

令和 5 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
研究課題名	癌遺伝子変異高感度・高精度解析技術の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：産業理工学部生物環境化学科・藤井政幸 共同研究者：農学部生物機能科学科・北山隆 産業理工学部生物環境化学科・神武洋二郎	

1. 研究目的・内容

申請者が独自に開発した新規 PCR 法を利用して、癌ゲノム医療に不可欠な癌遺伝子の変異を高感度・高精度かつ迅速・簡便・安価に検出できる技術を開発し、癌遺伝子変異解析コンパニオン診断キットとしての実用化を目指す。開発した新規 PCR 法では化学修飾プライマーとプルーフリーディングポリメラーゼを組み合わせて遺伝子 DNA の一塩基変異を高感度 (1 サンプル中 10 コピー)・高精度 (野生型遺伝子中 0.01%の野生型遺伝子) に検出できる。本研究ではリキッドバイオプシーによる血液循環腫瘍 DNA(ctDNA)の解析を想定した血漿中の微量 DNA を解析し、同様の検出感度 (1 サンプル中 10 コピー)・検出精度 (野生型遺伝子中 0.01%の野生型遺伝子) を目指す。さらに、同一細胞中での野生型および変異型 mRNA の定量解析を可能にするため、標的 RNA を試料とした RT-PCR(逆転写 PCR)法による定量解析法の開発を目指す。

2. 研究経過及び成果

(1) 高感度・高精度 PCR 法のための新規化学修飾プライマーの探索 (藤井・北山)
 ホスホロチオエート骨格(PS)、2'-O-MeRNA、LNA、2'-O-MOERNA、BNA などの化学修飾核酸を組み入れたプライマーと各種 DNA ポリメラーゼとの組み合わせによる一塩基変異特異的 PCR 法の開発を検討した結果、2'-O-MeRNA(POM)および BNA(POB)を組み入れたプライマーと 3'-エクソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼの組み合わせにより目標とする一塩基変異特異的 PCR 法の開発に成功した。KRAS 遺伝子の第 12 コドン 35 位の変異を解析したところ、検出感度 $8.3 \times 10^{-13} \mu M$ (1 サンプル中 10 コピー)、変異識別精度 0.01% (野生型に混在する変異型の比率) で 4 種類の一塩基変異を完全に識別できた。POM では 30 サイクル以下、POB では 45 サイクル以下では目的外の遺伝子は全く検出されなかった。また、同一検体中に野生型遺伝子と変異型遺伝子が混在する場合でも 0.01%の変異型遺伝子のみを濃度依存的に検出できることも分かった。Scorpion-ARMS 法や TaqMan プロブ法等の既存のがん遺伝子変異診断に使用されているコンパニオン診断薬では検出限界は 1 サンプル中 50-100 コピー、変異識別精度限界は TaqMan プロブ法とその改良法 10%~1%、Cleavage 法 7.5%、PNA-LNA Clamp 法 1%、Scorpion-ARMS 法 1%であり、本技術は既存のコンパニオン診断薬の性能を大きく上回っている。
 今後、同様の化学修飾プライマーを用いて他の癌ドライバー遺伝子 EGFR や TP53 などの様々なタイプの変異の検出を評価するとともに新たな化学修飾核酸を組み入れたプライマーを用いて評価し、さらには、実検体に近い血漿中にスパイクインした模擬検体を用いて検出感度や変異検出精度を評価する。

(2) RNA 検体からの RT-PCR による検出感度、検出精度の評価 (藤井・北山)
 2'-O-MeRNA(POM)を組み入れたプライマーと 3'-エクソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメ

レーザーを組み合わせた RT-PCR 反応による検出感度、変異検出精度の検証を行った。その結果、DNA 検体を用いた場合と同様の検出感度 1 サンプル中 10 コピー、変異検出精度 0.01% を保持していることが証明できた。

(3) RT-PCR 法による新型コロナウイルスオミクロン株 BA.1、BA.2、BA.5 の検出 (藤井・神武)

本アレル特異的 PCR 法を新型コロナウイルスの変異株検出に応用し、同ウイルススパイクタンパク mRNA の cDNA をテンプレートとして 1355 位と 1486 位の 2 つの変異を同時に検出する化学修飾プライマーを用いて検証を行ったところ、検出感度 $8.3 \times 10^{-13} \mu\text{M}$ (10 コピー)、変異検出精度 0.01% で変異株を検出できた。既存法では変異点を 1 つずつ検出するが、本技術ではスパイクタンパク mRNA 1355 位と 1486 位における 2 つの変異をフォワードプライマーとリバースプライマーのそれぞれの 3'-末端で同時に検出することで、オミクロン株 BA.1、BA.2、BA.5 を一度の PCR 反応で識別できることが判明した。また、同様のプライマーと化学修飾プライマーを用いて RNA をテンプレートとしたワンステップ RT-PCR 反応でも、同様の検出感度 $8.3 \times 10^{-13} \mu\text{M}$ (10 コピー)、変異検出精度 0.01% でオミクロン株 BA.1、BA.2、BA.5 を一度の PCR 反応で識別できた。このことにより、化学修飾プライマーは逆転写酵素のプライマーとしても検出感度の低下を招くことなく機能していることが示された。実検体での実証実験により近づく成果である。

(4) 癌細胞から抽出した全 mRNA からの RT-PCR による検出精度の評価 (藤井・神武)

培養細胞(HeLa 細胞, PK-45H 細胞)から全 mRNA を抽出、逆転写酵素により cDNA を合成、未修飾プライマー (PO) および化学修飾プライマー (POM) を用いる RT-PCR 法により、HeLa 細胞中に発現する *KRAS^{wt}* mRNA および PK-45H 細胞に発現する *KRAS^{G12D}* mRNA を定量し、比較した。その結果、従来法の未修飾プライマー (PO) を用いると HeLa 細胞中に本来発現していない *KRAS^{G12D}* mRNA が検出され、PK-45H 細胞中に発現していない *KRAS^{wt}* mRNA も検出されており、*KRAS^{wt}* mRNA および *KRAS^{G12D}* mRNA を独立に定量解析できないことがわかった。一方、本技術の化学修飾プライマー (POM) を用いると、HeLa 細胞中では *KRAS^{G12D}* mRNA は検出されず、PK-45H 細胞中では *KRAS^{wt}* mRNA は検出されなかったことから、両者を独立して定量解析可能であることが示された。また、細胞抽出液に含まれる夾雑物等により PCR 反応が阻害されないことも証明された。この研究成果により本技術は「癌遺伝子変異解析キット」「SNPs 解析キット」として既存製品の機能をはるかにしのぐものであることが実証され、商品化への期待がさらに大きくなったと言える。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

- (1) 化学修飾プライマー POM, POB を用いて他の癌ドライバー遺伝子 EGFR や TP53 などの様々なタイプの変異の検出を評価する。
- (2) 新たな化学修飾核酸 POL, POMOE を組み入れたプライマーを用いて KRAS 遺伝子変異検出の検出感度、一塩基識別精度を評価する。
- (3) 実検体に近い血漿中に KRAS 遺伝子をスパイクインした模擬検体を用いて検出感度や変異検出精度を評価する。
- (4) 共同研究先を探して実検体を用いてがん遺伝子変異検出の検出感度、一塩基識別精度を評価し、「癌遺伝子変異解析キット」「SNPs 解析キット」として商品化する可能性を検証する。さらにリキッドバイオプシーのためのコンパニオン診断薬としての商品化の可能性を検証する。
- (5) 共同研究先を探して実検体を用いて新型コロナウイルス変異株検出の検出感度、一塩基識別精度を評価し、「新型コロナウイルス変異株検出キット」として商品化する可能性を検証する。
- (6) 鳥インフルエンザウイルスやその他のウイルスの実検体を用いて検出感度、一塩基識別精度を評価し、「ウイルス変異株検出キット」として商品化する可能性を検証する。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
第 40 回日本薬学会九州山口支部大会 Regulation of mRNA Using ASO- Regnase-1 Binding Motif	ポスター発表	2023 年 11 月 18 日
第 40 回日本薬学会九州山口支部大会 化学修飾プライマーを用いる新規アレ	ポスター発表	2023 年 11 月 18 日

ル特異的 PCR 法による KRAS 遺伝子変異の高感度・高精度検出		
第 40 回日本薬学会九州山口支部大会 化学修飾プライマーを用いる PCR 法による癌遺伝子変異、SARS-CoV-2 変異株の高感度・高精度検出法	ポスター発表	2023 年 11 月 18 日
Advances in Noncanonical Nucleic Acids 2023 Crosstalk between Chemical Biology and Structural Biology of RNA Interference	招待講演	2023 年 10 月 18 日
The 50th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry A Novel Regulation Method of mRNA Using RNA Stem-Loop Motif	ポスター発表	2023 年 11 月 1 日
第 35 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 化学修飾プライマーを用いる新規アレル特異的 PCR 法	ポスター発表	2023 年 7 月 28 日
日本薬学会第 143 年会領域融合セッション Effect of 5'-Modification of siRNA on the Asymmetry Recognition and the Elimination of Off-Target Effect	ポスター発表	2023 年 3 月 28 日
日本薬学会第 143 年会 5'-末端修飾による siRNA 非対称性認識への影響とオフターゲット効果の回避	ポスター発表	2023 年 3 月 27 日
Anticancer Research Histone H1.2 Represses the Transcription of the p16 Tumor Suppressor Gene.	国際学術論文	2023 年 8 月
The 30 th FAOBMB & 8 th BMB Conference The cell cycle regulation by long noncoding RNAs.	ポスター発表	2023 年 11 月 23 日
近畿大学大学院サイエンスネットワーク 2023・第 11 回院生サミット 頭頸部癌及び大腸癌細胞における長鎖ノンコーディング RNA, OIP5-AS1 の機能解明.	ポスター発表	2023 年 8 月 31 日
第 60 回化学関連支部合同九州大会 長鎖ノンコーディング RNA, OIP5-AS1 による癌細胞増殖制御機構の解明.	ポスター発表	2023 年 7 月 1 日
第 60 回化学関連支部合同九州大会 レスベラトロール誘導体による癌細胞増殖抑制効果の検証と作用機序の解明.	ポスター発表	2023 年 7 月 1 日
Carbohydrate Polymers Technologies and Applications A boron dipyrromethene-derivative fluorescent probes for β -cyclodextrin and maltooligosaccharide hydrophobicity recognition	国際学術論文	2024 年 3 月 18 日

日本化学会 第104 春季年会 (2024) 酸性条件下におけるアレン型ゼルンボンの環化反応に関する量子化学的研究	ポスター発表	2024 年 3 月 25 日
日本農芸化学会 2024 年度大会 BODIPY の誘導体化によるハイブリッド蛍光色素合成および疎水性相互作用を利用したオリゴ糖の定量	口頭発表	2024 年 3 月 25 日
日本農芸化学会 2024 年度大会 生物活性向上を指向したアルギニンオリゴマー結合型ゼルンボン誘導体の合成	口頭発表	2024 年 3 月 25 日
日本農芸化学会 2024 年度大会 ジプロモゼルンボン誘導体の反応性を利用した多環式化合物の構築	口頭発表	2024 年 3 月 25 日
日本農芸化学会 2024 年度大会 新規機能性物質創製に向けて: 光学活性をもつキラルゼルンボン誘導体の創製	口頭発表	2024 年 3 月 25 日
日本農芸化学会 2024 年度大会 植物化学物質であるゼルンボンから誘導体化された高反応性アレン型ゼルンボンの Bronsted 酸誘導による渡環反応	口頭発表	2024 年 3 月 25 日
日本農芸化学会 2024 年度大会 リパーゼを用いたゼルンボール誘導体の立体選択的トランスエステル化	口頭発表	2024 年 3 月 26 日
近大附中新聞 製作協力: 産経新聞大阪本社 植物が作る化学物質 秘めた可能性を発信	新聞	2024 年 3 月 31 日
じっきょう ～新たな機能を創造するこれからの合成化学: クリックケミストリー～	雑誌	2023 年 4 月 1 日