

# 令和元年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目： 新領域開拓

研究期間： 令和 元年 10月～令和 2年 3月

研究課題名： 肺癌ドライバー変異検査キットの開発

ラボ長

所属： 物質創成専攻機能物質化学領域

氏名： 鈴木 啓一郎

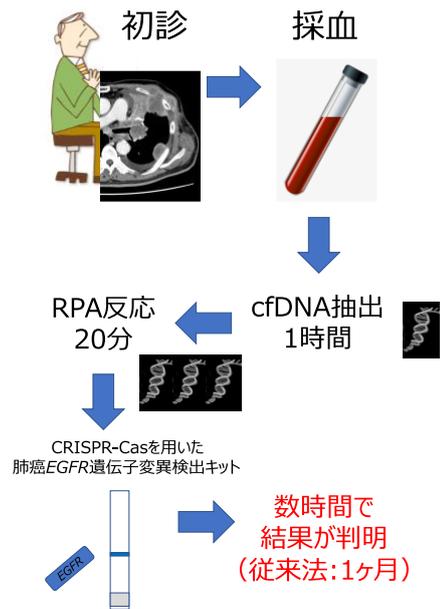
## 研究成果

日本人の男性癌死亡原因の第一位である肺癌は、治療薬の存在する遺伝子変異（ドライバー変異）を最も多く有する癌種であり、使用可能な分子標的薬剤の種類も最も多い固形癌でもある。ドライバー変異を有する場合には特異的に抗癌作用を発揮する分子標的薬剤を使用することができるため、肺癌の治療方針として、ドライバー変異の有無を解析する診断薬（コンパニオン診断薬）を用い、迅速に検査することが極めて重要である。しかしながら、現在のコンパニオン診断薬は個々のドライバー遺伝子変異をそれぞれ異なる遺伝子解析手法にて個別に検出するため、検査費用が高く且つ原因遺伝子の確定までに要する時が一ヶ月程度かかるなどの欠点が存在する。

近年、ゲノム中の特定の遺伝子配列を特異的に認識する CRISPR-Cas を利用した遺伝子工学技術『ゲノム編集技術』が誕生し、臨床応用へ向けた研究が進んでいる。本技術を応用することにより、特定の配列（遺伝子変異）をアトモル濃度（ $10^{-18}$  mol）レベルの高感度に検出できることが確認された

(Gootenberg et al, Science 2017)。このシステムの最大の利点は、採血だけで済むこと、末梢血から抽出した DNA 中の変異遺伝子を検出できる感度があること、変異の検出まで数時間程度で済むこと、また検査にかかる費用も従来に比べて極めて安価に抑えられることが挙げられる。しかしこれまでの研究は基礎段階にあり、癌診療における応用については実用的な段階ではない。

本研究は、CRISPR-Cas を用いた変異認識方法を肺癌変異に最適化し、癌患者の末梢血に含まれる微量の腫瘍由来 DNA から治療薬の存在する複数の肺癌関連遺伝子変異を迅速（3 時間以内）かつ簡易的に検出する検査方法を確立し、臨床応用まで進めることで、次世代の癌診断技術を確認することを目的とする（右図）。特に本研究課題では、日本人の肺癌のドライバー変異の約半数（55%）を占める EGFR 遺伝子変異を対象を絞り、検出システムの構築から臨床検体での真価の検討までを行い、臨床応用可能な簡便な検出キットの作製を目指す。研究体制としては、CRISPR-Cas を利用した遺伝子工学の研究者である研究代表者グループ（鈴木啓一郎・坂東裕哉）が EGFR 遺伝子変異検出システムを開発し、肺癌臨床に 10 年以上携わっており日本有数のがんセンターである大阪府立病院機構大阪国際がんセンターで勤務している共同研究者（國政啓）が臨床検体を準備することでシステム評価を行う。



### 肺癌遺伝子変異検査キットの開発

末梢血中に微量に存在するセルフリーDNA より肺癌関連遺伝子を増幅し、CRISPR-Cas を応用した検査用ストリップを用いることで、肺癌ドライバー変異の有無を数時間以内に判定する技術の開発。

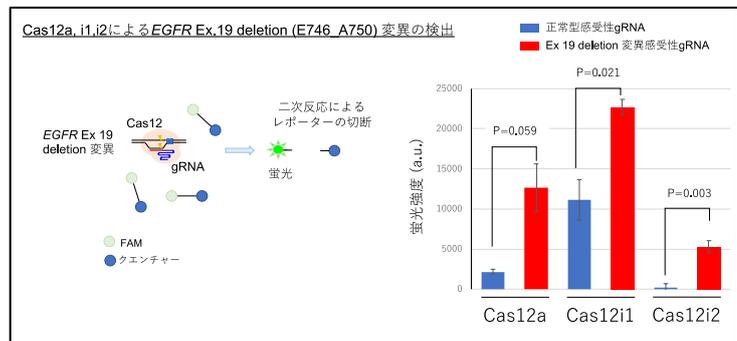
上記の研究目的を達成するために、令和元年度は以下の研究に取り組み、成果を挙げた。

・Cas タンパク質/gRNA の精製：CRISPR-Cas は RNA 誘導型ヌクレアーゼであり、Cas タンパク質がガイド RNA（gRNA）と呼ばれる標的配列と相同な配列を含む short RNA と結合し、標的配列（DNA

もしくは RNA) を認識・切断する。CRISPR-Cas は、ファージなどの外来性遺伝子の侵入に対して細菌・古細菌が備える獲得免疫機構であり、遺伝子群を形成する複合体の構造から 6 つのサブクラスに分類される (Type I-VI)。最近、Type V に属する Cas12a, Cas14 は DNA を、Type VI に属する Cas13a は RNA を標的とした非特異的切断活性を有することが明らかになった。つまり、標的となる特定の DNA/RNA 配列が存在すると、その配列を特異的に切断すると同時に二次的な反応として非標的配列をランダムに切断する。この特性を利用し、切断されると蛍光を発するレポーター分子を試験管内の反応液中に混和するだけで、極めて迅速に標的配列の有無が蛍光で検出できる複数の方法が報告された (Gootenberg et al, Science 2017; Chen et al, Science 2018; Harrington et al, Science 2018)。

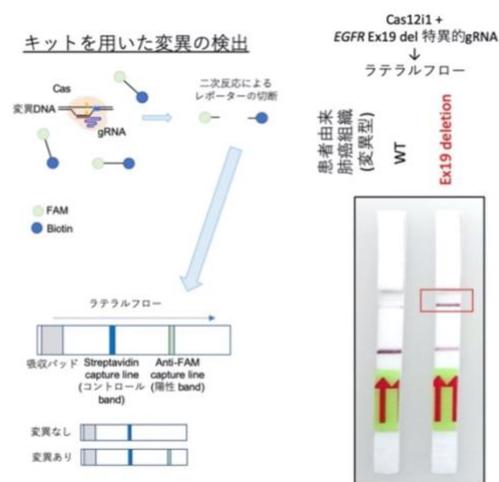
本研究では、複数の Cas タンパク質を比較するため、DNA を認識する Type V に属し、複数の生物由来の Cas タンパク質が同定されている Cas12 family に注目した。本年度の研究成果として、既存の Cas12a に加え、これまでに報告されていない Cas12c1, Cas12c2, Cas12g, Cas12i1, Cas12i2 の合計 6 種類の Cas タンパク質を大腸菌内で発現させ精製した。EGFR 遺伝子変異には多数の variant が存在するが、最も頻度の高い (44.8%) EGFR Ex. 19 del 変異のみを特異的に認識するために必要な gRNA を各 Cas タンパク質ごとに作製した。

・**蛍光レポーターアッセイを用いた EGFR 変異検出系の確立:** 精製した 6 種の Cas12 タンパク質と gRNA に加え、標的配列が切断されると蛍光を発するレポーター分子を試験管内で反応させる。標的として、EGFR 遺伝子変異を添加した時のみ蛍光を発する Cas/gRNA の組み合わせを同定する。標的配列は肺癌変異培養細胞由来 DNA を用いた。本年度の研究成果として、使用した 6 種類の Cas タンパク質のうち、Cas12a, Cas12i1, Cas12i2 タンパク質



を用いて、最も頻度の高い EGFR Ex. 19 del (E746\_A750) 変異の特異的な検出に成功した (上図)。

・**EGFR 遺伝子変異簡易検出キットの開発:** 臨床応用を目指し、簡便な検査方法とするため、開発した CRISPR-Cas を用いた肺癌ドライバー変異検出システムを簡易キット化するにあたり、肺癌ドライバー変異検出システムをラテラルフローに搭載した。ラテラルフローとは、ニトロセルロース製ストリップからなる安価なパッドで、妊娠や糖尿病検査等数多くの診断試験で用いられている。原理的には吸収パッドより吸い上げられたサンプルがストリップ上を移動し、CRISPR-Cas により変異が検出された時のみレポーター分子が切断されバンド上に捕捉され可視化される。本年度の研究成果として、開発したキットを用いることで、患者由来肺癌組織の DNA から変異の検出に成功した (右図)。



以上のように本年度は CRISPR-Cas システムを用いた肺癌ドライバー変異検査キットのプロトタイプ作製に成功した段階である。ただし、現状のプロトタイプではバンドによる変異判別能が高くないため、令和 2 年度以降は患者の末梢血由来の微量なセルフリー DNA から変異を検出可能とする高感度のキット開発と臨床応用を目指す。

キーワード：遺伝子工学、ゲノム編集、CRISPR、肺癌、個別化医療

#### 研究経費（R1年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	911,227 円	0 円	0 円	87,773 円	999,000 円

#### 共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

國政 啓・大阪府立病院機構大阪国際がんセンター呼吸器内科

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

坂東 裕哉・大阪大学基礎工学研究科・学部4年生

#### 発表論文等（令和2年3月31日現在）

研究代表者および主な共同研究者の研究業績のうち、本研究課題に関連するもののみを、現在から順に発表年次を過去に遡って記入してください。

〔雑誌論文〕 該当なし

〔著書〕 該当なし

〔学会発表〕 該当なし

〔その他〕 該当なし

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

申請中：AMED 次世代がん医療創生研究事業令和2年度一次公募

#### 参考となるHP等

該当なし