

RNA1 分子検出による癌の遺伝子点突然変異診断

研究代表者

川井 清彦 大阪大学産業科学研究所 准教授

共同研究者

川井 久美 名古屋大学大学院医系研究科 准教授

丸山 厚 東京工業大学生命理工学院 教授

小阪田 泰子 大阪大学高等共創研究院 准教授



1. 研究の背景と達成目標

分子標的薬の治療適応決定には、がん細胞、がん組織で確かにその遺伝子変異が検出されることを確定するコンパニオン診断が必須となっている。術中に遺伝子変異の検出ができ分子標的薬の治療適応決定が可能となれば、術中に切除部位に高濃度で薬剤を直接投与することができるなどの治療選択肢が生まれる。本研究では、遺伝子中の点変異を細胞中の RNA 1 分子から読み分け、がんを 1 分子レベルで迅速に診断できる技術開発を目指す。病理診断において、発がんの指標となる点変異を有する標的 RNA に特異的に結合し、蛍光の点滅現象(=blinking)のパターンにより変異の有無を読み分け可能な蛍光分子修飾プローブ DNA を開発する。培養細胞上で、蛍光 1 分子観察により細胞内で blinking を観測する条件を確立し、最終的に、1 分子蛍光観測により、患者より得られた細胞、および、病理切片上における点変異診断を目指す。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・グリオーマ、および、大腸がんにおいて高い割合で見られる、IDH1 遺伝子の R132H 変異、CTTNB1 遺伝子の S41A 変異を、蛍光 1 分子測定により診断可能なプローブを開発した。
- ・R132H 変異を有する IDH1 を強制発現させたヒトアストロサイト細胞 (NHA) において、対象変異 RNA の検出・診断を意味する blinking パターンの測定に成功した。

3. 研究成果

標的 RNA に相補的な配列を有する DNA に蛍光分子を導入した蛍光分子修飾プローブ DNA を設計・合成した。光照射に伴い光電荷分離状態を生じ、その間光らなくなることを利用して蛍光の blinking が観測されるよう制御した。光電荷分離に由来する blinking では、DNA 内を電子が移動する速さに応じて blinking パターンが変化するため、観測に最適な時間領域 (消えて観測される時間が $100 \mu\text{s} \sim 20 \text{ms}$) で blinking し、かつ、点変異により blinking パターンが変化する必要があるため、天然の塩基に加え種々の化学修飾を施した非天然塩基 (デアザグアニン、デアザアデニン、ジアミノプリン、イノシン等) を導入したプローブ DNA のライブラリーを構築し、測定に用いた。モデル系として、まず化学合成した RNA (50 塩基程度) を対象として実験を行った。IDH1 遺伝子の正常および R132H 変異を有する RNA にプローブ DNA を結合し、1 分子蛍光観測により一つ一つのプローブ DNA/RNA 複合体から発せられる蛍光の点滅パターンを測定した。その結果、blinking パターンに有意な差が観測され、原理的に RNA1 分子を読み分け可能であることが確認された。同様に、CTTNB1 遺伝子の S41A 変異を読み分け可能なプローブの開発に成功した。次に、細胞上での RNA 診断を行った。R132H 変異を有する IDH1 を強制発現させたヒトアストロサイト細胞を共同研究者川井久美准教授が名古屋大学にて培養し、大阪大学において研究代表者が細胞を固定化し、プローブ DNA を添加し細胞上での 1 分子蛍光観測を行った。細胞上において、R132H 変異特有の蛍光 blinking パターンが観測され、RNA1 分子検出による癌の点突然変異診断が可能であることが示された。死細胞中ではあるが、本研究により初めて細胞内での光電荷分離寿命の 1 分子測定に成功し、学術的にも非常にユニークなアプローチに

よる、RNA の 1 分子検出・診断が達成された。

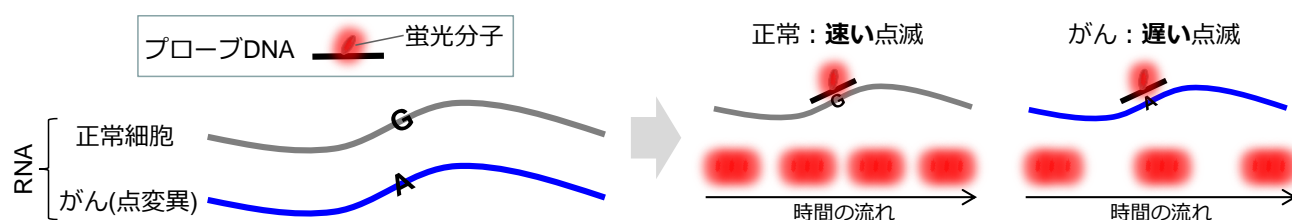


図. プローブが標的 RNA に結合するか、しないかで点変異、すなわち、たった 1 塩基の違いを読み分けることは難しい。本研究では、DNA 内の電子の流れる速さが 1 塩基の違いにより大きな影響を受けることを利用する。標的 RNA に結合すると、時どき光電荷分離により光らなくなり、結果として blinking が観測されるように、蛍光プローブ修飾 DNA を設計・合成。DNA 内の電子の移動の速さに応じて blinking が変化するため、blinking 観測により、点変異を検出し診断する。

4. 今後の展開

コロナウイルスの PCR 検査に代表されるように、ごく微量検出のために通常は情報増幅が必要となり、コストと時間を要した。本研究で注目する増幅過程を経ず 1 分子そのままを診断する手法の発展により、検出・診断における大幅な時間短縮につながると期待される。蛍光分子による標識は、遺伝子診断にとどまらず、生体イメージング、分子生物学の基礎研究など、幅広い分野で利用されている。複数のターゲット分子を同時に読み分ける場合、これまでは、色の違い、すなわち発光波長の違いを利用してきた。本課題で達成を目指す blinking を利用した識別では、これに時間軸の概念を追加することができる。すなわち、同じ波長でもどのように blinking するか（輝くか）により、ターゲット分子を区別することができるようになる。従来の組織学的診断は色調や形態、蛍光強度の差異を元にした鑑別に依存してきたが、本手法では光の点滅の間隔や頻度といった新たな物理化学パラメータが加わることになり、より多くのターゲット分子を同時に読み分けられる分析・診断技術へと発展することが期待される。blinking が 2014 年にノーベル化学賞を贈られた超解像顕微鏡の検出原理としても注目されていることからわかるように、数十 nm 程度の高い空間分解能で 2 つの標識を識別でき、より微細領域の分析・診断が可能になると期待される。

5. 発表実績

論文：

1. Kinetics of Photoinduced Reactions at the Single - Molecule Level: The KACB Method, Kiyohiko Kawai, Atsushi Maruyama, *Chemistry-A, European Journal* in press doi:10.1002/chem.202000439.
2. Blinking 制御による核酸 1 分子分析 ～1 分子の反応速度を測る～, 川井清彦, *FBC NewsLetter*, **58**, 5-10, (2019).

学会発表（招待講演）：

1. Single-Molecule Level Monitoring of Nucleic Acids Conformational Changes by Controlling the Fluorescence Blinking, Kawai Kiyohiko, π -System Figuration European-Japanese Workshop 2019, 2019 年 11 月 14 日 Zabre (Poland).
2. 核酸 1 分子を見つける、調べる, 川井清彦, 第 22 回生命化学研究会, 2019 年 6 月 22 日, 北見.