

イヌの尿路上皮がんおよび前立腺がんにおける遺伝子変異の 簡単で高感度な新規検出方法

奥村 史朗*¹ 大里 義治*²

A Novel Rapid Detection Method for a Single-nucleotide Substitution Mutation Derived from Canine Urothelial and Prostatic Carcinoma Cells

Shiro Okumura and Yoshiharu Ohsato

イヌの尿路上皮がん及び前立腺がんの早期発見のために、これらのがん固有で既知の BRAF 遺伝子における一塩基置換変異を簡便かつ迅速に検出する方法を開発した。尿沈査に含まれるがん細胞の変異検出はペットのがんの早期診断に有効であるが、尿沈査には正常な細胞も多く含まれ、がん細胞含有割合が小さい場合は従来法による検出は困難であった。従来法と今回開発した新法で 38 のイヌの尿沈査サンプルを検査し結果を比較したところ 34 サンプルで結果が一致し、残りの 4 サンプルはすべて従来法で陰性、新法では陽性であった。不一致の検体の変異遺伝子の存在率を次世代シーケンサーで調べたところ、変異遺伝子が少数（0.1～1.4%）ながら存在し、我々が開発した新しい検出法は PCR 法と同等の手間とコストで高感度な検出が可能であることが示された。

1 はじめに

通常の PCR において一塩基置換変異に特異的なプライマーを設計する場合はプライマーの 3' 末端に一塩基置換部分を配置するが、ほとんどの場合で野生型遺伝子においても増幅が生じる。そこで野生型遺伝子に特異的に結合してプライマーとの結合を阻害する“Blocker”を添加し、野生型遺伝子の PCR 増幅が起きにくい新規高感度判定法を開発した（図 1）。Blocker は変異部分を中央付近に配置し、野生型遺伝子に対して完全に相補的な一本鎖 DNA であり、3' 末端にリン酸を修飾しており伸長反応が生じない構造となっている。変異遺伝子からのみ増幅が起きるようにするには、遺伝子に対する Blocker とプライマーの親和性を適切に調整する必要があるため、相転移温度の異なる複数の Blocker とプライマー候補を設計し、適切な組み合わせを検討した。

2 研究, 実験方法

2-1 プライマーとBlockerの選択の予備試験

プライマーと Blocker の選択は、最終濃度 0.4 μM の Blocker を用いた PCR によって検討した。反応総量 10 μL で、鋳型 DNA 40 ng, TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)（タカラバイオ製）5 μL , 各

プライマーの最終濃度 0.4 μM の反応液を用意し 95°C で 30 秒間プレヒートした後、95°C で 5 秒間の変性、30 秒間のアニーリング、および 59°C での伸長の 3 ステップを 90 サイクルの PCR を実施し、増幅結果から適切なプライマーと Blocker の組み合わせを選択した。

2-2 感度試験によるプライマーとBlockerの決定

変異遺伝子と野生型遺伝子の標準サンプルを等量混合して変異遺伝子が9000コピー/ μL の濃度で含まれる溶液を調製し、この溶液を野生型遺伝子の標準サンプルにより3倍の段階希釈し、がん細胞の存在量が異なるイヌ尿沈査のDNA抽出物を模倣した、変異遺伝子濃度が9000, 3000, 1000, 333, 111, 37コピー/ μL の希釈列を作製した。2-1で選択したプライマーとBlockerの組み合わせ3種類について、希釈列各 1 μL のサンプルをテンプレートとする感度テストを行ない、高感度かつ偽陽性が出にくい組み合わせを1種類決定した。

2-3 検体による検証

実際にイヌの尿沈査から得た DNA 抽出物 38 サンプルについて、2-2 で決定したプライマーと Blocker を用いた PCR を行い、増幅があったものを陽性、なかったものを陰性と判定し、従来法と結果を比較した。

2-4 第3世代シーケンサーによる検証

検体による検証を行った結果、従来法と判定が相違した 4 検体と、比較のため従来法と新規方法両方で陽性であった 5 検体および陰性であった 5 検体について第 3 世代シーケンサー（Flongle セル：ナノポア社

*1 生物食品研究所

*2 有限会社カホテクノ

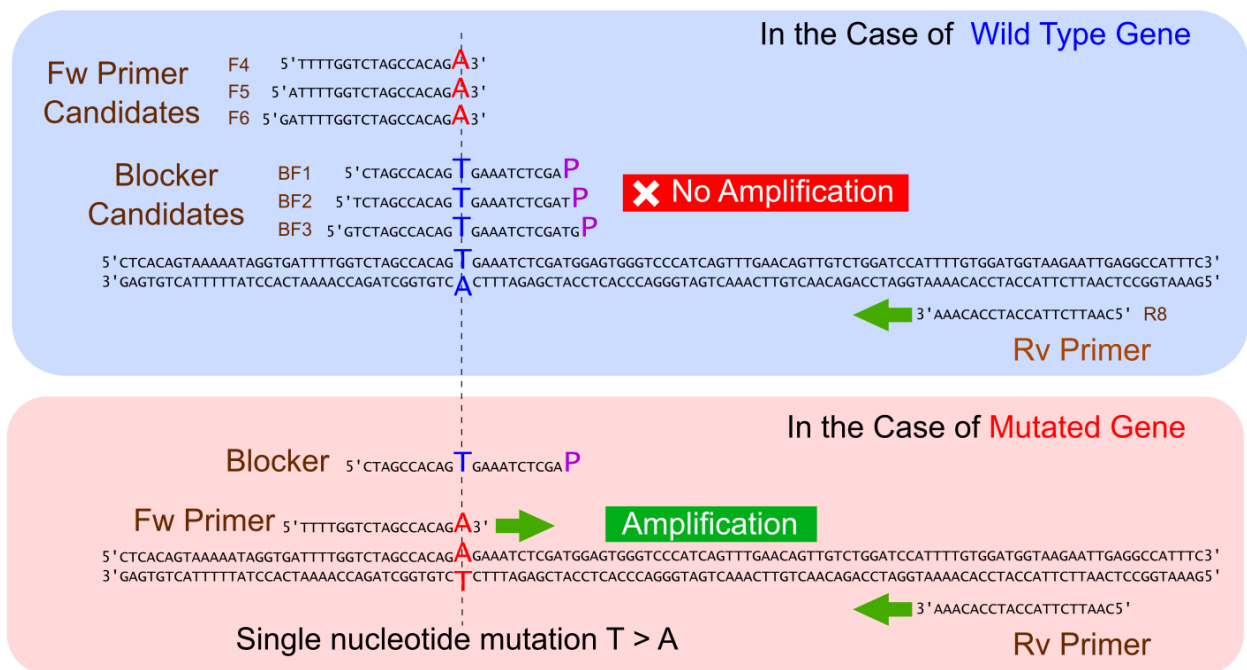


図1 新規検査方法の概要

製)を用いて、検体ごとに1000回以上ずつ当該部分の塩基配列を決定し、変異遺伝子含有率を決定した。これは尿沈渣中に含まれるサンプル中のがん細胞の割合を示唆する値となる。

3 結果と考察

3-1 適切なプライマーとBlockerの選択と従来法との比較

それぞれ相転移温度が異なるフォワードプライマー6種類、リバープライマー8種類、Blocker6種類を設計し、その組み合わせの合計288種類の中から、予備試験と感度試験を通して、変異遺伝子の検出感度が高く、偽陽性が生じにくかった1種類の組み合わせを選択した。この組み合わせを用いて、実際にイヌの尿沈渣38サンプルについて変異遺伝子の有無の判定を行い、従来法と結果を比較したところ、34サンプルについて結果が一致し、4サンプルについては一致しなかった。一致しなかった4サンプルは、すべて従来法で陰性、新法で陽性だった。

3-2 第3世代シーケンサーによる検証

従来法と判定が相違した4検体(表1 網掛あり)と、比較のため従来法と判定が一致した10検体(表1 網掛なし)について第3世代シーケンサーで変異遺伝子含有率を決定したところ、判定が陰性で一致したサンプルの変異遺伝子含有率はすべて0.0%で、陽性で一致したサンプルでは14~50%であった。また、判定が

一致しなかったサンプルでは変異遺伝子含有率0.1~1.4%と少ないながら変異遺伝子が存在していることを確認できた。

4 まとめ

本検証においては、新法は偽陽性がなく、従来法に対して100倍程度(検出できる変異遺伝子含有率の下限が、従来法14%に対して新法では0.1%)高い検出感度を有することが示された。

5 掲載論文

PLoS One: 18(9), e0286229 (2023)

Sample ID	Sanger Method	Our New Method	Match or Not	Mutation Ratio(%)
1-11	—	—	Match	0.0
1-12	—	—	Match	0.0
1-14	—	—	Match	0.0
2-2	—	—	Match	0.0
2-12	—	—	Match	0.0
1-15	+	+	Match	14.3
1-17	+	+	Match	49.6
2-3	+	+	Match	43.8
2-8	+	+	Match	18.9
2-9	+	+	Match	37.6
1-4	—	+	Not	0.1
1-6	—	+	Not	0.4
1-20	—	+	Not	1.2
2-11	—	+	Not	1.4

表1 従来法との判定比較と変異遺伝子割合