

令和2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 2年 4月～令和 3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

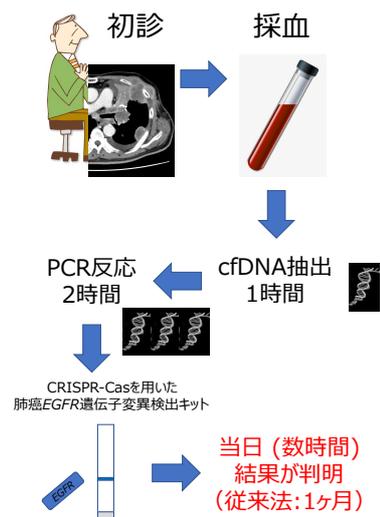
研究成果

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**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、2020年ノーベル化学賞へと発展した。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) かつ簡易的かつ高感度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立することを目的とする (上図)**。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。

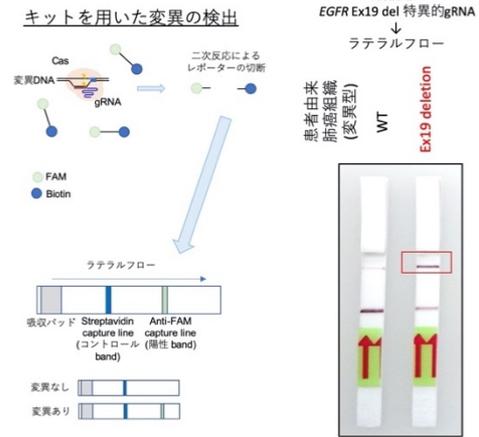
令和元年度は複数の Cas タンパク質を比較するため、既存の Cas12a に加え、これまでに報告されていない Cas12c1, Cas12c2, Cas12g, Cas12i1, Cas12i2 の合計6種類の Cas タンパク質を大腸菌内で発現させ精製した。*EGFR* 遺伝子変異には多数の variant が存在するが、最も頻度の高い (44.8%) *EGFR* Ex. 19 del (15塩基の欠失) 変異のみを特異的に認識するために必要な gRNA を作製した。使用した6種類の Cas タンパク質のうち、**Cas12a, Cas12i1, Cas12i2 タンパク質を用いて、*EGFR* Ex. 19 del (E746_A750) 変異の特異的な検出能を持つことを確認した。**さらに臨床応用を目指し、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



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。

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。開発したプロトタイプキットを用い、患者由来肺癌組織の DNA から *EGFR* Ex. 19 del 変異の検出に成功した (右図)。



本年度(令和2年度)は臨床応用へ向け研究参加者を増強し、以下の研究成果を挙げた。

・ *EGFR* Ex. 19 del 変異の超高感度検出条件の検討: 昨年

度構築した *EGFR* Ex. 19 del 変異検出システムを最適化し、より高感度に検出できる条件の検討を行なった。本年度は新たに Type I に属する Cas3 タンパク質を共同研究者(東京大学・真下教授)より入手し、様々な条件化で定量的に比較検討を繰り返した結果、4種類の Cas タンパク質で当該変異を検出可能となり、特に Cas12i2 では 0.1% の極微量の変異 DNA の存在を検知できるようになった (Fig. 1)。本研究で標的検体とする末梢血中には肺癌細胞由来の変異型 DNA がセルフリー DNA (cfDNA) として極微量含まれており、これを検出する必要がある。PCR 法により変異領域を含む *EGFR* 遺伝子断片を増幅する場合、正常細胞 cfDNA 由来の正常型 *EGFR* 遺伝子が増幅されてしまい、検出感度が下がる原因となる。これを解決するため、微量に存在する変異型 DNA を特異的に増幅することで高感度化を目指した。様々な条件を検討した結果、正常型 DNA と相補的な RNA を PCR 反応液中に投与する ORNi-PCR 法 (Tanigawa et al, PLOS ONE 2014) を用いることで、**変異型 DNA を従来の 12 倍程度特異的に増幅することに成功**し、高感度化の基盤技術を確認した (Fig. 2)。

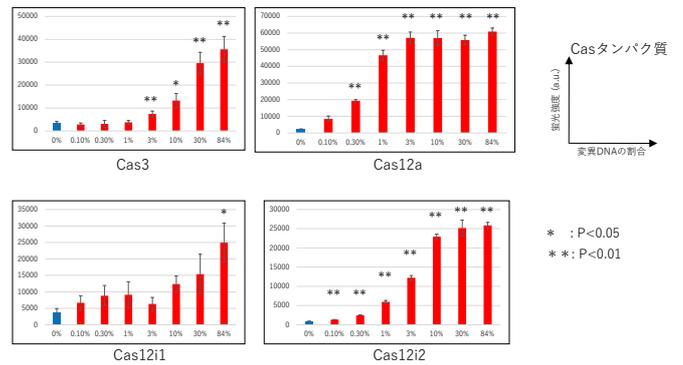


Fig.1 *EGFR* Ex.19 del 変異の検出能力の定量的解析

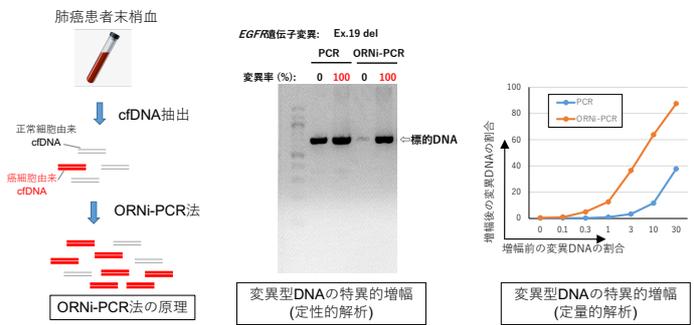


Fig.2 ORNi-PCR法を用いた *EGFR* Ex.19 del 変異の特異的増幅

・ *EGFR* L858R 変異, T790M の検出: 上記のように 15 塩基欠失 (*EGFR* Ex. 19 del 変異) の認識に成功した。本年度はより高精度の塩基識別能力が求められ、Ex. 19 del 変異に次ぐ 2 番目に頻度の高い *EGFR* 遺伝子変異である L858R 変異の検出を目指した。3 種類の Cas タンパク質、2 種類の gRNA の組み合わせを用いた結果 Cas12a/gRNA②の組み合わせで L858R 変異の検出に成功した。また 0.3% の微量の変異 DNA の検出にも成功した (Fig. 3a)。更に、新たに Cas3 タンパク質を用いることで、同じく 1 塩基置換タイプである T790M 変異の検出にも成功した (Fig. 3b)。

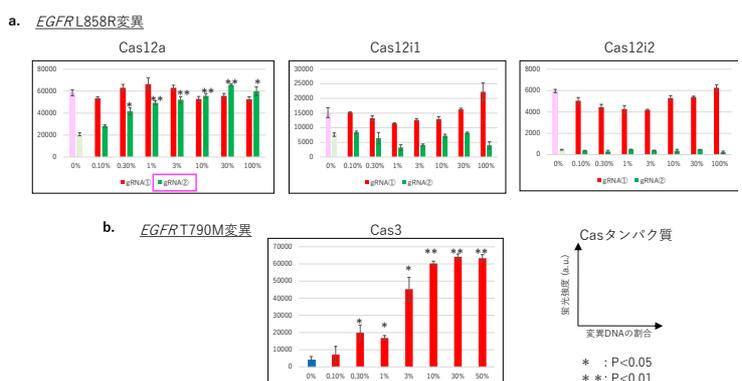


Fig.3 *EGFR* L858R 変異, T790M の検出

・肺癌患者末梢血検体を用いたキットによる変異検出: 上記の特異的変異検出できる CRISPR システムをラテラルフローに搭載し簡易検出キットを作製した。肺癌患者検体を使用するにあたり、本年度は本学倫理委員会の承認を得た(大阪大学研究倫理委員会承認番号 889)。共同研究者(大阪府立病院機構大阪国際がんセンター・國政啓先生)が臨床検体を準備し、EGFR 遺伝子 Ex. 19 del 変異、L858R 変異、T790M 変異の簡易キットでの検出に成功した(Fig. 4)。また肺癌患者の末梢血から抽出した cfDNA を用い、Ex. 19 del 変異と L858R 変異の検出に成功した。

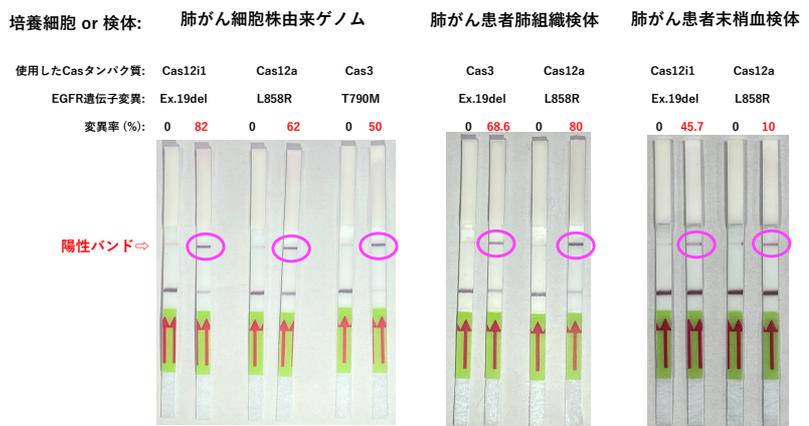


Fig.4 EGFR簡易キットによる変異検出

以上のように本年度は肺癌患者の末梢血を含む検体に対して

ドライバ変異検査キットを用いて(EGFR 変異の約 90%を占める)3 種類の変異に成功した段階にある。ただし、使用した患者サンプルは肺癌末期段階の患者由来であり、変異 DNA の割合が高い。令和 3 年度以降は上記の ORNi-PCR 法などと組み合わせ、初期肺癌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、論文化、大型研究費獲得並びに臨床応用を目指す。超高度 (0.01%以下)の変異検出能を持たせることで、肺癌初期段階での早期診断方法となりうるか検討し、将来的には定期健康診断時の血液検査で検出可能な医療技術とすることも視野に入れて研究を進める。

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 (R2 年度) の内訳

| 備品費 | 消耗品費 | 旅費 | 謝金 | その他 | 合計 |
|----------|-----------|-----|-----|-----------|-------------|
| 29,040 円 | 703,144 円 | 0 円 | 0 円 | 936,816 円 | 1,669,000 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

真下 知士・東京大学医科学研究所

(2) 研究協力者 (氏名・所属・学年 (学生の場合))

坂東 裕哉・大阪大学大学院基礎工学研究科修士課程 1 年生

高島 聖真・大阪大学大学院基礎工学研究科修士課程 1 年生

発表論文等 (令和 3 年 3 月 31 日現在)

[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

該当なし

参考となるHP等

該当なし