

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590668

研究課題名(和文)フローサイトメトリーによる核酸代謝酵素欠損症診断法の基礎的検討

研究課題名(英文)Basic evaluation of diagnosis of nucleic acid metabolizing enzyme deficiency by flow cytometry

研究代表者

登 勉(Nobori, Tsutomu)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60106995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸代謝酵素(以下MTAP)の欠損は種々の癌で高頻度に認められる。一方、正常細胞・組織では本酵素活性は正常であり、この違いを利用した選択的治療法の開発が期待されている。本研究では、簡便な診断方法として、フローサイトメトリー法(FCM)による酵素欠損の診断法についての基礎的検討を行った。更に、MTAPプロモーターメチル化診断のための高速液体クロマト法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) is frequently deficient in a variety of malignancies, although the enzyme is active in normal cells or tissues. This difference in enzyme activities can be exploited to design the tumor-specific chemotherapy. We tried to develop the diagnostic method of MTAP enzyme deficiency which can be easily applied to clinical samples compared to genetic diagnosis. Anti-MTAP monoclonal antibody which we generated worked well with certain cell lines, whereas it did not with other cell lines. This might be caused by the difference in the amount of MTAP protein expressed. Since MTAP deficiency is known to be caused by the gene deletion or promoter hypermethylation, we developed the rapid high-pressure liquid chromatography (HPLC) to detect methylated DNA. PCR products were amplified from the methyl sulfite-modified DNA and PCR products with single nucleotide substitutions were separated by HPLC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：MTAP 酵素欠損 プリン代謝 フローサイトメトリー 選択的化学療法 コンパニオン診断薬 プロモーターメチル化

1. 研究開始当初の背景

2003年には、国際ヒトゲノム計画が完了し、ゲノム情報に基づく医療、個別化医療、の実現への期待が高まった。科学研究や医学研究が始まった。臨床検査医学分野でも、ゲノム情報を用いた診断が日常的に実施されるようになった。癌細胞に起こったゲノム変化診断する方法や解析技術の開発と臨床応用は、癌診療にとって特に重要である。既に多くのゲノムマーカーが発見され、臨床的有用性に関する報告がなされている。

2011年、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) は、今後の創薬におけるモデルを示し、創薬初期から疾患特異的な分子標的を発見し、分子標的の診断法と同時開発・同時承認を推奨した。そして、コンパニオン診断薬である治療薬が最も有効と予想される患者の同定、重篤な副作用のリスクが高いと予想される患者の同定、投与計画や投与量の変更、そして治療の中止を決定するための治療効果のモニタリングを使用目的とすると定義した。

次世代高速シーケンサー (NGS) などを用いた検討の結果、同じ組織から発生した癌であってもそれぞれに個性があり、治療効果や予後に影響することがわかった。これらの成果をもとに、正常細胞と癌細胞の差異を標的にした治療法は、より選択性の高い癌治療となりうることは容易に想像される。

核酸代謝酵素の1つである Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) は、全ての正常細胞・組織では活性を認めるが、小児白血病、肺癌、脳腫瘍などの癌で高頻度に欠損している。これらの悪性腫瘍以外にも、膵癌、肝癌、骨肉腫、中皮腫、Mantle cell lymphoma などでも MTAP 酵素欠損が報告されている。この酵素はプリン・サルベージ経路を介したアデニン・ヌクレオチドの供給に関与しているので、酵素欠損癌細胞では、プリン新生合成阻害剤に感受性である。

一方、正常細胞は、MTAP の基質である Methylthioadenosine (MTA) を患者血中から取り込みアデニン・ヌクレオチドを産生する。従って、プリン新生合成阻害剤により癌細胞はプリン欠乏になり死滅するが、正常細胞は生き残る。MTAP 酵素欠損を標的にした化学療法は、選択性の高い化学療法になる可能性が高いと言える。

2. 研究の目的

MTAP 酵素欠損を標的とする分子標的治療法の開発・臨床応用における課題は、正常細胞が混入した臨床検体に適した MTAP 酵素欠損診断法の開発である。選択的薬療法の対象患者を選ぶ際に、正確な酵素欠損の診断は必須である。研究代表者は、診断法の確立のために遺伝子欠失診断法と特異抗体による免疫組織染色法を開発した。骨肉腫の臨床検体を用いて検討した結果は満足できるもの

であった (Int J Oncol 31:1069,2007)。

本研究では、蛋白質レベルでの MTAP 酵素欠損診断法としてフローサイトメトリーによる診断法の基礎的検討を計画した。また、MTAP 酵素欠損の原因の約 10% はプロモーターメチル化であり、その簡易診断法の開発も計画した。

本研究は、治療選択検査としてのコンパニオン診断薬と分子標的治療の組み合わせの重要性を示すモデルとなり、今後の臨床検査のモデルとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) FCM による MTAP 酵素欠損診断

FCM による白血病の病型診断は日常診療でルーチン化しており、本学附属病院検査部でも実施している。MTAP 蛋白の細胞内局在は細胞質および核で、細胞膜上には発現していない。従って、細胞の前処理 (permeabilization) に工夫が必要であるが、白血病細胞における MTAP 蛋白欠損を FCM によって診断する方法の開発を行なった。

プロトコール (細胞質内染色)

1. サンプルをチューブに分注
2. IntraPrep Reagent 1 を 100 μ L 添加し、ミキサーで攪拌
3. 室温で 15 分間インキュベーション
4. PBS で洗浄 (PBS4mL 添加、[500G] 10 分間 室温で遠心後、上清を除去)
5. ミキサーで軽く攪拌
6. IntraPrep Reagent 2 を 100 μ L 添加し、ピペッティング
7. 室温で 5 分間インキュベーション
8. Goat Serum を 20 μ L 添加し、タッピングで混和
9. 室温で 5 分間インキュベーション
10. 一次抗体 5 μ L 添加し、タッピングで混和
11. 室温で 20 分間インキュベーション
12. PBS で洗浄 (PBS4mL 添加、[500G] 10 分間 室温で遠心後、上清を除去)
13. タッピングで混和
14. 二次抗体 20 μ L を添加し、タッピングで混和
15. 室温・暗所で 15 分間インキュベーション
16. PBS で洗浄 (PBS4mL 添加、[500G] 10 分間 室温で遠心後、上清を除去)
17. タッピングで混和
18. (16)(17)の操作を繰り返す
19. PBS を 500 μ L 添加、タッピングで混和
20. 再浮遊した細胞を測定する

プロトコール (細胞核内染色)

1. サンプルをチューブに分注
2. * Human FoxP3 Buffer A を 2mL 添加し、ミキサーで攪拌
3. 室温で 10 分間インキュベーション

- 4.遠心(500G 5分間 室温で遠心後、上清を除去)
- 5.ミキサーで軽く攪拌
- 6.PBSで洗浄(PBS2mL添加、[500G] 5分間 室温で遠心後、上清を除去)
- 7.タッピングで混和
- 8.*Human FoxP3 Buffer Cを250 μ L添加し、ピペティング
- 9.室温で30分間インキュベーション
- 10.PBSで洗浄(PBS2mL添加、[500G] 5分間 室温で遠心後、上清を除去)
- 11.タッピングで混和
- 12.Goat Serum を20 μ L添加し、タッピングで混和
- 13.室温で5分間インキュベーション
- 14.一次抗体5 μ L添加し、タッピングで混和
- 15.室温で30分間インキュベーション
- 16.PBSで洗浄(PBS2mL添加、[500G] 5分間 室温で遠心後、上清を除去)
- 17.タッピングで混和
- 18.二次抗体20 μ Lを添加し、タッピングで混和
- 19.室温・暗所で30分間インキュベーション
- 20.PBSで洗浄(PBS2mL添加、[500G] 5分間 室温で遠心後、上清を除去)
- 21.タッピングで混和
- 22.(20)(21)の操作を繰り返す
- 23.PBSを500 μ L添加し、タッピングで混和
- 24.再浮遊した細胞を測定する

(2) MTAP酵素欠損とDNAメチル化

MTAP酵素欠損のうち約10%は、MTAPプロモーターの高メチル化が原因となっている。酵素欠損の診断アルゴリズムにおいて、MTAPプロモーターのメチル化診断法の開発も重要であり、臨床的価値は高い。我々は、MTAPプロモーターをはじめとする様々な遺伝子プロモーターのメチル化状態を観察するための簡便なスクリーニング法として高速液体クロマト法を開発した。略述すると、Bisulfite処理したDNAを鋳型としてPCR増幅を行い、処理していないDNAからのPCR産物とともに、陰イオン交換樹脂を充填したカラムを用いた高速液体クロマト法で分離した。

4. 研究成果

(1) FCMによるMTAP酵素欠損診断法の開発

固形腫瘍での酵素タンパクの欠損診断については免疫組織染色法(IHC)による方法が確立している。白血病などの浮遊癌細胞については、従来からFCM解析が病型診断に多用されている。MTAP酵素欠損が高頻度に認められる急性Tリンパ性白血病(TALL)に用いるために、FCM解析によるMTAPタンパク検出を検討した。MTAPタンパクは細胞内に局在するため、細胞膜透過剤を用いて一次ならびに二次抗体を細胞内に移入し、FCM解析を行った。膜透過剤の条件や抗体使用量の設定を行い、培養白血病細胞株のMTAPタンパクの解析が

可能となった。しかしながら、使用する細胞によっては、細胞内MTAPタンパクの検出ができなかった。このことから、MTAPタンパクの発現量は細胞株によって異なること、そのためにFCMによるMTAP酵素欠損の診断は困難であると結論した。

(2) MTAP酵素欠損とDNAメチル化

高速液体クロマト法によるメチル化および非メチル化DNAの検出の可能性に関して、1カ所にC/Tの置換をもつ20塩基の合成オリゴを用いて検証した。オリゴ4-1(図1の青)はCCAGCATCGATCATATTGCGで、オリゴ4-2(図1の赤)はCCAGCATCGATCATATTGIGの配列を有する。

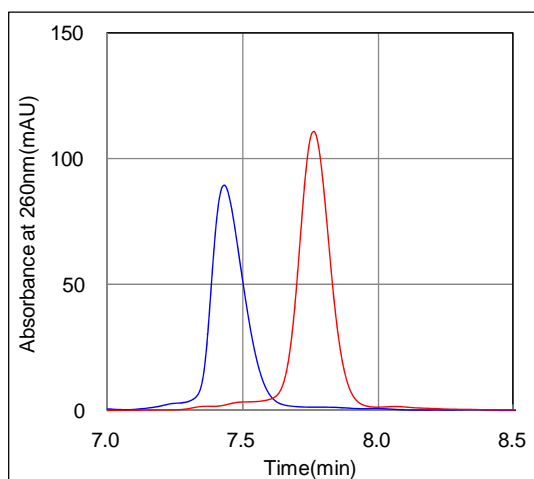


図1. HPLC法による合成オリゴの分離

メチル化DNAでは、CpGジヌクレオチドのシトシンがメチル化されている。Bisulfite処理によりメチル化シトシンは変化せず、非メチル化シトシンはウラシルに変化する。PCR反応による増幅後には、メチル化シトシンはCとして認識され、非メチル化シトシンはチミンに変化する。図1の結果は、シトシンとチミンが1カ所で置換された場合であっても明瞭に分離できることを示している。他の実験では、4カ所にC/T置換を有する合成オリゴの分離も可能であった。

MTAPプロモーターのメチル化については、我々や他の研究グループが報告している。Forward primerとreverse primerを用いて、MTAPプロモーター部位から202塩基長のPCR産物を増幅した。鋳型にはMTAPプロモーターがメチル化されている細胞株DHL-9とメチル化されていない293T細胞からのDNAをBisulfite処理して用いた。メチル化DNA(DHL-9)と非メチル化DNA(293T)は7.5分から8.5分で溶出され、明らかな2つのピークとして検出された。PCR増幅部位には16個のCpGが存在しているが、PCR増幅産物の10%弱の置換が生じる程度のメチル化であれば、HPLC法により、短時間で精度よく検出することができた(特許出願中のため、詳細

な方法と結果については示していない)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

登勉、望木郁代、中谷中、個別化医療におけるバイオカーカーとコンパニオン診断薬、レギュラトリーサイエンス学会誌査読有、3巻、2013、181-189、

松尾百華、阿部泰典、杉本和史、西岡淳二、川嶋洋介、曾家義博、中谷中、登勉、GENECUBE を用いた Q プローブ法による IL28B 遺伝子 SNP 解析法の開発、日本臨床検査自動化学会誌、査読有、38巻、2013、141-145

Sugawawa Y, Nakase K, Nakamura A, Ohishi K, Sugimoto Y, Fujieda A, Monma F, Suzuki K, Masuya M, Matsushima Y, Wada H, Nobori T, Katayama N, Clinical Utility of a panfungal polymerase chain reaction assay for invasive fungal diseases in patients with hematologic disorders, European Journal of Hematology, 査読有, vol. 90, 2013, 331-339

〔学会発表〕(計 3 件)

登勉、臨床検査の将来を展望する、生物試料分析科学会、2014年3月1日、鈴鹿医療科学大学(三重県鈴鹿市)

登勉、ポストゲノム時代の医療とバイオマーカー検査、日本臨床化学会、2013年8月30日、あわぎんホール(徳島県徳島市)

登勉、あれもこれも全部遺伝? ~ 遺伝子を極めてみませんか~、日本遺伝子診療学会、2013年7月20日、アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:メチル化 DNA の検出方法

発明者:與谷卓也、登勉

権利者:積水メディカル株式会社
国立大学法人三重大学

種類:特許

番号:P03592507

出願年月日:平成 25 年 7 月 18 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

登勉 (NOBORI, Tsutomu)

三重大学・大学院医学系研究科・特任教授

研究者番号:60106995