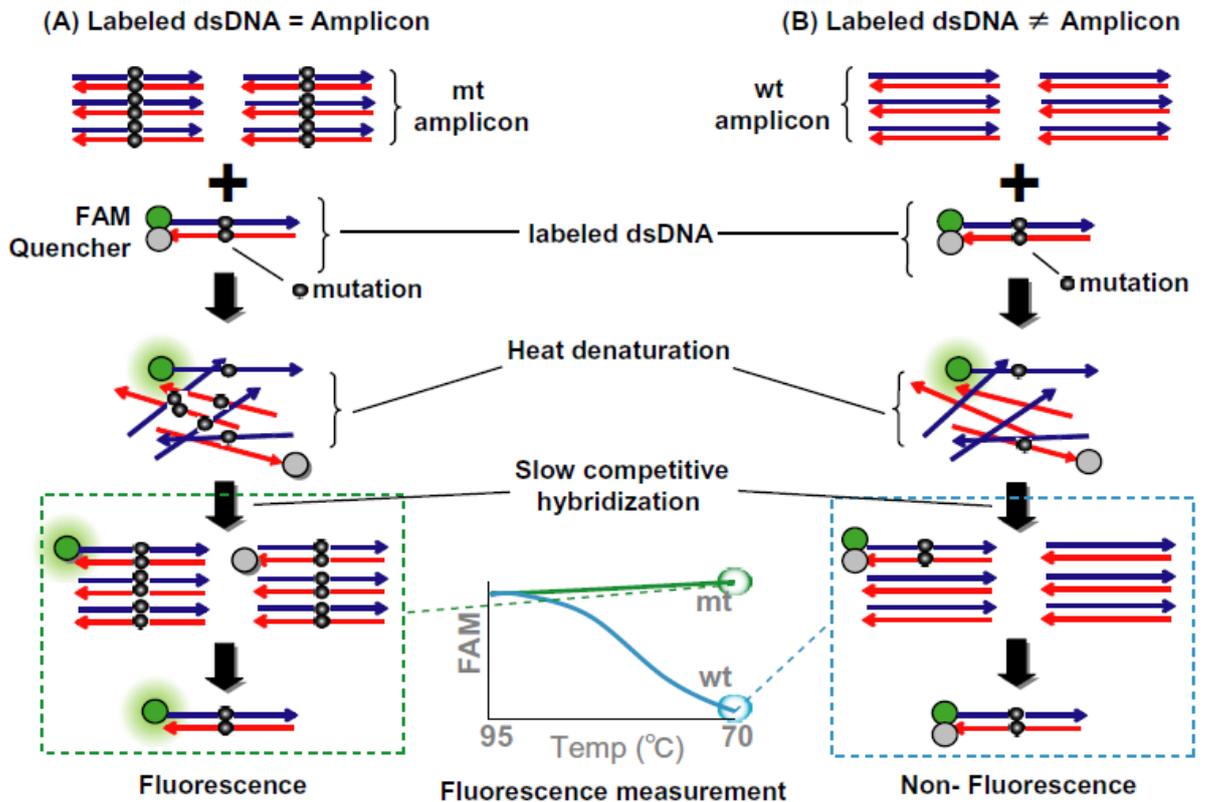


図 2-1 FRET-PHFA の原理

FRET-PHFA で用いる化学合成二本鎖標識 DNA は、3' 末端を FAM などのドナー色素、その相補鎖の 5' 末端をアクセプター(例えば Alexa594 など)あるいは消光剤(例えば DABCYL)で修飾されており、これらがハイブリダイズしたときに FRET を観察できるように設計している。通常の PCR により調製された増幅産物と二本鎖標識 DNA の競合ハイブリダイゼーション後に、二本鎖標識 DNA が元の二本鎖を形成しているか、していないかを FRET により観察することができる。特徴的な点はこれらの標識 DNA の長さは PCR 産物と全く同じ長さに設計している点である。短鎖の二本鎖標識 DNA の場合にはまず長鎖の増幅産物同士が二本鎖を形成するため、二本鎖標識 DNA との鎖交換効率が低下し、変異検出感度が低下すると予測される。しかし FRET-PHFA では二本鎖標識 DNA と増幅産物がホモジニアスな関係にあるため、二本鎖標識と増幅産物の配列が同一の場合に双方の間で鎖交換反応が熱力学的に容易に平衡に達すると考えられる。増幅産物中に複数の配列があった場合は二本鎖標識 DNA と完全に同一なものから優先的に鎖交換しながら二本鎖を形成していく。一方、増幅産物中の配列に二本鎖標識 DNA と一致するものがない場合、二本鎖標識 DNA は他の増幅産物とは鎖交換を行わず、もとの二本鎖に戻る。このように FRET-PHFA では競合ハイブリダイゼーションに伴う二本鎖標識 DNA の形成率を FRET により検出する。

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

## 2.2 材料と方法

### 合成オリゴ

本実験に用いた野生型の合成 DNA、*KRAS* 遺伝子識別用標識 DNA、PCR に用いたプライマーなどの化学合成オリゴの一覧を表 2-1 に示す。プライマーはファスマック社、標識 DNA、鋳型合成 DNA は日本バイオサービスから購入した。なお、標識 DNA の FAM を 3' 末端にのみ修飾したものには、その相補鎖の 5' 末端は DABCYL、あるいは Alexa594 が修飾された標識 DNA を用い、両末端を FAM で修飾したものにはその相補鎖の両末端を DABCYL で修飾したものを二本鎖標識 DNA として用いた。また、標識 DNA は PCR 産物と全く同じ長さ (54 bp) になるように設計した。

### 株化がん細胞由来 DNA

*KRAS* 野生型として A431、MCF-7、G12A の変異型として RPMI-8226、G12D の変異型として CCRF-CEM、G12C の変異型として NCI-H23、G12V の変異型として SW403、G12S の変異型として A549、そして G13D の変異型として MDAME231 の細胞から抽出した DNA を用いた。外部評価に用いた株化がん細胞由来 DNA は、野生型と各変異型 DNA を所定の割合にて混合したものを用いた。これらの株化がん細胞由来 DNA は、米国、ミリアド社より譲り受けた。

### PCR

PCR 反応液の組成は、250 nM フォワードプライマー、250 nM リバースプライマー、250  $\mu$ M dNTP (タカラバイオ社)、1 $\times$ PCR 緩衝液 (タカラバイオ社)、2.5 ユニット Taq DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社)、とし、全体の反応液を 117.5  $\mu$ l とした。この PCR 反応液に 10ng/  $\mu$ l あるいは 25 ng/  $\mu$ l の株化がん細胞 DNA あるいは 0.1 nM 一本鎖合成 DNA を鋳型 DNA として 2.5  $\mu$ l 添加し、全体の反応容量を 50  $\mu$ l とした。PCR の反応条件は 94 $^{\circ}$ C、2 分間の処理後、94  $^{\circ}$ C (20 秒)  $\rightarrow$  58  $^{\circ}$ C (30 秒)  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C (30 秒) の変性、アニーリング、伸長反応を、I-Cycler (BioRad 社) にて 40 サイクルあるいは 50 サイクル行った。

## FRET- PHFA

FRET- PHFA の基本的評価では 0.5M EDTA (Invitrogen 社) を  $2\ \mu\text{l}$ 、2M の NaCl を  $1\ \mu\text{l}$ 、50  $\times$  ROX (Invitrogen 社) を  $0.6\ \mu\text{l}$ 、FAM 標識 DNA (日本バイオサービス社) を  $1\ \mu\text{l}$ 、DABCYL 標識 DNA (日本バイオサービス社) を  $1\ \mu\text{l}$  を前混合したものに PCR により調製された増幅産物  $14.4\ \mu\text{l}$  を加えて、合計  $20\ \mu\text{l}$  の反応系で行った。標識 DNA のみの反応は増幅産物の代わりに  $1\ \times$  PCR 緩衝液 (タカラバイオ社) を  $14.4\ \mu\text{l}$  加えた。

なお、蛍光測定は ABI7900 を用い、3 つの条件にて実施した。条件 1 (従来条件) (測定時間 60 分):  $95\ ^\circ\text{C}$ 、30 秒の変性後、 $90\ ^\circ\text{C}$  まで  $1.0\ ^\circ\text{C}/\text{min}$  の速度で温度を降下させて、 $75\ ^\circ\text{C}$  まで、 $1\ ^\circ\text{C}$  ずる温度を降下させ、その度に 3 分間その温度を保持することを繰り返した。条件 2 (測定時間 43 分):  $95\ ^\circ\text{C}$ 、30 秒の変性後、 $85\ ^\circ\text{C}$  まで  $1.0\ ^\circ\text{C}/\text{min}$  の速度で温度を降下させて、 $75\ ^\circ\text{C}$  まで、 $1\ ^\circ\text{C}$  ずる温度を降下させ、その度に 3 分間その温度を保持することを繰り返した。条件 3 (測定時間 13 分):  $95\ ^\circ\text{C}$ 、30 秒の変性後、 $100\ ^\circ\text{C}/\text{min}$  で  $85\ ^\circ\text{C}$  まで降下させ、 $75\ ^\circ\text{C}$  までの間を  $1.0\ ^\circ\text{C}/\text{min}$  の速度で温度を降下させた。

FRET-PHFA の外部評価では 0.5 M EDTA (Invitrogen 社)  $2\ \mu\text{l}$ 、2 M の NaCl  $1\ \mu\text{l}$ 、500 nM FAM 標識 DNA (日本バイオサービス社)  $1\ \mu\text{l}$ 、500 nM Alexa594 標識 DNA (日本バイオサービス社)  $1\ \mu\text{l}$  を前混合したものに PCR により調製された増幅産物  $15\ \mu\text{l}$  を加えて、合計  $20\ \mu\text{l}$  の反応系で行った。標識 DNA のみの反応は増幅産物の代わりに  $1\ \times$  PCR 緩衝液を  $14.4\ \mu\text{l}$  加えた。

なお、蛍光測定は ABI7900 を用い、条件 1 (測定時間 60 分):  $95\ ^\circ\text{C}$ 、30 秒の変性後、 $85\ ^\circ\text{C}$  まで  $0.96\ ^\circ\text{C}/\text{min}$  の速度で温度を降下させて、 $85\ ^\circ\text{C}$  から  $75\ ^\circ\text{C}$  まで各温度で 3 分間保持しながら温度を  $1\ ^\circ\text{C}$  ずつ降下させた。

## FRET-PHFA の補正

FRET-PHFA で得られた結果を正確に把握するために下記の式に蛍光データを当てはめて解

析を行った。

$$\Delta \text{FAM} = \text{FAM} [95^\circ\text{C 終点}] - \text{FAM} [75^\circ\text{C or } 35^\circ\text{C 終点}] \dots \textcircled{1}$$

FAMの値をROXなどの蛍光色素でwell間差を補正している場合は①の $\Delta$ FAMは相対強度の、補正していない場合は蛍光強度の変化量を意味する。①の式により、ハイブリダイゼーション中の標識DNAの蛍光変化量を算出することができる。

さらに、毎測定ごとに標識DNAのみの反応を参照し、下記の式からINDEX値を算出した。

$$\text{INDEX} (\%) = \Delta \text{FAM} [\text{試料}] / \Delta \text{FAM} [\text{標識DNAのみ}] \dots \textcircled{2}$$

これにより、標識DNAのみの蛍光変化量を100%としたとき、試料ではどの程度の標識DNAがもとに戻ったか、あるいは戻らなかったかを予測することができる。

外部評価では各標識DNAのINDEX閾値を以下のように設定し、その閾値以下だとKRAS遺伝子陽性とした。各標識DNAのINDEX値の閾値は野生型25%、G12A44%、G12C48%、G12D45%、G12R39%、G12S40%、G12D48%、そしてG13D47%とした。

#### TheraScreen®

TheraScreen®のKRAS遺伝子検出キットをDxS社から購入し、Glab病理解析センター（日本、札幌市）に株化がん細胞由来DNA試料からKRAS遺伝子検出実験を委託した。操作はDxS社規定のマニュアルに準じた(22)。測定装置はABI7900(マニュアルではABI7700を推奨)を用いて行い、各プローブセットの $\Delta$ Ct値を計算し、その値がDxS社の定める各APC (assay performance characteristics) 以下だった場合、陽性とした。

表 2-1 実験で用いたオリゴ DNA

---

PCR primers for KRAS gene  
 F-primer TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT  
 R-primer TATCGTCAAGGCACTCTTGCC

Template DNA  
 Wild  
 TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **G**TGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA  
 G12A  
 TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **Gc**TGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA  
 G12C  
 TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **t**GTTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA  
 G12D  
 TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **Ga**TGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA  
 G12R  
 TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **c**GTTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA  
 G12S  
 TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **a**GTTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA  
 G12V  
 TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **Gt**TGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA  
 G13D  
 TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **G**T**Ga**C GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA

Labeled DNA for KRAS mutations  
 Wild 5'-FAM-TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **G**TGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-FAM or none-3'  
 3'-DAB or Ale 594-ATATTGAACACCATCAACCTCGA **CC**ACCG CATCCGTTCTCACGGAAGTCTAT-DAB or none-5'  
 G12A 5'-FAM-TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **Gc**TGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-FAM or none-3'  
 3'-DAB or Ale 594-ATATTGAACACCATCAACCTCGA **Cg**ACCG CATCCGTTCTCACGGAAGTCTAT-DAB or none-5'  
 G12C 5'-FAM-TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **t**GTTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-FAM or none-3'  
 3'-DAB or Ale 594-ATATTGAACACCATCAACCTCGA **a**CACCG CATCCGTTCTCACGGAAGTCTAT-DAB or none-5'  
 G12D 5'-FAM-TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **Ga**TGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-FAM or none-3'  
 3'-DAB or Ale 594-ATATTGAACACCATCAACCTCGA **Ca**ACCG CATCCGTTCTCACGGAAGTCTAT-DAB or none-5'  
 G12R 5'-FAM-TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **c**GTTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-FAM or none-3'  
 3'-DAB or Ale 594-ATATTGAACACCATCAACCTCGA **gc**ACCG CATCCGTTCTCACGGAAGTCTAT-DAB or none-5'  
 G12S 5'-FAM-TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **a**GTTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-FAM or none-3'  
 3'-DAB or Ale 594-ATATTGAACACCATCAACCTCGA **ta**ACCG CATCCGTTCTCACGGAAGTCTAT-DAB or none-5'  
 G12V 5'-FAM-TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **Gt**TGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-FAM or none-3'  
 3'-DAB or Ale 594-ATATTGAACACCATCAACCTCGA **Ca**ACCG CATCCGTTCTCACGGAAGTCTAT-DAB or none-5'  
 G13D 5'-FAM-TATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT **G**T**Ga**C GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-FAM or none-3'  
 3'-DAB or Ale 594-ATATTGAACACCATCAACCTCGA **CCa**C**G**C CATCCGTTCTCACGGAAGTCTAT-DAB or none-5'

---

太字は、*KRAS* 遺伝子のコドン 12、13 を表し、小文字は、変異サイトを表す

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

## 2.3 結果

### 標識 DNA のクエンチャー及びアクセプターの選択

FRET-PHFA では標識 DNA の FAM などのドナーからの蛍光をより効率的に消光させる必要がある。そこで、FAM 標識 DNA とその相補鎖 3' 末端に Alexa594、あるいは DABCYL を修飾した標識 DNA の組み合わせにより、ハイブリダイゼーションに伴う蛍光変化量 (FRET 効率) に違いが出るかについて確認を行った。図 2-2 に標識 DNA のみの蛍光挙動を示す。FAM 標識 DNA の相補鎖にアクセプターをつけるか、クエンチャーをつけるかでハイブリダイゼーションに伴う蛍光挙動が変化することが分かった。FAM、DABCYL の標識 DNA セットの  $\Delta$ FAM は 1705、FAM、Alexa594 の標識 DNA セットの  $\Delta$ FAM は 2248 となり、FAM の相補鎖にアクセプターを修飾するほうが 1.3 倍程度 FAM を効果的に消光できることが分かった。

### 標識 DNA の蛍光強度と蛍光修飾数の関係と標識 DNA による変異識別能の確認

本検討では鋳型 DNA には表 2-1 記載の人工合成 DNA (野生型と G12D) を用いて PCR により増幅産物を調製した。

図 2-3 に示すように FAM を片側修飾した標識 DNA よりも両末端修飾を行った標識 DNA の方が同じコピー数で蛍光強度が 2 倍以上増加することが分かった。また、片側修飾のみの標識 DNA と増幅産物がミスマッチの時の INDEX 値は 66 %、両側修飾した標識 DNA と増幅産物がミスマッチの時の INDEX 値は 82 % となり、両側修飾した標識 DNA の方がより変異識別性が高くなることを示している。Okamura らは RNA にハイブリダイズする近接プローブのドナーを二つ連続で修飾することにより劇的に蛍光強度を増加させ FRET 効率を上げている。本検討のように相補的な 2 本鎖標識 DNA においても修飾数を増やすことで蛍光強度を改善することが示唆された。また、本結果から FRET-PHFA において標識 DNA が増幅産物の一塩基の違いを識別できることもこのデータから実証された。

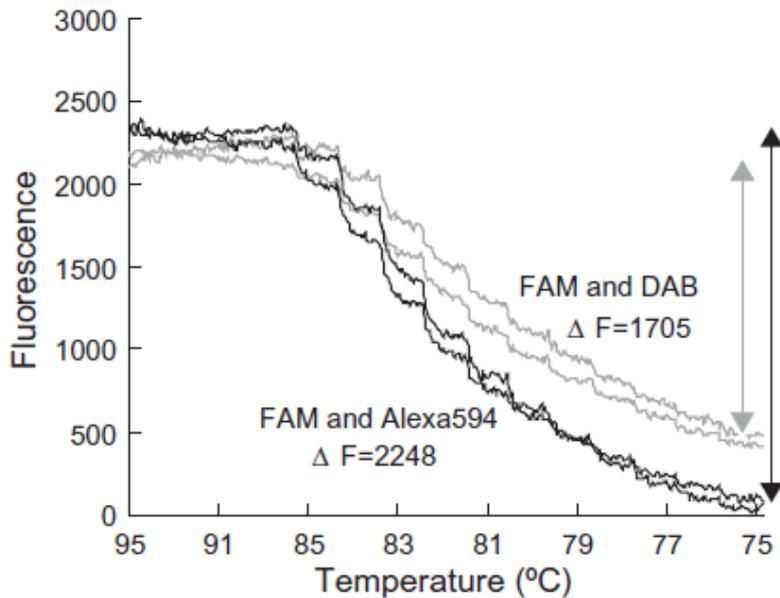


図 2-2 異なるドナー、アクセプターの組み合わせによる FRET 効果  
 温度条件は、条件②、標識 DNA は *KRAS* 野生型用を用いた結果である。  
 なお、本図は Elsevier 社から転載許可を受けている。

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

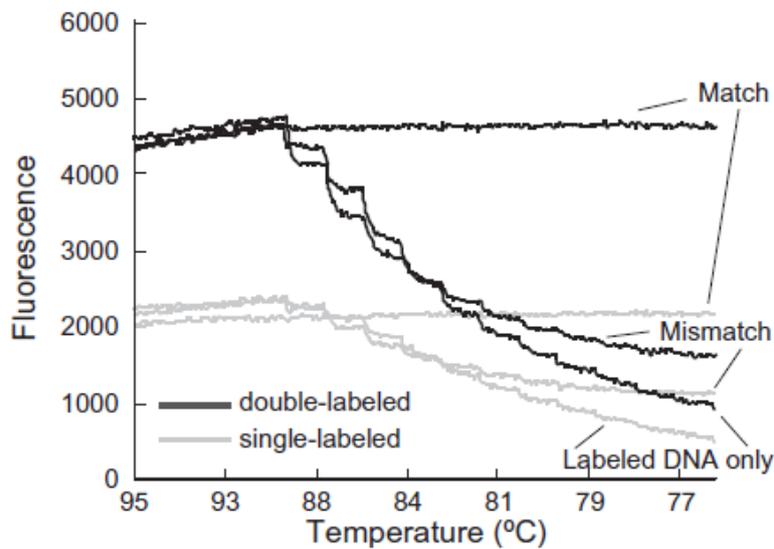


図 2-3 片側蛍光修飾された標識 DNA と両側蛍光標識された標識 DNA のミスマッチ識別能力  
 標識 DNA は、野生型用の標識 DNA を用いた。温度条件は、条件②で行った。

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

## FRET-PHFA 測定時間短縮の検討

Okaらの報告(32)によると従来の PHFA ではハイブリダイゼーションの精度を高めるために、厳密な温度管理が必要であることを述べている。そのために、ハイブリダイゼーションのための降温速度は  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  程度にする必要があり、 $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  から  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  まで温度を降下させると測定時間は 4 時間を要する。そこで、我々は FRET-PHFA での測定時間の短縮化の検討を行った。なお、本検討では鋳型 DNA に株化がん細胞由来 DNA を用いて PCR により増幅産物を調製した。図 2-4 に示すように、条件1において  $85^{\circ}\text{C}$  以降に蛍光が変化していることが分かる。すなわち、標識 DNA の  $T_m$  値が  $85^{\circ}\text{C}$  付近にあることを示している。条件1では  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  から  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  の間を 3 分間保持させながら緩やかに温度を低下させている。 $90^{\circ}\text{C}$  から  $85^{\circ}\text{C}$  までは蛍光は変化せず、 $85^{\circ}\text{C}$  以降から蛍光が階段状に変化していることが観察された(図 2-4A)。階段状に変化している理由は  $85^{\circ}\text{C}$  から  $75^{\circ}\text{C}$  の間において各温度保持している間は蛍光の変化がほとんど観察されず、 $1^{\circ}\text{C}$  温度を降下させると同時に蛍光挙動も一緒に変化しているためである。条件 1~3 のミスマッチの INDEX 値は、それぞれ、 $81.0\%$  (図 2-4A)、 $81.5\%$  (図 2-4B)、 $84.7\%$  (図 2-4C) となった。つまり、条件 1 の従来法よりも約 10 倍速めた  $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (保持なし)の降温速度でも正確なハイブリダイゼーションがほとんど平衡に達していることが分かる。条件 3 の測定時間は約 13 分であり、数時間を要していた従来法に比べ、大幅に測定時間を短縮することに成功した。さらに、温度降下速度を  $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  以上に速めた場合に、少ない変異を検出する際の影響を調べた (図 2-4 の D)。 $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  以上の降下速度では、野生型試料と少ない変異の割合の試料の区別が付きにくくなることが分かった。 $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の温度降下の際は、野生型の INDEX 値は、 $90\%$  ( $\text{SD}=\pm 2.9$ )で、 $1.25\%$ の変異型の INDEX 値は  $76\%$  ( $\text{SD}=\pm 2.7$ ) となり、変異の検出は可能であることがわかる。標識 DNA の  $T_m$  値付近の温度 (図 2-4 のグレー領域)を  $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  程度の温度降下速度にすることが極微量の変異型の識別に重要であることがわかった。

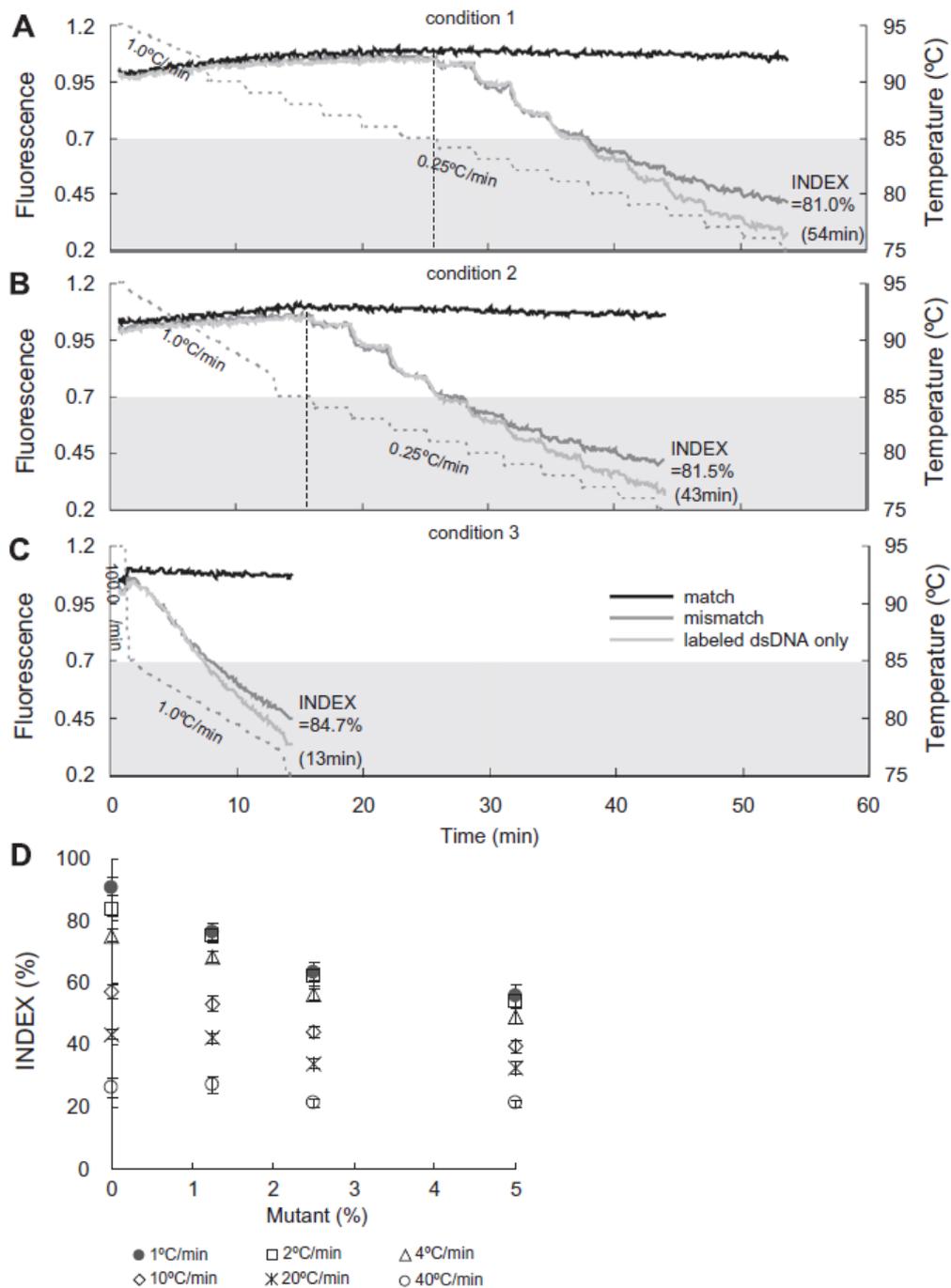


図 2-4 FRET-PHFA の時間短縮化

3 つの温度条件にて測定を行った。グラフ A、B、C は、それぞれ、温度条件が 1~3 で実行したときの蛍光挙動を示す。グラフ D は、ramp レート毎の G12S の標識 DNA の INDEX 値を示している。増幅産物は、株化がん細胞由来 DNA(野生型:MCF-7、変異型:A549)から調製した。A549 は、KRAS の G12S (GGT>AGT)をヘテロで有する。標識 DNA は、両末端が標識されているものを用いた。破線は、温度プロフィールを示す。

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

### 株化がん細胞由来 DNA 混合試験による FRET-PHFA の変異検出感度実験

FAM、DABCYL で両末端修飾された二本鎖標識 DNA を用いて、時間短縮した測定条件により少ない割合の *KRAS* 遺伝子変異を検出できるかどうかを実証するために野生型の株化がん細胞由来 DNA と G12S の株化がん細胞由来 DNA の混合比率を変えた DNA から PCR を行い、そこから得た増幅産物と標識 DNA の FRET-PHFA を行った。結果を図 2-5 に示す。変異の割合依存的に蛍光挙動、INDEX 値が変化することが確認された。本結果より最大 1.25% の G12S を FRET-PHFA により検出可能であることが実証された。また、各 INDEX 値のプロットは図 2-5B のようなカーブを描くことから、10%以下の少ないであっても検出可能な反応系であることが分かる。さらにこの INDEX カーブを配列ごとに描くことで未知試料の INDEX 値から変異含有量を半定量することができると考えられる。

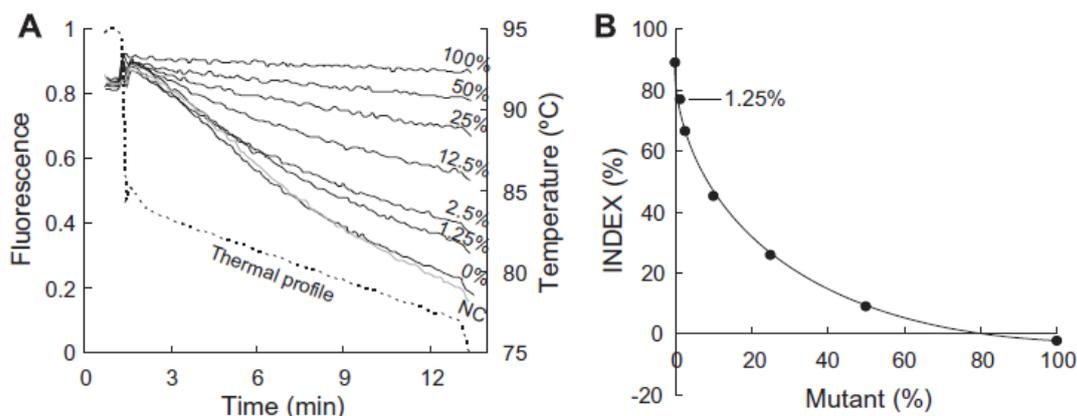


図 2-5 株化がん細胞由来 DNA 混合試験による FRET-PHFA の検出感度

(A) 変の割合ごとの G12S の標識 DNA の相対蛍光強度比、(B) 変異の割合ごとの INDEX 値を示し、温度条件は、条件3にて実行した。増幅産物を調製した際の PCR サイクル数は 50 サイクルで実行した。

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

## 外部検査機関における TheraScreen®との比較

FRET-PHFA の *KRAS* 遺伝子変異検出感度及び変異識別能を評価するために英 DxS 社の TheraScreen®との比較検証を外部検査機関に委託した。FRET-PHFAによる *KRAS*遺伝子変異検査対象はエキソン 2 のコドン 12、コドン 13 中の野生型、G12A、G12C、G12D、G12R、G12S、G12V そして G13D の計 8 種とし、TheraScreen®と同じ変異を検出できるようにした。FRET-PHFA における各標識 DNA の閾値は外部評価前に行った合成 DNA を鋳型とした反応結果(データ未記載)から各標識 DNA に対して増幅産物中変異 0%(野生型のみ)及び 5%の INDEX 値の相関関係から方法記載の通りに設定した。具体的にはそれぞれの標識 DNA の野生型増幅産物の INDEX 値から 5%の変異を含む増幅産物の INDEX 値の中間(検出感度 2.5%程度)を *KRAS* 遺伝子変異陽性の閾値とした。各試料に対する各標識 DNA の INDEX 値から設定した閾値を差し引いた値 ( $\Delta$ INDEX)を表 2-2 に示す。マイナスの値は標識 DNA の INDEX 値が所定の閾値を下回り、標識 DNA が変異を検出したことを意味している。本結果より FRET-PHFA により全ての変異を検出することができ、最大 1.25%の *KRAS* 遺伝子変異を検出することが外部病理検査機関によって実証された。また、マイナスの値は各試料に対して必ず野生型と変異型の二つのみであり、他の標識 DNA が閾値を下回ることはなかった。このことから FRET-PHFA における各標識 DNA は優れた変異識別性を有していることが分かる。

一方、表 2-3 に示すように TheraScreen®との比較評価では 5%と 2.5%の G12D 試料の  $\Delta$ Ct 値が DxS 指定の APC を下回る結果となり、偽陰性となった。また、50%G12A 試料では G12C、G12D、G12V のプローブセットが偽反応を起こすことが観察された。よって表 2-4 に示すように FRET-PHFA は既に臨床用に市販されている TheraScreen®と比較して同等以上に高感度、高精度に *KRAS* 遺伝子変異を検出できることが明らかとなった。

表 2-2 FRET-PHFA による株化がん細胞由来 DNA 中の *KRAS* 遺伝子変異の検出

ID	Sample	Mutation detection labeled dsDNA set						
		G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D
1	50% G12A	<u>-31.4</u>	21.4	13.9	45.7	30.7	8.0	17.7
2	25% G12D	14.7	12.0	<u>-12.9</u>	25.0	23.5	8.2	17.0
3	25% G13D	21.0	14.4	12.9	30.7	25.0	13.0	<u>-20.8</u>
4	12.5% G12C	18.7	<u>-26.2</u>	16.1	26.4	19.2	18.3	12.4
5	10% G12S	13.4	4.7	5.7	25.0	<u>-11.4</u>	7.4	6.8
6	5% G12D	8.7	9.2	<u>-10.2</u>	22.2	23.3	5.8	11.7
7	5% G12S	10.8	8.7	5.1	28.9	<u>-7.3</u>	10.2	7.5
8	5% G12V	10.6	9.0	5.1	28.6	12.8	<u>-3.5</u>	6.2
9	5% G13D	20.0	15.8	17.4	30.6	29.3	15.7	<u>-8.9</u>
10	2.5% G12C	12.6	<u>-11.2</u>	9.5	22.4	18.5	11.4	7.8
11	2.5% G12D	4.4	9.7	<u>-3.7</u>	25.5	23.2	6.0	9.6
12	2.5% G12V	11.0	11.3	8.4	31.4	16.1	<u>-2.0</u>	1.4
13	2.5% G13D	15.7	13.6	13.7	33.3	22.3	12.7	<u>-9.7</u>
14	1.25% G12C	9.9	<u>-5.8</u>	11.3	31.0	17.1	10.8	5.1
	Cutoff	<b>44</b>	<b>48</b>	<b>45</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>48</b>	<b>47</b>

表中の数値は、 $\Delta$ INDEX 値を示している(実際の INDEX 値-カットオフ値)。各下線引かれた数値は、マイナスの値であり、カットオフ値を下回る、つまり変異陽性であることを示している。

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

表 2-3 Thrascreen による株化がん細胞由来 DNA 中の *KRAS* 遺伝子変異の検出

ID	Sample	Mutation detection probe set						
		G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D
1	50% G12A	0.3	<b>4.6</b>	-	-	<b>2.7</b>	<b>5.4</b>	-
2	25% G12D	-	-	5.0	-	-	-	-
3	25% G13D	-	-	-	-	-	-	5.2
4	12.5% G12C	-	3.1	-	-	-	-	-
5	10% G12S	-	-	-	-	7.0	-	-
6	5% G12D	-	-	<b>8.2</b>	-	-	-	-
7	5% G12S	-	-	-	-	7.0	-	-
8	5% G12V	-	-	-	-	-	5.4	-
9	5% G13D	-	-	-	-	-	-	8.5
10	2.5% G12C	-	5.0	-	-	-	-	-
11	2.5% G12D	-	-	<b>10.0</b>	-	-	-	-
12	2.5% G12V	-	-	-	-	-	6.3	-
13	2.5% G13D	-	-	-	-	-	-	8.5
14	1.25% G12C	-	5.8	-	-	-	-	-
	APC	6.5	7.0	8.0	8.0	9.0	6.5	9.0

表中の値は、 $\Delta$ Ct 値を示す。-は、シグナルなしを示す。太字は、擬陽性(試料ID1のG12C、G12S、G12V)と偽陰性(試料ID6と11のG12D)を意味する

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

表 2-4 第三者(検査センターラボ)による FRET-PHFA と TheraScreen の比較

ID	Sample	FRET-PHFA	TheraScreen®
1	50% G12A	+	+
2	25% G12D	+	+
3	25% G13D	+	+
4	12.5% G12C	+	+
5	10% G12S	+	+
6	5% G12D	+	-
7	5% G12S	+	+
8	5% G12V	+	+
9	5% G13D	+	+
10	2.5% G12C	+	+
11	2.5% G12D	+	-
12	2.5% G12V	+	+
13	2.5% G13D	+	+
14	1.25% G12C	+	+

+は変異陽性、マイナスは、変異陰性を表す

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

## 2.4 考察

FRET-PHFA は試料とホモジニアスな二本鎖標識 DNA の競合的鎖交換反応による新規な非酵素的変異検出を提供する。HRM などで一塩基の違いを観察するためには  $T_m$  値のわずかな違いにより変異の有無を検出する必要がある[13-16]。FRET-PHFA では二本鎖標識 DNA を用いることで  $T_m$  値のわずかな違いを識別することができる (図 2-5)。さらに、従来の PHFA の課題であった測定時間を大幅に短縮することができた (図 2-4)。図 2-5 から、わずか開始 6 分程度で各試料の蛍光変化に差があることが確認できる。今回、我々が PHFA の時間を短縮できることに気付いた一番の理由は、二本鎖標識 DNA の FRET 効率をリアルタイムで測定し、蛍光が変化していない各温度における無駄な保持時間を観察できたことである。また、競合ハイブリダイゼーション中の降温速度についても従来の PHFA で報告されている降温速度より 10 倍はやめでも識別性が保持できることが分かった。図 2-4 の D では、 $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上の温度降下により標識 DNA の識別能が失われていることが分かる。つまり、 $T_m$  値付近の降温速度を劇的に速めると、hetero-duplex が形成されることになり、ミスマッチの識別性が損なわれることが分かる。したがって、正確なハイブリダイゼーションを行うためには  $T_m$  値付近の降温速度を  $1.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  以内にするのが重要であることが分かった。実際の遺伝子検出を行う場合は変性温度とハイブリダイゼーション後の 2 点のみの蛍光を測定し、INDEX 値を算出するだけで容易に判定が可能である。

FRET-PHFA の反応原理から少ない割合の変異を検出するためには二本鎖標識 DNA の濃度はできるだけ低く設定する必要がある。なぜならば、二本鎖標識 DNA に対して増幅産物のコピー数が多いほど鎖置換反応が起こりやすく、二本鎖標識 DNA が元の二本鎖に戻る確率 (INDEX 値)が低くなるためである。図 2-6 に FRET-PHFA における増幅産物中の変異の割合と標識 DNA の INDEX 値との相関関係をシミュレーションした結果を示す。例えば増幅産物中の変異が 1%で変異型と同じ配列の標識 DNA と競合させた時、標識 DNA と増幅産物の比が 1:20 の場合は、約 83% ( $1/1.2$ )の標識 DNA が元の二本鎖を形成する。一方、標識 DNA と増幅産物の比が 1:1,000 の場合は、増幅産物中の変異が 1%の時で約 9% ( $1/11$ )の標識 DNA が、さらに変異が 0.5%の時でも 17%の標識 DNA しか元の二本鎖を形成しないことになる。つまり、標識 DNA の濃度を下げるこ

で少ない変異をより確実且つ高感度に検出できる理論となり、0.5%の変異型を容易に区別できることを示唆している(図 2-6B)。しかし、FRET-PHFA で低い割合の変異を検出するために二本鎖標識 DNA の濃度をできるだけ低く設定すると、検出すべき蛍光量が減少してしまい汎用装置での検出が困難になる。そこで、感度向上のため図 2-3 の結果から蛍光を両末端に修飾することで同じ DNA コピー数で蛍光強度を2倍以上に高めることに成功した。さらに標識 DNA の蛍光強度を高め、増幅産物との相対比を大きくすることができれば現状よりも少ない変異を容易に検出できる。

株化がん細胞由来 DNA 混合実験では G12S の変異を FRET-PHFA によって最大 1.25%まで検出することができた(図 2-5)。FRET-PHFA では野生型も変異型も共通のプライマーで増幅しており、変異型をエンリッチにさせる工夫(例えば、制限酵素による野生型切断[17-19]や PNA クランピング[21-23]など)を施さなくとも、低い割合の *KRAS* 遺伝子変異を検出できることが証明された。また、重要な点は、本手法の再現性の良さである(図 2-4D)。それゆえ、カットオフ値も  $2\sigma$  あるいは  $3\sigma$  での設定が可能となった。さらに、図 2-5B の INDEX 値のプロットカーブは図 2-6A と同様のカーブを描いていることからシミュレーションに近いことが実際の反応においても起きていると考えられる。また、PCR がプラトーに達していればほぼ一定の増幅産物量となり、そのような条件では変異型の半定量も可能である。

本稿で最も重要な点は外部検査機関において現在、最も大腸がん *KRAS* 遺伝子検査において注目されている TheraScreen®[33]との株化がん細胞由来 DNA の混合試料を用いた比較検証において、FRET-PHFA は TheraScreen®と同等、それ以上の検出感度及び変異識別性を証明したことである(表 2-5)。特に、TheraScreen®では 5%及び 2.5%の G12D 変異試料(試料#6、11)を偽陰性とした。さらに 50%G12A(試料#1)の試料では G12A のプローブ以外に G12C、G12S、G12V がクロストークしており、G12S に関しては APC を大きく下回っている。このようにアレル特異的 PCR による変異検出では識別プライマーが一度間違える(ミスプライミング)とそれらが増幅され、擬陽性となりやすい。TheraScreen®は非常に優れた変異検出法であるが変異識別プライマーが微妙な温度の影響などを受けてミスマッチの試料に対する擬陽性が観察されやすい技術と考えられる。一方、

FRET-PHFA にとって PCR は一定の増幅産物を得る手段でしかなく、変異識別に関しては標識 DNA との競合ハイブリダイゼーションにより行うので、プライマーダイマーや偽産物が増幅産物中に混入していたとしてもそれらを排除した反応系で確実に正しい変異を同定できる。

表 2-2 に示すように FRET-PHFA においても 50%G12A (試料#1)では G12V が、G12S (-aGTGGC-)の増幅産物に対しては G12C (-tGTGGC-)、G12D (-GaTGGC-)の標識 DNA が、G12V (-GtTGGC-) の増幅産物に対しては G12D (-GaTGGC-) の標識 DNA が反応する傾向にある。それぞれの変異の割合が減ると  $\Delta$ INDEX も増加する傾向にあるため、若干は配列依存的なクロストークが生じて全体の反応が平衡化していることが予想される。しかしこのように配列依存的なクロストークが観察されたものの、各標識 DNA の所定の閾値を定めることにより全ての試料から *KRAS* 遺伝子変異を検出することが可能であった。特徴的な点は、G13D (-GGAMDSC-) の増幅産物は、他の標識 DNA と間違っただけでなく、また G12R (-cGTGGC-)の標識 DNA も他の試料に対してほとんど間違っただけでなく反応していないことである。

コストや測定時間は臨床検査を考えた場合に重要なファクターとなる。Whitehall ら[34]は FFPE 試料からの *KRAS* 変異検出において様々な手法をさまざまな因子ごとに比較している。そこでは ARMS は高感度だが非常に高価であると報告している。FRET-PHFA はその検出に酵素を使用せず、試薬組成も単純且つ検出に用いる標識 DNA は低濃度であるために非常に安価な変異検出技術である。さらに、測定時間は PCR 時間を含めて 1 時間程度で終了する。また、1 検体あたりに必要な鋳型量は、TheraScreen では 160ng (20ng/ 反応)、FRET-PHFA では 25-50ng (20ng/反応) と使用する鋳型 DNA 量も比較的少なく済む。

結論として我々は簡便、迅速、安価な遺伝子検査法として FRET-PHFA を開発した。FRET を検出に利用することで主にコスト、操作、反応工程の簡略、測定時間短縮の面において従来の PHFA の課題を劇的に改善することができた。着目すべき点としては FRET-PHFA に用いる標識 DNA は変異近傍の塩基配列による影響が比較的小さく、ほとんど最適化する必要がないという点である。すなわち FRET-PHFA は様々な遺伝子変異に対して容易に対応できる。さらに増幅産物

のサイズが非常に短いのでゲノムが断片化しているFFPE 試料などにも対応が可能だと考えている。

さらに本手法は従来の PHFA や HRM よりも測定時間が短く、遺伝子変異を高感度に検出できる。

そのため専用チップ及び解析装置による完全自動化へ移行しやすいと考えられる。

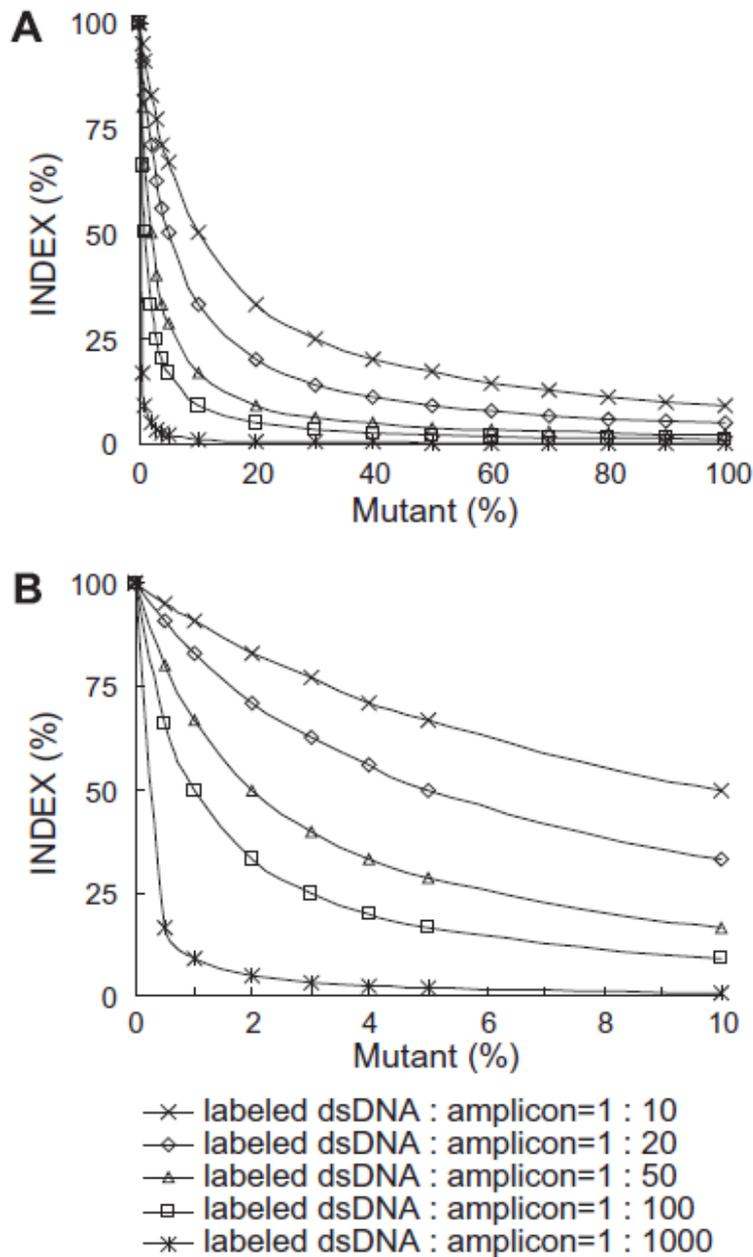


図 2-6 INDEX 値のシミュレーション

(A)横軸の変異型の割合が 0%-100%、(B)横軸の変異型の割合が 0%-10%

Reprinted from Analytical Biochemistry, Vol 408, shiro kitano et al., Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, Pages No.197, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

## 2.5 参考文献

1. Brink, M., et al., *KRAS oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study*. Carcinogenesis, 2003. **24**(4): p. 703-10.
2. van Krieken, J.H., et al., *KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program*. Virchows Arch., 2008. **453**(5): p. 417-31. .
3. Chien, C.C., et al., *Correlation of KRAS codon 12 mutations in human feces and ages of patients with colorectal cancer (CRC)*. Transl. Res., 2007. **149**(2): p. 96-102.
4. Ogino, S., et al., *Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing*. J. Mol. Diagn., 2005. **7**(3): p. 413-21.
5. Kumar, R. and L.L. Dunn, *Designed diagnostic restriction fragment length polymorphisms for the detection of point mutations in ras oncogenes*. Oncogene Res., 1989. **4**(3): p. 235-41.
6. Marras, S.A., F.R. Kramer, and S. Tyagi, *Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons*. Genet. Anal., 1999. **14**(5-6): p. 151-6.
7. Tyagi, S., D.P. Bratu, and F.R. Kramer, *Multicolor molecular beacons for allele discrimination*. Nat. Biotechnol., 1998. **16**(1): p. 49-53.
8. Newton, C.R., et al., *Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)*. Nucleic Acids Res., 1989. **17**(7): p. 2503-16.
9. Okayama, H., et al., *Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification*. J. Lab. Clin. Med., 1989. **114**(2): p. 105-13.
10. Tatsumi, K., et al., *Rapid screening assay for KRAS mutations by the modified smart amplification process*. J. Mol. Diagn., 2008. **10**(6): p. 520-6. .
11. Kosaka, T., et al., *Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib*. Clin. Cancer Res., 2006. **12**(19): p. 5764-9.
12. Shitara, K., et al., *Phase II study of combination chemotherapy with irinotecan and cetuximab for pretreated metastatic colorectal cancer harboring wild-type KRAS*. Jpn. J. Clin. Oncol. , 2010. **40**(7): p. 699-701.
13. Do, H., et al., *High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 142.
14. Fassina, A., et al., *Detection of EGFR and KRAS mutations on trans-thoracic needle aspiration of lung nodules by high resolution melting analysis*. J. Clin. Pathol., 2009. **62**(12): p. 1096-102. .
15. Ma, E.S., et al., *Detection of KRAS mutations in colorectal cancer by high-resolution*

- melting analysis*. J. Clin. Pathol., 2009. **62**(10): p. 886-91.
16. van Eijk, R., et al., *Sensitive and specific KRAS somatic mutation analysis on whole-genome amplified DNA from archival tissues*. J. Mol. Diagn., 2010. **12**(1): p. 27-34. .
  17. Dieterle, C.P., et al., *Detection of isolated tumor cells by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for KRAS mutations in tissue samples of 199 colorectal cancer patients*. Clin. Cancer Res., 2004. **10**(2): p. 641-50.
  18. Jacobson, D.R. and N.E. Mills, *A highly sensitive assay for mutant ras genes and its application to the study of presentation and relapse genotypes in acute leukemia*. Oncogene, 1994. **9**(2): p. 553-63.
  19. McLean, P.A., et al., *A new method for extraction of iron-molybdenum cofactor (FeMoco) from nitrogenase adsorbed to DEAE-cellulose. 1. Effects of anions, cations, and preextraction treatments*. Biochemistry, 1989. **28**(24): p. 9402-6.
  20. Amicarelli, G., et al., *FLAG assay as a novel method for real-time signal generation during PCR: application to detection and genotyping of KRAS codon 12 mutations*. Nucleic Acids Res., 2007. **35**(19): p. e131.
  21. Chen, C.Y., S.C. Shiesh, and S.J. Wu, *Rapid detection of KRAS mutations in bile by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and melting curve analysis: comparison with restriction fragment length polymorphism analysis*. Clin. Chem., 2004. **50**(3): p. 481-9. .
  22. Dabritz, J., et al., *Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes*. Br. J. Cancer., 2005. **92**(2): p. 405-12.
  23. Luo, J.D., et al., *Detection of rare mutant KRAS DNA in a single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe*. Nucleic Acids Res., 2006. **34**(2): p. e12.
  24. Cross, J., *DxS Ltd*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(4): p. 463-7.
  25. Kimura, H., et al., *Evaluation of epidermal growth factor receptor mutation status in serum DNA as a predictor of response to gefitinib (IRESSA)*. Br. J. Cancer, 2007. **97**(6): p. 778-84.
  26. Kuang, Y., et al., *Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer*. Clin. Cancer Res., 2009. **15**(8): p. 2630-6.
  27. Kimura, H., et al., *Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with non-small-cell lung cancer*. Clin. Cancer Res., 2006. **12**(13): p. 3915-21.
  28. Terouanne, B., et al., *Quantitative and qualitative analysis of amplified DNA*

- sequences by a competitive hybridization assay.* Anal. Biochem., 1992. **205**(2): p. 193-9.
29. Oka, T., et al., *A simple method for detecting single base substitutions and its application to HLA-DPB1 typing.* Nucleic Acids Res., 1994. **22**(9): p. 1541-7.
  30. Tada, M., et al., *Quantity of mutant KRAS gene in pancreatic secretions for diagnosis of pancreatic carcinoma with different assays: analysis of 100 patients.* Clin. Chim. Acta., 2002. **324**(1-2): p. 105-11.
  31. Cardullo, R.A., et al., *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1988. **85**(23): p. 8790-4.
  32. Morrison, L.E., *Basic principles of fluorescence and energy transfer.* Methods Mol. Biol., 2008. **429**: p. 3-19.
  33. Franklin, W.A., et al., *KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer.* J. Mol. Diagn., 2010. **12**(1): p. 43-50.
  34. Whitehall, V., et al., *A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting.* J. Mol. Diagn., 2009. **11**(6): p. 543-52.

### 第3章 FRET-PHFA 法の臨床性能評価

#### 3.1 緒言

本章では、FRET-PHFA の臨床性能評価として、大腸がん凍結組織 (n= 31)、FFPE 試料 (n= 34) の計 65 試料から FRET-PHFA により *KRAS* 遺伝子変異を検出した。比較試験により、FRET-PHFA と InvaderPlus の *KRAS* 遺伝子変異検出率はそれぞれ 36 %、ダイレクトシーケンスによる検出率は 31 % と FRET-PHFA は、InvaderPlus と同等、ダイレクトシーケンスよりも高感度に *KRAS* 遺伝子変異を検出することが分かった。FRET-PHFA は、異なる臨床検体である凍結組織とパラフィン包埋組織片から抽出した DNA から所定のカットオフ値により、*KRAS* 遺伝子変異を検出することができた。本結果より、FRET-PHFA は、試料の状態により結果が左右されない頑健性を確保していることが分かった。体細胞変異における臨床検体は、固定形態や抽出方法により様々なコンディションにあると予想され、試料の状態に依存しない頑健性を確保した FRET-PHFA は、臨床現場への応用展開が期待される。

我々は、既に高感度に遺伝子変異を検出できる方法として FRET-PHFA を開発している[1]。本手法は、検出に酵素を用いないために再現性が良く、非常に低コストで遺伝子検出を行うことができる。また、検出性能は ARMS-Scorpion と同等以上であることも既に確認している[1]。また、FRET-PHFA では PCR サイズを 60 bp 以内に設計しているので、FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) 切片試料のように DNA の断片化[2]が進んだ検体においても威力を発揮することが期待できる。そこで、本研究では、大腸がん臨床検体試料 (FFPE と凍結) 中の *KRAS* 遺伝子変異を FRET-PHFA により検出することを目的とし、その際に塩基配列解析の業界標準であるダイレクトシーケンス (DS) と他のノンシーケンシングな手法である InvaderPlus アッセイ[3, 4]の二つの方法とも比較を行った。

## 3.2 材料と方法

### 株化がん細胞由来 DNA

HOP-62 (G12C ヘテロ)、RPMI-8226 (G12A ヘテロ)、SN12C (野生型)、CCRF-CEM (G12D ヘテロ)、HCT-116 (G13D ヘテロ)、MDA-MB-231 (G13D ヘテロ)、NCI-H23 (G12C ヘテロ)、OVCAR-5 (G12V ホモ)、A549 (G12S ホモ)、MALME-3M (野生型)、OVCAR-8 (野生型)を用いた。A549、MDA-MB-231 は ATCC から、残りの株化がん細胞由来 DNA は、シカゴ大学が保有しているものを用いた。

### 臨床検体

本研究の計画について図 3-1 に示す。大腸がん凍結試料 31 検体、FFPE 試料 34 検体から、DNA を抽出し、*KRAS* の遺伝子変異を検出した。凍結組織からの DNA 抽出は、キアゲン社の midi のキットプロトコルに準じて、抽出した。パラフィン包埋された試料からの DNA 抽出は、エピセクター社の簡易抽出 (QuickExtract) キットを用いた。また、これらの組織はシカゴ大学が患者に対し、インフォームドコンセントを実施し、入手したものである。

### FRET-PHFA

FRET-PHFA のために用いたプライマーや標識 DNA の配列は既報[5]に準じた。PCR 反応液の組成は、250nM フォワードプライマー、250nM リバープライマー、250  $\mu$  M dNTP、1 $\times$ PCR バッファー (10 mM Tris [pH 8.3], 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl)、2.5 ユニット Taq DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ社) とし、この PCR 反応液に 25 ng/反応となるように抽出DNAを添加し、PCR を行った。PCR の反応条件は 94  $^{\circ}$ C、2 分間の処理後、94  $^{\circ}$ C (20 秒)  $\rightarrow$  58  $^{\circ}$ C (30 秒)  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C (30 秒) の変性、アニーリング、伸長反応を、I-Cycler (BioRad 社) にて 50 サイクル行った。

FRET-PHFA の組成は 0.1  $\mu$  l の 50 $\times$ ROX (Invitrogen 社)、0.5M EDTA (Invitrogen 社) 2  $\mu$  l、2 M の NaCl 1  $\mu$  l、500 nM FAM 標識 DNA (日本バイオサービス社) 1  $\mu$  l、500 nM DAB 標識

DNA (日本バイオサービス社) 1  $\mu$ l を前混合したものに PCR により調製された増幅産物 14.9  $\mu$ l を加えて、合計 20  $\mu$ l の反応系で行った。なお、蛍光測定は MX3000P を用いて、95°C、30 秒変性後、90 °C から 60 °C の温度範囲の蛍光データを取得した。蛍光データは、図 3-2 のように補正した。また、既報[5]に従い、INDEX 値を算出し、各標識 DNA のカットオフ値を 2 SD で算出した。

### InvaderPlus

InvaderPlus のためのオリゴ配列を表 3-1 に示す。

反応液組成は、10 mM の MOPS 緩衝液 (pH 7.5)、7.5 mM の塩化マグネシウム、1×Gotaq Flexi 緩衝液、25  $\mu$  M の dNTPs、40 mM の NaCl、0.5 U の GoTaq ポリメラーゼ (プロメガ社)、48 U の クリベース、1×Oligo ミックス、10 ng の抽出 DNA を含み、全体量を 10  $\mu$ l とした。1×Oligo ミックスの組成は、1  $\mu$  M の F-プライマー、1  $\mu$  M の R-プライマー、1  $\mu$  M アレルプローブ(野生型)、1  $\mu$  M アレルプローブ (変異型)、50 nM インバーダープローブ、0.25  $\mu$  M の FRET-カセット 1、0.25  $\mu$  M の FRET カセット 2 になるように調製した(表 3-2)。全て、野生型のシグナルが RED、変異型のシグナルが FAM で検出されるように設計した。変異陽性の閾値は、5 分の時点の FAM シグナルが一定値以上あることと定義した。各変異の閾値は G12A: 5,000、G12C: 5,000、G12D: 9,000、G12S: 8,000、G12V: 7,000 そして G13D: 10,000 とした。

### ダイレクトシーケンス(DS)

10 ng の抽出 DNA を鋳型としてフォワード-プライマー: AGTCACATTTTCATTATTTTATTA-TAAGGCCTGCTGAAAATGA、リバーズ-プライマー: TCGTCCACAAAATGATTCTGAATTA-GCTGTATCG を用いて PCR を行い、その後、GenElute™ PCR Clean-Up Kit (シグマアルドリッチ) を用いて精製し、シーケンス解析装置は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer、シーケンス反応試薬は Big Dye Terminator v3.1 を用いて、フォワード側の配列を解析した。バックグラウンドノイズよりも変異部の塩基強度が強い場合に、陽性と判定した。

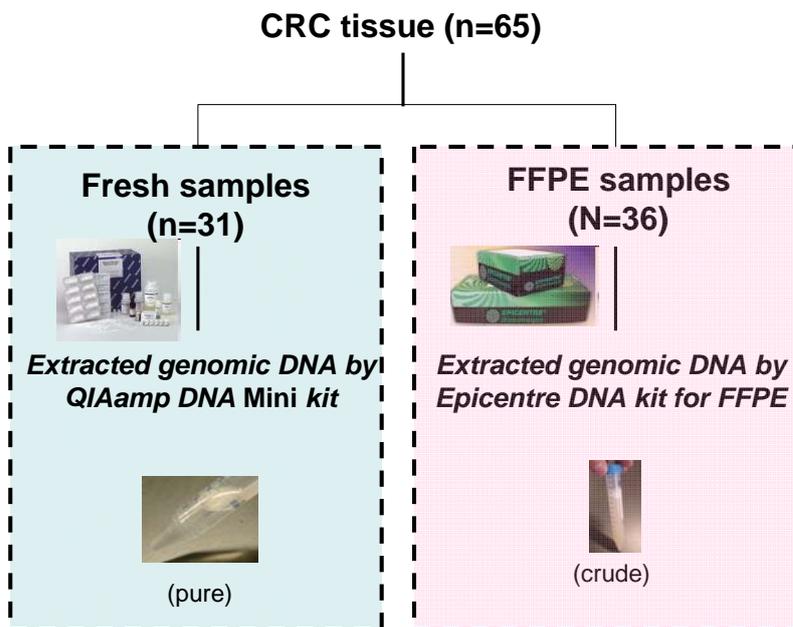


図 3-1 FRET-PHFA の臨床性能評価

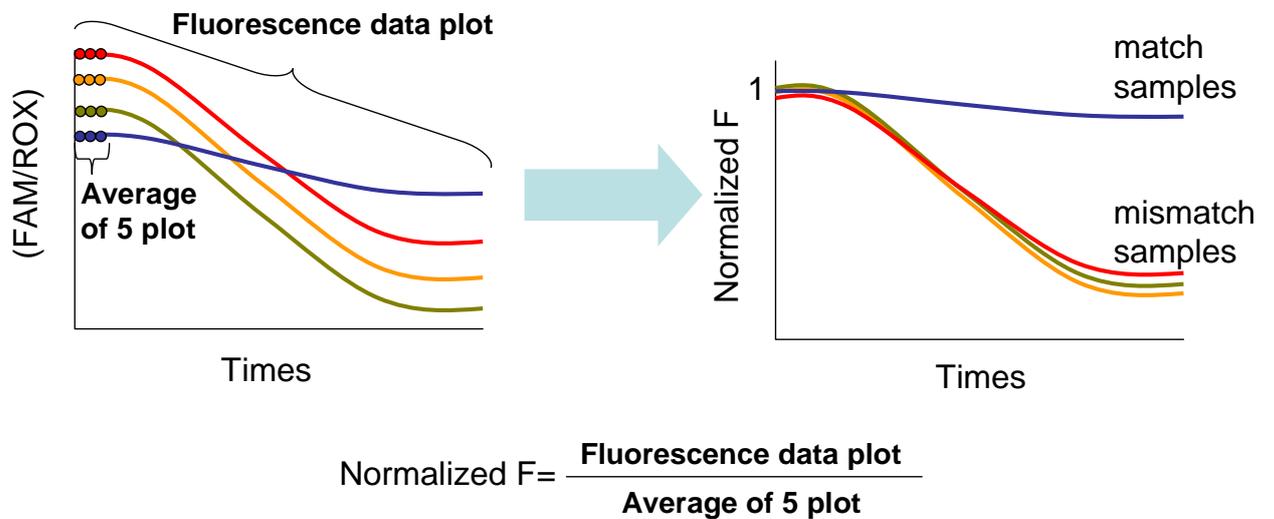


図 3-2 FRET-PHFA の蛍光強度の補正

表 3-1 インバーダーアッセイに用いたオリゴ類

<b>Primer</b>	
Forward primer	AGTCACATTTTCATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA
Reverse primer	TCGTCCACAAAATGATTCTGAATTAGCTGTATCG
<b>Probe</b>	
G_215W_AL-AM3	ACGGACGCGGAGGGTGGCGTAGGC
A_G12S_AL-AM6	CGCGAGGCCGAGTGGCGTAGGCAA
C_G12R_AL-AM6	CGCGAGGCCGCGTGGCGTAGGC
T_G12C_AL-AM6	CGCGAGGCCGTGTGGCGTAGGCAA
G_216W_AL-AM3	ACGGACGCGGAG GTGGCGTAGGCAAG
A_G12D_AL-AM6	CGCGAGGCCGATGGCGTAGGCAAGA
C_G12A_AL-AM6	CGCGAGGCCGCTGGCGTAGGCAAG
T_G12V_AL-AM6	CGCGAGGCCGTTGGCGTAGGCAAGA
G_219W_AL-AM3	ACGGACGCGGAG GCGTAGGCAAGAGTG
A_G13D_AL-AM6	CGCGAGGCCGACGTAGGCAAGAGTG
<b>Invader Oligo</b>	
T_kRAS-lvd-215	TGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTT
A_kRAS-lvd-215	TGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTA
T_kRAS-lvd-216	GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT
A_kRAS-lvd-216	GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGA
T_kRAS-lvd-219	TTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGT

表 3-2 インバーダーアッセイの *KRAS* 遺伝子変異検出用混合プローブ

<b>G12D</b>	<b>G12A</b>	<b>G12V</b>	<b>G12R</b>
G_216W_AL-AM3	G_216W_AL-AM3	G_216W_AL-AM3	G_215W_AL-AM3
A_G12D_AL-AM6	C_G12A_AL-AM6	T_G12V_AL-AM6	C_G12R_AL-AM6
T_kRAS-lvd-216	T_kRAS-lvd-216	A_kRAS-lvd-216	T_kRAS-lvd-215
Forward primer	Forward primer	Forward primer	Forward primer
Reverse primer	Reverse primer	Reverse primer	Reverse primer
Arm6-FAM	Arm6-FAM	Arm6-FAM	Arm6-FAM
Arm3-RED	Arm3-RED	Arm3-RED	Arm3-RED
<b>G12S</b>	<b>G12C</b>	<b>G13D</b>	
G_215W_AL-AM3	G_215W_AL-AM3	G_219W_AL-AM3	
A_G12S_AL-AM6	T_G12C_AL-AM6	A_G13D_AL-AM6	
T_kRAS-lvd-215	A_kRAS-lvd-215	T_kRAS-lvd-219	
Forward primer	Forward primer	Forward primer	
Reverse primer	Reverse primer	Reverse primer	
Arm6-FAM	Arm6-FAM	Arm6-FAM	
Arm3-RED	Arm3-RED	Arm3-RED	

### 3.3 結果

#### 株化がん細胞 DNA から *KRAS* 遺伝子変異検出

10 の株化がん細胞由来ゲノムから FRET-PHFA により *KRAS* 遺伝子変異を検出し、シーケンス結果と一致することを確認した。結果を図 3-3 に示す。全ての結果が DS の判定結果と一致した。このときの各標識 DNA の INDEX 値について表 3-3 に示す。この表から、野生型試料 (n=3) に対する各 *KRAS* 遺伝子変異検出用の標識 DNA の INDEX 値の平均を算出し、その平均値からそれぞれの 2 SD を減算して、カットオフ値 (G12A; 68%、G12C; 61%、G12D; 50%、G12R; 64%、G12S; 42%、G12V; 46%、そして G13D; 49%) を算出した。なお、本カットオフ値を次の臨床検体の変異検出基準とした。なお、既報[5]により、2 SD のカットオフ値で 5% を容易に検出できることは確認済みである。したがって、各標識 DNA を下回った場合、変異陽性(少なくとも 5 %は変異が存在)とした。また野生型のカットオフ値は、A549、OVCAR-5 の株化がん細胞を用いて 3 回の実験結果を元に野生型標識 DNA の INDEX 値の平均値を算出し、そこから 2 SD を減算した値をカットオフ値(57%)とした。

IvaderPlus により株化がん細胞由来 DNA から *KRAS* 遺伝子変異検出した結果を図 3-4 に示す。FRET-PHFA と同様、シーケンス結果と一致することを確認した。なお、株化がん細胞由来 DNA 混合試験において変異 5 %は、15 分以内に反応が立ち上がることを確認している。

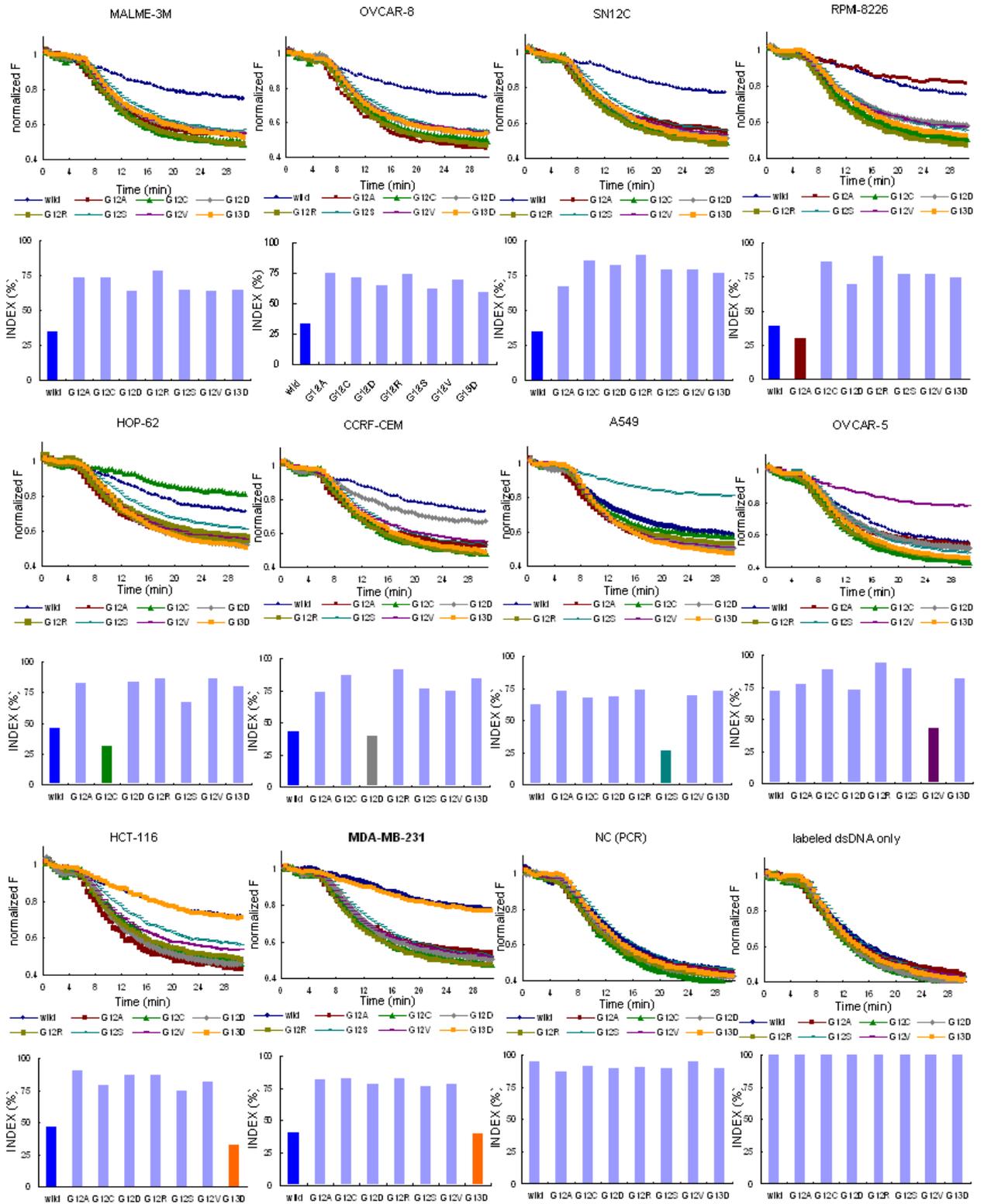


図 3-3 FRET-PHFA による各株化がん細胞中の *KRAS* 遺伝子変異の検出  
 上段は、補正された蛍光挙動を示す。下段は、INDEX 値を示す。

表 3-3 各株化がん細胞の FRET-PHFA の INDEX 値

cell-line genomic DNA	wild	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D
HOP-62	<b>46</b>	83	<b>31</b>	83	87	67	87	80
RPMI-8226	<b>38</b>	<b>30</b>	86	70	90	77	77	74
SN12C	<b>35</b>	67	85	82	90	79	79	77
CCRF-CEM	<b>43</b>	74	87	<b>40</b>	91	77	75	84
HCT-116	<b>46</b>	91	79	87	87	75	81	<b>33</b>
MDA-MB-231/ATCC	<b>41</b>	82	83	78	82	76	78	<b>39</b>
OVCAR-5	72	77	89	73	94	90	<b>43</b>	82
A549/ATCC	62	73	68	69	74	<b>27</b>	69	73
MALME-3M	<b>34</b>	73	73	64	78	65	64	64
OVCAR-8	<b>33</b>	75	71	65	74	62	69	59
PCR (NC)	100	100	100	100	100	100	100	100

太字は、標識 DNA の変異型を試料が有していることを示している。

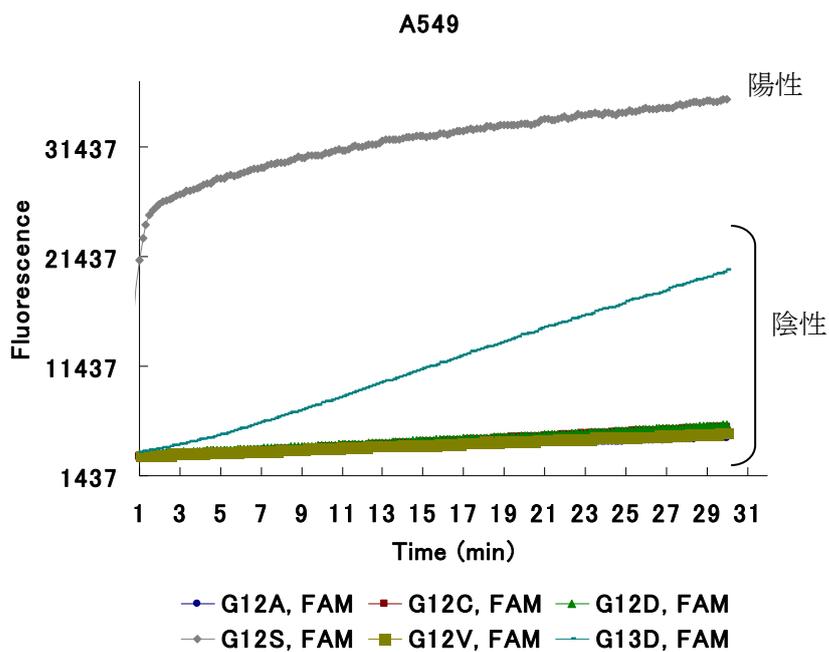


図 3-4 IvaderPlus によるがん細胞由来ゲノム(A549)からの *KRAS* 遺伝子変異検出

### FRET-PHFA による臨床検体を用いた遺伝子変異検出の実現性

図 3-5 に FRET-PHFA による大腸がん凍結試料と FFPE 試料から *KRAS* 遺伝子変異を検出した結果を示す。前述の株化がん細胞由来 DNA を用いて決定したカットオフ値により凍結組織、FFPE 試料ともに *KRAS* 遺伝子変異を検出した。これにより、FRET-PHFA により臨床試料(凍結、FFPE)中の遺伝子変異を検出できることが示された。なお、全ての検体において株化がん細胞由来 DNA の実験で定めたカットオフ値は、臨床検体の実験でも機能することが確認できた (表 3-4 と 3-5)

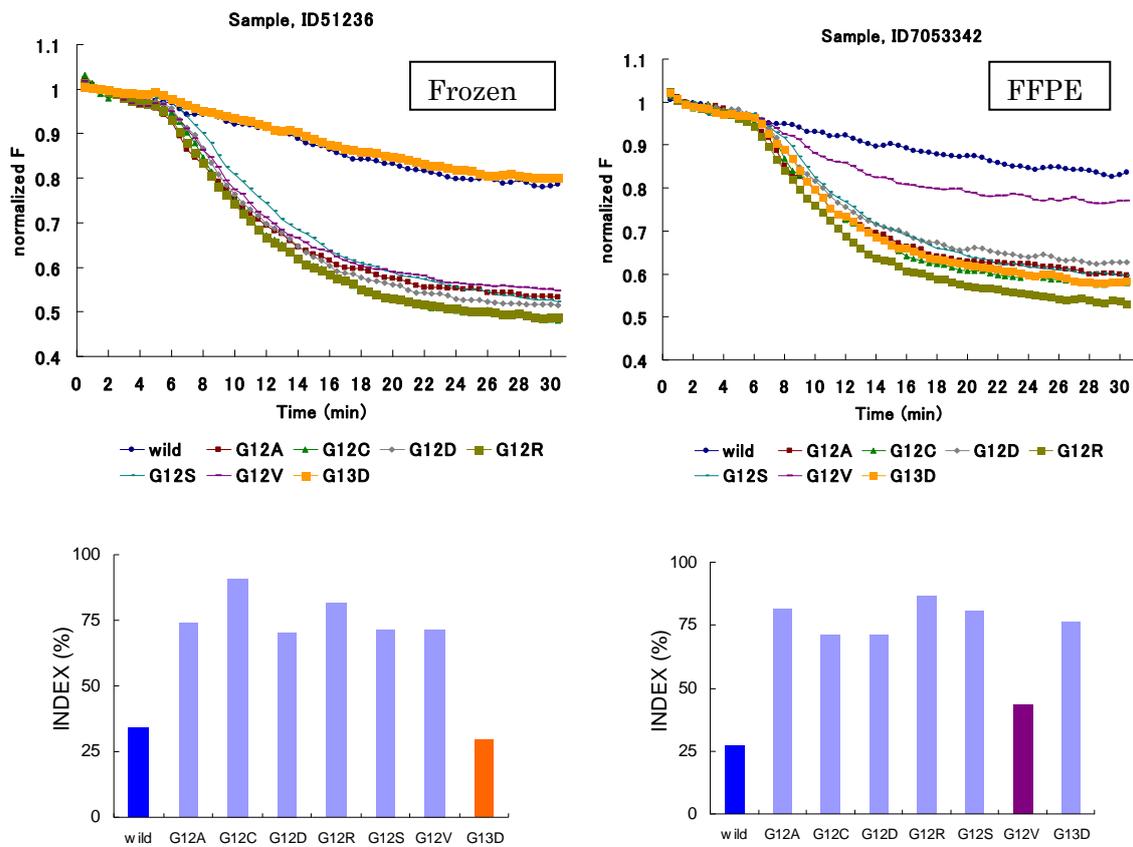


図 3-5 FRET-PHFA による形態の異なる臨床検体(凍結と FFPE)からの *KRAS* 遺伝子変異検出 上段は蛍光挙動を示し、下段は各標識 DNA の INDEX 値を示す。

表 3-4 大腸がん凍結組織を試料全ての各標識 DNA の INDEX 値

ID	wild	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D
41605	<b>28</b>	65	87	68	84	59	69	59
41940	<b>31</b>	70	79	58	85	67	<b>36</b>	62
41948	<b>34</b>	74	88	70	92	69	71	<b>35</b>
41989	<b>34</b>	73	87	70	90	67	75	67
50097	<b>36</b>	72	80	68	73	<b>32</b>	74	72
50394	<b>34</b>	70	92	67	81	68	73	<b>36</b>
50482	<b>33</b>	69	93	65	84	68	77	67
50501	<b>32</b>	73	90	66	83	65	75	64
51236	<b>34</b>	74	91	70	82	71	71	<b>30</b>
51774	<b>28</b>	69	90	64	80	64	71	69
51782	<b>35</b>	68	86	63	81	61	71	61
51988	<b>33</b>	78	85	71	96	74	81	68
56524	<b>47</b>	79	87	72	92	76	85	71
56757	<b>44</b>	78	88	76	85	80	84	78
57061	<b>38</b>	79	83	71	87	75	79	71
57386	<b>38</b>	77	79	74	87	74	77	71
57702	<b>39</b>	68	85	<b>43</b>	83	71	72	72
57884	<b>45</b>	73	83	66	82	73	76	74
59101	<b>52</b>	81	85	73	86	75	81	68
59646	<b>30</b>	76	77	67	83	68	72	68
59713	<b>42</b>	84	95	77	89	79	84	79
60401	<b>39</b>	76	<b>52</b>	72	88	73	72	74
60682	<b>46</b>	85	87	80	97	84	89	76
61522	<b>33</b>	84	75	74	91	79	82	76
61895	<b>30</b>	83	73	73	89	80	79	72
62598	<b>27</b>	81	71	71	86	81	<b>43</b>	76
62616	<b>32</b>	84	74	76	85	78	76	75
63394	<b>51</b>	88	78	84	89	86	84	<b>38</b>
63439	<b>31</b>	80	73	79	84	83	78	74
64546	<b>50</b>	84	78	79	86	87	85	78
65089	<b>33</b>	86	77	78	85	80	85	75
cut-off	57	64	61	50	64	51	55	49

表 3-5 大腸がん FFPE 試料全ての各標識 DNA の INDEX 値

ID	wild	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D
41939	<b>44</b>	79	98	60	95	78	<b>46</b>	76
41947	<b>49</b>	81	95	71	89	80	92	<b>41</b>
50096	<b>50</b>	94	87	75	86	<b>44</b>	87	75
51233	<b>59</b>	94	104	85	98	87	97	<b>47</b>
51773	<b>40</b>	91	98	76	94	81	90	76
51779	<b>46</b>	85	96	79	90	84	92	75
7053306	<b>38</b>	85	92	68	84	76	79	67
7053307	<b>35</b>	81	85	63	80	71	76	62
7053308	<b>37</b>	82	87	<b>47</b>	83	79	77	70
7053309	<b>30</b>	82	92	66	80	73	79	65
7053310	<b>38</b>	77	90	64	80	69	78	59
7053311	<b>33</b>	78	85	71	96	74	81	68
7053312	<b>47</b>	79	87	72	92	76	85	71
7053314	<b>38</b>	79	83	71	87	75	79	71
7053315	<b>38</b>	77	79	74	87	74	77	71
7053316	<b>39</b>	68	85	<b>43</b>	83	71	72	72
7053318	<b>52</b>	81	85	73	86	75	81	68
7053319	<b>30</b>	76	77	67	83	68	72	68
7053320	<b>51</b>	84	95	77	89	79	84	79
7053337	<b>39</b>	76	82	72	88	73	72	<b>42</b>
7053339	<b>46</b>	85	87	80	97	84	89	76
7053340	<b>33</b>	84	75	74	91	79	82	76
7053341	<b>30</b>	83	73	73	89	80	79	72
7053342	<b>27</b>	81	71	71	86	81	<b>43</b>	76
7053343	<b>32</b>	84	74	76	85	78	76	75
7053344	<b>51</b>	88	78	84	89	86	84	<b>38</b>
7053346	<b>31</b>	80	73	79	84	83	78	74
7053347	<b>50</b>	84	78	79	86	87	85	78
7053348	<b>33</b>	86	77	78	85	80	85	75
7053349	<b>43</b>	84	79	76	87	79	80	74
7053350	<b>36</b>	75	83	75	97	76	83	73
7053351	<b>27</b>	74	75	67	85	70	73	70
7053352	<b>44</b>	76	83	77	88	78	80	81
7053353	<b>54</b>	80	81	82	86	79	83	83
cut-off	57	64	61	50	64	51	55	49

## DS との *KRAS* 遺伝子変異頻度の違い

表 3-6 に大腸がん凍結組織(n=31)、表 3-7 に大腸がん FFPE 試料(n=34)からの *KRAS* 遺伝子変異を DS、IvaderPlus、FRET-PHFA でジェノタイプングした結果を示す。凍結組織では、ID60401 では G12C、ID63439 では G12V が FRET-PHFA と IvaderPlus により検出されたが、ダイレクトシーケンスでは検出できず野生型とした。さらに、FFPE 試料においても、ID7053308 の検体ではダイレクトシーケンスでは変異未検出(野生型)だが、FRET-PHFA とインバーダープラスでは G12D を検出した。*KRAS* 遺伝子変異の検出頻度はダイレクトシーケンスで31%、インバーダープラスと FRET-PHFA はそれぞれ、ともに 36%であった(表 3-8)。

表 3-6 三手法による *KRAS* 遺伝子変異検出結果の比較 (凍結組織)

Sample ID	Direct Sequencing	FRET-PHFA	Invader Plus®
	<i>KRAS</i> mutation	<i>KRAS</i> mutation	<i>KRAS</i> mutation
41605	n.d	n.d	n.d
41940	G12V	G12V	G12V
41948	G13D	G13D	G13D
41989	n.d	n.d	n.d
50097	G12S	G12S	G12S
50394	G13D	G13D	G13D
50482	n.d	n.d	n.d
50501	n.d	n.d	n.d
51236	G13D	G13D	G13D
51774	n.d	n.d	n.d
51782	n.d	n.d	n.d
51988	G12V	G12V	G12V
56524	n.d	n.d	n.d
56757	n.d	n.d	n.d
57061	n.d	n.d	n.d
57386	n.d	n.d	n.d
57702	G13D	G13D	G13D
57884	G13D	G13D	G13D
59101	n.d	n.d	n.d
59646	n.d	n.d	n.d
59713	n.d	n.d	n.d
60401	<b>n.d.</b>	G12C	G12C
60682	G12D	G12D	G12D
61522	n.d	n.d	n.d
61895	n.d	n.d	n.d
62598	n.d	n.d	n.d
62616	n.d	n.d	n.d
63394	G12V	G12V	G12V
63439	<b>n.d.</b>	G12V	G12V
64546	n.d	n.d	n.d
65089	G12D	G12D	G12D
total	11	13	13

表 3-7 三手法による *KRAS* 遺伝子変異検出結果の比較 (FFPE 組織)

Sample ID	Direct Sequencing	FRET-PHFA	Invader Plus®
	<i>KRAS</i> mutation	<i>KRAS</i> mutation	<i>KRAS</i> mutation
41939	G12V	G12V	G12V
41947	G13D	G13D	G13D
50096	G12S	G12S	G12S
51233	G13D	G13D	G13D
51773	n.d.	n.d.	n.d.
51779	n.d.	n.d.	n.d.
7053306	n.d.	n.d.	n.d.
7053307	n.d.	n.d.	n.d.
7053308	<b>n.d.</b>	G12D	G12D
7053309	n.d.	n.d.	n.d.
7053310	n.d.	n.d.	n.d.
7053311	n.d.	n.d.	n.d.
7053312	n.d.	n.d.	n.d.
7053314		n.d.	n.d.
7053315	n.d.	n.d.	n.d.
7053316	G12D	G12D	G12D
7053318	n.d.	n.d.	n.d.
7053319	n.d.	n.d.	n.d.
7053320	n.d.	n.d.	n.d.
7053337	G13D	G13D	G13D
7053339	n.d.	n.d.	n.d.
7053340	n.d.	n.d.	n.d.
7053341	n.d.	n.d.	n.d.
7053342	G12V	G12V	G12V
7053343	n.d.	n.d.	n.d.
7053344	G13D	G13D	G13D
7053346	n.d.	n.d.	n.d.
7053347	n.d.	n.d.	n.d.
7053348	n.d.	n.d.	n.d.
7053349	n.d.	n.d.	n.d.
7053350	n.d.	n.d.	n.d.
7053351	n.d.	n.d.	n.d.
7053352	n.d.	n.d.	n.d.
7053353	n.d.	n.d.	n.d.
total	8	9	9

表 3-8 三手法による *KRAS* 変異出現頻度の比較

Methods	Frequency of mutation
	(n=65)
FRET-PHFA	36%
InvaderPlus®	36%
DirectSequence	31%

### 3つの方法による KRAS 遺伝子頻度 (2x2)比較

DS と FRET-PHFA、InvaderPlus と FRET-PHFA の2x2比較を表 3-9に示す。ダイレクトシーケンスで野生型、FRET-PHFA で変異型となった試料は3検体(ID)存在し、そのうち、2検体が凍結組織、残りの一つが FFPE 試料であった。インバーダープラスでは凍結組織 ID63439 を所定の閾値では変異を検出できなかったが、FRET-PHFA ではダイレクトシーケンス、インバーダープラスで検出が困難であった試料を2SDのカットオフ値で検出した。Fig5に各手法の変異検出感度の差について示す。DSでは、ID7053308の検体では、GGTのセカンドベースには、Gしか検出されていないが、FRET-PHFA、InvaderPlusではそれぞれ、G12Dを陽性としている。さらに、ダイレクトシーケンスでG12Dと観察されたID7053341の検体は、FRET-PHFA及びInvaderPlusにおいて、ID7053308のシグナルよりも高いS/N比で検出された。凍結組織ID63439では、ダイレクトシーケンス野生型とし、FRET-PHFAとInvaderPlusにてG12Vと判定した(表3-6)。

表 3-9 FRET-PHFA と既存方法との2x2比較

FRET-PHFA vs DirectSequence				FRET-PHFA vs Invader Plus®			
FRET-PHFA	Direct Sequence			FRET-PHFA	InvaderPlus®		
	Wt	Mt	Total		Wt	Mt	Total
Wt	43	0	43	Wt	43	0	43
Mt	3	19	22	Mt	0	22	22
Total	43	16	65	Total	43	22	65

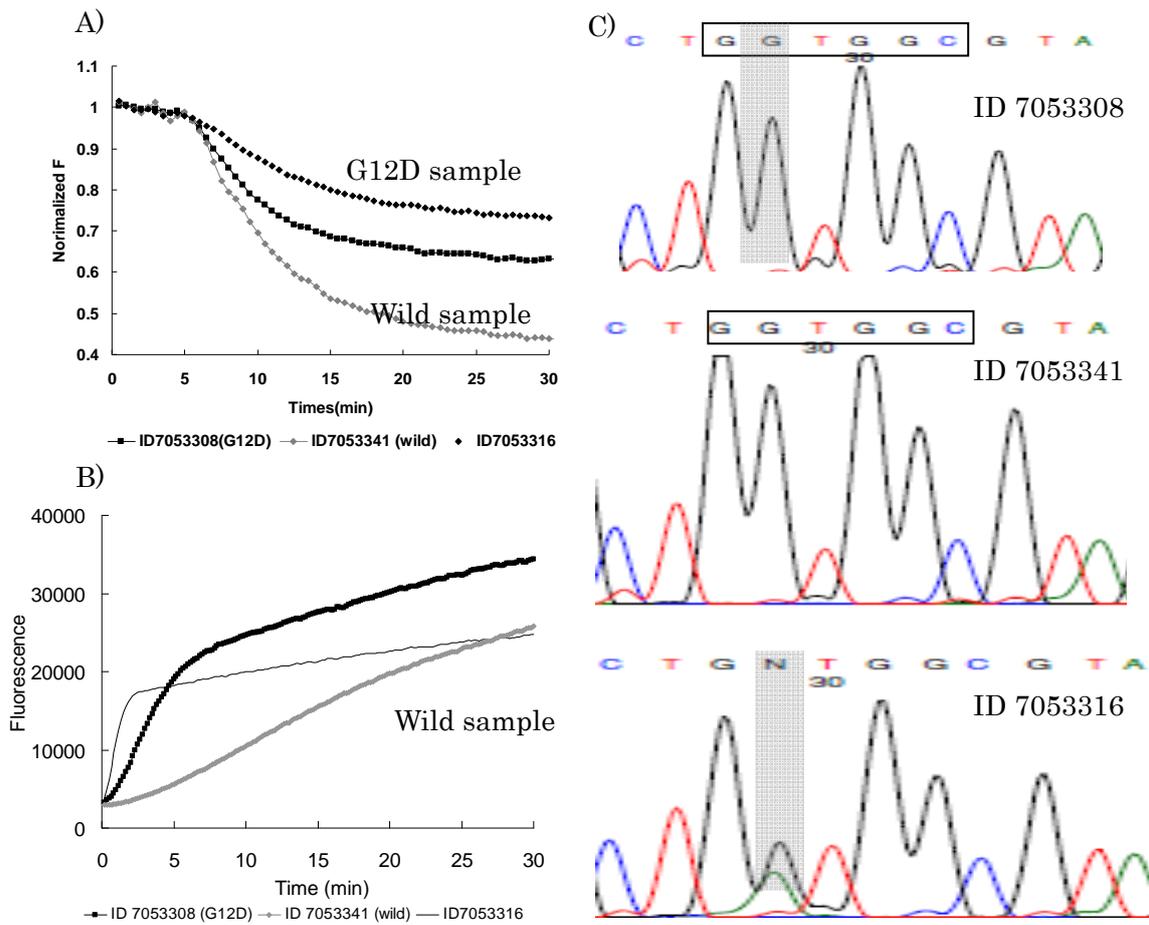


図 3-6 三種の方法の検出性の比較

A)FRET-PHFA, B)IvaderPlus, C)DS の典型的なデータを例示する。DS の波形は、線で囲った箇所が *KRAS* 遺伝子のコドン 12、13 の箇所である。ID7053316 は、3 つの方法すべてで G12D、ID7053341 は、すべて野生型と判定された試料である。ID7053308 は、DSは野生型、FRET-PHFAと IvaderPlus は G12D 陽性と判定した。

### 3.4 考察

今回、FRET-PHFAにより、65検体の大腸がん試料中の *KRAS* 遺伝子変異をダイレクトシーケンスよりも多く検出した。FRET-PHFA、InvaderPlus の ID7053308 と ID7053341 の挙動は変異の割合に依存して変化しているため、ID7053308 に含まれる変異の量は ID7053341 よりも少ないことが予測できる。すなわち、ダイレクトシーケンスでは変異の量が少なかったために感度が足りず、検出できなかったと考えられる(図 3-6)。FRET-PHFA がダイレクトシーケンスよりも高感度であることを臨床試料から示すことができた。

今回、形態の異なる臨床試料、一つは凍結組織、もう一つは FFPE 組織試料を使って、FRET-PHFA がダイレクトシーケンスと同等の頑健性、インバーダープラスと同等の検出感度を有していることを証明した(図 3-5)。

FFPE 試料の DNA 断片化による PCR 効率の劇的な阻害に関しては、三種の方法で顕著な差は、観察されなかったが、FRET-PHFA では、非常に短い増幅産物サイズ(~60bp)の設計で PCR を行うことができるために、仮に FFPE 試料の DNA ダメージが大きくても、そこから標的配列を増幅し、変異を検出することができると期待される。

今回の報告では、FRET-PHFA の比較できるノンシーケンシングな手法として InvaderPlus アッセイを用いた。株化がん細胞の予備実験では、InvaderPlus により 2.5%の微量な変異まで検出できることを証明した。既に我々は、インバーダープラスでも体細胞変異が検出できることを証明している[6]。インバーダー反応は、PCR の後に、変異識別工程(インバーダー反応)を設けており、またそのインバーダー反応時に蛍光を増幅させるため、検出感度は良く、PCR35 サイクルでも 2.5%程度の体細胞変異を検出できる。一方、FRET-PHFA では、変異識別工程で酵素を用いないため、増幅産物量に依存しやすいが、PCR サイクル数を 50 サイクルとして、鋳型量のばらつきをキャンセルできる。また、株化がん細胞 DNA 試験で定めたカットオフ値が実際の臨床検体を用いた試験でも機能することが分かった。臨床検体は様々な形態、コンディションが予想され、試料の状態に依存しない頑健性は重要である。今回の臨床試験から、異なる臨床検体、異なる抽出法において FRET-PHFA は体細胞変異を検出することが可能であった。

*KRAS*などの体細胞変異を検出する方法に必要な要素として、技術的側面以外では、検査員の労働時間、コストが重要視されている[7]。FRET-PHFAの測定に要する時間は1.5時間、コストは、変異識別工程は非酵素反応で進行させ、プローブ量も非常に少なく(通常プライマー濃度の1/100～1/20)、低コストで実施できる。

### 3.5 参考文献

1. Kitano, S., et al., *Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay*. Anal. Biochem., 2011. **408**(2): p. 197-205. .
2. Kotoula, V., et al., *Targeted KRAS mutation assessment on patient tumor histologic material in real time diagnostics*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7746.
3. Kwiatkowski, R.W., et al., *Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay*. Mol Diagn, 1999. **4**(4): p. 353-64.
4. Lyamichev, V., et al., *Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(3): p. 292-6.
5. Kitano, S., et al., *Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay*. Anal Bio Chem, 2011. **408**(2): p. 197-205.
6. Kitano, S., et al., *A novel fully automated molecular diagnostic system (AMDS) for colorectal cancer mutation detection*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e62989.
7. Whitehall, V., et al., *A multicenter blinded study to evaluate KRAS mutation testing methodologies in the clinical setting*. J. Mol. Diagn., 2009. **11**(6): p. 543-52.

## 第4章 FRET-PHFA法の超高速化

### 4.1 緒言

FRET-PHFAは緩やかな温度勾配中において2本鎖蛍光標識DNAと試料2本鎖DNAとの競合的鎖置換反応を利用する変異検出方法である[1]。本手法で用いる2本鎖蛍光標識DNAは検出する2本鎖試料DNAと全く同じ配列、同じ長さに設計することで一塩基の違いを高感度に検出できる特徴を持っている[1]。一般的にPHFAでは精度の高いハイブリダイゼーションを行うために緩やかな温度勾配中(0.1 °C/min- 0.3°C/ min)で反応を行うことが重要とされており[1-3]、DNAの変性温度から急激に温度を降下させると2本鎖標識DNAの一塩基識別能が著しく低下することが分かっている。つまりPHFAは非酵素反応による単純で簡便な競合的ハイブリダイゼーションアッセイである反面、熱力学的平衡反応の範疇を逸脱することはできず、極端な温度変化では識別性を保持することができない(不安定なハイブリッドを形成する)。そのような不安定なハイブリッド形成は緩やかな温度勾配においても10-20%程度起こっているが、その中で体細胞変異を最大0.5%まで検出できる系を我々は構築している。筆者らは1 °C/minの温度降下速度にてKRAS遺伝子変異を検出可能であることを報告しているが、反応には厳密な温度制御が必要である。

丸山らが人工核酸シャペロンとして設計したCCC、PLL-g-Dex、核酸シャペロンの役割は、第1章にて前述したように核酸塩基対の解離・再形成を促すことで、準安定なミスハイブリッドから熱力学的にもっとも安定な状態に落とし込むことである。従って、シャペロン活性は二重鎖核酸とその相補的単鎖間の核酸鎖交換反応に対する共重合体の加速効果を指標に評価することができる。PLL-g-Dexは、この核酸鎖交換反応を一万倍以上加速し、同一条件下では天然の核酸シャペロンを凌ぐ活性を持つことが見いだされている[4, 5]。そこで我々はFRET-PHFAのさらなる向上を目指し、超高速で温度を降下させた場合に、カチオン性くし型共重合体(PLL-g-Dex)により標識DNAと試料DNAの間に起こる不安定なハイブリッド形成を制御しつつ遺伝子変異を検出できるかについて検討を行った。

## 4.2 材料と方法

### 試料

FRET-PHFA に用いた試料は、合成オリゴと PCR 産物を用いた。合成オリゴは、日本バイオサービスから購入した。*KRAS* 遺伝子に関しては、野生型の株化がん細胞として MCF-7、G12S の株化がん細胞として A549 を用いた。それぞれの濃度調製に関しては、既報[6]に準じた。*ALDH2* に関しては、Cycleave® Human *ALDH2* Typing Probe/Primer Set Ver. 2 キットに同梱されているコントロール DNA (allele 1 と 2) を用いた。

### プライマーと標識 DNA

*KRAS* 遺伝子変異検出には、既報[6]と同様のプライマーと標識 DNA (G12S) を用いた。標識 DNA は、一方の DNA の両末端を FAM、もう一方の相補鎖である DNA の両末端を DABCYL で修飾したものをを用いた。*ALDH2* 遺伝子増幅用のフォワードプライマーは、5' -AAGAGTTGGGCGAGTACGGG-3'、リバープライマーは、5' -AAAGTCCCACACTCACAG-TTTTC-3' を設計し、ファスマック社の合成品を購入した。実験に用いた合成オリゴ及び標識 DNA を表 4-1 に示す。それぞれの標識 DNA の濃度は、ND-1000 (ThermoScientific 社) を用いて測定した。

### カチオン性くし型共重合体 (PLL-*g*-DEX)

用いた PLL-*g*-Dex 既報[4, 5, 7]に準じて合成したカチオンポリマー (CP) ① : Mw=2,000 ポリリジンに 88wt%のデキストランが付加、CP② : Mw=5,000 ポリリジンに 88wt%のデキストランが付加、CP③ : Mw=15,000 ポリリジンに 88wt%のデキストランが付加、CP④ : Mw=2,000 グアニジノ化ポリリジンに 88wt%のデキストランが付加、CP⑤ : Mw=15,000 グアニジノ化ポリリジンに 88wt%のデキストランが付加)の 5 種類である。合成品に関しては、既報[4, 5, 7]に準じ、<sup>1</sup>H-NMR にて合成物を確認した。

## PCR

*KRAS* 遺伝子変異検出に関しては、PCR の条件は、既報[6]に準じて I-Cycler(バイオラッド社)により実行した。PCR サイクル数は 50 サイクルとした。*ALDH2* の PCR 条件は、94 °C、2 分間にて前変性後、94 °C、5 秒間の変性工程、57 °C、10 秒間のアニーリング工程、72 °C、20 秒間の伸張工程を 1 サイクルとし、合計 40 サイクル行った。

## FRET-PHFA

*KRAS* 遺伝子変異検出に関しては、既報[6]と同様の反応組成に、所定の濃度のカチオン性くし型共重合体を N/ P 比[4, 5, 7]が 8-10 となるように 2  $\mu$ l 添加し、最終反応容量は 20  $\mu$ l とした。N/ P 比に関しては、PCR 産物を用いた実験では、正確な合計の試料 DNA 量が不明なため、おおよその N/ P 比とした。*ALDH2* の実験では、CP③のみを用いた。試料に合成オリゴを用いた時は、標識 DNA に対して 10 倍量のアンチセンスとセンスのオリゴ DNA をそれぞれ 1  $\mu$ l ずつ反応系に添加し、D.W. にて 20  $\mu$ l にメスアップした。また、*KRAS*、*ALDH2* の PCR にて調製した増幅産物は、12.2  $\mu$ l 反応に用いた。カチオン性くし型共重合体を添加しない場合は、代わりに D.W. を加えた。また、試料 DNA なしの反応では、増幅産物の代わりに、既報[6]と同様に 1  $\times$  PCR 緩衝液(タカラバイオ社)を増幅産物と同量加えた。蛍光測定と温度制御は、ABI7900 (アプライドバイオシステムズ社)を用いた。測定条件は、35 °C で 15 分間保持し、その後、95 °C、30 秒間で保持後、85 °C までを降下速度 1 °C/min で実行し、85 °C から 35 °C まで 0.25 °C/min の速度で温度を下げ、35 °C で 30 秒間保持 (condition 1) し、次に、96 °C/min の昇温速度にて 95 °C に到達後、30 秒間保持し、85 °C までを 96 °C/min の速度で温度を降下させ、その後、1 °C/min の速度にて 35 °C まで降下させた後、30 秒間保持 (condition 2) し、96 °C/min の昇温速度にて 95 °C に到達後、30 秒間保持し、35 °C までを 96 °C/min の速度で温度を降下させ、30 秒間あるいは 15 分間保持 (condition 3) し、蛍光を連続的に追跡した。

## **ΔFRET**

FRET-PHFA の評価を以下の式 1、2 により、標識 DNA が元の 2 本鎖を形成する割合を求めた。標識 DNA の ΔFRET の値が 0 に近似する場合は標識 DNA と試料の配列は同一であることを示す。ΔFRET の値が 100% に近似する場合はミスマッチであることを示す。FRET-PHFA では ΔFRET は変異の割合依存的に変化する。

$$\Delta F = \text{FAM [95 } ^\circ\text{C or 90 } ^\circ\text{C]} - \text{FAM[60 } ^\circ\text{C or 35 } ^\circ\text{C]} \dots [1]$$

$$\Delta \text{FRET} = \Delta F(\text{試料}) / \Delta F(\text{標識 DNA のみ}) \times 100 \dots [2]$$

## **融解曲線解析**

*KRAS* 遺伝子変異 G12S を検出する標識 DNA を用いて、カチオン性くし型共重合体の有無による融解曲線解析を行った。ABI7900 (アプライドバイオ社) にて、95 °C、30 秒間保持した後、0.25 °C/min の速度で 35 °C まで温度を降下させ、 $-(\Delta dF / \Delta dt)$  を算出し、 $T_m$  値を推測した。

表 4-1 本実験に用いた合成オリゴと標識 DNA

---

合成オリゴ

*KRAS-wild (sense)* :

5' -TATAAACTTGTGGTAGTTGGATAT GGTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-3'

*KRAS-wild (anti-sense)* :

5' -TATCGTCAAGGCACTCTTATCTAC GCCACC AGCTCCAACCTACCACAAGTTTATA-3'

*KRAS-G12S (sense)* :

5' -TATAAACTTGTGGTAGTTGGATAT aGTGGC GTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATA-3'

*KRAS-G12S (anti-sense)* :

5' -TATCGTCAAGGCACTCTTATCTAC GCCACT AGCTCCAACCTACCACAAGTTTATA-3'

標識 DNA

*ALDH2(allele A)-FAM* :

5' (6-FAM)-AAGAGTTGGGCGAGTACGGGCTGCAGGCATACACTaAAGTGAAAACCTG  
TGAGTGTGGGACCTTT-3'

*ALDH2(allele A)- DABCYL* :

5' -AAAGGTCCCACACTCACAGTTTTCACTTtAGTGTATGCCTGCAGCCCGTACTCGC  
CCAACTCTT-(DABCYL)3'

*ALDH2(allele G)-FAM* :

5' (Alexa594)-AAGAGTTGGGCGAGTACGGGCTGCAGGCATACACTgAAGTGAAAACCTG  
TGAGTGTGGGACCTTT-3'

*ALDH2(allele G)- Ale594* :

5' -AAAGGTCCCACACTCACAGTTTTCACTTcAGTGTATGCCTGCAGCCCGTACTCGC  
CCAACTCTT-(DABCYL)3'

---

下線部は *KRAS* コドン 12、13 を示し、小文字は、変異箇所あるいは SNP の箇所を示す。

### 4.3 結果

#### 合成オリゴを用いた実験

試料として *KRAS* 遺伝子の配列の二本鎖のオリゴを用いた各種測定条件による蛍光挙動を図 4-1 に示す。標識 DNA と試料 DNA の配列が全く同じ場合(マッチ)、カチオンポリマーの添加の有無、あるいはその種類に関係なく、急激な温度変化においても鎖置換による強い蛍光が観察された(図 4-1A)。しかし、標識 DNA と試料 DNA の配列に 1 塩基の違いがある場合(ミスマッチ)、96 °C/min で急激に降温したとき、カチオンポリマーの種類によって異なる蛍光変化が観察された(図 4-1B 赤点線枠)。図 4-2 に図 4-1 赤点線枠を拡大した図を示す。カチオンポリマー未添加の系では標識 DNA と試料 DNA がミスマッチの場合でも蛍光が変化しておらず(表 4-2、 $\Delta F= 0.08$ )、偽陽性の挙動を示した。

しかし、カチオンポリマー 2、3、5 をそれぞれ添加した系においては急激に温度を降下させても偽陽性が減少し、その結果、標識 DNA は元の 2 本鎖を優先的に再形成することで蛍光が大きく変化している(図 4-1B、4-2、表 4-2)。

一方で、カチオンポリマー5 のグアニジノ化されているポリマーはグアニジノ化されていないカチオンポリマー3 と比較すると大きく  $\lambda_{\text{em}}$  値を低下させている現象も観察された。また分子量が 2,000 のものは未添加と比較して大きな変化は観察されず、分子量が 15,000 のカチオンポリマーが最も急速な温度変化中で標識 DNA の識別性を保持する ( $\Delta F= 0.54$ ) 効果があった(表 4-2)。

#### *KRAS* 遺伝子変異の迅速検出

試料として PCR により調製した増幅産物を用いて検討を行った結果を図 4-4 に示す。PCR 産物を試料とした場合においてもカチオンポリマーを添加した反応系では急速な温度降下中でもミスマッチの識別性を保持していることが観察された。カチオンポリマー未添加の系では急激な温度降下により誤って鎖置換が起こる割合が非常に多い(図 4-3A の青矢印)。

しかしながら、カチオンポリマーを添加した反応系では、高速な温度降下においてもマッチ、ミスマッチが識別可能となっている(図 4-3A の赤矢印)。

#### 標識 DNA の融解曲線解析

カチオンポリマー有無における標識 DNA の  $T_m$  値の変化を図 4-4 に示す。グアニジノ化した PLL-*g*-Dex 以外、カチオンポリマー未添加と添加した系では、分子量によらず、 $T_m$  値に差が出なかった。分光光度計を用いても融解曲線解析を行ったが、同様の結果を得た(データ未記載)。

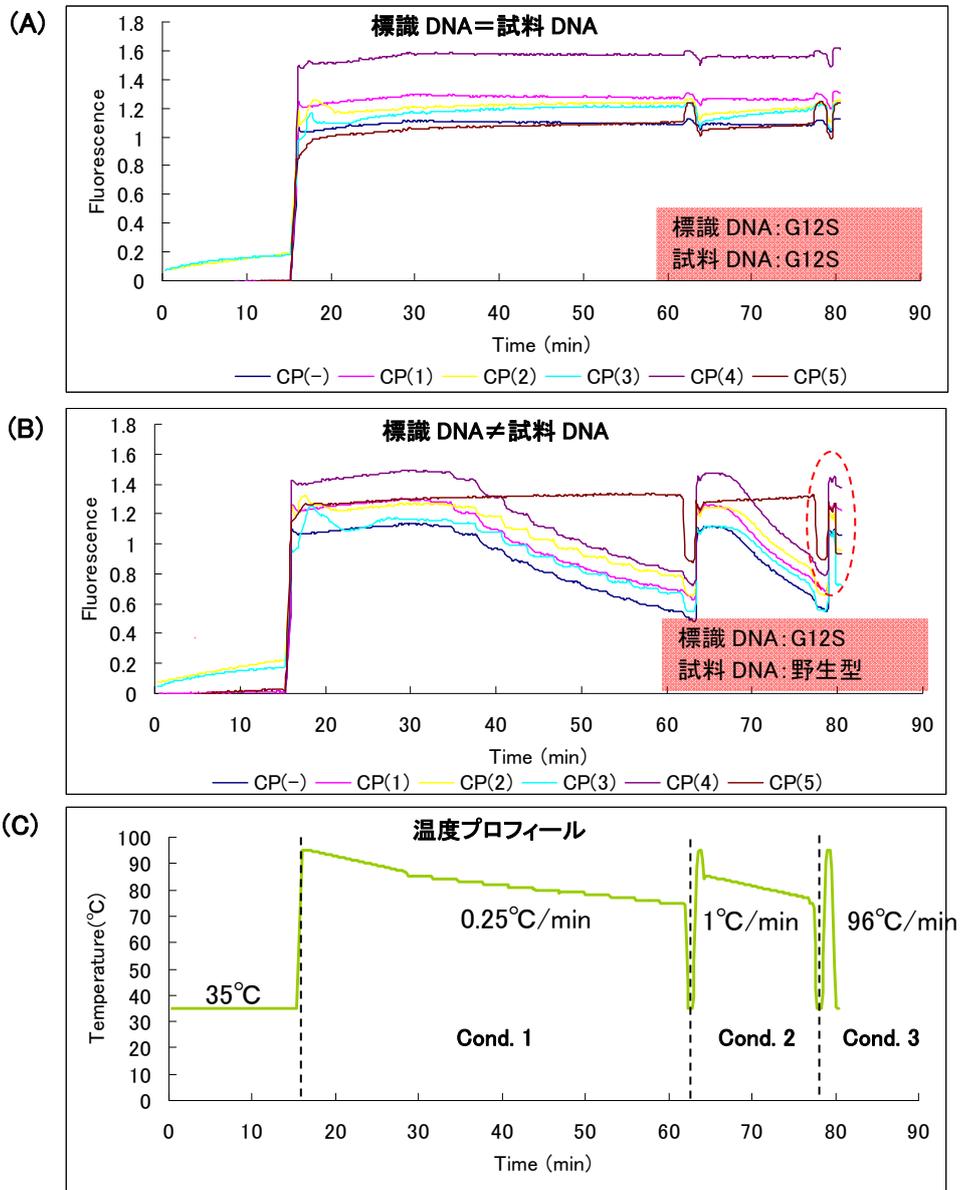


図 4-1 カチオンポリマーが標識 DNA の識別性に与える影響

(A) の図は試料 DNA と標識 DNA の配列が完全に一致する場合の蛍光挙動を示す。標識核酸は過剰に存在するターゲットオリゴに希釈され、鎖組換え反応が起こり、FRET は観察されない。

(B) の図はターゲットオリゴと標識核酸の配列が一塩基異なる場合の蛍光挙動を示す。この場合は標識 DNA と試料 DNA との間で鎖組換え反応は起きず、標識 DNA は優先的に元の 2 本鎖を形成し、FRET が起こる(この場合は FAM の蛍光エネルギーが DABCYL に吸収される)。

(C) の図は ABI7900 の温度プロフィールを示す。35°C で 15 分間保持し、その後、95°C から 35°C までの温度域に関して降温速度条件を変えて蛍光を連続的に測定した。

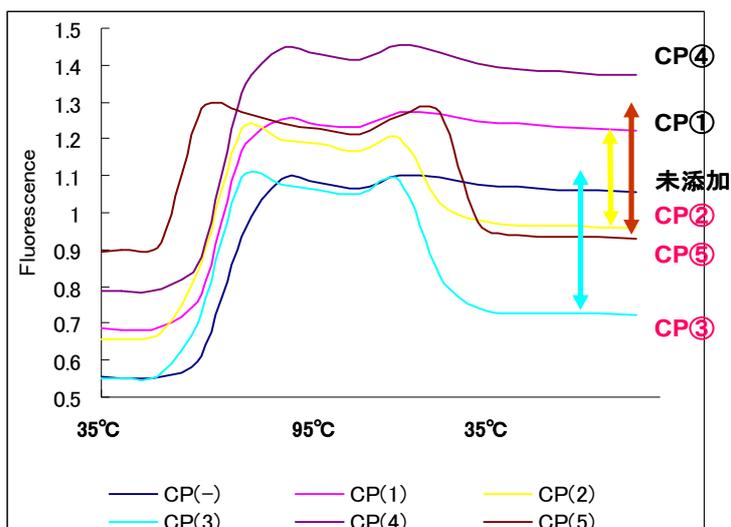


図 4-2 急激な温度降下中における標識 DNA の識別性 (ミスマッチ) に与えるカチオンポリマーの影響

図 2B のデータの 78.5min 以降のデータ(赤枠で囲った部分)を拡大した図である。図中の矢印は変性温度から急激に温度を降下させたときの蛍光変化量を示す。すなわち、標識 DNA と試料の配列はミスマッチであるため、鎖置換は起こらず、標識 DNA は元の 2 本鎖を形成し、FRET が起きていることが分かる。

表 4-2 カチオンポリマーの分子量と温度変化による識別性の関係

	-CCC	PLL-g-Dex			GPLL-g-Dex	
		2K	5K	15K	2K	15K
condition1	$\Delta 0.53$	$\Delta 0.64$	$\Delta 0.60$	$\Delta 0.63$	$\Delta 0.59$	$\Delta 0.60$
condition2	$\Delta 0.50$	$\Delta 0.63$	$\Delta 0.63$	$\Delta 0.62$	$\Delta 0.54$	$\Delta 0.57$
condition3	$\Delta 0.08$	$\Delta 0.10$	$\Delta 0.30$	$\Delta 0.50$	$\Delta 0.12$	$\Delta 0.54$

表中の数値は、 $\Delta F = \text{FAM}[95^\circ\text{C}] - \text{FAM}[35^\circ\text{C}]$  を示し、condition は方法の節に記載した温度条件である。Condition1、2 は緩やかな温度勾配中の蛍光挙動変化であり、-CCC における値が、FRET-PHFA 本来の蛍光変化である。FRET-PHFA では、マッチでは、 $\Delta F$  は 0 に近づき、ミスマッチの場合は、 $\Delta F$  の値は大きくなる。

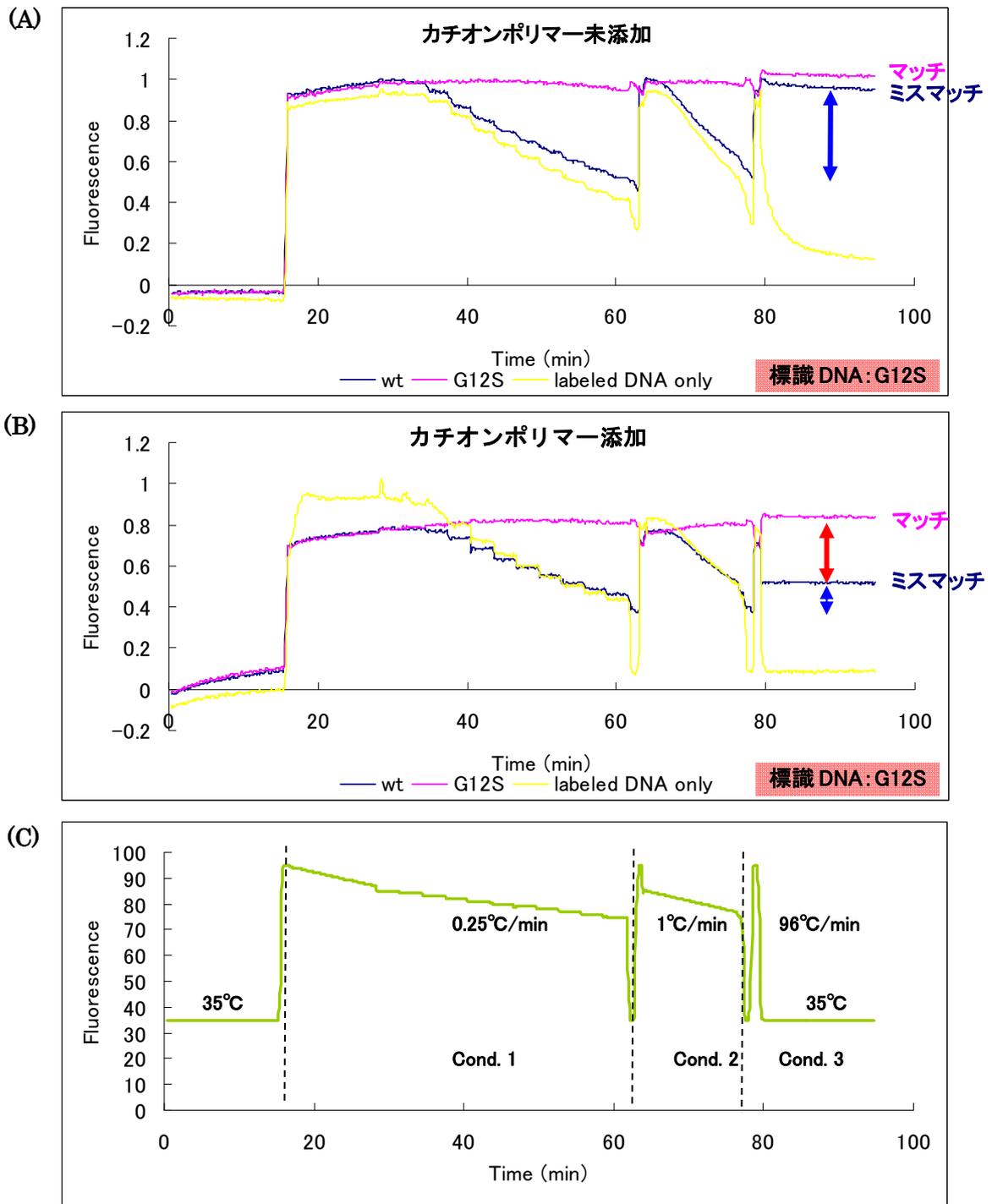


図 4-3 カチオンポリマーが FRET-PHFA に与える影響

(A) の図はカチオンポリマー未添加の場合、(B) の図はカチオンポリマーを添加した場合の蛍光挙動を示す。(C) の図は ABI7900 の温度プロフィールを示す。35°C で 15 分間保持し、その後、95°C から 35°C までの温度域に関して降温速度を変えた条件を連続的に測定した。

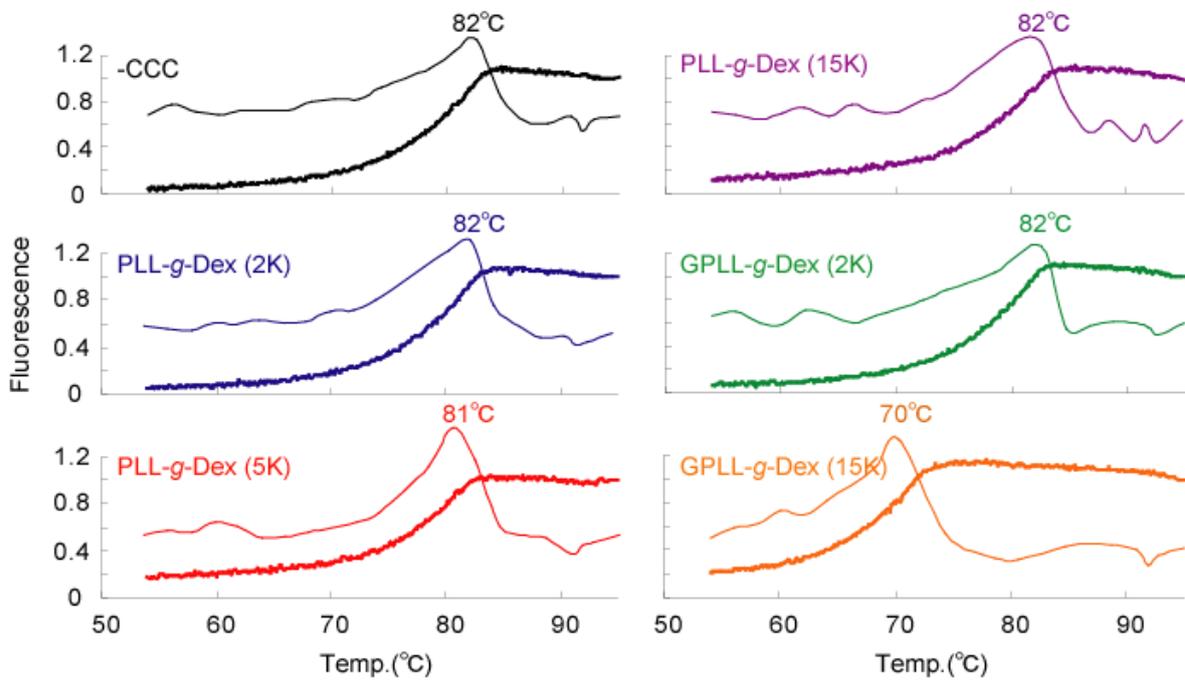


図 4-4 分子量の異なるカチオンポリマー(N/ P= 8)が標識 DNA(54 bp)の  $T_m$  値に与える影響

## ALDH2 の SNP 高速検出

ALDH2 の SNP の検出では、ALDH2 の A アリルを検出する標識 DNA は FAM で修飾されており、G アリルを検出する標識 DNA は Alexa594 で修飾されている。また、それぞれの標識 DNA の相補鎖の 3' 末端は DABCYL で修飾されているものを用いた。この場合の FRET-PHFA の原理図について、図 4-5 に示す。これまで報告した FRET-PHFA は、単色であったが、2 色にすることにより SNP などは、1 ウェルで判定が可能となる。

緩やかな降温速度 (1 °C/ min) で FRET-PHFA による ALDH2 のタイピングを行った場合の蛍光挙動の結果を図 4-6A 及び B に示す。カチオンポリマー添加系では、各標識 DNA と試料 DNA がミスマッチだった場合の蛍光変化がカチオンポリマー未添加の反応系よりも大きく、よりネガティブコントロールに近い挙動を示した。つまり優先的に標識 DNA が元の 2 本鎖を形成する割合、すなわちミスマッチの識別性がカチオンポリマーを添加することにより改善されたことになる。さらにその蛍光挙動から  $\Delta$ FRET により数値化したものを図 4-7 の C, D に示す。カチオンポリマーを添加した反応系ではミスマッチの場合の  $\Delta$ FRET がカチオンポリマー未添加系の場合よりも大きくなり、マッチの場合はより  $\Delta$ FRET の値が小さくなった(図 4-6 中の表 C、D)。

さらに、同様の反応系にて急激な温度変化中(緩やかな温度条件の約 150 倍の降温速度)での鎖置換反応において KRAS 遺伝子と同様に ALDH2 の SNP の検出においてもカチオンポリマーの識別改善効果が確認できるか検討を行った(図 4-7)。カチオンポリマー未添加の反応系ではマッチ、ミスマッチの  $\Delta$ FRET の差がほとんどなく、特に標識 DNA の SNP が A アリルの場合に、試料 DNA の SNP が G アリルだった場合は著しく識別性を損ない、マッチ、ミスマッチの区別がついていない(図 4-7A の青色棒グラフ)。ところが、カチオンポリマーを添加した反応系(図 4-7B)では、A アリルの標識 DNA と G アリルの試料 DNA の PHFA において、標識 DNA が元の 2 本鎖を形成する割合が増加した。また G アリルの標識 DNA の場合は、A アリルの試料 DNA の識別性を 2 倍向上させた( $\Delta$ FRET の値が 40 %から 80 %に増大)。

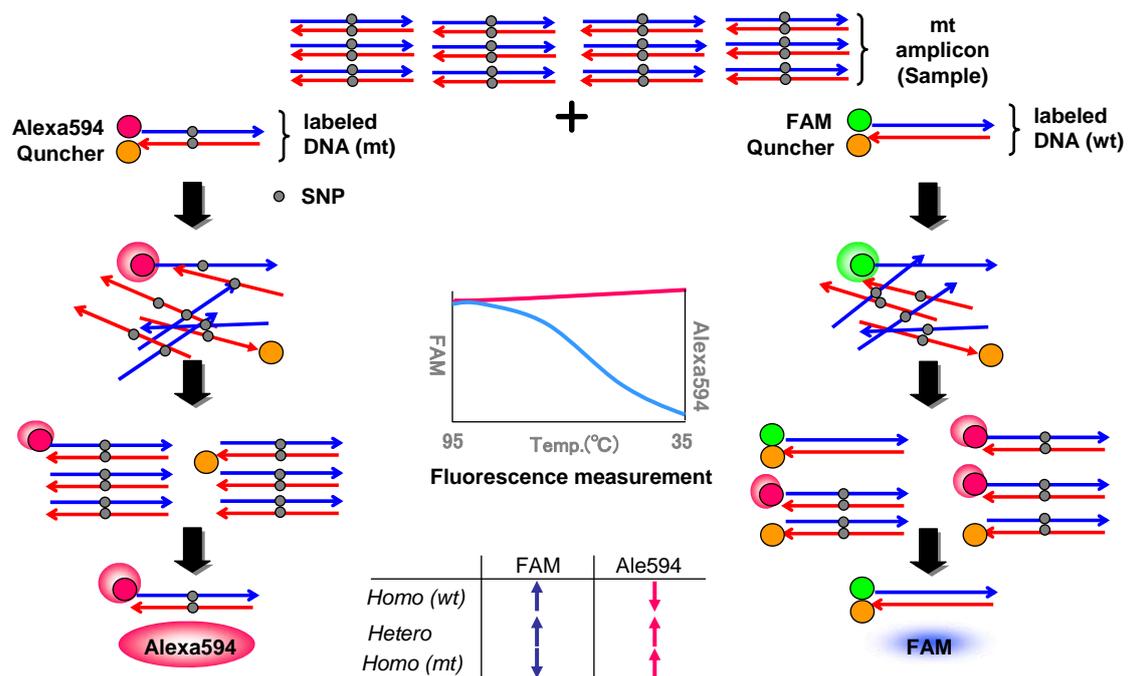
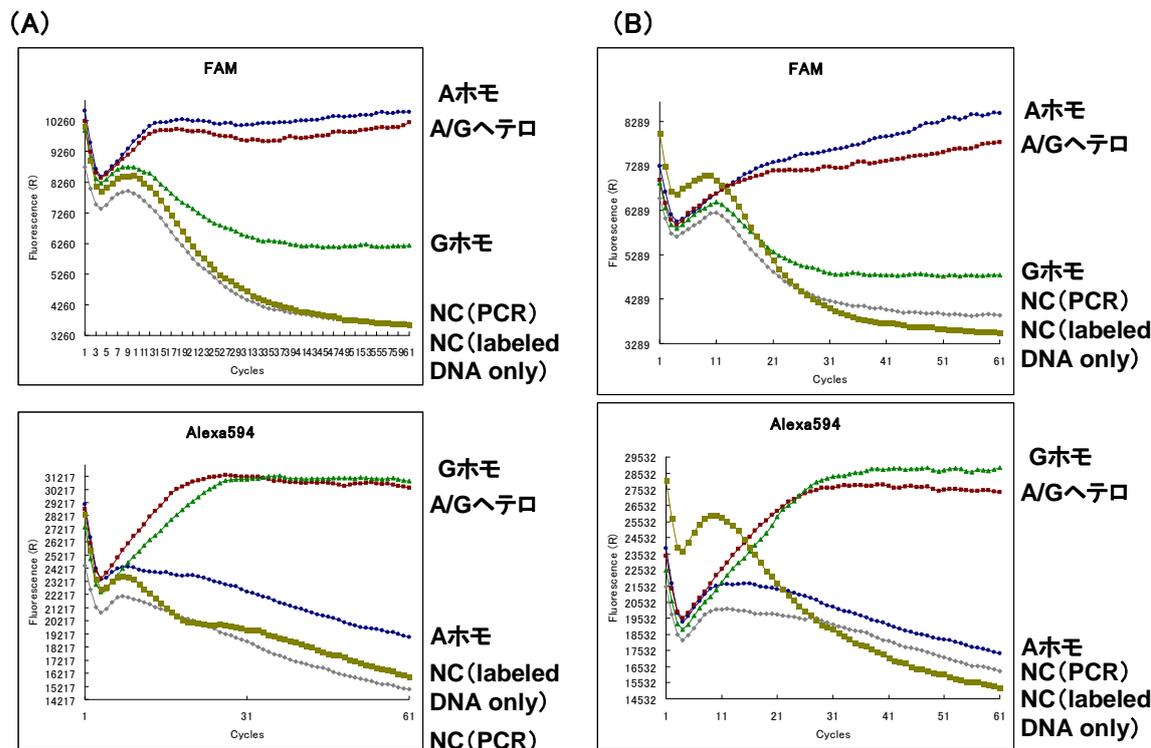


図 4-5 FRET-PHFA による SNP 検出 (2 色)

Amplicon は PCR による増幅産物を意味する。DNA 変性後、温度を降下させた後の測定終点時に FAM 及び Alexa594 の蛍光変化がなければ(蛍光が光り続けている場合)、アリルがヘテロであることを表し、FAM あるいは Alexa594 のどちらか一つの蛍光が存在する場合は、どちらかのアリルがホモで存在することになる。



(C)

	$\Delta$ FRET(%)	
	FAM	Alexa594
Aホモ	-56.3	74.9
A/G	-48.4	-119.4
Gホモ	54.6	-145.6

(D)

	$\Delta$ FRET(%)	
	FAM	Alexa594
Aホモ	-138.1	104.3417
A/G	-105.3	-415.397
Gホモ	58.8	-532.121

図 4-6 蛍光 PHFA 法による *ALDH2* の検出におけるカチオンプライマーの影響

図の横軸は温度を示し、30 秒に 1 回の走査を 1 サイクルとし、1 サイクルにつき 0.5°C ずつ降温させた。縦軸は蛍光強度を示す (ROX の補正はなし)。

(A) の図はカチオンポリマー未添加の系における蛍光 PHFA の FAM 及び Alexa594 の挙動を示す。(B) の図はカチオンポリマー (CP③) 添加の系における蛍光 PHFA の FAM 及び Alexa594 の挙動を示す。(C)、(D) の表は (A)、(B) の蛍光データを以下の補正式よりそれぞれ算出したものである。

$\Delta F = \text{FAM}[90^\circ\text{C}] - \text{FAM}[\text{end point } 60^\circ\text{C}] \cdots [1]$  FAM の値は ROX で補正している。

$\Delta \text{FRET}(\%) = \Delta F(\text{試料}) / \Delta F(\text{標識核酸のみ}) \times 100 \cdots [2]$

※標識核酸のみとは試料が存在しない時の標識核酸のみの挙動を表す。

※なお、測定は、変性条件から 1 °C/min の降温速度にて標識 2 本鎖核酸と試料 2 本鎖核酸の競合的ハイブリダイゼーションを行った。

※図中の NC (PCR) とは鋳型が D. W. の試料を意味し、NC (labeled DNA only) とは標識核酸のみの反応で 1 × PCR 緩衝液に標識 DNA を溶解させた反応系である。

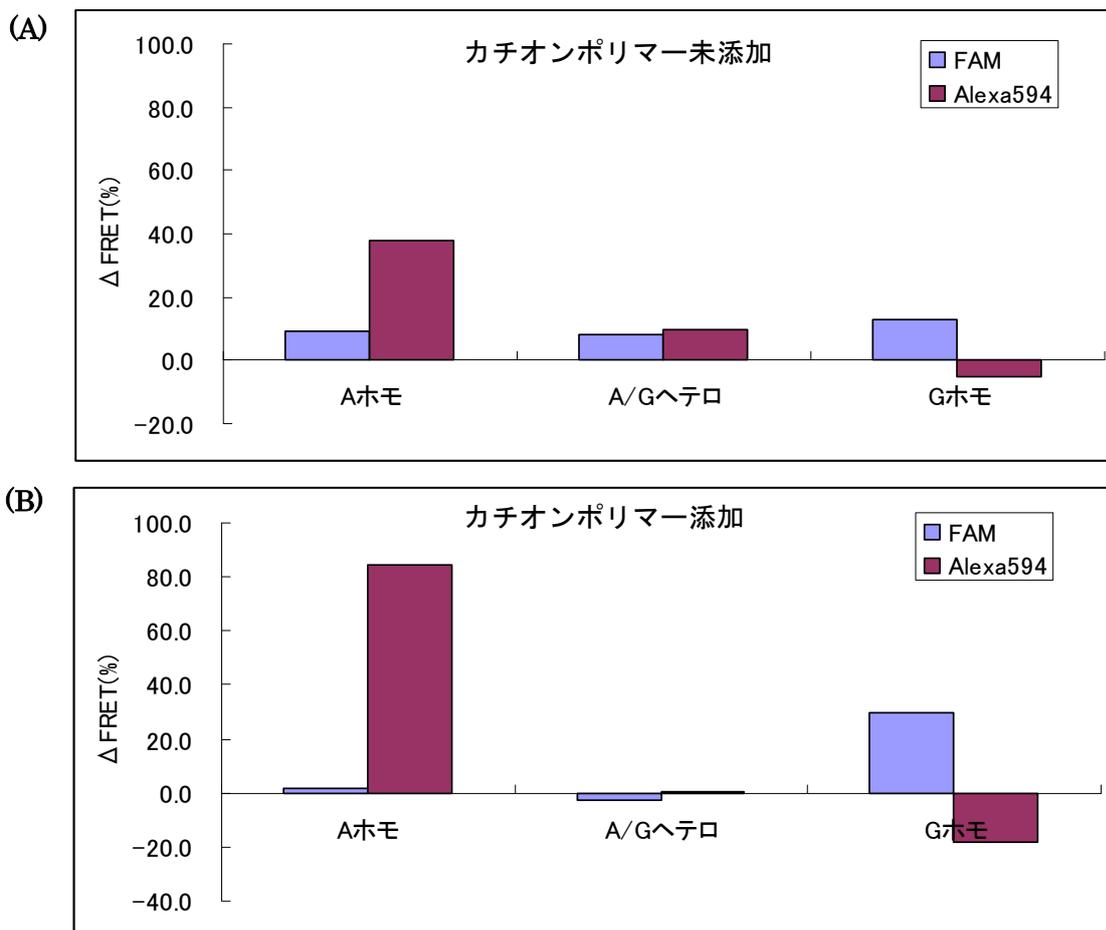


図 4-7 FRET-PHFA における急激な温度変化中での鎖置換反応とカチオンポリマーが標識 DNA の一塩基識別性に与える影響

(A) の図はカチオンポリマー未添加、(B) の図はカチオンポリマー添加した場合における  $\Delta FRET$  を棒グラフによって示した。青色は FAM で修飾された A アリル検出用の標識 DNA の  $\Delta FRET$ 、朱色は Alexa594 修飾でされた G アリル検出用の標識 DNA の  $\Delta FRET$  を示している。  $\Delta FRET$  は以下の補正式 [1、2] により算出している。

$$\Delta F = \text{FAM}[90^\circ\text{C}] - \text{FAM}[60^\circ\text{C}] \cdots \cdots [1]$$

※FAM の値は ROX で補正している。

$$\Delta FRET = \Delta F(\text{試料}) / \Delta F(\text{標識 DNA のみ}) \times 100 \cdots \cdots [2]$$

なお、降温速度は 2.5°C/秒(装置最高速度)で実施した。つまり緩やかな温度条件と比較すると約 150 倍の降温速度である。

$\Delta FRET$  の値が大きい場合、試料と標識 DNA が鎖置換を起こさず、標識 DNA が元の 2 本鎖を形成している割合が多いことを意味している。つまり、試料と標識 DNA はミスマッチであることを表している。一方、 $\Delta FRET$  の値が小さい場合、温度変化に伴い、蛍光が変化しておらず、試料と標識 DNA の間で鎖置換が起きていることを表している。つまり、試料と標識 DNA はマッチであることを表している。実際の判定では各標識 DNA に固有の  $\Delta FRET$  の閾値を設定し、その値により陽性(マッチ)、陰性(ミスマッチ)を判定する。

#### 4.4 考察

FRET-PHFA は、競合ハイブリダイゼーション[8, 9]を利用した酵素非依存的変異識別方法である。本法により、*KRAS* 遺伝子変異検出を高感度に識別することを既に報告している[6]。FRET-PHFA は、再現性が良く、頑健性を確保した臨床性能も有しているが、厳密な温度制御が必要であった。今回の研究により、カチオン性くし型共重合体を用いることにより、非常に乱暴な温度の下げ方をしても、マッチ、ミスマッチの識別性が損なわれないことが確認された。図 4-3、4-7 の結果から 2 本鎖 DNA 同士の鎖置換反応においてもカチオンポリマーによるハイブリッドの形成・促進効果(核酸シャペロン活性)があることが分かった(しかも通常の降温速度の約 100~150 倍速めた条件において)。一方で、カチオンポリマー未添加の系では、急速に温度を降下させると、ミスマッチの識別性が大きく損なわれ、ミスマッチの試料でもマッチかのような偽陽性となってしまった。これは、急速な温度変化により試料と標識 DNA の間で Hetero-Duplex が多く形成されてしまうためだと推測される。カチオンポリマーを添加することにより、正しく二本鎖が形成され、試料と標識 DNA がミスマッチの際に、標識 DNA 同士で元の二本鎖を再形成できている(図 4-8)。さらに、高速化に対応しているカチオンポリマーのバックボーンであるポリリシンの分子量が 5,000 以上からその効果が観察されている(表 4-2)。標識 DNA の長さとの関係があるかもしれないが、詳細は検討中である。*ALDH2* の検出においてもカチオンポリマーと標識 DNA 及び試料 DNA が相互作用を起こし、FRET-PHFA における核酸識別性を改善していると考えられた。また、マッチの蛍光挙動が FAM, Alexa594 で右肩上がりになっている理由は蛍光物質の温度依存性、及び Tris 緩衝液の pH が温度によって変化することで蛍光量が増加しているためだと考えている。

また、図 4-4 の結果から、54 bp の標識 DNA に対し、カチオンポリマーの添加によって  $T_m$  値が変化していない。したがって、FRET-PHFA の高速化において、 $T_m$  値の変化が直接の原因になってはいないと考えられる。Choi らは、20 bp 程度の二本鎖 DNA に対しては、

PLL-*g*-Dex が  $T_m$  値を 10 °C 程度上昇させる報告をしている [7]。今回の結果とは異なることから、対象となる DNA の長さやポリリシンの分子量、濃度と  $T_m$  値への変化がなんらかの関係を有していると考えられる。さらに、グアニジノ化したカチオンポリマーは、標識 DNA の  $T_m$  値を 15 °C 以上下げている (図 4-9)。Choi ら [7] は、グアニジノ化したカチオンポリマーは、確かに  $T_m$  値を下げる効果はあるが、グアニジノ化されていないカチオンポリマーを添加するだけで  $T_m$  値が上昇するため、元の DNA の  $T_m$  値よりも低くなることはないことを報告している。しかしながら、グアニジノ化した PLL-*g*-Dex (分子量 15,000) では、N/P 比 8 の条件において、 $T_m$  値が劇的に元の標識 DNA の  $T_m$  値よりも下げる効果があることを見出した。本知見は、DNA の  $T_m$  値操作の観点において興味もたれるところであり、現在、本現象を厳密化している。

今回、カチオンポリマーを添加することにより、標識 DNA 及び試料 DNA の外的環境が変化し、配列依存的な傾向はあるものの急激な温度変化中 (測定時間数十秒) でも標識 DNA の識別性を向上させることができることを今回示すことができた。

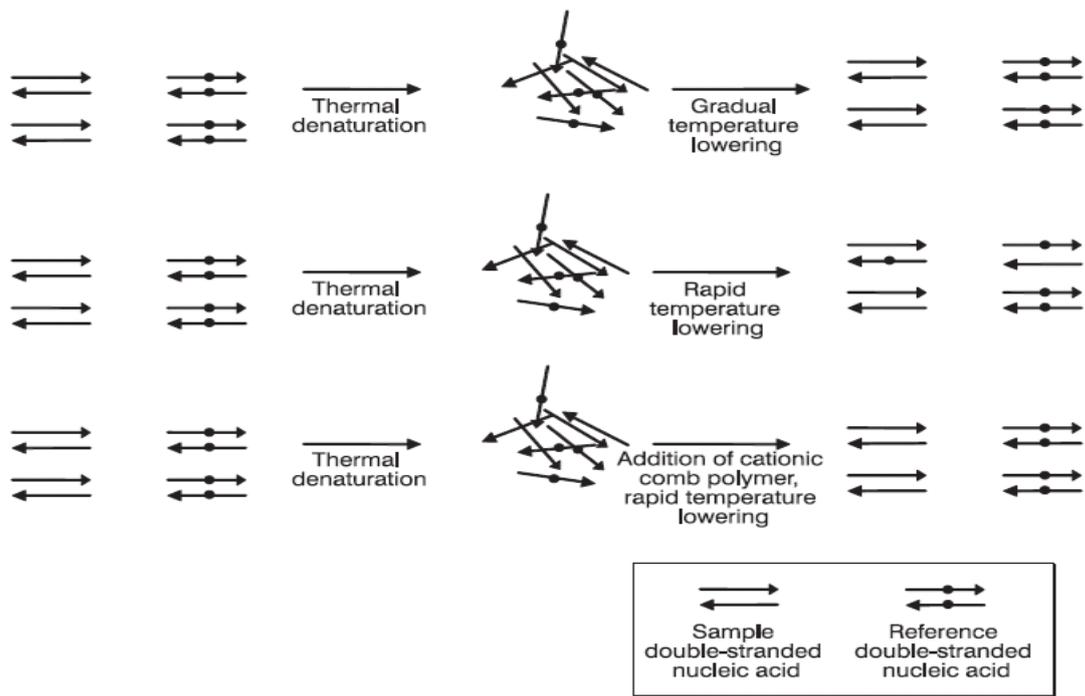


図 4-8 超高速な温度変化における FRET-PHFA に与えるカチオンポリマーの効果

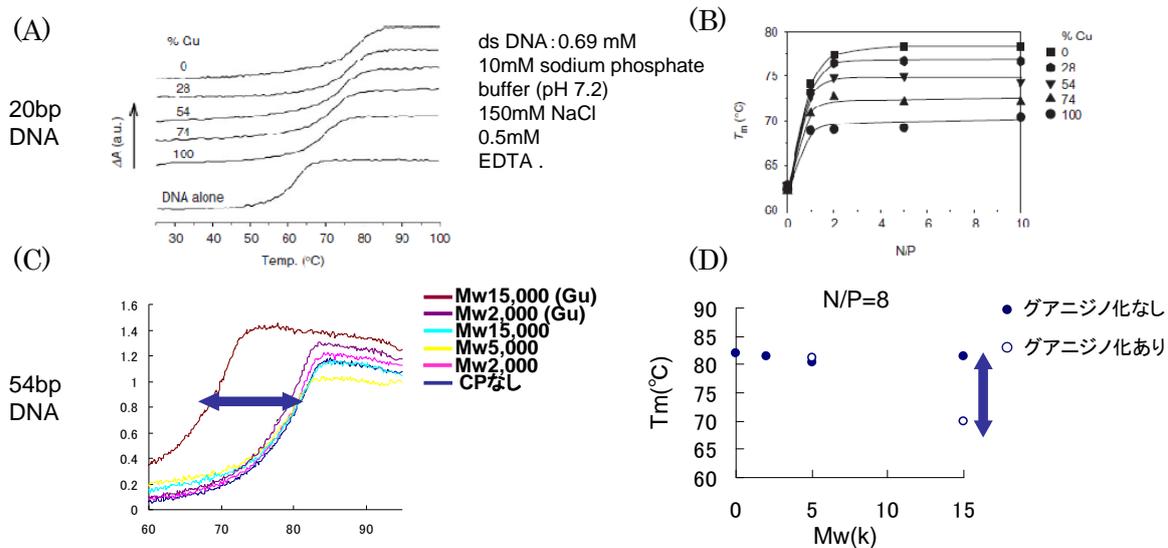


図 4-9 グアニジノ化カチオンポリマーが標識 DNA の  $T_m$  値に与える影響

上段は、Nucleic Acids Research, 2008, Vol. 36, No. 1 からの抜粋データ、(A) 20 bp の DNA の融解曲線、(B) グアニジノ化依存的な  $T_m$  値の変化を示している。下段は、本研究のデータを示す。

#### 4.5 参考文献

1. Kitano, S., et al., *Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay*. Anal Bio Chem, 2011. **408**(2): p. 197-205.
2. Oka, T., *Patent WO98/02574; PCT/JP97/02370*. 1999.
3. Oka, T., et al., *A simple method for detecting single base substitutions and its application to HLA-DPB1 typing*. Nucleic Acids Res., 1994. **22**(9): p. 1541-7.
4. Kim, W.J., T. Akaike, and A. Maruyama, *DNA strand exchange stimulated by spontaneous complex formation with cationic comb-type copolymer*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(43): p. 12676-7.
5. Kim, W.J., et al., *Cationic comb-type copolymers for DNA analysis*. Nat Mater, 2003. **2**(12): p. 815-20.
6. Kitano, S., et al., *Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay*. Anal Biochem, 2011. **408**(2): p. 197-205.
7. Choi, S.W., A. Kano, and A. Maruyama, *Activation of DNA strand exchange by cationic comb-type copolymers: effect of cationic moieties of the copolymers*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(1): p. 342-51.
8. Cardullo, R.A., et al., *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1988. **85**(23): p. 8790-4.
9. Morrison, L.E., *Basic principles of fluorescence and energy transfer*. Methods Mol. Biol., 2008. **429**: p. 3-19.

## 第5章 全自動遺伝子解析システム (AMDS) による大腸がん遺伝子変異検出

### 5.1 緒言

*KRAS*、*BRAF*そして *PIK3CA* 遺伝子変異は、大腸がんを高頻度に認められる変異である。とりわけ、*KRAS* 遺伝子変異は、転移性大腸がんのセツキシマブ、パニツムマブなどの抗 EGFR 抗体薬治療の強力な奏功性予測マーカーである。変異解析方法においては、既存方法は、測定時間が長く、簡単にすべてのがん研究者ならびに病理学者が実行できるものではない。そこで、我々は、FRET-PHFA の全自動化を目指し、インバーダープラス法をモデルとした、その場診断 (Point of care testing) 向けの新規、簡便、高感度、且つ全自動の遺伝子解析システム (Automated Molecular Diagnostic System) の実現可能性検証を行った。本研究では、大腸がん中の *KRAS*、*BRAF* 及び *PIK3CA* 遺伝子変異検出において AMDS とダイレクトシーケンス (DS) を比較した。

解析に用いた DNA は、凍結組織切片 (n=89) と FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) 切片 (n= 70) の合計 159 検体から抽出した DNA を用いた。DS で検出された全ての変異 (凍結組織切片 n=41、FFPE 標本切片 n= 27) は、AMDS で 100%検出した。しかし、8 つの凍結組織切片と 6 つの FFPE 切片は、DS で野生型と判定され、AMDS では変異型と判定した。それらの不一致の試料をクローニング解析を行い、全て組織切片中に変異があることを確認した。ジェノタイピングのコールレートは、DS では、凍結組織切片では 100 % (89/89)、FFPE 切片では 74.3 % (52/70) であったが、AMDS は、どちらの形態の組織切片も 100%であった。また、凍結組織 (n= 41) から、DNA の抽出及び精製を含む全自動解析を行い、全ての変異をわずか 70 分で検出可能であった。

AMDS は、感度や精度の点において DS を上回り、労働時間の多い手動の解析方法よりも簡便に遺伝子変異を検出することができる。AMDS は、変異解析の POCT 装置として期待される。

ヒト *KRAS* がん遺伝子は、大腸がんの 30%以上において変異が生じている。これまでに、

約 3,000 の遺伝子変異が観察されている[1]。最も高頻度に観察される変異は、*KRAS* のコドン 12 (~82%)、13 (17%) に生じる変異であり、それらは、コドン 12 に存在し、大腸がんの増殖に大きく関与する[2, 3]。*BRAF* 遺伝子は、RAS/MAPK 経路におけるセリン/スレオニンキナーゼをコードしており、大腸がん に 4-15% の頻度で遺伝子変異 (V600E) が観察される。*PIK3CA* 遺伝子は、PI3K の触媒ユニットである p110 $\alpha$  をコードしており、大腸がんの 10-30% にその変異が観察される[4-6]。これまでの報告により、*KRAS*、*PIK3CA* あるいは *BRAF* に変異が生じると大腸がんの予後が悪いことが報告されている[7]。また、再発した大腸がん患者において *PIK3CA* に変異が生じていると予後が悪いことも報告されている[8]。

セツキシマブ、パニツムマブは大腸がんにとって非常に効果的な分子標的薬である。しかし、G13D[9]以外の *KRAS* 遺伝子変異が生じた大腸がん患者には奏功しないことが分かっている[10, 11]。しかしながら、*BRAF* と *PIK3CA* に関しては、抗 EGFR 抗体薬の奏功性予測因子として決定的な臨床結果はまだ出ていない[12, 13]。大腸がん患者の治療効果予測における重要な因子である遺伝子変異を迅速、簡便、正確に検出できる技術は臨床現場に求められている。これまで、多くの方法が開発されてきているが、非常に操作が煩雑であったり、試薬コストが高かったり、少ない変異しか検出できなかつたりする課題を抱えている。例えば、DS は、まだ、塩基配列解析としては業界標準であるが、複数の工程があり、全自動解析能が低い。また、測定時間が長い。他の新しい方法、例えば、PCR をベースとした検査方法[14-17]やシーケンシングベースのもの[18, 19]、融解曲線の一種である HRM(高解像度融解曲線解析)[20]などは、どれも DS よりも高感度に変異を検出することができる。しかし、それらは、人の労力がかかり、簡単に医師が実行できるものではない[21]。しばしば、それらの検査方法を行うために検査センターに検体を送ることによる時間の消費により、治療開始が遅れることにもつながる。

そこで、我々は DNA 抽出、PCR、遺伝子変異検出、結果判定を全自動で行うことが出来る遺伝子解析システム (AMDS) を開発した (図 5-1 A: 装置、B: チップ、C: カートリッジ、D:

アッセイ手順)。AMDS は、カートリッジ、分注チップ、DNA チップをセットすれば、DNA 試料をカートリッジに加えるだけで、判定まで全自動で行うことが出来る。AMDS に用いる DNA チップは、マイクロ流路を有し、それらが 23 個のウェルに通じている。さらに、そのウェルには遺伝子変異検出に必要な試薬(インベータープラス)が全て乾燥固定されている。インベータープラスは、FEN(フラップエンドヌクレアーゼ)を利用した遺伝子解析方法であり、様々な遺伝子多型を検出できることが既に報告されている(参考文献)。また、このアッセイは、PCR とインベーター反応[22, 23]をホモジニアスな系にて実行可能であり、PCR 増幅した産物に対して、インベーター反応を行うことにより遺伝子変異を識別する。なお、インベータープラスを用いた体細胞変異検出は本報告が初めてである。今回の報告では、AMDS による *KRAS*、*BRAF* そして *PIK3CA* の体細胞変異検出の実現可能性に関して、下記の点から DS と二重盲比較検証を行った。

#### 1. 感度

DS と AMDS によるタイトレーションスタディを行い、検出感度に関して比較を行った。

#### 2. 信頼性

大腸がん試料を用いたクリニカルスタディを実施し、DS と AMDS の判定結果に関して比較を行った。

#### 3. 頑健性

異なる組織固定形態(凍結、FFPE)、DNA の精製度などに寄らず、ロバスト性を確保した検出が可能か DS と比較した。また、凍結組織標本切片からの全自動解析の実現可能性検証を行った。

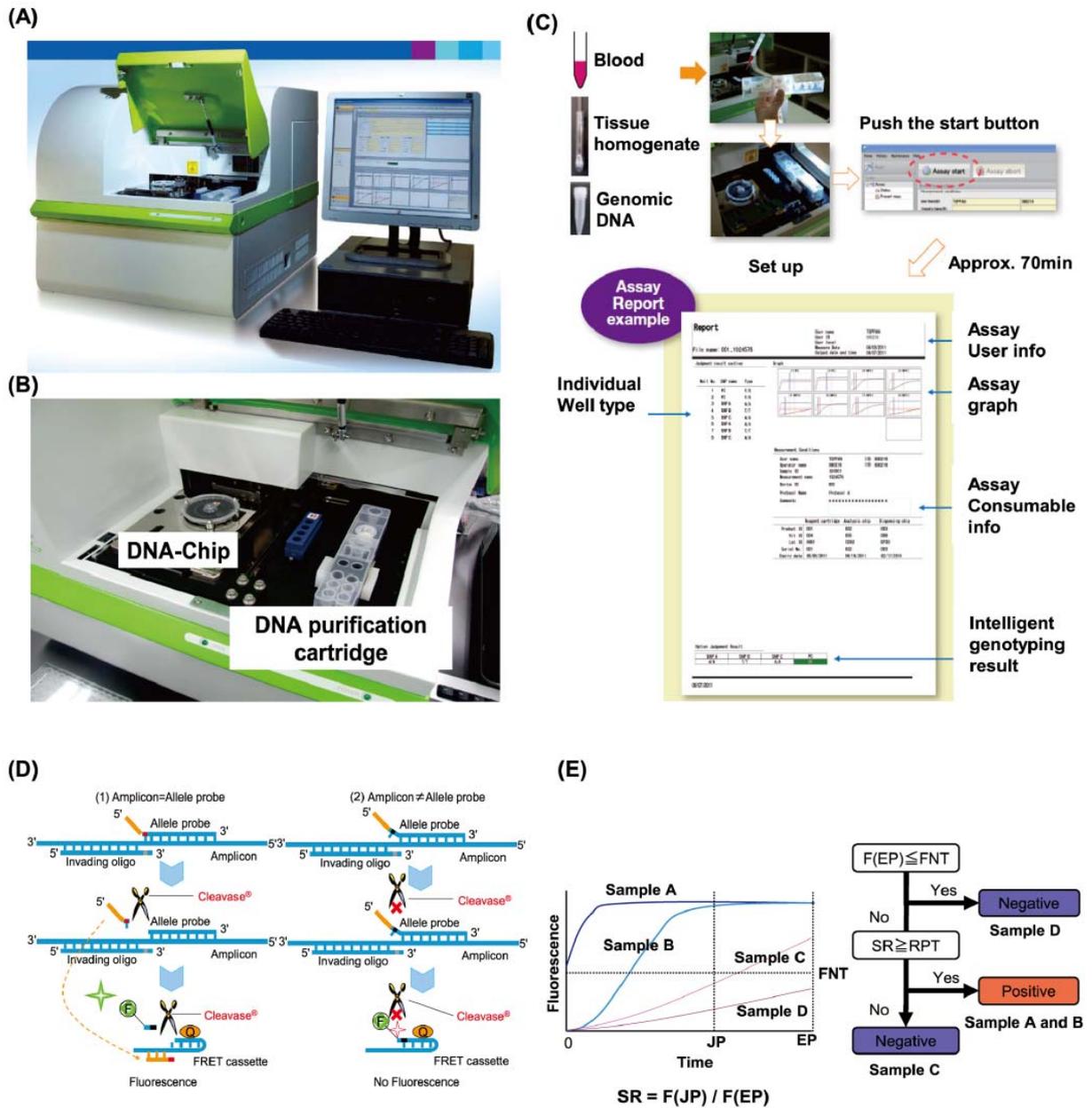


図 5-1 AMDS 詳細 (A)、(B)AMDS (DNA チップ、DNA 精製カートリッジと装置本体) (C)AMDS のアッセイ手順 (D)インバーダーアッセイの原理 (E)判定アルゴリズムの原理 EP : END point time、F(EP) : Fluorescence strength at EP、F(JP) : Fluorescence strength at JP、SR : Signal ratio、RPT: positive ratio threshold

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

## 5.2 材料と方法

### プラスミド

ヒトの大腸がん細胞中に普遍的に存在する *KRAS* エキソン 2 のコドン 12、13 に生じる 7 つのノンシノニマスな点突然変異 (G12A、G12C、G12D、G12R、G12S、G12V、G13D)、*BRAF* のエキソン 15 の V600E のホットスポットのノンシノニマスな点突然変異、*PIK3CA* のエキソン 9 のヘリカルドメインをコードしている E542K、E545K、E545G、及びキナーゼドメインのエキソン 20 の H1047L と H1047R のノンシノニマスな点突然変異を検出対象とした。AMDS を評価するために、それらの野生型、変異型をプラスミド pCR<sup>®</sup>2.1 (インビトロジェン) に工学的にクローンして調製した。なお、合成されたプラスミド DNA は、DS により配列を検証している。これらのプラスミドに挿入した産物長は 300 bp であり、全長 4.2 kb である。これらのプラスミド DNA は TE 緩衝液に溶解後、使用前まで -20°C で保管されたものを用いた。

### 大腸がん試料

本検証に用いた大腸がん (mCRC) 組織、凍結試料 (89 検体)、パラフィン包埋試料 (70 検体) は、シカゴ大学医学部の H $\mu$  Man Resource Center から提供された。全ての検体は大腸、結腸がんと病理学的に診断されており、全て原発巣の組織である。それらの検体はマニユアルマイクロダイセクションされておらず、がん化したと思われる部位を目視で切除し、ミクロトームによりスライス (1.0 cm<sup>2</sup> × 10  $\mu$  M) した試料である。本研究はシカゴ大学の Institutional Review Board (IRB) により承認されているものである。

### AMDS

AMDS は、PCR とインバーダーアッセイ試薬入りの 23 の反応場を設けた DNA チップをベースとした全自動遺伝子解析システムである (図 5-1 の A と B)。AMDS の測定手順を図 5-1 の C に示す。AMDS の基本測定手順は、1. カートリッジでの DNA 抽出、2. DNA 抽出液を DNA

チップに送液後、遠心により DNA 抽出液を各ウェルに分配、その後、ミネラルオイル送液し、遠心によりオイル封止、 3. PCR、4. インバーダー反応、5. 結果判定 までを全自動で解析可能である。PCR 条件は、93 °C、120 秒の初期変性後、93 °C、31 秒、66 °C、16 秒のステップを 30 サイクルあるいは、35 サイクル行った。その後、taq 失活のために 97 °C、120 秒の変性工程後、61 °C、600 秒間、インバーダー反応による FAM、RED のシグナルをそれぞれ 30 秒間に 1 回ずつ計測した。なお、AMDS は FAM (490nm 励起、520nm 計測)、RED (580 nm 励起、595 nm 計測)、それぞれの独自のフィルタを搭載している。

#### DNA チップと DNA 精製カートリッジ

本検証に用いた分析チップと DNA 精製カートリッジはクリーンルーム (ISO class 8) 内で全て作製した。それぞれのウェル容量は 12  $\mu$ l であり、インバーダープラスに必要な試薬がトレハロース水溶液に溶解した状態で乾燥固定されている。試薬組成は 1 ウェルあたり、1 M の MOPS (同仁化学研究所) 緩衝液 (PH7.7) を 0.1  $\mu$ l、10 mM each dNTP (ロッシュ社) を 0.05  $\mu$ l、1 M トレハロース (林原工業) 水溶液を 0.96  $\mu$ l、20 $\times$ オリゴミックスを 0.60  $\mu$ l、5.0 U/  $\mu$ l の Hawk taq (ロッシュ社) を 0.22  $\mu$ l、15,000U/  $\mu$ l のクリベース 2.0 (TWT 社) は 0.04  $\mu$ l となっており、合計 1.99  $\mu$ l の試薬混合液をウェルに分注し、乾燥固化させた。20 $\times$ オリゴミックスは、100  $\mu$ M の probe (野生型用) を 0.06  $\mu$ l、probe (変異型用) を 0.06  $\mu$ l、10  $\mu$ M のインバーダーオリゴを 0.06  $\mu$ l、100  $\mu$ M のフォワードプライマーを 0.12  $\mu$ l、100  $\mu$ M リバースプライマーを 0.12  $\mu$ l、50  $\mu$ M の FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) カセット (FAM) を 0.06  $\mu$ l、50  $\mu$ M の FRET カセット (RED) を 0.06  $\mu$ l、DW を 0.06  $\mu$ l の試薬組成となっている。なお、プライマーやインバーダーオリゴ、そしてプローブは全て、TWT 社のインバーダー設計ソフトにより設計した。また、反応系のポジティブコントロールとして TCF4 を用いた。各オリゴセットとオリゴの配列を表 5-1 に示す。

DNA 精製カートリッジは、溶解緩衝液、洗浄緩衝液、希釈緩衝液と 3 つの試薬が封入され

ている。溶解緩衝液は、グアニジン塩酸塩、Tris-HCl (pH 6.8)、EDTA、Triton X-100、DDW (DNase free) 構成されており、細胞の溶解に伴う DNA の抽出を行った。本法は、カオトロピック効果を利用した DNA 生成方法である[24, 25]。洗浄緩衝液は、抽出した DNA を吸着しているガラスフィルタを洗浄するためのもので、試薬は Tris-HCl 緩衝液(シグナルドリッチ) (pH 7.5)、EDTA、NaCl、Ethanol、DDW (Lonza 社) で構成された。ガラスフィルタ洗浄、乾燥後、DDW にて DNA を溶出し、MgCl<sub>2</sub>(シグマアルドリッチ)、NaCl(シグマアルドリッチ)、DDW (Lonza 社) で構成される希釈緩衝液にて精製 DNA を希釈し、調製された 270  $\mu$ l の試料液を DNA チップに送液を行った。なお、この時、各ウェルの MgCl<sub>2</sub> の終濃度は 6.25 mM、NaCl の終濃度は 20 mM となるようにした。

#### InvaderPlus アッセイの変異検出原理

図 5-1 の D にインバーダーアッセイによる変異検出原理を示す。PCR とインバーダーアッセイは、一つの反応系にて完結することができる。試料の DNA を PCR にて増幅後、Taq 伸張酵素を失活させ、インバーダーアッセイにより産物中の変異を検出する。インバーダーオリゴとアレルプローブが PCR 産物の片方の DNA 鎖にハイブリダイゼーションすることによって生じた立体構造をフラップエンドヌクレアーゼ(クリベース)が認識する。このとき、増幅産物の配列とアレルプローブが一致する場合は、クリベースが働き、アームの配列の部分をカットする。カットされたアーム配列は、自己ループ型の FRET カセットに再ハイブリダイゼーションすることにより、再度クリベースが FRET カセット内の蛍光物質と消光物質との間の配列を切断し、蛍光物質が消光物質から離脱することにより蛍光を生じる。一方、アレルプローブと増幅産物の配列が一塩基でも異なる場合は、クリベースはその立体構造を認識することができず、蛍光を発しない。反応系においては、2 種類 FRET カセット (FAM と RED) を用いて、二つのアレルを識別することが可能である。

## 判定方法

AMDS の基本判定アルゴリズム原理と手順に関して、図 5-1 の E に示す。ある遺伝子変異に関して陽性か陰性かを判定するための、第 1 段階としては、測定終点の F[EP]が、所定の閾値(F[NT])よりも小さいか大きいかを判定する。F[EP]が F[NT]を下回った試料 D は、陰性となる。F[EP]が F[NT]を上回った試料 A~C に関しては、以下の式により、反応性を数値化し、それを指標にして判定を行った。

$$\text{Signal Ratio} = F [\text{JP}] / F [\text{EP}]$$

この式により、EP のシグナルと判定点(JP)のシグナル比を算出する。したがって、この SR が所定の閾値以下である、試料 C は陰性、試料 A、B は陽性となる。今回の臨床性能試験における各遺伝子変異の閾値(THR)は、プラスミド DNA の 5 %試料の結果を反映し、判定を行った。各 THR は、表 5-2 に示す。

## ダイレクトシーケンス(DS)

DS 用の各プライマー配列は、*KRAS*(フォワード)： 5' GAATGGTCCTGCACCAGTAA3'、*KRAS*(リバーズ)： 5' -GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA-3'、*BRAF*(フォワード)： 5' -TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3'、*BRAF*(リバーズ)： 5' -AGCATCTCAGGGCCAAAAT-3'、*PIK3CAex9*(フォワード)： 5' -CTGTGAATCCAGAGGGGAAA-3'、*PIK3CAex9*(リバーズ)： 5' -ACATGCTGAGATCAGCCAAAT-3'、*PIK3CAex20*(フォワード)： 5' -ATGATGCTTGGCTCTGGAAT-3'、*PIK3CAex11*(リバーズ)： 5' -GGTCTTGCCTGCTGAGAGT-3' を用いた。各 PCR 産物の長さは、*KRAS*：214 bp、*BRAF*：228 bp、*PIK3CAex9*：269 bp、*PIK3CAex20*：273 bp で、PCR 条件は、95℃ 10min の前変性後、94 °C 20 秒、60 °C 20 秒、72°C 30 秒を 40 サイクル行い、72 °C 10 分の伸長反応を行った。シーケンス解析は ABI3730(アプライドバイオシステムズ)を用いて、ビッグダイターミネーター法によるサイクルシーケンシングを行った。

## プラスミドを用いた AMDS の検出感度試験

AMDS の感度を把握するために、プラスミド DNA を用いた感度試験を行った。野生型のプラスミド DNA と変異型のプラスミド DNA を図 5-2 の A のように混合し、合計の DNA 量が 1 fg/ウェル、10 fg/ウェル、100 fg/ウェルとなるように添加した。なお、その試料中に、10 ng/ $\mu$ l の濃度のキャリア DNA としてサケ精子由来 DNA (シグマアルドリッチ) を共存させた (終濃度 10 ng/ $\mu$ l)。混合したプラスミド試料組成は、10 fg/ $\mu$ l のプラスミド DNA を 30  $\mu$ l、500 mM の NaCl (シグマアルドリッチ) を 12  $\mu$ l、100 mM の MgCl<sub>2</sub> (シグマアルドリッチ) を 18  $\mu$ l、DW を 270  $\mu$ l とし、混合後、そのうち 270  $\mu$ l を DNA チップに送液した。また、バックグラウンドシグナルの検証に用いたヒトゲノムは Novagen human genome DNA (EMD バイオサイエンス) を用いて、反応系において 1 ng/ウェル、10 ng/ウェル、100 ng/ウェルとなるように調製した。

## 臨床性能評価

AMDS の臨床性能評価に関して DS と比較した実験デザインを図 5-2 の B に示す。凍結組織標本切片 (n=89) からの DNA 抽出は、QIAamp® DNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、DNA の抽出及び精製を行い、各試料 1 ng/ $\mu$ l の DNA 濃度に調製した。DNA チップへの送液試料の組成は、10 ng/ $\mu$ l の精製 DNA を 30  $\mu$ l、500 mM の NaCl を 12  $\mu$ l、100mM の MgCl<sub>2</sub> を 18  $\mu$ l、DW を 270  $\mu$ l とし、混合後、270  $\mu$ l を DNA チップに送液した。また、FFPE 標本切片 (n=70) からは、Epicentre QuickExtract™ (Illumina) を用いて抽出し、原液を 50 倍希釈したものを調製した。なお、このキットは精製工程を含まないため、DNA 試料は非常にクルードである。DNA チップへの送液試料の組成は、原液 50 倍希釈の抽出 DNA を 30  $\mu$ l、500 mM の NaCl を 12  $\mu$ l、100 mM の MgCl<sub>2</sub> を 18  $\mu$ l、DW を 270  $\mu$ l とし、混合後、270  $\mu$ l を DNA チップに送液した。

## クローニング解析

DS と AMDS の変異ステイタスが異なる試料(n=14)に関して、クローニング解析を行った。各 DNA 試料を鋳型として、DS で用いた同様のプライマーを用いて、*KRAS*、*BRAF*、そして *PIK3CA*(エクソン 9 と 20)のそれぞれの PCR 産物を調製した。用いたプライマー配列を表 5-3 に示す。用いた伸張酵素は、GoTaq (プロメガ社)と PrimeStar (タカラバイオ社)を用いた。その後、平滑末端処理にて pUC118/Hinc II、pMD19/EcoRV のベクターにインサートを行った。インサートクローンの確認は青白判定でスクリーニングし、各試料につき 192 個のコロニーをランダムにピックアップし、グリセロールストックとして調製した。その 192 のグリセロールストックから RCA(ローリングサイクル増幅)を Illustra TempliPhi DNA Amplification kit(GE ヘルスケア社)を行い、その産物について DS を行い塩基配列解析を行った。DS は、ABI3730x1(Applied Biosystems 社)を用いた。

## 凍結組織からの全自動解析

AMDS による全自動体細胞変異解析を実証するため、大腸がん凍結組織標本切片 41 検体から、約 1 mg の組織をガラスホモジナイザーで 20 秒間、すりつぶし、200  $\mu$ l の DW で溶解させ、そのホモジネート全量を抽出カートリッジに供し、AMDS にて全自動解析を行った。なお、本大腸がん凍結組織標本は、臨床性能評価で用いた患者試料と同一であるが、別切片を用いた。

## 統計解析

統計解析は、検出力と  $\kappa$  係数[26]を算出し、DS と AMDS による変異検出における偶然の一致率を計算した。

表 5-1 本研究で用いたオリゴ

<i>KRAS</i> mutation	Sequence (5' → 3')
F-Primer	AGTCACATTTTCATTATTTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGA
R-Primer	TCGTCCACAAAATGATTCTGAATTAGCTGTATCG
<b>G12A</b>	
Allele Probe (Mt)	CGCGAGGCCG_CTGGCGTAGGCAAG
Allele Probe (Wt)	ACGGACGCGGAG_GTGGCGTAGGCAAG
Invader Oligo	GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG
<b>G12C</b>	
Allele Probe (Mt)	CGCGAGGCCG_TGTGGCGTAGGCAA
Allele Probe (Wt)	ACGGACGCGGAG_GGTGGCGTAGGC
Invader Oligo	TGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTG
<b>G12D</b>	
Allele Probe (Mt)	CGCGAGGCCG_ATGGCGTAGGCAAGA
Allele Probe (Wt)	ACGGACGCGGAG_GTGGCGTAGGCAAG
Invader Oligo	GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG
<b>G12S</b>	
Allele Probe (Mt)	CGCGAGGCCG_AGTGGCGTAGGCAA
Allele Probe (Wt)	ACGGACGCGGAG_GGTGGCGTAGGC
Invader Oligo	TGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTG
<b>G12V</b>	
Allele Probe (Mt)	CGCGAGGCCG_TTGGCGTAGGCAAGA
Allele Probe (Wt)	ACGGACGCGGAG_GTGGCGTAGGCAAG
Invader Oligo	GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG
<b>G13D</b>	
Allele Probe (Mt)	CGCGAGGCCG_ACGTAGGCAAGAGTGC
Allele Probe (Wt)	ACGGACGCGGAG_GCGTAGGCAAGAGTG
Invader Oligo	TTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGG
FRET (Arm 6)	FAM-TCT-Q-AGCCGGTTTTCCGGCTGAGA_CCGCCTCCGG-NH <sub>2</sub>
FRET (Arm 3)	RED-TCT-Q-TCGGCCTTTTGCCGAGAGA_CTCCGCTCCGT-NH <sub>2</sub>
<i>BRAF</i> mutation	Sequence (5' → 3')
F-Primer	TGAGATCTACTGTTTTCCTTACTACTACACCTCAGATA
R-Primer	ACAAAATGGATCCAGACAACTGTTCAAACTGATG
<b>V600E</b>	
Allele Probe (Mt)	CGCGCCGAGG_TCTGTAGCTAGACCAAAATC
Allele Probe (Wt)	ACGGACGCGGAG_ACTGTAGCTAGACCAAAATC
Invader Oligo	GGACCCACTCCATCGAGATTCC
FRET (Arm 1)	FAM-TCT-Q-AGCCGGTTTTCCGGCTGAGA_CCTCGGCGCG-NH <sub>2</sub>
FRET (Arm 3)	RED-TCT-Q-TCGGCCTTTTGCCGAGAGA_CTCCGCTCCGT-NH <sub>2</sub>
<i>PIK3CA</i> mutation	Sequence (5' → 3')
F-Primer (exon9)	GGAAAATGACAAAGAACAGCTCAAAGCAATTCT
R-Primer (exon9)	TGCTGATGATCAGCCAAATTCAGTTATTTTTCTGT
<b>E542K</b>	
Allele Probe (Mt)	ACGGACGCGGAG_TAGAGAGAGGATCTCGT
Allele Probe (Wt)	CGCGCCGAGG_CAGAGAGAGGATCTCGT
Invader Oligo	GAAAATCTTCTCCTGCTCAGTGATTTA
<b>E545K</b>	
Allele Probe (Mt)	ACGGACGCGGAG_TAGTGATTCAGAGAGAGGA
Allele Probe (Wt)	CGCGCCGAGG_CAGTGATTCAGAGAGAGG
Invader Oligo	GACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGCTA
<b>E545G</b>	
Allele Probe (Mt)	ACGGACGCGGAG_CCAGTGATTCAGAGAGAG
Allele Probe (Wt)	CGCGCCGAGG_TCAGTGATTCAGAGAGAG
Invader Oligo	TGACTCCATAGAAAATCTTCTCCTGCA
F-Primer (exon20)	ACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTCA
R-Primer (exon20)	TCTCAGTTATCTTTCAGTTCAATGCATGCTGTT
<b>H1047L</b>	
Allele Probe (Mt)	ACGGACGCGGAG_CGTGCATCATTATTGT
Allele Probe (Wt)	CGCGCCGAGG_TGTGCATCATTATTGTTT
Invader Oligo	TTGTTGTCCAGCCACCATGAG
<b>H1047R</b>	
Allele Probe (Mt)	ACGGACGCGGAG_AGTGCATCATTATTGTTT
Allele Probe (Wt)	CGCGCCGAGG_TGTGCATCATTATTGTTT
Invader Oligo	TTGTTGTCCAGCCACCATGAG
FRET (Arm 3)	FAM-TCT-Q-AGCCGGTTTTCCGGCTGAGA_CTCCGCTCCGT-NH <sub>2</sub>
FRET (Arm 1)	RED-TCT-Q-TCGGCCTTTTGCCGAGAGA_CCTCGGCGCG-NH <sub>2</sub>
Positive control	Sequence (5' → 3')
F-Primer	TTCCACCGTCTTCTTACCGCCTG
R-Primer	CCCCAGTCTCCAAAATCCGATTGT
Allele Probe	CGCGCCGAGG_TGCTAAAATGCATCACCA
Invader Oligo	TTGTTGTCCAGCCACCATGAG
FRET (Arm 1)	FAM-TCT-Q-AGCCGGTTTTCCGGCTGAGA_CCTCGGCGCG-NH <sub>2</sub>

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

表 5-2 AMDS の各変異型の判定閾値

	G12A	G12C	G12D	G12R	G12S	G12V	G13D	V600E	E542K	E545K	E545G	H1047L	H1047R
NT	2x10 <sup>5</sup>												
RPT	0.841	0.835	0.972	0.937	0.837	0.889	0.909	0.539	0.950	0.806	0.801	0.985	0.921
JP (min)	3.0	3.0	4.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	4.0	5.0	5.0	4.0	3.0

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

表 5-3 クローニング解析に用いた PCR プライマー

<i>KRAS</i> mutation	Sequence (5' → 3')
F-Primer-1*	GAATGGTCCTGCACCAGTAA
R-Primer-1*	GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA
F-Primer-2**	<u>GGATCTTCCAGAGATATCGAATGGTCCTGCACCAGTAA</u>
R-Primer-2**	<u>CTGCCGTTTCGACGATATCGTGTGACATGTTCTAATATAGT</u>
<i>BRAF</i> mutation	Sequence (5' → 3')
F-Primer-1*	TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG
R-Primer-1*	AGCATCTCAGGGCCAAAAT
<i>PIK3CA</i> <sup>e9</sup> mutation	Sequence (5' → 3')
F-Primer-1*	CTGTGAATCCAGAGGGGAAA
R-Primer-1*	ACATGCTGAGATCAGCCAAAAT
F-Primer-2**	<u>GGATCTTCCAGAGATATCCTGTGAATCCAGAGGGGAAA</u>
R-Primer-2**	<u>CTGCCGTTTCGACGATATCACATGCTGAGATCAGCCAAAAT</u>

プライマー1 は、Gotaq にて増幅した際のプライマー、プライマー2 は、PrimeStar を用いて増幅した際のプライマーで、下線部はベクター特異的な配列を示す。

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

### 5.3 結果

#### プラスミドを用いた AMDS と DS の検出感度の比較

AMDS の検出感度に関して検証を行うために、野生型と変異型のプラスミド DNA を混合して種々の変異割合の試料を用いて DS と AMDS により実施した。DS による体細胞変異解析に関して、これまでに 20~30 %以下の体細胞変異検出が困難であることが報告されているが、我々の結果においても、25 %以下の変異検出は困難であることが分かった(図 5-2 の C)。特に各試料の 5%のピークは、検出されない、もしくはノイズとの差別化することが難しい。一方、AMDS による挙動は、5%のシグナルを明らかに検出することができ、最大 0.5%の *KRAS* 遺伝子変異を検出できた(図 5-2 の D)。

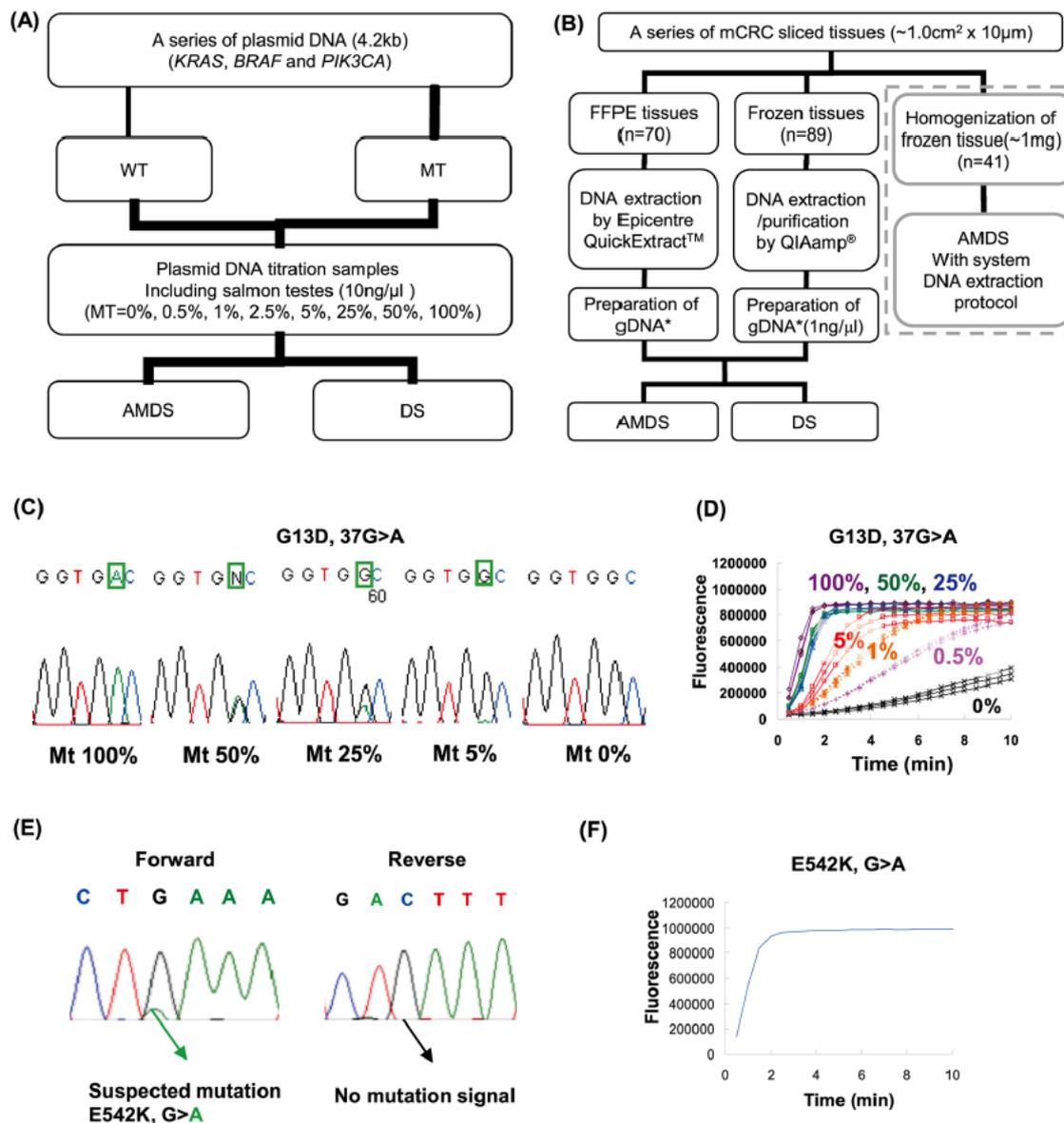


図 5-2 AMDS の評価 (A) プラスミド DNA 対とレーシヨンスタディ

プラスミドは 13 の種類の変異型と 4 種類 (*KRAS1*, *BRAF*: 1, *PIK3CA*: 2) 野生型を用いた。(B) 70 の FFPE 切片と 89 の凍結組織切片をそれぞれ、EpicentreQuickExtract と QIAamp DNA Micro kit から DNA を抽出あるいは精製した。破線の 41 検体は、凍結組織から AMDS により全自動解析を行った。なお、その際の組織はニードルにより 1mg 程度パンチして得たものを試料とした。(C) DS による *KRAS*(G13D) の検出結果。反応に供したプラスミド DNA は 1fg/反応とした。(D) AMDS による *KRAS*(G13D) の検出結果。反応に供したプラスミド DNA は 1fg/反応とした。(◇; mt 100%, ○; mt 50%, △; mt 25%, □; mt 5%, \*; mt 1%, +; 0.5% and ×; mt 0%) (E) 試料 ID56754 の DS の波形データ(フォワード、リバース) (F) AMDS による ID56754 からの検出結果。

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

## 臨床性能評価における AMDS と DS の検出感度の比較

AMDS による体細胞変異検出の実現可能性検証を 153 名の大腸がん患者の凍結標本切片 (n=89)、FFPE 標本切片 (n=70) を用いて実施した。6 名の患者は FFPE 切片と凍結組織切片のどちらも解析を行った。本臨床性能比較評価は、二重盲目試験で行った。表 5-4~6 に *KRAS*、*BRAF* 及び *PIK3A* の 2 x 2 比較を示す。DS で検出できた凍結組織切片 (合計 n=41、46.0%) あるいは、FFPE 組織切片 (n= 27、38.5 %) 中の全ての変異を AMDS にて 100.0 % 検出した。AMDS で野生型とし、DS で変異型とした試料はなかった。さらに、AMDS は DS で検出できなかった凍結組織切片 (n= 8、9.0 %)、FFPE 組織切片 (n= 6、8.6 %) 中の変異を検出した。表 5-7 に示すように、*KRAS* と *PIK3CA* の遺伝子変異が共存している患者が 153 名中 3 名いた (3.9 %)。さらに、それらの *PIK3CA* 遺伝子変異は E545K 特異的であった。

DS と AMDS の不一致試料の典型的なデータを図 5-2 の E と F に示す。この試料は、フォワード方向の解析ではわずかに変異のシグナルが観察されたが、リバース方向からは変異のシグナルが消失した。対照的に、AMDS での検出は非常に明瞭に陽性と分かるものであった。

## DS と AMDS の不一致試料のクローニング解析

AMDS による解析にて、DS と異なる変異ステータスを示した *KRAS*、*BRAF* の試料に関してクローニング解析を実施し、AMDS の信頼性確認を行った (図 5-3A と B)。クローニング解析におけるエラーレート (ER) は、塩基置換数 / (各インサート長 × クローンシーケンスが成功した数) にて算出した。この ER よりも低い、変異検出率は伸張酵素の読み違いエラーであるとみなした。ER は各試料で変動した (GoTaq: 0.16 %~0.29 %、PrimeStar: 0.03 %-0.06 %)。PrimeSTAR は 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性があるため、エラーレートは GoTaq に比べて低い。全ての試料から、遺伝子変異が、それぞれの ER よりも高い出現頻度で観察された (図 5-3A と B)。この結果から AMDS で、変異陽性、DS で野生型とした *KRAS*、*BRAF* の遺伝子に確実に変異が生じていることを証明した ( $p=1.04 \times 10^6$ )。これにより、臨床性能評価に関しても、AMDS が DS よりも高感度に体細胞変異検出を行えることが示された。本研究では、

臨床性能評価を行う上で統計学的に試料サイズは十分である。なぜならば、表 5-4~6 に示すように *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* の検出力はそれぞれ、0.96、0.97、0.94 であり、 $\kappa$  係数も 0.91、0.67、0.70 となったことから偶然である可能性が低いことが分かるためである。

図 5-3C に、153 名の大腸がん患者の変異頻度をべん図に示した。*KRAS* は 28.7% (44/153)、*BRAF* は 2.5 % (4/153)、*PIK3CA* は 10.1 % (16/ 153) の出現頻度であった。そのうち、*KRAS* と *PIK3CA* の遺伝子変異が共存した患者は、3.9 % (6/ 153) であった。

AMDS と DS の頑健性については、異なる方法にて調製した DNA を用いて検証した。Qiagen 社の試薬キットは精製 DNA であるが、Epicentre 社の試薬キットは抽出 DNA である。凍結組織切片のジェノタイピングコールレートは、DS は 100.0% (89/89)、FFPE 組織切片では、74.3 % (52/ 70) であった。AMDS は、再試験はなく、1 回目の試験にて、凍結組織、FFPE 組織切片ともに 100.0 % であった。図 5-4A に G13D の検出結果を示す。この試料は同一患者のもので、DS での解析では、FFPE 切片にて波形が乱れ、3 回テストして、いずれも成功しなかったが、AMDS は、どちらの検体からも明瞭な陽性シグナルが観察された。DS では 18 の試料を再テストし、そのうち 10 の試料は解析できたが、残りの 8 つの試料に関しては、解析不能であった。8 試料のうち 7 試料が *BRAF* 遺伝子の配列解析ができなかった。残り 1 試料は、*KRAS* と *PIK3CA* が解析不能であった。

試料の濃度に対する頑健性の検証として、プラスミド DNA を過剰に反応系に添加して検証を行った(図 5-4B)。5 % のシグナルを 1 fg/ウェル-100 fg/ウェルとブロードな試料濃度においても明瞭に検出が可能であった。ここで 1 fg/ウェルに存在するプラスミド DNA のコピー数は、210 コピーで、ヒトゲノムに換算すると 0.63 ng となる。臨床性能試験で用いた凍結組織切片中の精製 DNA は 10 ng/ウェルとなるように添加しており、この検証の範囲内で実行している。また、バックグラウンドシグナルも、ヒトゲノム DNA 濃度依存的に増加する傾向は観察されなかった(図 5-4C)。

## AMDS による大腸がん凍結組織標本切片 (n=41) を用いた全自動解析の実現可能性検証

AMDS により凍結組織ホモジネートから全自動で解析を行えるかどうかを検証した。結果を表 5-5 に示す。臨床性能評価にて、キアゲンキットで抽出、精製した DNA を用いた TGA の結果と DNA 精製カートリッジを用いた全自動解析との各遺伝子変異検出率の比較を行った。全て結果が一致し、且つ、DS で検出できなかった遺伝子変異を全て検出 (5/41) されたことから、AMDS による大腸がん組織ホモジネートからの体細胞変異検出は約 1 mg の大腸がん組織ホモジネートがあれば実行可能であると言える。

表 5-4 *KRAS* 遺伝子変異検出 (DS *v. s.* AMDS)

<i>KRAS</i> mutation ( $\kappa=0.91$ , $P=0.96$ )							
Frozen tissues				FFPE tissues			
AMDS	DS			AMDS	DS		
	MT	WT	TOTAL		MT	WT	TOTAL
MT	31	1	32	MT	21	3	24
WT	0	57	57	WT	0	45	45
TOTAL	31	58	89	TOTAL	21	48	69*

MT = Mutant-type.

WT = Wild type.

$\kappa$  =  $\kappa$  coefficient.

$P$  = statistical power.

\* = 1 *KRAS* analysis in the FFPE tissues were failed in DS due to noisy sequencing data.

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

表 5-5 *BRAF* 遺伝子変異検出 (DS *v. s.* AMDS)

<i>BRAF</i> mutation ( $\kappa=0.67$ , $P=0.97$ )							
Frozen tissues				FFPE tissues			
AMDS	DS			AMDS	DS		
	MT	WT	TOTAL		MT	WT	TOTAL
MT	2	1	3	MT	1	0	1
WT	0	86	86	WT	0	62	62
TOTAL	2	87	89	TOTAL	1	62	63*

MT = Mutant-type.

WT = Wild type.

$\kappa$  =  $\kappa$  coefficient.

$P$  = statistical power.

\* = 7 *BRAF* analysis in the FFPE tissues were failed in DS due to noisy sequencing data.

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

表 5-6 *PIK3CA* 遺伝子変異検出 (DS *v. s.* AMDS)

<i>PIK3CA</i> mutation ( $\kappa=0.7$ , $P=0.94$ )							
Frozen tissues				FFPE tissues			
AMDS	DS			AMDS	DS		
	MT	WT	TOTAL		MT	WT	TOTAL
MT	8	6	14	MT	5	3	24
WT	0	75	75	WT	0	61	45
TOTAL	8	81	89	TOTAL	5	64	69*

MT = Mutant-type.

WT = Wild type.

$\kappa$  =  $\kappa$  coefficient.

$P$  = statistical power.

\*=1 *PIK3CA* analysis in the FFPE tissues were failed in DS due to noisy sequencing data.

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

表 5-7 多重遺伝子変異(凍結組織切片、FFPE 組織切片)

Sample ID#	Status	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>PIK3CA</i>
60682	Frozen	G12D	–	E545K
63439	Frozen	G12V*	–	E545K*
41949	Frozen	G13D	–	E545K
41950	Frozen	G13D	–	E542K*/E545K*
7053316	FFPE	G12D	–	E545K*
60681	FFPE	G12D	–	E545K

\*= DS called as wild-type.

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

(A)

Frozen tissues		
Sample	AMDS	Cloning analysis
Frozen ID# 63439 (KRAS G12V)		18/189 (10.0%) ER*=0.29%
Frozen ID# 41950 (PIK3CA E542K)		6/241 (2.5%) ER*=0.24%
Frozen ID# 41950 (PIK3CA E545K)		7/242 (3.0%) ER*=0.20%
Frozen ID# 50502 (BRAF V600E)		15/189 (8.0%) ER*=0.20%
Frozen ID# 56754 (PIK3CA E542K)		35/175(20.0%) ER*=0.22%
Frozen ID# 56755 (PIK3CA E542K)		18/184 (9.8%) ER*=0.16%
Frozen ID# 56756** (PIK3CA E542K)		6/156 (4.0%) ER*=0.05%
Frozen ID# 63440** (PIK3CA E542K)		35/147 (24.0%) ER*=0.05%

\*ER=error rate

\*\*Clone sample used PrimeSTAR® GXL DNA polymerase

(B)

FFPE tissues		
Sample	AMDS	Cloning analysis
FFPE ID# 41947** (KRAS G13D)		23/189 (12.2%) ER*=0.03%
FFPE ID# 7053306** (PIK3CA E542K)		10/94 (11.0%) ER*=0.06%
FFPE ID# 7053313 (KRAS G12D)		18/186 (10.0%) ER*=0.27%
FFPE ID# 7053316 (PIK3CA E545K)		55/191 (28.7%) ER*=0.23%
FFPE ID# 46171 (PIK3CA E545K)		17/191 (9.0%) ER*=0.24%
FFPE ID# 7053317 (KRAS G12D)		11/189 (6.0%) ER*=0.27%

\*ER=error rate

\*\*Clone sample used PrimeSTAR® GXL DNA polymerase

(C)

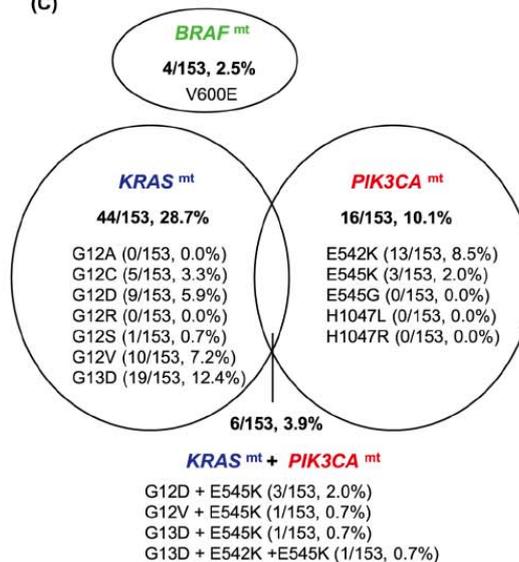


図 5-3 クローニング解析と臨床検体の遺伝子変異まとめ

(A) 凍結組織切片のクローニング解析結果 (B) FFPE 組織切片のクローニング解析結果 PCR は、凍結組織切片の ID=56756、ID=63440、そして、FFPE 組織切片である ID=41947、ID=7053306 に関して、PrimeSTAR を用いた。残りの検体は、GoTaq を用いた。試料中の潜在的な変異の割合は、(標的変異のシーケンスの数/コロニーをピックアップした内の成功したシーケンス数) とした。 (C) KRAS、BRAF、PIK3CA 遺伝子頻度のベン図。

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

(A)

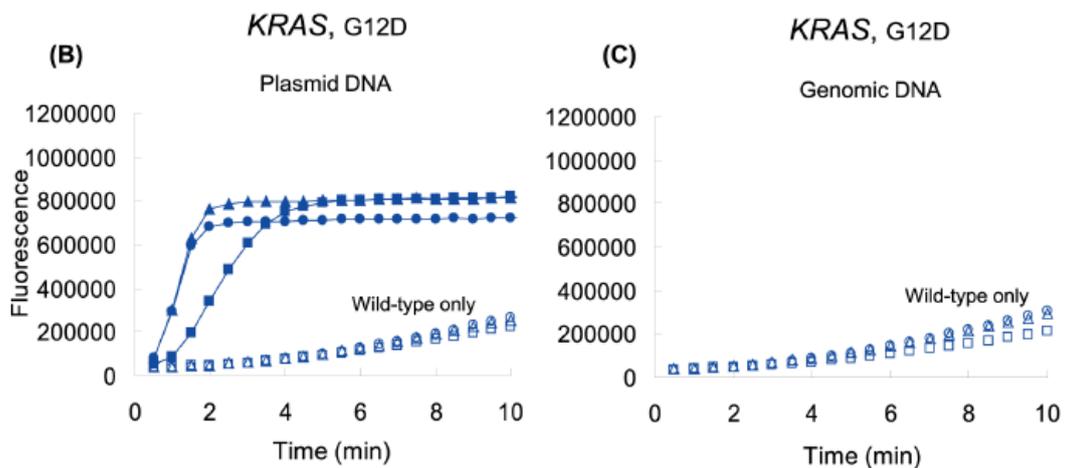
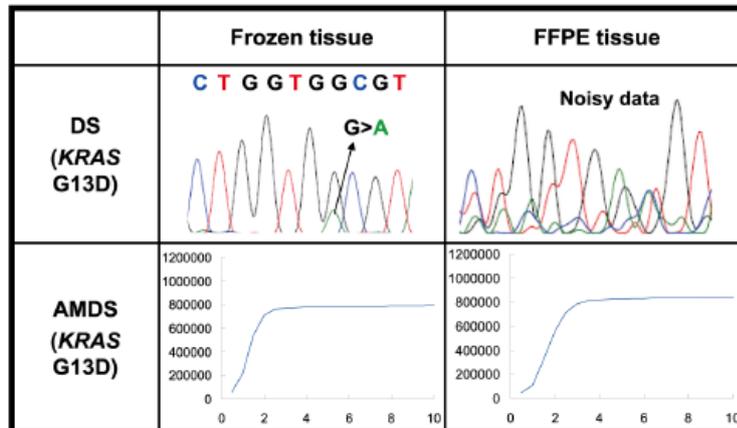


図 5-4 AMDS の頑健性

(A) DS と AMDS の結果(同一患者、異なる検体、異なる DNA 調製方法) (B) AMDS のプラスミド DNA の解析結果 5%の変異型(●; 100fg/ウェル、■; 10fg/ウェル、▲; 1fg/ウェル)、野生型(○; 100fg/ウェル、□; 10fg/ウェル、△; 1fg/ウェル) (C) AMDS によるヒトゲノムの解析 野生型(○; 100ng/ウェル、□; 10ng/ウェル、△; 1ng/ウェル)

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

(B) 表 5-8 キアゲンキットと AMDS の DNA 精製カートリッジの比較

---

---

**AMDS *v.s.* QIAGEN**

QIAmp® DNA Micro Kit	AMDS		
	WT	MT	TOTAL
WT	19	0	19
MT	0	22	22
TOTAL	19	22	41

WT = Wild-type.

MT = Mutant type.

Reprinted from PLoS one, Vol 8, shiro kitano et al., A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System (AMDS) for Colorectal Cancer Mutation Detection, e62989, Copyright (2013), with permission from PLOS.

#### 5.4 考察

FRET-PHFA の全自動化を目指し、インベーター反応をモデルとした全自動遺伝子解析システムである AMDS の実現可能性検証として、大腸がん患者の二つの異なる形態の 159 の検体を用いた臨床性能評価を行った。我々のデータは、DS よりも AMDS の方がより高感度であることを示唆している。これは、変異の割合が少ない検出において非常に重要なことである。図 5-4B と C では、AMDS は 100 倍の濃度差があっても検出が可能であることを示し、さまざまな試料濃度に対応できることを示した。さらに、FFPE 組織切片は、ホルマリンで固定することから、DNA とタンパク質が架橋的に結合して、それらは、DNA の断片化を引き起こす。このことが原因で FFPE の臨床検体は、通常のゲノム DNA よりも品質が悪く、PCR 効率が低下することが報告されている [27]。図 5-3、図 5-4A では、AMDS は、臨床検体の種類によらず、DS よりも高感度で変異を検出可能であることが示された。

加えて、AMDS は、大腸がん凍結組織から全自動で *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* を解析可能であった。1mg 程度の凍結組織を実験に用いていることから、内視鏡などで得た生検試料にも対応できると推測される。したがって、AMDS による変異解析システムは、非常に簡便で、一定の手技も必要とせず、誰でも検出が可能である。

もうひとつ重要な点として、クローニング解析において、クローニング解析において、我々は GoTaq を用いたがエラーレートが高かった。一方で、PrimeSTAR では、エラーレートが Taq 伸張酵素の 10 倍程度低い結果となった。この結果は、セルフリーDNA 中の遺伝子変異の高感度変異検出時には、校正機能付きの伸張酵素を用いるべきだろう。

153 名の大腸がん患者中の変異パターンは既報とおおむね一致した [28-30]。我々は、*KRAS* と *PIK3CA* の多重遺伝子変異に関心を持った。例えば、153 名のうち 6 名 (3.9%) は、2 つ、あるいは 3 つの遺伝子変異を有していることになる。これは *KRAS* と *PIK3CA* は、がん化の相乗効果を示す報告 [30, 31] を補足する結果である。さらに、二つの試料は *KRAS* の G13D の遺伝子変異と *PIK3CA* の E545K と、あるいは、E542K を持っている。これまでに、G13D は、

*KRAS* 遺伝子変異の中でも野生型と同じような抗 EGFR 抗体薬に対する奏功性を示すと報告されている [9]。しかし、*KRAS* 遺伝子変異と *PIK3CA* のヘリカルドメインに遺伝子変異が存在した場合、PI3K 経路が RAS-PI3K によって活性化 [13, 30] され、抗 EGFR 抗体薬の効果が得られないことも推測できる。すなわち、抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測因子として *KRAS* だけでなく、*PIK3CA* 遺伝子変異も観察されるように将来はなるかもしれない。さらに、試料 ID51950 は 3 つの変異を有しているが、*PIK3CA* の E542K と E545K は、それぞれ独立した遺伝子上に存在することがクローニング解析により分かった。これは、がんのヘテロジェナイティー (不均一性) を指すものであり、このタイプの多重変異は、COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) にも報告されていない。

## 5.5 参考文献

1. Bamford, S., et al., *The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website*. Br J Cancer, 2004. **91**(2): p. 355-8.
2. Edkins, S., et al., *Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(8): p. 928-32.
3. Russo, A., et al., *Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies*. Ann Oncol, 2005. **16**(Suppl 4): p. iv44-49.
4. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
5. Samuels, Y. and V.E. Velculescu, *Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers*. Cell Cycle, 2004. **3**(10): p. 1221-4. .
6. Samuels, Y., et al., *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers*. Science, 2004. **304**(5670): p. 554. .
7. Barault, L., et al., *Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers*. Int J Cancer, 2008. **122**(10): p. 2255-9.
8. Ogino, S., et al., *PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(9): p. 1477-84. .
9. De Roock, W., et al., *Association of KRAS p. G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab*. JAMA, 2010. **304**(16): p. 1812-20.
10. Amado, R.G., et al., *Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer*. J. Clin. Oncol., 2008. **26**(10): p. 1626-34.
11. Karapetis, C.S., et al., *KRAS mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(17): p. 1757-65.
12. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5705-12. .
13. Jhawer, M., et al., *PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab*. Cancer Res, 2008. **68**(6): p. 1953-61.
14. Amicarelli, G., et al., *FLAG assay as a novel method for real-time signal generation during PCR: application to detection and genotyping of KRAS codon 12 mutations*. Nucleic Acids Res., 2007. **35**(19): p. e131.

15. Cross, J., *DxS Ltd. Pharmacogenomics*, 2008. **9**(4): p. 463-7.
16. Janne, P.A., et al., *A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(3 Pt 1): p. 751-8.
17. Tatsumi, K., et al., *Rapid screening assay for KRAS mutations by the modified smart amplification process*. *J. Mol. Diagn.*, 2008. **10**(6): p. 520-6. .
18. Ogino, S., et al., *Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing*. *J. Mol. Diagn.*, 2005. **7**(3): p. 413-21.
19. Oliner, K., et al., *A comparability study of 5 commercial KRAS tests*. *Diagn*, 2010. **5**: p. 23.
20. Do, H., et al., *High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies*. *BMC Cancer*, 2008. **8**: p. 142.
21. Hoshi, K., et al., *Rapid detection of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer by the SMart-Amplification Process*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(17): p. 4974-83.
22. Kwiatkowski, R.W., et al., *Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay*. *Mol Diagn*, 1999. **4**(4): p. 353-64.
23. Lyamichev, V., et al., *Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes*. *Nat Biotechnol*, 1999. **17**(3): p. 292-6.
24. Boom, R., et al., *Rapid and simple method for purification of nucleic acids*. *J Clin Microbiol*, 1990. **28**(3): p. 495-503.
25. Kathryn, M., et al., *Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions*. *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, 1996. **181**: p. 635-644.
26. J, C., *A coefficient of agreement for normal scales*. *Educational and Psychological Measurement*, 1960. **20**: p. 37-46.
27. Kotoula, V., et al., *Targeted KRAS mutation assessment on patient tumor histologic material in real time diagnostics*. *PLoS One*, 2009. **4**(11): p. e7746.
28. Janku, F., et al., *PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e22769.
29. Soulieres, D., et al., *KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies*. *Curr Oncol*, 2010. **17**(Suppl 1): p. S31-40.
30. Yuan, T.L. and L.C. Cantley, *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme*. *Oncogene*, 2008. **27**(41): p. 5497-510.
31. Gupta, S., et al., *Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is*

*required for ras-driven tumorigenesis in mice.* Cell, 2007. **129**(5): p. 957-68.

## 第6章 結論

臨床応用を目指した新規がん遺伝子変異検出方法を開発するにあたり、「高感度化」、「頑健性」、「迅速性」、「臨床性能」、「全自動化」のキーワードを掲げて研究を展開してきた。研究成果として、第2章では、競合ハイブリダイゼーションを利用した新規遺伝子変異検出方法である FRET-PHFA を開発し、変異検出精度及び感度において、既存の検出方法と同等以上の性能を有することを確認した。さらに、第3章では、それらの方法をシカゴ大学医学部と共同で臨床性能評価を行い、種々のがん組織からも *KRAS* 遺伝子変異を検出できることが確認された。これらの結果を持って、凸版印刷の子会社である理研ジェネシス社は、2012年に国内三番目の *KRAS* 遺伝子変異検出キットとして FRET-PHFA を薬事申請し、承認を受けた。その後、ヨーロッパ CE マーク (IVD) も取得することが出来た。現在、国内外に試薬キットを販売している。本研究で開発した手法が実際の臨床検査で使われている。第4章では、カチオン性くし型共重合体を用いて、FRET-PHFA の課題である厳密な温度管理を必要としない、超高速遺伝子変異検出が可能であることを示唆し、わずか終十秒で遺伝子変異を検出できることを確認した。本研究から興味深い知見が得られているため、引き続き厳密化の研究を継続したい。

第5章では、将来的に FRET-PHFA の全自動化を目指し、まずは、実現可能性検証としてインバーダー法を用いた全自動遺伝子検査システム (AMDS) による臨床性能評価をシカゴ大学と共同で行った。本成果をもとに AMDS による *KRAS* 遺伝子変異検出に関して薬事承認準備中である。また、本研究で得られた知見から FRET-PHFA の全自動化についても取り組んでいる。

1984年に発明された PCR[1]は、分子生物学、遺伝子工学の研究手法に革命をもたらし、ゲノム解読ならびに次世代シーケンサーなどの遺伝子配列解析技術革新に主要な役割を果たしてきた。検査の現場からは免疫クロマトグラフィーなどに代表される免疫検査と同

じように“血液1滴を垂らせば結果がわかる遺伝子関連検査”を求める声も強い。そのような現場のニーズに答えるためには、さらなる格段の技術革新が必要である。さらに、ヒトの遺伝子関連検査に関しては、全ゲノムシーケンシングが低価格化し、従来の検出技術にとって変わるのではないかとの声も聞かれるようになっている。このような状況の中、核酸検出技術がさらに簡便化、高精度化、高機能化、低価格化に向け発展することを期待したい。

1. Leslie, A. G., et al., *Polymorphism of DNA double helices*. J Mol Biol, 1980. 143(1): p. 49-72.

## 研究業績

### 論文リスト(主)

1. Kitano, S., Nakayama, M., Yamane, A., Tsukahara, Y., and Amano, M. (2011) Detection of DNA mutations by fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay, *Anal Biochem* 408, 197-205.
2. Kitano, S., Myers, J., Nakamura, J., Yamane, A., Yamashita, M., Nakayama, M., Tsukahara, Y., Ushida, H., Liu, W., Ratain, M. J., and Amano, M. (2013) A novel fully automated molecular diagnostic system (AMDS) for colorectal cancer mutation detection, *PLoS One* 8, e62989.
3. Kitano, S., Yamane, A., Shimada, N., Nakayama, M and Maruyama, A. (2014) Ultra fast Detection of DNA mutations by FRET-PHFA Assisted with Cationic Comb-type Copolymers, *Chemistry Letters*, *In preparation*.
4. Kitano, S., Liu, W., Ratain, M. J., and Nakayama, M. (2014) Clinical validation of FRET-PHFA for personal colorectal cancer treatment, *Anal Biochem*, *In preparation*.

### 論文リスト(参考)

1. 北野史朗. (2013) 全自動遺伝子解析システムによる大腸がん分子標的効果予測, *Medical Science digest*, 39, 284-287.
2. 北野史朗. (2014) 全自動遺伝子解析システムによる大腸がん向けリキッドバイオプシ, *Bio clinica* 29, 80-82.
3. Kitano, S., Iwai, T., Nakayama, M., and Yamada, T. (2015) An Ultrasensitive Molecular Diagnostic Method of Blood Biopsy for Personalized Real-time monitoring of Colorectal Cancer, *Clin Cancer Res*, *In preparation*.

### 学会参加リスト (海外)

1. Kitano, S., Yamane, A., Masahiko, A., Shimada, N., and Maruyama, A. (2010) Ultra fast Detection of DNA mutations by FRET-PHFA Assisted by Cationic Comb-type Copolymers, 37<sup>th</sup> ISNAC, *poster presentation*
2. Kitano, S., Nakamura, J., Yamane, A., Amano, M., Ratain, M. J., and Liu, W. (2010) Simple and cost-effective somatic mutation detection method for clinical cancer treatment, 8<sup>th</sup> AACR-JCA joint conference, *poster presentation*
3. Kitano, S., Myers, J., Amano, M., Ratain, M. J., and Liu, W. (2011) A Novel Fully Automated Molecular Diagnostic System for Personalized Treatment of Colorectal Cancer, ESMO 2011, *poster presentation*

4. Kitano, S., Myers, J., Amano, M., Ratain, M. J., and Liu, W. (2011) A Fully Automated Molecular Diagnostic System Capable of Point-of-Care for Personalized Cancer, ENASCO (EORTC-NCI-ASCO) joint conference, *poster presentation*
5. Kitano, S., Yamane, A., Ratain, M. J., Liu, W., Shimada, N., Maruyama, A., and Amano, M. (2011) A Novel Molecular Diagnostic Method for Personalized Cancer Treatment, 38<sup>th</sup> ISNAC, *poster presentation*
6. Kitano, S., Nakamura, J., Nakayama, M., Ratain, M. J., Liu, W., and Amano, M. (2013) A simple and cost-effective somatic mutation detection method for clinical cancer treatment, AACR-JCA joint conference, *poster presentation*
7. Kitano, S., Nakayama, M., Iwai, T., Yamada, T., and Uchida, E. (2013) An Ultrasensitive Molecular Diagnostic Method for Blood Biopsy in Personalized Treatment of Colorectal Cancer, ESMO (2014), *poster presentation*

#### 学会参加リスト(国内)

1. 北野史朗、Wanqing Liu、Mark J Ratain、天野雅彦 (2011) 大腸がん分子標的治療効果予測のための臨床用体細胞遺伝子変異検出システム(Quimple®)の研究開発、第18回 日本遺伝子診療学会、口頭発表
2. 北野史朗、Wanqing Liu、Mark J Ratain、天野雅彦 (2012) 全自動遺伝子解析システム Quimple による大腸がん組織中の KRAS、BRAF、PIK3CA 体細胞変異遺伝子変異検出 第19回 日本遺伝子診療学会、口頭発表
3. 北野史朗、中山雅人、天野雅彦、松本智司、山田岳史 (2013) 再発性大腸癌患者末梢血中の KRAS 遺伝子変異検出、第20回 日本遺伝子診療学会、口頭発表
4. 北野史朗、中山雅人、松本智司、岩井琢磨、内田英二、山田岳史 (2014) 大腸癌患者末梢血中 KRAS、BRAF 遺伝子変異モニタリングの臨床的妥当性、第21回 日本遺伝子診療学会、口頭発表

#### 特許リスト

1. VEGF 阻害剤長期奏功性予測方法 (平成26年 11月14日 出願)
2. VEGF 阻害剤長期奏功性予測方法 特願2013-237162 (平成25年 11月15日 出願)
3. EGFR 阻害剤感受性予測方法 PCT/JP2014/057556 (平成26年 3月19日 出願)
4. EGFR 阻害剤感受性予測方法 特願2013-057033 (平成25年 3月19日 出願)
5. 標的塩基配列の識別方法 特願2012-508268 (平成23年 3月25日 出願)
6. 遺伝子型の識別方法 特願2011-507005 (平成22年 3月26日 出願)

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた東京工業大学 生命理工学研究科 丸山研究室教授の丸山厚先生、ならびに助教の嶋田直彦先生、また、シカゴ大学医学部教授の Mark Ratain 先生、Jamie Myers 氏、パデュー大学の Wanqing Liu 先生に深く感謝いたします。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた山根明男氏、株式会社理研ジェネシス代表取締役の塚原祐輔氏、日本医科大学付属病院 消化器外科 講師の山田岳史先生、がん研有明病院 消化器センター 化学療法科 医長の篠崎英司先生、凸版印刷株式会社 中山雅人 課長、天野雅彦 部長にも深く感謝します。