

研究種目：新領域開拓

研究期間：令和3年4月～令和4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、臨床応用へ向けた研究も進んでいる。当該システムは、人工ヌクレアーゼである Cas タンパク質と標的配列に相補的なガイド RNA (gRNA) を用いた最新のゲノム編集ツールである。任意の配列を標的に結合や切断を行い、ゲノム配列を自由に認識及び改変する技術であり、特別な技術や設備がなくても容易に作製可能であることから、生命科学研究に多大な影響を及ぼした。最近、複数の Cas タンパク質が DNA または 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 他)。

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かつ簡易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 (図 1)。**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。

前年度までの報告では、1) 複数の Cas タンパク質と gRNA を作成し、様々な *EGFR* 遺伝子変異に対する活性をスクリーニングした結果、Cas12a、Cas12i1、Cas12i2 タンパク質が *EGFR* Ex. 19 del (E746_A750)、L858R、T790M 変異を検出することが明らかになった。2) さらに上記の肺癌ドライバー変異検出システムを簡易キット化するため、肺癌ドラ

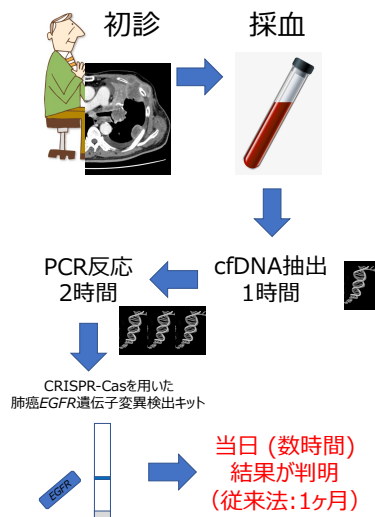


図1 肺癌遺伝子変異検査キットの開発

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。

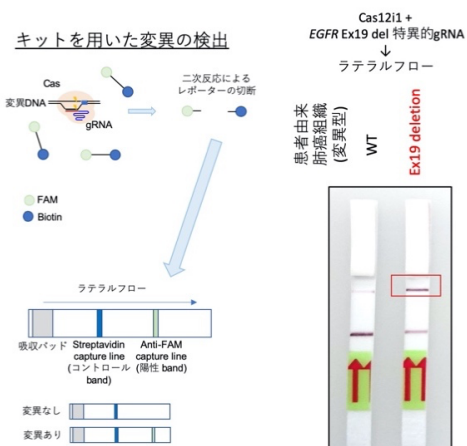


図2 検査キットの原理と患者検体の検出

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。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原理である。本研究で *EGFR* 変異簡易検出キットを開発し、機能評価を行なった結果、患者由来肺癌組織の DNA 及び一部末梢血検体から (*EGFR* 変異の約 90%を占める) 3 種類の変異の検出に成功した (図 2)。

本年度(令和 3 年度)は臨床応用へ向け、更なる高感度化を目指した。また患者末梢血由来の検体を用い、以下の研究成果を挙げた。

・ **gRNA 作製方法の検討:** 本システムで変異を認識する機能を担う gRNA は、RNA の鋳型となるオリゴ DNA を用いて *In vitro* transcription 法により short RNA を発現させる転写合成で調製していた。しかしこの調製方法では 2 本鎖 RNA も転写合成される可能性が指摘されてきた (Xin M et al, *NAR* 2018)。そこでホスホロアミダイト法により化学合成された RNA を用いることを検討した。*EGFR*

遺伝子 Exon19 の 15 塩基対欠損変異の検出系で転写合成 gRNA と化学合成 gRNA の検出能を比較した結果、当該変異を検出可能な Cas12a、Cas12i1、Cas12i2 タンパク質すべてにおいて化学合成 gRNA を用いることで検出感度が上昇し、さらに WT 配列に対する切断も抑制できることから、以降の実験では化学合成 gRNA を用いることとした (データ省略)。

・ **ORNi-PCR を用いた *EGFR* 変異の超高感度検出条件の検討:** 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、阻害物質として正常型 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、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。 *EGFR* Ex.19 del

(E746_A750)、L858R、T790M の 3 つの変異に対して様々な阻害 RNA 等で最適条件を検討した結果、それぞれの変異に対して変異型 DNA を従来の数倍～十倍程度特異的に増幅することに成功した。さらに増幅産物を用いて本システムで変異検出を行なったところ、従来法の 10 倍～100 倍高感度で変異を検出することに成功した (図 3)。また検出限界は 0.03%～0.1%であり、ごく微量の変異 DNA を検出できる系の開発に成功した。

検出能の向上 (15塩基対欠損変異)

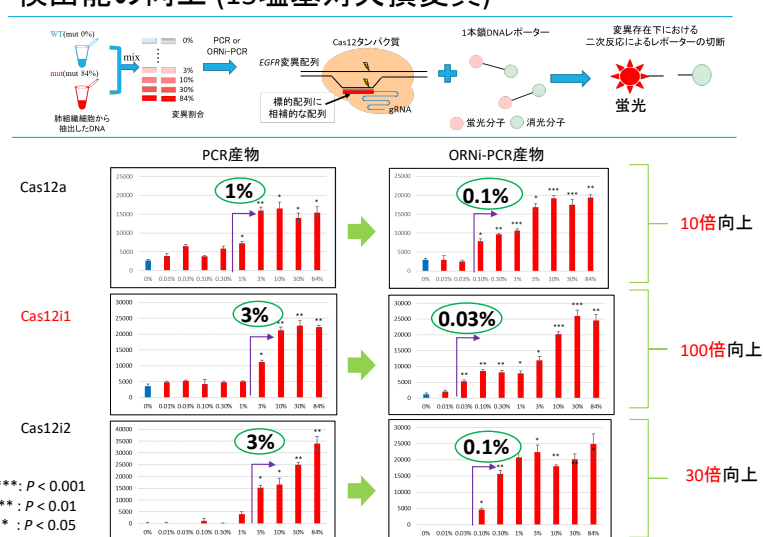


図 3 ORNi-PCR を用いた *EGFR* 変異の超高感度検出
一例として *EGFR* Ex. 19 del (E746_A750) 変異に対する検出感度

表1 肺癌患者における *EGFR* 遺伝子変異診断結果

ID	<i>EGFR</i> mutation type	Guardant結果 (VAF*)
1	<i>EGFR</i> Ex.19 del (L.747_T.751)	<i>EGFR</i> L.747_T.751deletion (4.9)
	<i>EGFR</i> T790M	<i>EGFR</i> T790M (4.6)
2	<i>EGFR</i> L858R	<i>EGFR</i> L858R (3.0)
3	<i>EGFR</i> WT	<i>EGFR</i> WT
4	<i>EGFR</i> L858R	<i>EGFR</i> L858R (11.9)
5	<i>EGFR</i> WT	<i>EGFR</i> WT
6	<i>EGFR</i> Ex.19 del (E746_A750)	<i>EGFR</i> E746_A750deletion (53.1)
7	<i>EGFR</i> L858R	検出限界以下
10	<i>EGFR</i> Ex.19 del (E746_A750)	検出限界以下

*Variant allele frequencyの略。つまり変異率を表す。

・肺がん患者末梢血を用いた *EGFR* 変異の超高感度検出条件の検討: 本学研究倫理委員会で承認されたヒトゲノム研究指針(大阪大学研究倫理委員会承認番号 889)に基づき、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8名の肺癌患者から内視鏡により肺腫瘍組織を採取した。従来のコンパニオン診断薬により *EGFR* 遺伝子変異を診断した結果、*EGFR* 遺伝子変異なし2名、*EGFR* Ex. 19 del 変異3名、*EGFR* L858R 変異3名、*EGFR* T790M 変異1名(患者 ID#1 は *EGFR* Ex. 19 del 変異と T790M

変異両方を有する)であることが判明した(表1)。これらの患者から末梢血を採取し、cfDNAを調整した。本技術の比較対象として、末梢血由来の cfDNA より最新の診断法(Guardant360)で遺伝子診断を行なったところ、患者 ID#7(L858R 変異)、#10(Ex. 19 del 変異)に関しては、末梢血から変異が検出できなかった。一方、本研究で開発した診断法を用いることで、全ての患者から遺伝子変異を短時間で検出することができた(図4)。

以上のように本年度は、肺がん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診断キット開発に成功した。現在、論文投稿準備中である。さらに短時間(〜3時間)、安価(一検体あたり約600円)かつ高感度(0.1%以下の極微量の変異DNAを検出することに成功)であることから(図3)、令和4年度は通常の検査方法では検出できない早期肺癌患者の検出に挑戦し、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予定である。

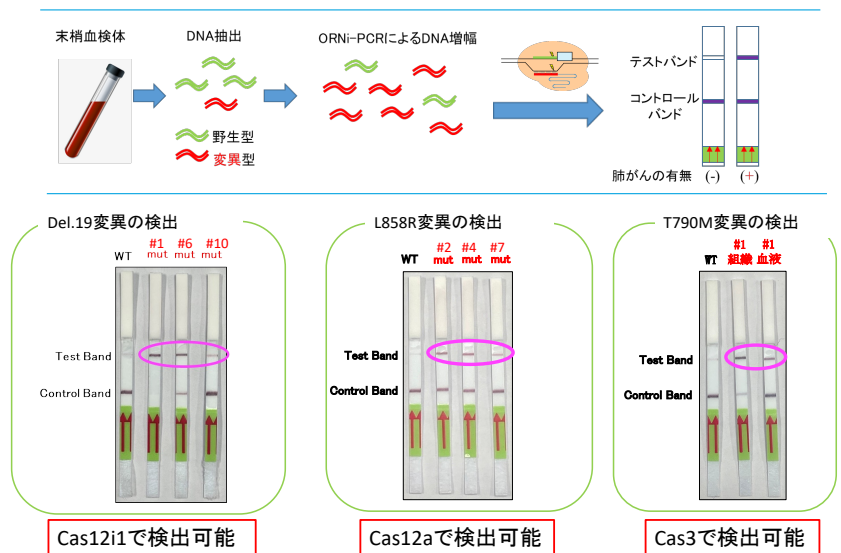


図4 開発した *EGFR* 変異検出キットを用いた肺癌患者末梢血サンプルからの遺伝子変異検出

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（R3年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	465,200 円	0 円	0 円	346,800 円	812,000 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2年生

高島 聖真・大阪大学大学院基礎工学研究科修士課程2年生

発表論文等（令和４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

公益財団法人旭硝子財団 2022 年度採択「研究奨励」申請中

参考となるHP等

該当なし