

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

氏 名 : 北野 史朗

論文題名 : 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

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

近年、分子標的薬治療では、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、あ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、新たながん個別化医療の道が開けつつある。

次世代のがん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」であると熟考し、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。

本小論の構成は以下の通りである。

第 1 章は序論であり、抗がん剤治療における遺伝子検査の必要性、既存の遺伝子変異検出技術、FRET-PHFA 法の着想、迅速検出のためのツールとして活用を期待できるカチオン性くし型共重合体、そして、本研究の目的について纏めた。

第 2 章では、新規方法論 (FRET-PHFA 法) を開発し、がん細胞由来 DNA 中の KRAS 遺伝子変異を最大 1% の検出感度にて検出可能であることが明らかとなった。また、本方法論を、第三者(検査センター)が、FRET-PHFA 法と既存の KRAS 遺伝子変異検出方法である TheraScreen の比較を行った。TheraScreen 法では、KRAS 遺伝子変異検出の擬陽性や儀陰性が観察されたが、FRET-PHFA では、全て正しく判定することができた。これにより、変異識別に酵素を用いない競合ハイブリダイゼーションを利用したがん遺伝子検出方法の開発に成功した。

第 3 章では、国内薬事承認を視野にいた方法論の臨床性能評価をシカゴ大学医学部と共同で行い、その研究成果について纏めた。大腸がんの臨床検体臨床における遺伝子検査の実現性検証として、大腸がん凍結組織 (n=31)、FFPE サンプル (n=34) の計 65 サンプルから 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 IvaderPlus 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、IvaderPlus と同等、ダイレクトシーケンスよりも高感度に KRAS 遺伝子変異を検出できることが分かった。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、サンプル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結果となった。

第 4 章では、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。

カチオン性くし型共重合体 (PLL-*g*-Dex) を FRET-PHFA の反応系に添加することにより、わずか数十秒で変異を識別できることが明らかとなった。カチオン性くし型共重合体未添加の系では、高速 (100°C/min) にて温度を降下させることにより遺伝子増幅サンプルと標識 DNA の間で Hetero-Duplex が多く形成され、一塩基識別能が著しく損なわれた。しかし、PLL-*g*-Dex のバックボーンポリマーであるポリリシンの分子量を 5,000 以上にするることにより、高速に温度を降下させても一塩基識別能を確保していることが分かった。本検討により FRET-PHFA の課題であった厳密な温度制御の必要がなくなり、迅速遺伝子診断の可能性が期待できる結果を得た。

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ベータ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。それらの不一致のサンプルをクローニング解析し、全て組織切片中に変異があることを確認した。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、労力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た。

第 6 章では本小論の総括を行い、本研究の今後の展望について述べた。

〔作成要領〕

1. 用紙はA4判上質紙を使用すること。
2. 原則として、文字サイズ10.5ポイントとする。
3. 左右2センチ，上下2.5センチ程度をあげ，ページ数は記入しないこと。
4. 要旨は2,000字程度にまとめること。
(英文の場合は，2ページ以内にまとめること。)
5. 図表・図式等は随意に使用のこと。
6. ワードプロ浄書すること（手書きする場合は楷書体）。

この様式で提出された書類は，「九州大学博士学位論文内容の要旨及び審査結果の要旨」の原稿として写真印刷するので，鮮明な原稿をクリップ止めで提出すること。